

МОНИТОРИНГ ОППОРТУНИСТИЧЕСКОЙ МИКРОФЛОРЫ ПРИ ВТОРИЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЁГКИХ И ДИНАМИКА УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS GR. VIRIDANS*

Л.В. Ивушкина

ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом
Департамента здравоохранения города Москвы»

MONITORING OF OPPORTUNISTIC MICROFLORA IN SECONDARY INFECTIONS OF THE RESPIRATORY SYSTEM IN PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS AND THE DYNAMICS OF *STREPTOCOCCUS GR. VIRIDANS* STRAINS RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS

L.V. Ivushkina

Представлены результаты трехлетнего (2010-2012 гг.) локального микробиологического мониторинга при вторичных инфекциях у больных туберкулёзом органов дыхания, вызванных оппортунистической микрофлорой в г. Москве. Определены лидирующие микроорганизмы, представителями которых являются грамположительные кокки *Streptococcus gr. viridians*. Проведен сравнительный анализ *in vitro* динамики устойчивости *S. gr. viridans* к антибиотикам широкого спектра действия, обладающим противотуберкулёзной активностью (рифампицину, левофлоксацину, моксифлоксацину), который продемонстрировал отличие по профилю резистентности штаммов, выделенных от пациентов, находящихся на обследовании в филиалах и структурных подразделениях МНПЦБТ.

Ключевые слова: туберкулёз легких, оппортунистическая инфекция, условно-патогенные микроорганизмы, антибиотикорезистентность, микробиологический мониторинг.

The results of local microbiological monitoring at the secondary infections, caused by opportunistic micro flora in patients with pulmonary tuberculosis, carried out 2010-2012 in Moscow are presented. Gram-positive cocci *Streptococcus gr. viridian* have been identified as leading microorganisms. Comparative analysis of the microorganisms resistance dynamics *in vitro* to broad-spectrum antibiotics with anti-TB activity – rifampicin, levofloxacin, moxifloxacin, was performed. It demonstrated the difference in the profile of resistance of *S. gr. viridian* strains, isolated from the patients, examined in the branches and subdivisions of the Moscow Research and Clinical Center for Tuberculosis Control of the Moscow Government Health Department.

Keywords: pulmonary tuberculosis, opportunistic infection, opportunistic pathogens, antibiotics resistance, microbiological monitoring

Введение

Течение туберкулёза легких (ТБЛ) нередко осложняется присоединением неспецифического воспаления, вызванного оппортунистической микрофлорой, что изменяет и усложняет клинические проявления туберкулёза. При сочетанном процессе ухудшаются результаты лечения ТБЛ – снижается частота закрытия полостей распада и прекращения бактериовыделения, удлиняются сроки выздоровления, отмечается многосимптомность, преобладание альтернативных и экссудативных изменений [4, 6, 9]. В то же время, больные с хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) составляют контингент лиц с повышенным риском заболевания туберкулёзом.

К факторам риска развития вторичных инфекций у больных фтизиатрической клиники относятся: длительное применение антибактериальных препаратов широкого спектра действия, повышенная колонизация верхних и нижних отделов дыхательных путей условно-патогенными микроорганизмами (УПМ), инвазивные процедуры [2, 3, 4].

Вторичные инфекции, возникающие в виде обострения неспецифических бронхитов, пневмонии и осложняющие течение фиброзно-кавернозного туберкулёза, инфильтративного туберкулёза, туберкулем и т. д., разнообразны и не представлены определенным возбудителем [5, 7, 9].

Ведущую роль в определении этиологии неспецифических инфекций нижних дыхательных путей играют микробиологические

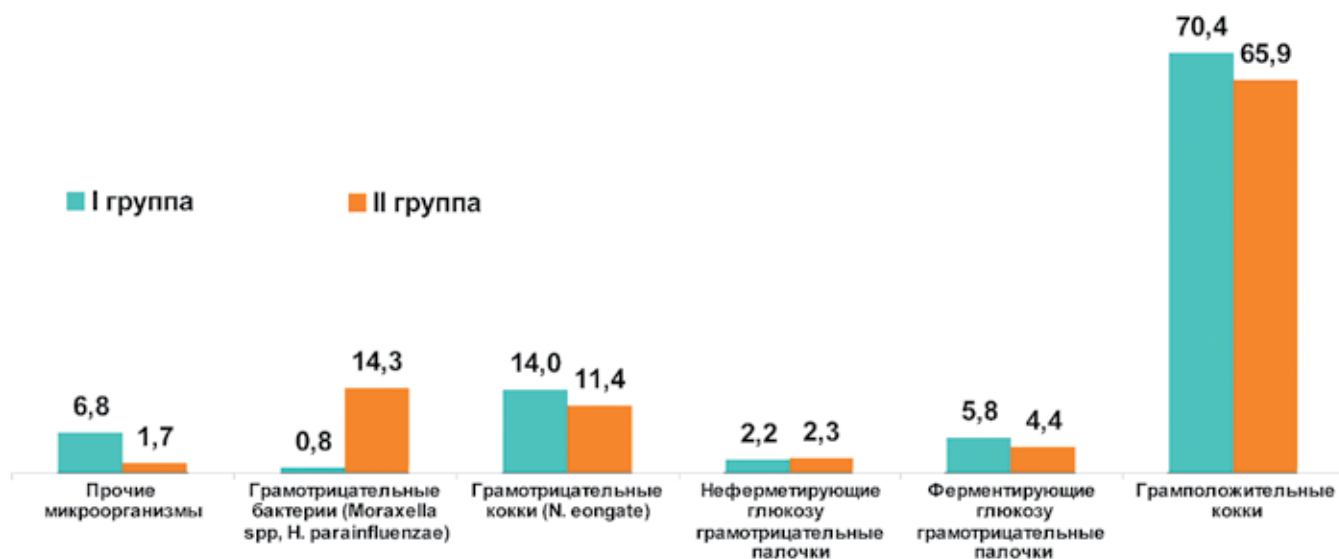


Рис.1. Частота выделения (в %) условно-патогенной микрофлоры у пациентов МНПЦБТ (2010-2012 гг.)

методы исследования, позволяющие не только определить видовую принадлежность возбудителя, но и получить его качественную и количественную характеристику, определить чувствительность к антибиотикам. Поэтому своевременная диагностика вторичной инфекции нижних дыхательных путей у больных ТБЛ и направленное лечение вызванных ею осложнений – одна из актуальных проблем современной фтизиатрии [8, 11, 13].

Цель работы – изучение спектра нетуберкулёзной микрофлоры, выделенной из органов дыхания, и оценка чувствительности доминирующих грамположительных бактерий *S. gr. viridans* к антибактериальным препаратам у больных туберкулёзом легких.

Материалы и методы исследования

Динамика лекарственной устойчивости *S. gr. viridans* проанализирована *in vitro* у больных ТБЛ, находившихся на стационарном и амбулаторном лечении в Московском городском научно-практическом центре борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы (МНПЦБТ) в течение трех лет (2010-2012 гг.).

Выделено две группы наблюдения. Первую составили 3858 амбулаторных пациентов, наблюдаемых в филиалах и подразделениях МНПЦБТ, от которых были получены образцы диагностического материала из нижних дыхательных путей (мокрота и бронхиальный секрет). Из этих образцов выделено и идентифицировано 4436 штаммов микроорганизмов (доля положительных посевов – 88,3%). Вторую группу составили больные, находившиеся на стационарном лечении в клинике №1 МНПЦБТ. От них получено 3388 образцов мокроты и бронхиального секрета, из которых выделено и идентифицировано 5497 штаммов микроорганизмов (высеваемость этиологически значимых микроорганизмов в диагностических титрах – 92,1%).

Поводом для исследования на неспецифическую микрофлору (вторичную бактериальную инфекцию нижних отделов дыхательного тракта) служили:

- клинические данные (ухудшение состояния больного на фоне специфической антибактериальной терапии, появление признаков вторичной инфекции: слизисто-гнойная, гнойная, слизисто-гнойная с прожилками крови мокрота, воспалительные изменения периферической крови, высокая лихорадка, обильная аускультативная картина);
- рентгенологически подтвержденное наличие жидкого содержимого в полостях;
- выявление неспецифических катаральных эндобронхитов 1 и 2 степени интенсивности воспаления при бронхоскопическом исследовании;
- подготовка больного к операции на легких и послеоперационные осложнения (пневмония, эмпиема остаточной полости, свищ и др.)

Материал для исследования собирали в стерильную посуду и доставляли в микробиологическую лабораторию не позднее двух часов с момента сбора мокроты. Для оценки качества доставленных образцов микроскопировали окрашенные по Граму мазки мокроты при малом (×10) увеличении, оценивая при этом правильность её сбора по методу Murray/Washington (1975). Образцы, не отвечавшие требованиям, браковались и в исследование не включались [8].

Посев исследуемого материала проводили на питательные среды с колумбийским агаром (Columbia agar Bio-Rad, США) – основа для требовательных микроорганизмов с добавлением 5% крови крупного рогатого скота. Все дальнейшие исследования по выделению и идентификации выросших на питательных средах микроорганизмов проводили по общепринятым отечественным и зарубежным методикам [Приказ Минздрава СССР № 535, 1985 г.; Manual of Clinical Microbiology, 1999].

Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с учетом морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств. Для идентификации использовали микробиологический анализатор BD BBL™ Crystal™ AutoReader (Becton Dickinson, США). Штаммы УПМ, полученных при свободном откашливании, расценивали как этиологически значимые при концентрации $>10^6$ КОЕ/мл, и полученные с помощью инвазивных методов — в концентрации $<10^3$ КОЕ/мл [8].

Чувствительность этиологически значимых микроорганизмов к антибактериальным препаратам определяли стандартизированным диско-диффузионным методом (ДДМ), согласно общепринятым методикам [МУК 4.2.1890-04 от 04. 03. 2004, Минздрава России; NCCLS (США), 2002, 2003, 2004] «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», а также руководствуясь стандартами Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS), с 2005 г. – Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI). При определении чувствительности использовали стандартизированные качественные диски фирм Bio-Rad Laboratories (США) [1, 10].

Для интерпретации полученных результатов антибиотикограмм, использовали анализатор «OSIRIS», фирмы Bio-Rad Laboratories (США).

Ввод, статистическую обработку и анализ данных проводили с помощью компьютерной системы микробиологического мониторинга «МИКРОБ-2» (СМММ).

Внутренний контроль качества определения чувствительности к антибиотикам осуществляли с использованием референтных штаммов Американской коллекции типовых культур (ATCC) – *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, рекомендуемых МУК 4.2.1890-04 Минздрава России.

Результаты работы и их обсуждение

По результатам микробиологического мониторинга за 2010-2012 годы была сопоставлена этиологическая структура микроорганизмов отделяемого нижних дыхательных путей при вторичных инфекционных процессах у пациентов с ТБЛ I и II групп (табл. 1, рис. 1).

Спектр микроорганизмов, выделенных из нижних дыхательных путей пациентов I группы, представлен следующими видами микроорганизмов:

Табл. 1 Структура родового и видового состава ведущей микрофлоры нижних дыхательных путей

Виды микроорганизмов	МНПЦБТ филиалы		МНПЦБТ клиника №1	
	число культур	%	число культур	%
Грамположительные кокки	3122	70,4	3610	65,9
в том числе:				
<i>Streptococcus gr.viridans</i>	2591	58,4	3463	63,1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	205	4,6	199	3,6
<i>Staphylococcus spp. (S.epidermidis, S.cohnii S.haemoliticus)</i>	74	1,6	133	2,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	121	2,7	101	1,8
Ферментирующие грамотрицательные палочки семейства Enterobacteriaceae:	293	5,8	244	4,4
<i>E.coli</i>	82	1,8	76	1,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	2,2	89	1,6
<i>Enterobacter spp.</i>	89	2,0	75	1,4
<i>P. mirabilis, S.marcescens, S.liguefaciens, C.freundii</i>	23	0,5	-	-
Неферментирующие грамотрицательные бактерии:				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69	1,5	112	2,0
Семейство Neisseriaceae:	651	14,06	643	13,4
<i>N. elongate</i>	622	14,0	628	11,4
<i>Acinetobacter spp. (A.baumannii, A.iwoffii)</i>	29	0,6	15	0,3
Грамотрицательные палочки	39	0,8	783	14,2
в том числе:				
<i>Moraxella .spp</i>	30	0,6	683	12,4
Семейство Pasteurellaceae <i>H. parainfluenzae</i>	9	0,2	100	1,8
Прочие	232	6,8	94	1,7
ВСЕГО:	4436	100,0	5486	100,0

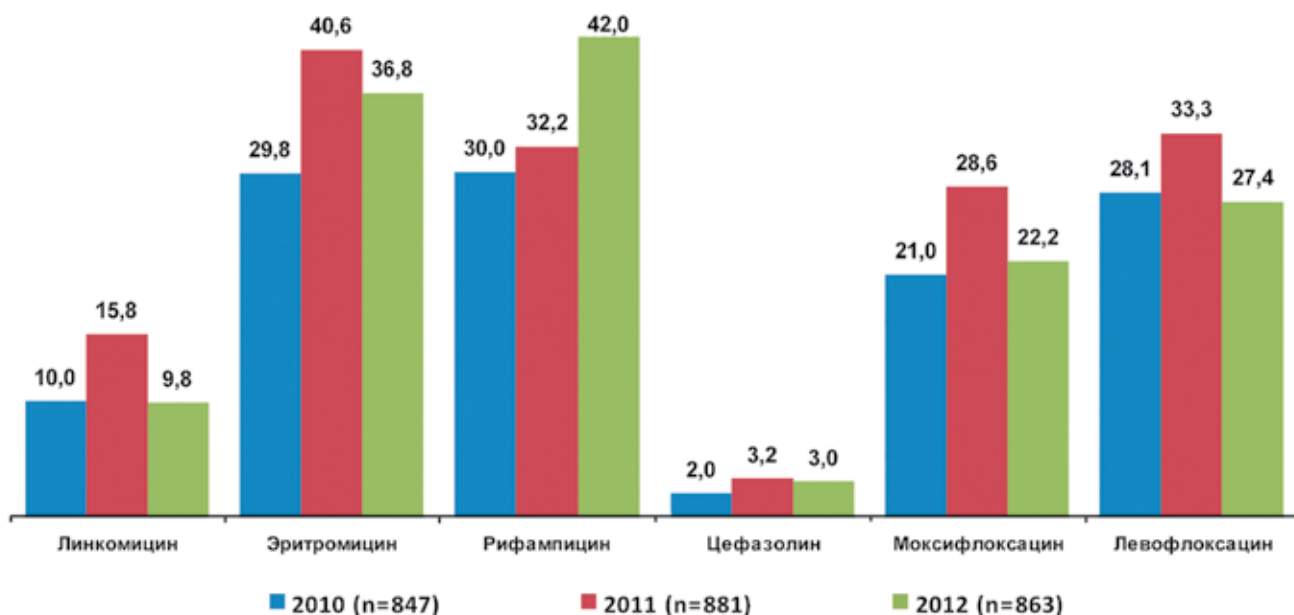


Рис. 2. Динамика резистентности (в %) *Streptococcus gr. viridians* (n=2591) к антибиотикам *in vitro*, I группа пациентов.

1) традиционно преобладали штаммы грамположительных кокков (70,4%), среди которых доминировали *S. gr. viridans* – 58,4%, реже высевали *S. pneumoniae* – 4,6%, *S. aureus* – 2,7%, *Staphylococcus spp.* – 1,6%;

2) грамотрицательные ферментирующие глюкозу палочки семейства *Enterobacteriaceae* (5,8%): *K. pneumoniae* (2,2%), *Enterobacter spp.* (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. sacazaki*) (2,0%), *E. coli* (1,8%), *P. mirabilis* (0,5%); на долю штаммов *P. mirabilis*, *Serratia spp.* (*S. marcescens*, *S. liquefaciens*), *C. freundii* пришлось 0,5% (у больных из стационара МНПЦБТ – II группа – данные виды за три года не высевали);

3) неферментирующие глюкозу грамотрицательные палочки (2,1%), из них большинство составили штаммы *P. aeruginosa* (1,5%), в остальных 0,6% случаев выделили *Acinetobacter spp.* (*A. baumannii*, *A. iwoffii*); достаточно часто высеваемые грамотрицательные кокки *N. elongate* (14,0%) не имели существенного клинического значения, представителей этого рода чаще всего выделяли в ассоциациях с *S. gr. viridians*, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus spp.* (87,5% случаев);

4) прочие микроорганизмы (*Peptococcus spp.*, *Stomatococcus spp.*, *Gemmella spp.*, *Candida spp.*, *Streptococcus spp.*) – 6,8% от всех выделенных штаммов.

Микробный пейзаж нижних дыхательных путей больных, находящихся на стационарном лечении в МНПЦБТ (II группа) отличался по количественному составу от микробного пейзажа пациентов I группы незначительно. Однако выявлены некоторые различия в структуре видового состава ведущей микрофлоры нижних дыхательных путей:

1) грамположительные кокки сохраняли лидирующее положение (65,9%): преобладали также *S. gr. viridans* (63,1%), *S.*

pneumoniae, *S. aureus*, *Staphylococcus spp.* выделили в 3,6%, 1,8% и 2,4% случаев соответственно;

2) доля грамотрицательных ферментирующих глюкозу палочек семейства *Enterobacteriaceae* составила 4,4%, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* выселили соответственно в 1,6%, 1,4% и 1,3% случаев.

3) неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии *P. aeruginosa* были выделены в 2,0% случаев, *A. baumannii* – в 0,3%; в составе ассоциаций также присутствовали бактерии рода *Neisseria* (11,4%) и появились грамотрицательные палочки рода *Moraxella*, *Haemophilus* (14,2% случаев, причем преобладали штаммы *Moraxella spp.* – 12,4%), наибольший рост этих изолятов отмечен в 2011 году;

4) прочие аэробные и факультативные грамположительные кокки составили 1,7% от всех выделенных штаммов.

При анализе динамики профиля лекарственной устойчивости (ЛУ) доминирующих грамположительных микроорганизмов *S. gr. viridans*, выделенных из нижних дыхательных путей при вторичных инфекциях у пациентов I группа выявлено, что количество штаммов, устойчивых к антибактериальным препаратам, в течение 2010-2012 гг. менялось скачкообразно (рис. 2).

Отмечено незначительно нарастание ЛУ к левофлоксацину: с 28,1% в 2010 г. до 33,3% в 2011 г., но в 2012 г. ЛУ к левофлоксацину выявлена только у 27,4% штаммов. Также отмечено достоверное нарастание числа штаммов с ЛУ к моксифлоксацину: с 21,0% до 28,6% случаев в 2010-2011 гг. ($p < 0,05$), но в 2012 г. среди выделенных штаммов ЛУ к моксифлоксацину имели только 22,2%, что равно показателю 2010 г.

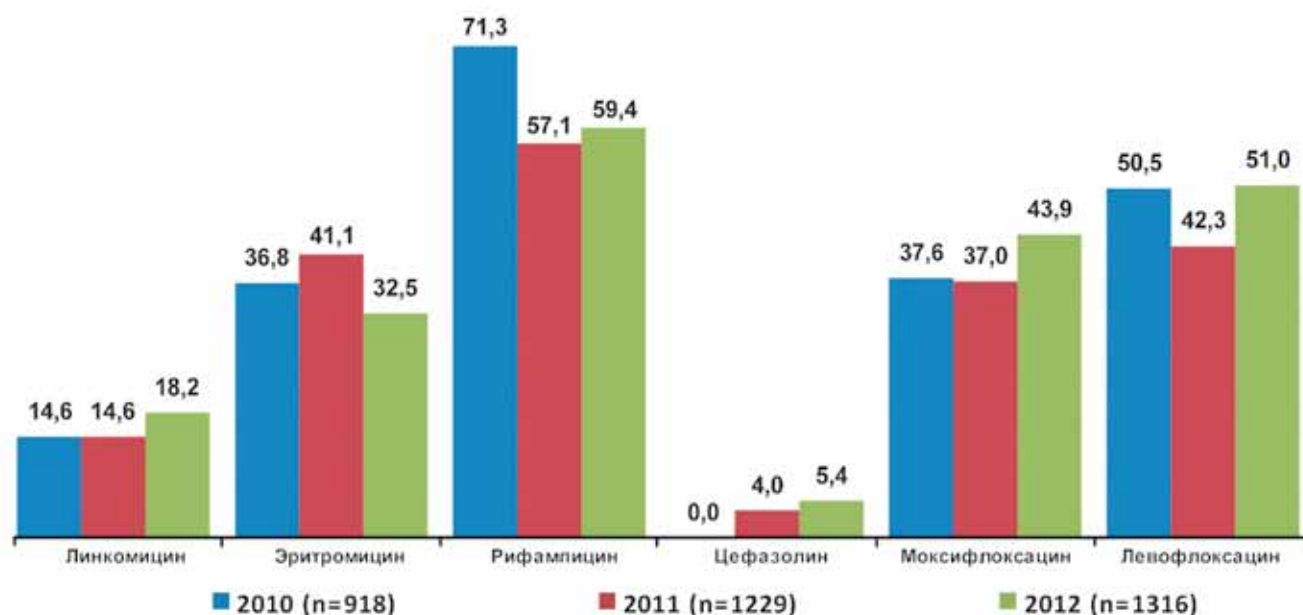


Рис. 3. Динамика резистентности (в %) *Streptococcus gr. viridians* (n=3463) к антибиотикам *in vitro*, II группа пациентов

Аналогично, после достоверного нарастания ЛУ к эритромицину в 2010-2011 гг. (с 29,8% до 40,6% штаммов, $p < 0,05$), в 2012 г. доля устойчивых штаммов снизилось 36,8% случаев. Доля штаммов с ЛУ к линкомицину составила в 2010 г. 10,0%, в 2011 г. – 15,8% и в 2012 г. – 9,8%. Достоверных изменений частоты ЛУ к цефазолину в 2010-2012 гг. не выявлено (2,0%, 3,2%, 3,0%; $p > 0,05$). В то же время, отмечено достоверное нарастание ЛУ к рифампицину: 2010 г. – 30,3%, 2011 г. – 32,2%, 2013 г. – 42,0% ($p < 0,05$).

При анализе динамики устойчивости штаммов *Streptococcus gr. viridians* у больных ТБЛ II группы выявлена высокая вариабельность уровня ЛУ клинических штаммов (рис. 3).

Достоверного увеличения числа штаммов с ЛУ к левофлоксацину в 2010-2012 гг. не выявлено (по 50,0%), тогда как в 2011г. таких штаммов было 42,3%. К моксифлоксацину же за 2010-2012 гг. прослежено достоверное нарастание устойчивости – с 37,0% до 43,9% случаев ($p < 0,05$).

Доля штаммов с ЛУ к эритромицину в 2010 г. составила 36,8% и в 2012 г. – 32,5%, но в 2011 г. наблюдалось увеличение доли ЛУ штаммов до 41,1%. К рифампицину в 2010 г. были устойчивы 71,3% штаммов, в 2011-2012 гг. их доля была меньше – 57,1% и 59,4% соответственно. Отмечено незначительное нарастание штаммов с ЛУ к линкомицину: 14,0% в 2010-2011 гг. и 18,2% в 2012 г. Достоверного увеличения числа штаммов с ЛУ к цефазолину не выявлено.

Следует подчеркнуть, что микробиологические исследования при оппортунистических инфекциях у больных ТБЛ представляют большие сложности, т.к. в диагностическом материале, как правило, присутствуют ассоциации микробов, в которые входят как возбудители заболевания, так и

«заносные» из других органов, внешней среды виды, а также микробы, которые могут попасть в материал в процессе его забора и доставки. Часто возникают некоторые трудности бактериологического подтверждения диагноза, связанные с немедленным началом химиотерапии основного заболевания – ТБЛ. Поскольку забор материала проводят на фоне поликомпонентного антибактериального лечения, возбудитель определить достаточно сложно, количественный и видовой состав микрофлоры варьирует у разных больных и меняется в процессе лечения.

Поэтому необходимо проведение регулярного мониторинга ЛУ, который позволит оценивать этиологическую структуру микробного пейзажа, профили ЛУ микроорганизмов, учитывать современные направления в антибиотикотерапии, и подборе антибиотиков для конкретного больного по результатам антибиотикограммы или до получения таковой.

Выводы

1. Объем клинического исследования и включение в него как амбулаторных пациентов филиалов МНПЦБТ из различных групп, так и больных ТБЛ, находившихся в клинике №1 МНПЦБТ можно считать, что результаты исследования микробного пейзажа отделяемого органов дыхания (мокрота, содержимое бронхов) позволили получить достоверное представление о видовом составе предполагаемых возбудителей вторичных инфекций при ТБЛ и их ЛУ в целом в г. Москве.

2. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у больных ТБЛ представлен микроорганизмами 8 родов; предполагаемыми этиологическими агентами в развитии вторичных инфекций лёгких являются *Streptococcus gr. viridans*, *Streptococcus*

pneumoniae, Staphylococcus spp., Staphylococcus aureus, Moraxella spp., Neisseria elongata, P. aeruginosa, Klebsiella spp., Escherichia coli, Enterobacter spp.

3. Анализ динамики ЛУ лидирующих штаммов *Streptococcus gr. viridans*, выделенных от пациентов с ТБЛ, находящихся на лечении в клинике №1 МНПЦБТ, отличается по профилю резистентности от штаммов микроорганизмов, выделенных от пациентов, находящихся на обследовании в филиалах МНПЦБТ высоким уровнем устойчивости к рифампицину, левофлокса-

цину, моксифлоксацину. Это свидетельствует о высокой степени селекции устойчивых штаммов УПМ на фоне длительного применения противотуберкулёзных препаратов.

4. При выборе антибактериального средства для лечения вторичных инфекций органов дыхания у больных ТБЛ следует учитывать, что изоляты оппортунистических инфекций являются представителями высокорезистентной нозокомиальной микрофлоры, среди которых преобладают низковирулентные аэробные и факультативно грамположительные кокки.

Литература

1. Авдеев С.Н., Чучалин А.Г. Роль бактериальной инфекции и выбор антибиотиков при обострении хронического бронхита // *Consilium medicum*. – 2000. – № 2. – С. 418–425.
2. Барлет Д.Д. Инфекции дыхательных путей: практическое руководство по диагностике и лечению инфекций респираторного тракта / Пер. с англ. – М.: Бином, 2000. – 192 с.
3. Вишнякова Л. А., Путов Н. В. Этиология острых пневмоний // *Тер. архив*. – 1990. – № 3. – С. 15–18.
4. Гаврильев С.С., Николаев В.П. и др. Совершенствование технологии химиотерапии туберкулёза легких, отягощенного сопутствующими заболеваниями // *Пробл. туберкулёза*. – 2001. – № 2. – С. 8-11.
5. Гизатулина Э.Д. // Характеристика неспецифической микрофлоры у больных туберкулёзом // *Клинич. микробиология и анти-микробн. терапия*. – 2010. – № 3. – С. 15-21
6. Ерохин В.В., Филиппенко Л.Н., Давыдов А.П. Электронно-микроскопическое изучение легких при туберкулёзе и неспецифическом воспалении // *Пробл. туберкулёза*. – 1982. – № 10. – С. 58-62.
7. Ивушкина Л.В., Митрохин С.Д., Мороз А.М. Роль отдельных представителей оппортунистической микрофлоры в развитии вторичной инфекции у больных туберкулёзом легких // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2004. – Т. 49. – № 10. – С.7-9.
8. Ивушкина Л.В. Микробиологическая диагностика оппортунистических инфекций у больных туберкулёзом легких // *Лабораторные исследования при туберкулёзе* / Под ред. В.И. Литвинова, А. М. Мороза. – М.: МНПЦБТ. – 2013.- С. 283-320.
9. Мишин В.Ю., Завражнов С.П. Эффективность химиотерапии у больных туберкулёзом легких с сопутствующей неспецифической бронхолегочной инфекцией // *Пульмонология*. – 2005. – № 2. – С. 33-35.
10. Приказ Минздрава СССР № 535 от 22.04.1985. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
11. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания Минздрава России: МУК 4.2.1890-04 от 04.03.2004.- 53 с.
12. Плетнев Г.В., Краснов В.А., Поташова В.А. Лечение больных деструктивным туберкулёзом легких и неспецифическим гнойным эндобронхитом // *Пробл. туберкулёза*. – 2003. - № 2. – С. 33-35.
13. Скала Л.З., Нехорошева А.Г., Лукин И.Н. и др. Современные технологии в клинической микробиологии и химиотерапии. Автоматизированное рабочее место врача-микробиолога, химиотерапевта и эпидемиолога // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2001. - № 12. – С. 25-32.
14. Шмелев Е.И. Хронические обструктивные болезни легких. – М.: Медицина, 2000. – С. 39-56.

Сведения об авторе

Ивушкина Лариса Валентиновна – врач-бактериолог Централизованной бактериологической лаборатории ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук
Москва, 107014, ул. Стромынка, д. 10
Телефон (499) 268 70 33
e-mail: mnpbdir2012@yandex.ru