

**ХАЧИЯН**

Магда Мелсиковна

**КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ И  
ПОДРОСТКОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ В КРАСНОДАРСКОМ  
КРАЕ И ОЦЕНКА РОЛИ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ  
ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ**

3.1.21. Педиатрия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Пермь 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (и.о. ректора – доктор медицинских наук, профессор Н.В.Минаева)

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Кондратьева Елена Ивановна**

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук **Чернуха Марина Юрьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Мельникова Ирина Михайловна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой педиатрии №1 ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

**Мещеряков Виталий Витальевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой детских болезней БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа-Югры «Сургутский государственный университет»

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_2021 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.052.02 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26 <http://www.psmu.ru/>, с авторефератом – на сайтах: <http://www.psmu.ru/> и <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент

**Карпунина Наталья Сергеевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Муковисцидоз (МВ) представляет собой наследственное моногенное заболевание с аутосомно-рецессивным наследованием и нарушением структуры гена *CFTR*, проявляющееся нарушением функции всех экзокринных желез и имеющим чаще всего тяжелое течение и серьезный прогноз (Гинтер Е. К., 2010, Капранов Н. И., 2011, 2014). Тяжесть состояния пациентов в основном обусловлена поражением дыхательных путей и бактериальным инфицированием бронхиального секрета, поэтому необходим пожизненный мониторинг микробного пейзажа и использование антибактериальной терапии (Капранов Н.И., 2016, 2019; Castellani C, et al., 2018).

В странах с высоким числом больных МВ при перерасчете на единицу населения функционируют национальные регистры пациентов с МВ [www.ecfs.eu, www.cfri.ie, www.cff.org]. Полученные эпидемиологические данные при создании регистров способствуют изучению особенностей генетической и клинической характеристики пациентов с МВ, позволяют разрабатывать факторы риска развития состояний, угрожающих жизни и прогнозировать течение заболевания, совершенствовать стандарты диагностики, систему диспансеризации и реабилитации пациентов. Анализ динамики состояния здоровья пациентов Краснодарского края с учетом проводимых мероприятий по усовершенствованию медицинской помощи не проводился.

Кроме того, регистр способствует изучению микробиологического профиля пациентов с МВ на территории отдельных регионов. Изучение структуры микрофлоры дыхательных путей и чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) определяет эффективность антимикробной терапии, от которой зависит респираторная функция и продолжительность жизни больных МВ (Шагинян И.А., 2017; Л. Р. Аветисян, 2019). В связи с этим изучение микробиологического профиля детей с МВ в Краснодарском крае является актуальным и имеет медико-социальное значение для данного региона.

Известно, что хроническая инфекция легких (ХИЛ), вызванная *Staphylococcus aureus*, является самой распространенной среди пациентов с МВ (58,4%), особенно в детском возрасте (60,9%) (Кондратьева Е.И., Капранов Н.И., 2018). *MRSA* (methicillin resistant *S. aureus* - метициллин резистентный *S. aureus*) имеет колоссальное клиническое и эпидемиологическое значение для пациентов с МВ, поскольку ХИЛ, вызванная *MRSA*, вызывает быстрое снижение функции легких (Dasenbrook E.C., 2010; Jennings M.T., 2017). Подобных исследований для *S. aureus* в России не проводилось.

### Степень разработанности темы исследования

В течение восьми лет ведения Регистра были достигнуты значительные результаты. Так, в 2020 году опубликована версия Регистра за 2018 г., которая аккумулировала информацию от 81 из 85 субъектов РФ. Данные представлены по всем 9 федеральным округам Российской Федерации (<https://mukoviscidoz.org/mukovistsidoz-v-rossii.html>). Количество сведений о

пациентах в регистре возросло с 1026 до 3142, диагностика заболевания изменилась с 1,0 до 0,5 лет, в рамках неонатального скрининга количество выявленных детей возросло за период 2011-2018 гг. с 28,8% до 48,2% (Куцев С.И., Кондратьева Е.И., 2020). Данные пациентов Краснодарского края вносились в регистр с 2011 года, но не анализировались в динамике, а с 2015 года регионы представлены в регистре в составе округов. Впервые изучение частоты МВ в крае, генетического разнообразия, роли неонатального скрининга в диагностике заболевания было проведено в 2007 году (Рукавичкин Д. В., 2007), больше исследований не проводилось.

Клинико-микробиологическая характеристика здоровья детей Краснодарского края не изучалась. Изучение микрофлоры дыхательного тракта пациентов с МВ Краснодарского края, а также антибиотикорезистентность наиболее значимых патогенов, играющих ведущую роль в прогрессировании поражения дыхательного тракта для рекомендаций по АБТ, не проводилось.

Для пациентов с МВ характерно инфицирование дыхательного тракта *S. aureus*. Эпидемиологическое значение *MRSA* определяется его способностью к приобретению резистентности к большинству существующих антибиотиков, что затрудняет лечение пациентов, поддерживает длительное существование источников *MRSA* и способствует формированию госпитальных клонов ([http://www.nasci.ru/education/methodical\\_recommendations](http://www.nasci.ru/education/methodical_recommendations)). При МВ данная проблема изучена недостаточно.

**Цель исследования:** изучить клинико-генетическую и микробиологическую характеристику муковисцидоза у детей и подростков Краснодарского края в динамике на основе данных регистров за 2011, 2015, 2018 годы и оценить эффективность мер по повышению качества оказания медицинской помощи, установить роль хронической стафилококковой инфекции при муковисцидозе для разработки подходов к ее профилактике и терапии.

**Задачи исследования:**

1. Установить заболеваемость муковисцидозом и изучить характеристику вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR* у пациентов с муковисцидозом в Краснодарском крае.
2. Оценить клиническую характеристику пациентов с муковисцидозом Краснодарского края и объем терапии в динамике по данным регистров 2011, 2015 и 2018 годов.
3. Исследовать структуру микрофлоры дыхательных путей пациентов с муковисцидозом Краснодарского края и определить чувствительность/резистентность основных микробных патогенов к антимикробным препаратам для обоснования рекомендаций для терапии.
4. Оценить значимость данных регистра пациентов Краснодарского края для разработки подходов к усовершенствованию медицинской помощи и их эффективности.
5. Изучить эпидемиологические и микробиологические особенности хронической инфекции легких у пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации, вызванной

*Staphylococcus aureus*, для разработки профилактических мероприятий и проведения рациональной антибактериальной терапии.

#### **Гипотеза исследования**

Пациенты с муковисцидозом в Краснодарском крае имеют ряд клинико-генетических и микробиологических особенностей течения болезни. Их выявление, а также изучение эпидемиологических и молекулярно-генетических особенностей хронической инфекции легких *S. aureus* – этиологии позволит оптимизировать амбулаторное наблюдение, терапевтическую тактику и снизить частоту обострений среди пациентов с муковисцидозом в Краснодарском крае.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Заболеваемость муковисцидозом по данным неонатального скрининга в Краснодарском крае составила 11,0 на 100 000 новорожденных в 2011 году и 15,8 на 100 000 новорожденных в 2018 году. За период 2011-2018 гг. по данным регистра муковисцидоза наблюдается положительная динамика: увеличение числа пациентов за счет лиц, выявленных по неонатальному скринингу (61%) и снижение возраста постановки диагноза в 2 раза, увеличение количества больных, получающих в качестве базисной терапии - гипертонический раствор, жирорастворимые витамины, снижение объема антибактериальной терапии. Аллельная частота генетических вариантов гена *CFTR* в Краснодарском крае в 2018 гг. была представлена F508del - 62,94%, *CFTR*dele2,3 - 5,59%, 2184insA - 2,80%, L138ins - 2,10%, G542X - 2,10%, W1282X - 2,10%, 2143delT - 1,40%, мутации N1303K, R334W, 1367del5, 1677delTA, 4015delT встречались в 0,70%. Медиана ожидаемой продолжительности жизни для родившихся в период 2015 - 2018 гг. составила 33,8 лет.

2. В 2011-2015 годах в Краснодарском крае отмечалось увеличение в 2,7 раза количества лиц с хронической *Pseudomonas aeruginosa* и высокая частота интермиттирующей *Pseudomonas aeruginosa* инфекции (25%), что отразилось на увеличении количества лиц, получающих ингаляционную и внутривенную антибактериальную терапию (77,94%). Отмечается рост резистентности неферментирующей грамотрицательной флоры к антимикробным препаратам. В Краснодарском крае частота высева *Staphylococcus aureus* за период наблюдения (2011 (37,04%), 2015 (33,82%), 2018 (38,9%) гг.) не изменилась. Разработка профилактических мероприятий в 2015 году привела к сокращению лиц с интермиттирующей синегнойной инфекцией и объема терапии в 1,7 раза к 2018 году.

3. *Staphylococcus aureus* является доминирующим возбудителем у пациентов с муковисцидозом РФ, выделяется у 53,3% при тяжелом течении заболевания и у 78,5% детей с отсутствием структурных изменений со стороны дыхательной системы. Эрадикация *Staphylococcus aureus* достигается у 66% пациентов, однако через 6 месяцев хроническая стафилококковая инфекция вновь обнаруживается в 55% случаев. Причиной хронической стафилококковой инфекции у больных МВ могут быть *Staphylococcus aureus* как госпитального (*MRSA* ST8 с SCCmec IV типом), так и не госпитального происхождения. Пациенты являются источником мультирезистентных эпидемически значимых штаммов *Staphylococcus aureus*.

### **Научная новизна**

Впервые описана клиническая характеристика детей и подростков с МВ Краснодарского края в соответствии с Европейским регистром по данным за 2011, 2015, 2018 годы. Проведен анализ заболеваемости МВ в крае и роли неонатального скрининга в диагностике МВ. На основе данных регистра пациентов Краснодарского края установлено, что аллельная частота генетических вариантов гена *CFTR* в Краснодарском крае в 2018 г. отличалась от показателей по РФ. Зарегистрирована высокая частота генотипа F508del/ F508del (42,9%) и низкое число «мягких» генотипов (7,8%). Аллельная частота генетических вариантов гена *CFTR* в Краснодарском крае в 2018 гг. была представлена F508del - 62,94%, *CFTR*dele2,3 - 5,59%, 2184insA - 2,80%, L138ins - 2,10%, G542X - 2,10%, W1282X - 2,10%, 2143delT - 1,40%, мутации N1303K, R334W, 1367del5, 1677delTA, 4015delT встречались в 0,70%.

Впервые описана функция легких пациентов с муковисцидозом Краснодарского края, нутритивный статус, осложнения. Проведен анализ применяемой в крае терапии пациентов с МВ, выявлены особенности и недостатки. Впервые изучена характеристика микробиологического пейзажа дыхательного тракта детей с муковисцидозом за период 2010-2020 годы. Впервые описана чувствительность и резистентность грамотрицательной и грамположительной флоры пациентов с муковисцидозом Краснодарского края. Представлен сравнительный анализ состояния здоровья детей Краснодарского края с пациентами из Московского региона и Красноярского края и ряда регионов юга страны. На основе полученных результатов разработаны мероприятия по улучшению медицинской помощи пациентам с МВ в крае и оценена их эффективность.

На территории РФ проведена оценка распространенности хронической стафилококковой инфекции и выявлены пути ее распространения. Изучены фенотипическая и генетическая гетерогенность *Staphylococcus aureus* и чувствительность *Staphylococcus aureus* к антибиотикам у пациентов РФ. На основе изучения эпидемических маркеров в полученных изолятах *Staphylococcus aureus* была описана популяционная структура и эпидемиологические особенности *MRSA* при МВ в России с целью совершенствования противоэпидемических мероприятий и контроля распространения ХИЛ, вызванной *Staphylococcus aureus*. Доказано, что *MSSA* являются фактором риска дальнейшего формирования хронической *MRSA* инфекции.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты показали, что заболеваемость в регионе составляет 11,0-15,8 на 100000 новорожденных. Количество пациентов за 7 лет увеличилось на 24 человека, из них 23 ребенка, при этом количество пациентов, выявленных по неонатальному скринингу, возросло до 28 в 2018 году. Общее число пациентов, выявленных по неонатальному скринингу, в 2018 году составило 47 (61,04%). Средний возраст установления диагноза снизился с 2011 по 2018 гг. в 2 раза.

В Краснодарском крае к 2015 году отмечалось увеличение числа лиц с неидентифицированными генетическими вариантами гена *CFTR*, что свидетельствовало о необходимости повышения охвата ДНК - диагностики с использованием широкого набора частых генетических вариантов и секвенирования. К 2018 году этот показатель снизился почти в 2 раза, но оставался выше, чем в стране, увеличилось число генетических вариантов гена *CFTR*.

Увеличение количества лиц с хронической синегнойной инфекцией среди пациентов Краснодарского края в период 2011-2015 гг. (по данным регистров) свидетельствовало о недостаточном использовании мер по профилактике перекрестной инфекции среди больных. В 2015 году регион отличала высокая частота назначения внутривенной антибактериальной терапии (77,94%), бронходилататоров (85,29%) и ингаляционных стероидов (29,41%), что в 2 раза превышало потребление антибактериальных препаратов и бронхолитиков пациентами РФ и центрального региона и свидетельствовало о недостаточной эффективности терапии на фоне отсутствия мер профилактики перекрестного инфицирования. Проведенные меры по усовершенствованию медицинской помощи пациентам МВ в детском возрасте (усиление мер профилактики перекрестной инфекции, развитие амбулаторной помощи и внедрение современных методов базисной терапии и АБТ хронической инфекции) привели к положительным результатам. Так, в 2018 году сократилось количество пациентов с интермиттирующим высевом *Pseudomonas aeruginosa* и, соответственно, частота назначения внутривенной антибактериальной терапии сократилась до 48,05%.

Результаты по изучению антибактериальной резистентности основных микробных патогенов дыхательного тракта предлагается использовать при назначении антибактериальной терапии пациентам с МВ в крае.

Показано, что больные МВ РФ инфицированы не уникальными сиквенс-типами *S. aureus*, а сиквенс-типами, которые широко распространены среди населения России. Низкий процент эффективности эрадикации *S. aureus* и высокая частота формирования ХСИ показывает отсутствие необходимости в проведении эрадикационной антибактериальной терапии и обосновывает ее применение при эпизодах острых респираторных инфекций и обострениях хронического процесса со стороны легких. Исследование показало, что в *MRSA* ST8 с SCCmec IV тип является эпидемическим для пациентов с МВ в РФ. Больные МВ являются их источником, что требует соблюдения профилактических мер, как при госпитализации, так и при динамическом наблюдении в амбулаторных условиях.

### **Внедрение результатов исследования**

Материалы диссертации внедрены в практическую работу пульмонологического отделения ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Минздрава Краснодарского края и центра муковисцидоза Пермского края ГБУЗ Пермского края «Краевая детская клиническая больница», в учебный процесс кафедры педиатрии с курсом неонатологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «КубГМУ»

Минздрава России и кафедры факультетской и госпитальной педиатрии ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А.Вагнера» Минздрава России.

На основе данных регистра и мониторинга микрофлоры дыхательного тракта была усовершенствована медицинская помощь пациентам МВ в детском возрасте в виде усиления мер профилактики перекрестной инфекции, развития амбулаторной помощи и внедрения современных методов базисной и антибактериальной терапии.

#### **Связь с научными программами**

Тема диссертации утверждена на заседании научно-координационного совета по педиатрии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера», протокол №770 от 01.12.2020г.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России «Разработка методов профилактики, диагностики и лечения инфекционных и соматических заболеваний у детей и подростков, номер государственной регистрации 115030310057» и темой ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова» «Разработка технологий персонализированной диагностики и терапии при муковисцидозе, номер государственной регистрации АААА-А18-118081390036-6».

#### **Апробация результатов исследования**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XVII, XVIII Национальных конгрессах «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 24-26 октября 2018 г.; 22-24 октября 2019 г.; 41-й конференции Европейского общества по муковисцидозу (European Cystic Fibrosis Society, ECFS; Белград (Сербия); 06-10 июня 2018 г.); XIV Национальном конгрессе «Актуальные проблемы муковисцидоза» (Красноярск, 25-26 апреля 2019 г.); 42-й конференции Европейского общества по муковисцидозу (European Cystic Fibrosis Society, ECFS; Ливерпуль, Великобритания, 5-8 июня 2019 г.); на XVII съезде педиатров России с международным участием «Актуальные вопросы педиатрии» (Москва, 14-17 февраля 2013г.); на XIII Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 21-23 октября 2014г.).

#### **Публикации по теме работы**

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 5 статей в рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций журналах, 2 из них - в журналах, индексируемых в реферативных базах данных зарубежных информационно-аналитических систем (Scopus).

#### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Диссертационное исследование соответствует п.п.1 и 5 паспорта специальности 3.1.21. Педиатрия (п. 1 - Рост, физическое, половое и нервно-психическое развитие, состояние функциональных систем ребенка, п.5 - Клиника, диагностика и лечение врождённых и наследственных болезней).



### Личный вклад автора

Гипотеза и дизайн исследования были разработаны автором при участии научного руководителя. Обследование пациентов, анализ историй болезни для регистров 2011-2015 и 2018 годов, создание генетической базы данных и базы данных пациентов Краснодарского края, включая данные по микрофлоре дыхательного тракта и ее чувствительности к антибактериальным препаратам, участие в сборе биоматериала для изучения стафилококковой инфекции, проведение ряда исследований, статистический анализ, формулировка профилактических и лечебных рекомендаций, подготовка основных публикаций в рамках исследования, а также диссертации и автореферата соискателем выполнены самостоятельно.

**Объём и структура работы.** Диссертация изложена на 168 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждений, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 251 источник, из них 72 отечественных и 179 – зарубежных авторов, приложения. Работа иллюстрирована 45 таблицами и 12 рисунками.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

В научно-исследовательскую работу вошли пациенты с подтвержденным диагнозом МВ, наблюдающиеся в Краснодаре и Краснодарском крае в период с 2011 по 2018 год. Пациенты наблюдались в ГБУЗ Детская краевая клиническая больница и ГБУЗ НИИ Краевая клиническая больница №1 имени профессора С.В. Очаповского. Использовались данные Регистров больных МВ Краснодарского края 2011, 2015 и 2018 годов (база данных). Регистры заполняли согласно рекомендациям Европейского регистра (ECFSPR). В 2011 году количество детей составило 54 человека и взрослых (старше 18 лет) - 16 человек, в 2015 году количество детей - 68 человек и взрослых – 24 человека, в 2018 году количество детей - 77 человек и взрослых – 17 человек. Диагноз устанавливали согласно рекомендациям Европейского консенсуса (Castellani С., 2018), были подвергнуты анализу выписки из амбулаторных карт (форма № 025/у) и стационаров (форма №003/у).

При проведении сравнительного анализа здоровья детей края с другими регионами использовали данные регистров пациентов с МВ за 2015 год, которые наблюдались в четырех Центрах МВ РФ: Краснодарский край, Москва и Московская область, Красноярский край.

**Таблица 1** - Возрастная структура больных 4-х регионов в 2015 г., n, %

Регион	Всего	Дети	Взрослые
г. Москва	353	233 (66,0)	120 (34,0)
Московская область	180	134 (74,4)	46 (25,6)
Краснодарский край	93	69 (74,6)	24 (25,8)
Красноярский край	63	59 (93,6)	4 (6,4)

Для исследования микробного статуса дыхательной системы пациентов с МВ Краснодарского края использовали 2189 посевов мокроты и трахеобронхиального секрета детей, находящихся на стационарном лечении в пульмонологическом отделении ГБУЗ ДККБ (Краснодар) за период с 2010 по 2020 гг. В 2010 году исследовано - 229 проб, в 2011 году – 195 проб, в 2012 году – 274 проб, в 2013 году – 284 проб, в 2014 году – 302 пробы, в 2015 году – 279 проб, в 2018 году – 382 пробы и в 2020 году – 244 пробы.

Микробиологические исследования биоматериалов и изучение свойств изолятов *S. aureus* проводили совместно с лабораторией молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Диагноз ХСИ устанавливали на основании критерия Лидса, предложенного для синегнойной инфекции (Ноо Z.H., 2018). Материалом для исследования роли и эволюции *S. aureus* служили: 1) 2020 мазков из зева и мокроты 400 больных МВ (300 детей и 100 взрослых) из различных регионов РФ; 2) 556 изолятов *S. aureus*, из которых 479 были выделены от детей и 77 - от взрослых больных МВ в период с 2006 по 2017 гг.; 3) 300 изолятов *S. aureus* от пациентов, наблюдавшихся амбулаторно, с острыми инфекционными заболеваниями (тонзиллит, отит, раневая инфекция, инфекция кожи, мастит и др.). Чувствительность к АБП определяли у 312 изолятов *S. aureus*, полученных от пациентов с МВ, и 300 изолятов от пациентов без МВ, наблюдающихся амбулаторно с признаками острых инфекций. Данные были представлены лабораторией молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России. Дизайн исследования ХСИ и свойств *S. aureus*: ретроспективное сплошное многоцентровое исследование.

До начала диссертационного исследования было получено одобрение локального этического комитета ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России для его проведения. Пациенты с МВ и/или их представители подписывали добровольное информированное согласие до включения в исследование. Конфликт интересов в работе отсутствует.

### **Методы исследования**

Анамнестически проведена оценка возраста установления диагноза, хлоридов пота, бактериологических посевов, функции внешнего дыхания (ФВД), нутритивных показателей, осложнений МВ (муковисцидоззависимый сахарный диабет (МЗСД), заболевания печени, поражение придаточных пазух носа, легочные кровотечения, пневмоторакс). Оценка нутритивного статуса осуществлялась с помощью индекса массы тела (ИМТ) по Quetelet (масса (кг) / рост (м)<sup>2</sup>) (Turck D., 2016). Функция легких анализировалась по результатам форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) и объема форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ<sub>1</sub>), в соответствии с критериями ERS/ATS в группе детей, способных сделать дыхательный маневр при проведении спирометрии (Castellani C., 2018). Исследования гена *CFTR* проведено согласно Консенсусу по МВ в 2016-2019 гг. в Кубанской межрегиональной медико-

генетической консультации (НИИ Краевая клиническая больница №1 им. С.В. Очаповского, зав. отд. Матулевич Е.А.) и в ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова». Проводился анализ лекарственной терапии такими препаратами как дорназа альфа и другие муколитики, антибиотики, бронхолитики, панкреатические ферменты, урсодезоксихолевая кислота. Продолжительность жизни больных МВ оценивалась с помощью построения кривой выживаемости Каплана-Мейера в обозначенный период наблюдения. Достоверность различий между группами определялась с помощью LogRank (Mantel-Cox).

### **Микробиологические методы исследования**

Идентификацию выделенных микроорганизмов из дыхательного тракта пациентов Краснодарского края проводили с учётом морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств. Идентификацию возбудителей проводили с помощью аппарата Vitec 2-compact (США) и биохимических пластин ПБДЭ (пластины биохимические дифференцирующие энтеробактерии) производства ООО «Научно-производственное объединение – Диагностические системы» г. Нижний Новгород (Россия).

ХСИ изучали с помощью эпидемиологических, бактериологических, молекулярно-генетических и статистических методов исследования. Эпидемиологию ХСИ анализировали методами описательной статистики и методом «случай-контроль» при сравнении антибиотикорезистентности изолятов, выделенных при МВ и от амбулаторных пациентов с острыми инфекционными заболеваниями. Исследование биологического материала проводили согласно алгоритму микробиологической диагностики (Чернуха М.Ю., 2019). Идентификацию *S. aureus* осуществляли стандартными методами, а при атипичных фенотипах - методом ПЦР гена, кодирующего фибриноген-связывающий протеин (Mason W.J., 2001). Определение антибиотикочувствительности проводили диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04.

Формирование биопленок (БП) изучали оценивая способность штаммов к адгезии на поверхности 96-луночной полистироловой планшеты. Гипермутабельность изучали с помощью метода серийных разведений согласно Prunier et al. (Prunier Et al, 2003). Идентификация *tecA*, *tecC* и гена, кодирующего лейкоцидин Пантона-Валентайна (*lukF-PV*), проведена в мультиплексной ПЦР по протоколу (<https://www.eurl-ar.eu/protocols.aspx>), рекомендованному референс-лабораторией по антибиотикорезистентности Европейского Союза, в лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Генетическое разнообразие изолятов *S. aureus* изучали методом типирования гена, кодирующего синтез коагулазы у *S. aureus* (*coa*), с использованием праймеров 5'-CGAGACCAAGATTCAACAAG-3' и 5'-AAAGAAAACCACTCACATCA-3' («Евроген») и эндонуклеазы рестрикции FastDigestHaeIII (Fermentas) (OmarNY, 2014) и с помощью мультилокусного секвенирования (MLST) согласно схеме, приведенной

в базе *pubmlst* (<https://pubmlst.org/saureus>). Идентификацию типов SCCmec осуществляли методом ПЦР согласно Zhang et al. (Zhang K. Et al, 2005). Полногеномное секвенирование штаммов *S. aureus* проводили на платформе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit и чипами 316v1 (Life Technologies Thermo Fisher, США) по протоколу производителя в лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL), используя среднее значение (M) ± стандартное отклонение (SD) или медиана (Me) (интерквартильный размах). При сравнении средних значений или медиан применялись t-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни. Статистическую обработку результатов микробиологических данных проводили в программе «Microsoft Office Excel 2010». Для определения 95% доверительных интервалов использовали метод Уилсона (Гржибовский А.М., 2008). Индекс разнообразия Симпсона рассчитывали по формуле Хантер-Гастона (Hunter P.R., Gaston M.A., 1988). Статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью критерия  $\chi^2$ . При  $p < 0,05$  различия считали статистически значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика пациентов с муковисцидозом по данным регистров 2011-2018 годов Краснодарского края

В 2011 году из 63646 новорожденных Краснодарского края неонатальный скрининг был проведен 63527 пациентам, по скринингу заподозрен и подтвержден диагноз МВ 7 новорожденным (11,0 на 100 000 новорожденных). В 2018 году из 63831 новорожденных неонатальный скрининг был проведен 63411 пациентам, подтвержден диагноз муковисцидоз 7 новорожденным (15,8 на 100 000 новорожденных). В Регистр пациентов Краснодарского края в 2011 г. были включены данные 70 больных: 54 ребенка и 16 взрослых, в 2015 году - 92 больных, из них взрослых 24 человека, в 2018 году – 94 пациента (77 – дети, 17 – взрослые).

Таблица 2 - Основные демографические и диагностические показатели (2011-2018 гг.).

Показатель	2011 (1)	2015 (2)	2018 (3)	p
Статус больных				
Возраст, годы				
M ± SD	7,80±5,30	6,78±4,22	8,11±4,43	p <sub>1-2</sub> =0,516 p <sub>2-3</sub> =0,065 p <sub>1-3</sub> =0,558
Me(IQR)	6,55 (7,29)	6,75 (7,68)	7,54 (8,09)	
Возраст установления диагноза, годы				
M ± SD	2,07±3,27	1,10±2,04	1,00±1,96	p <sub>1-2</sub> =0,005 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> =0,426
Me(IQR)	0,50 (2,67)	0,34 (0,84)	0,27 (0,68)	
Мекониевый илеус				

всего, %	5 (9,26)	12 (17,65)	13 (16,88)	$p_{1-2}=0,200$ $p_{2-3}=0,904$ $p_{1-3}=0,229$
Результат неонатального скрининга (положительный)				
всего, %	19 (35,19)	41 (60,29)	47 (61,04)	$p_{1-2}=0,003$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,323$

Количество пациентов за 7 лет увеличилось на 24 человека, из них группа детей на 23 ребенка, при этом количество пациентов, выявленных по неонатальному скринингу (Таблица 2) возросло на 22 человека ( $p=0,003$ ) в 2015 и на 28 в 2018. Общее число пациентов, выявленных по неонатальному скринингу, в 2018 году составило 47 (61,04%). В результате чего, количество детей, выявленных по неонатальному скринингу, увеличилось почти в 2,47 раза (Таблица 2). Средний возраст постановки диагноза снизился с 2011 по 2018 гг. в 2 раза (Таблица 2). Средний возраст детей в регистре практически не изменился. Значения потового теста не отличались по годам. За 8 лет (2011-2018) умерло 14 человек, из которых 6 – дети. Средний возраст смерти составил  $17,43 \pm 9,68$  лет.

Распределение генетических вариантов гена *CFTR* в регистрах края практически не различалось. Генотип F508del в гомозиготном состоянии среди пациентов Краснодарского края был выше, чем в РФ (Таблица 3). Количество пациентов с генотипом F508del / неF508del увеличилось с 2011 к 2018 году, но без статистически значимой разницы и было ниже, чем в РФ. Доля пациентов с «мягким генотипом» увеличилась за 7 лет, но была ниже показателя РФ в 2018 году.

**Таблица 3** - Характеристика генотипов гена *CFTR* детей с муковисцидозом, проживающих в Краснодарском крае за 2011 -2018 гг., n, (%)

Генотип	2011 год (1)	2015 год (2)	Регистр РФ 2015	2018 (3)	Регистр РФ 2018	p
F508del / F508del, %	26 (48,15%)	26 (38,24%)	29,1%	33 (42,86%)	31,6%	$p_{1-2}=0,207$ $p_{1-3}=0,463$ $p_{2-3}=0,481$
F508del / неF508del, %	10 (18,52%)	20 (29,41%)	47,2%	25 (32,47%)	45,6%	
неF508del / неF508del, %	10 (18,52%)	16 (23,53%)	23,7%	14 (18,18%)	22,8%	
Тяжелый	33 (94,29%)	34 (97,14%)	(83,6%)	47 (92,16%)	82,4%	$p_{1-2}=0,558$ $p_{1-3}=0,470$ $p_{2-3}=0,335$
Мягкий	2 (5,71%)	1 (2,86%)	(16,4%)	4 (7,84%)	17,6%	

После первых 2-х вариантов (F508del и CFTRdele2,3), наиболее часто встречающихся в крае и в РФ, только 2143delT и N1303K входили в первые десять по частоте генетических вариантов пациентов с МВ страны по данным 2011 и 2015 годов. В первых 10 генетических вариантах гена *CFTR* у детей Краснодарского края не зарегистрирован генетический вариант E92K, занимающий третью позицию в РФ (Регистр больных МВ в Российской Федерации. 2015 год, 2018 год). Благодаря расширению возможности молекулярно-генетического обследования, в том числе в

ФГБНУ «МГНЦ», у детей с МВ в 2018 году появились еще 5 генетических вариантов (W1282X, 1367del5, 1677delTA, 4015delT, L138ins). В Краснодарском крае отмечалось увеличение числа лиц с неидентифицированными мутациями к 2015 году, что свидетельствовало о необходимости повышения охвата ДНК - диагностики с использованием широкого набора частых мутаций и секвенирования. К 2018 году этот процент снизился почти в 2 раза, но оставался выше, чем в стране.

Показатели физического развития детей с 2011 по 2015 год достоверно не изменились, однако в дальнейшем наблюдается положительная динамика и достоверное увеличение перцентилей роста ( $p=0,015$ ) и массы ( $p=0,019$ ) к 2018 году. (Таблица 4). Все эти годы масса тела и ИМТ детей и подростков были ниже 50 перцентильного ряда и свидетельствовали о нутритивном дефиците. К 2018 году показатели увеличились по сравнению с 2011 годом и практически не отличались от показателей по РФ.

**Таблица 4** - Показатели нутритивного статуса у детей, проживающих в Краснодарском крае за 2011 -2018 гг., n, (%)

Показатель, Me (IQR),%	2011 (1)	2015 (2)	Регистр РФ, 2015	2018 (3)	Регистр РФ, 2018	p
Вес, перцентиль	7,40 (42,50)	17,90 (13,85)	29,70 (50,40)	32,99 (49,82)	36,69 (49,75)	$p_{1-3}=0,019$
Рост, перцентиль	21,50 (40,05)	118,00 (44,00)	31,40 (55,60)	43,52 (57,94)	41,88 (55,84)	$p_{1-3}=0,015$
ВМІ, перцентиль	13,90 (33,20)	14,87 (2,38)	29,10 (48,80)	25,78 (44,31)	37,74 (51,11)	$p_{1-3}=0,444$

Сравнительная характеристика микрофлоры респираторного тракта у детей представлена в таблице 5. Представляет интерес более низкая распространённость *Staphylococcus aureus*, чем по стране. Число пациентов с MRSA соответствовало показателю в стране до 2015 года, но в 2018 году патоген не был идентифицирован. За пятилетний период 2011-2015 гг. отмечена негативная тенденция к увеличению количества лиц с хронической синегнойной инфекцией ( $p=0,004$ ), что превышало средний показатель по РФ. В дальнейшем этот показатель стабилизировался.

**Таблица 5** - Сравнительная характеристика микрофлоры респираторного тракта у детей в Краснодарском крае за 2011-2018 гг., n, (%)

Возбудитель	2011 (1)	2015 (2)	РФ, 2015 (дети)	2018 (3)	РФ, 2018 (дети)	p
<i>Staphylococcus aureus</i> , %	20 37,04%	23 33,82%	58,4%	30 38,9%	60,9%	$p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,001$
MRSA, %	2 3,7%	1 1,46%	5,2%	-	3,5%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – хроническое инфицирование, %	8 14,81%	26 38,24%	25%	28 36,4%	26,3%	$p_{1-2}=0,004$ $p_{1-3}=0,007$ -

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -интермиттирующий высев, %	11 20,37%	17 25,00%	17%	9 11,69%	17,2%	- p <sub>2-3</sub> =0,003
<i>Burkholderia cepacia complex</i> , %	-	3 4,41%	4,6%	1 1,30%	3,7%	-
<i>Achromobacter spp.</i> , %	-	-	2,6%	6 7,79%	4,7%	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2 3,70%	2 2,94%	3,3%	1 1,30%	4,3%	-

Отмечалось достоверное снижение числа пациентов с интермиттирующим высевом *Pseudomonas aeruginosa* с 2015 по 2018 год. В 2015 году в регионе зарегистрировано 3 пациента, инфицированных *Burkholderia cepacia complex*, что может быть связано как с улучшением микробиологической диагностики, так и с особенностью госпитализации пациентов, и диктует необходимость организации профилактических мер. Не было выявлено *Achromobacter spp.* и *Stenotrophomonas maltophilia* до 2018 года, что может объясняться особенностями работы бактериологической лаборатории края и обследованием детей после 2015 года в центральных референсных лабораториях. ФВД детей с МВ в среднем составляла в 2011 году по ОФВ<sub>1</sub>-81,8±28,7 % долж. и к 2015 году снизилась до 75,4±16,8% долж. Показатели ОФВ<sub>1</sub> у детей РФ в 2015 году составили 82,3 ± 24,2 долж. Показатели спирометрии детей Краснодарского края достоверно увеличились к 2018 году (89,8±15,8 p=0,007), что соотносится с данными по снижению инфицирования детей *Pseudomonas aeruginosa*.

В регистрах 2011 и 2015 годов осложнений МВ не зарегистрировано и данные не приводятся. Поражение печени встречалось у 61,11% детей в 2011 и у 58,8% в 2015 году. С изменением подхода к диагностике поражения печени количество детей снизилось до 31,17%. Отсутствие осложнений свидетельствует о их гиподиагностике. Анализ терапии МВ за 5 лет изменился по ряду позиций со статистически значимой разницей (Таблица 6).

**Таблица 6** - Терапия при муковисцидозе среди детей, проживающих в Краснодарском крае за 2011 -2018 гг., n, (%)

Терапия (n,%)	2011 (1)	2015 (2)	Регистр РФ 2015	2018 (3)	Регистр РФ 2018	p
Гипертонический раствор (ГР) натрия хлорида	0	9 (13,24)	54,4	23 (29,87)	72,66	p <sub>1-2</sub> =0,005 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> =0,021
Антибиотики ингаляционные	16 (29,63)	41 (60,29)	40,7	42 (54,55)	43,61	p <sub>1-2</sub> =0,001 p <sub>1-3</sub> =0,008 p <sub>2-3</sub> =0,349
Антибиотики внутривенные	42 (77,78)	53 (77,94)	59,1	37 (48,05)	31,98	p <sub>1-2</sub> =0,914 p <sub>1-3</sub> <0,000 p <sub>2-3</sub> <0,001
Антибиотики пероральные	38 (70,37)	35 (51,47)	72,5	31 (40,26)	52,58	p <sub>1-2</sub> =0,023 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> =0,123

Бронходилататоры	50 (92,59)	58 (85,29)	56,9	67 (87,01)	44,23	$p_{1-2}=0,065$ $p_{1-3}=0,030$ $p_{2-3}=0,686$
Стероиды ингаляционные	1 (1,85)	20 (29,41)	15,8	16 (20,78)	11,65	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}=0,002$ $p_{2-3}=0,189$
Дорназа альфа	50 (92,59)	68 (100)	96,5	76 (98,70)	97,88	$p_{1-2}=0,255$ $p_{1-3}=0,768$ $p_{2-3}=0,347$
Азитромицин в субингибирующей дозе	27 (50,0)	26 (38,24)	31,6	16 (20,78)	30,04	$p_{1-2}=0,168$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,015$
Урсодезоксихолевая кислота	50 (92,59)	65 (95,59)	94,8	76 (98,70)	94,77	$p_{1-2}=0,266$ $p_{1-3}=0,222$
Панкреатические ферменты	51 (94,44)	65 (95,59)	96,2	76 (98,70)	94,86	-
Кинезитерапия	51 (94,44)	63 (92,65)	87,7	74 (96,10)	87,18	$p_{1-2}=0,213$ $p_{1-3}=0,409$ $p_{2-3}=0,479$

В 2011 году ГР не применялся в РФ, что нашло отражение в регистре Краснодарского края. В 2015 году 13,24% детей использовали ГР, но этот показатель гораздо ниже, чем в целом в РФ (54,4%). К 2018 году количество пациентов, получавших ГР, увеличилось более чем в 2 раза. Отмечается высокая частота применения внутривенной АБТ (около 78%) в 2011-2015 годах, в 2018 году этот показатель снизился до 48,05% в связи со снижением количества пациентов с интермиттирующим высеvom *Pseudomonas aeruginosa*. Увеличилось количество лиц, использующих жирорастворимые витамины, что соответствует европейским стандартам терапии МВ.

Ожидаемая продолжительность жизни пациентов, родившихся в период 2014–2018 гг. составила 33,8 лет (ДИ 30,6–37,2 лет) (Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации, 2018).

#### **Сравнительная характеристика пациентов с муковисцидозом Краснодарского края с пациентами других регионов**

Микробиологический профиль респираторного тракта показал ряд различий. Так, пациенты Москвы и Московской области достоверно чаще имели хроническую колонизацию *Staphylococcus aureus* (г. Москва – 75,11%, Московская область – 72,52%, Краснодарский край – 33,83%, Красноярский край – 44,07% ( $p_{1,2} = 0,489$ ;  $p_{1,3} = 0,000$ ;  $p_{1,4} = 0,000$ ;  $p_{2,3} = 0,000$ ;  $p_{2,4} = 0,000$ ;  $p_{3,4} = 0,406$ )); хронический высеvom *Pseudomonas aeruginosa* (г. Москва – 16,74%, Московская область – 15,27%, Краснодарский край – 38,24%, Красноярский край – 16,85% ( $p_{1,2} = 0,689$ ;  $p_{1,3} = 0,004$ ;  $p_{1,4} = 0,906$ ;  $p_{2,3} = 0,004$ ;  $p_{2,4} = 0,691$ ;  $p_{3,4} = 0,0282$ )); высеvom *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia ceracia complex*, *MRSA* не имел достоверных отличий в сравниваемых регионах.

Оценка нутритивного статуса детей с МВ показала, что в Краснодарском крае медиана веса составила 17,90 (13,85) и оказалась низкой в сравнении с показателями



детей г. Москвы ( $p=0,007$ ) и Московской области ( $p=0,074$ ). Полипозный пансинусит, цирроз печени с портальной гипертензией, синдром Псевдо-Барттера у детей Краснодарского края не были зарегистрированы в отличие от Москвы, Московской области и Красноярского края, что может быть связано с недостаточной настороженностью врачей и гиподиагностикой полипов носа и пазух, а также с особенностями климатических условий проживания. В 2015 году не было отмечено случаев электролитных расстройств у пациентов Краснодарского края, в отличие от сравниваемых регионов. Данные осложнения чаще встречаются в жаркое время года и в странах с жарким климатом. Отсутствие данного осложнения свидетельствует о гиподиагностике этого состояния.

### **Характеристика микрофлоры дыхательного тракта и чувствительности к антибактериальным препаратам при муковисцидозе в Краснодарском крае**

Частота высева чувствительных к антибиотикам *S. aureus* была высокой для всех тестируемых АБП, роста резистентности не отмечено. *MRSA* встречался у 8 больных в 2012 году, в дальнейшем количество больных уменьшилось до 1 (2015 год), и не регистрировалось в дальнейшем. Проведен анализ активности АБП и ее динамики в отношении штаммов *P. aeruginosa* и *P. aeruginosa muc.* у больных МВ в 2010 – 2020 гг. В период 2010-2015 гг. чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к тобрамицину снизилась с 83% до 63%, затем к 2018 году зарегистрировано снижение чувствительности к основному ингаляционному антибиотику до 56%, однако к 2020 году отмечается увеличение чувствительности к тобрамицину до 74%. Карбапенемы имеют высокую активность в отношении *P. aeruginosa* (81-84%), но в отношении *P. aeruginosa muc.* она снижается с 100% (2012) до 83% (2015), сохраняя лидирующую позицию для меропенема, однако с дальнейшим снижением чувствительности до 74% и 79% в 2018 году и 79% и 58% в 2020 году. Пиперациллин/тазобактам, цефоперазон/сульбактам показывают высокий профиль чувствительности все годы наблюдения. Активность ципрофлоксацина для *P. aeruginosa* (73% и 79% в 2011-2015гг.) сопоставима с таковой для *P. aeruginosa muc.* (100% -79 % в 2012-2015гг.) чувствительных штаммов, однако в последние годы мукоидные штаммы *P. aeruginosa* вдвое снизили свою чувствительность к ципрофлоксацину с 79% и 93% в 2015-2018 гг. до 42% в 2020 году.

### **Хроническая инфекция легких, вызванная *Staphylococcus aureus*, у пациентов с муковисцидозом**

Исследование биологического материала от 239 больных МВ детей РФ показало, что как при тяжелом течении заболевания, так и при легком, когда нет структурных изменений, *S. aureus* являлся доминирующим возбудителем и выделялся у 159 больных (53,4%, ДИ: 47,7%; 58,9%), а при легком у 80 (78,4%, ДИ: 69,5%; 85,3%). При этом моноинфекцию наблюдали только в 5% случаев, а в остальных случаях *S. aureus* встречался в составе ассоциаций с *P. aeruginosa* - в 35,3%.

Микробиологический мониторинг ХСИ был проведен у 75 больных МВ. Результаты показали, что после курса антибиотикотерапии *S. aureus* 33 пациента (44%) имели его повторный высев, среди 42 пациентов *S. aureus* не идентифицирован

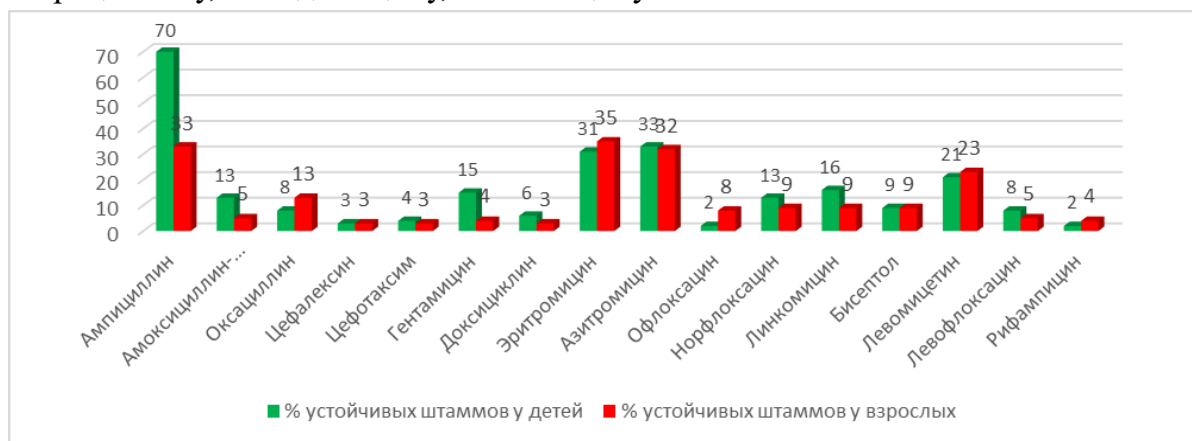
культуральным методом. С целью решения вопроса об эрадикации патогена у 42 пациентов после курса АБТ было проведено повторное обследование в течение 6 месяцев после лечения. *S. aureus* был выявлен у 23 (55%) больных снова, то есть из 75 пациентов 56 (74,7%) имели ХСИ. Для уточнения результатов культурального метода использовали генотипирование изолятов, выделенных в динамике. Отсутствие смены генотипа *S. aureus* выявлено среди 67% пациентов (ДИ: 51%; 79%), что свидетельствует в пользу отсутствия эффекта от курсов эрадикации назначаемой АБТ и продолжении персистенции первоначального генотипа *S. aureus*. Среди 33% (ДИ: 21%; 49%) больных МВ генотип *S. aureus* изменяется, следовательно, итогом АБТ была элиминация первоначального штамма *S. aureus*, однако в ближайшие 6 месяцев снова происходила колонизация дыхательных путей *S. aureus*, имевших иной генотип. В итоге, истинную эрадикацию регистрировали среди 49% больных с МВ, которые в последующие полгода снова имели высев *S. aureus*.

Генетический анализ изолятов от 59 пациентов, полученных с промежутком от 14 дней до 9 лет, позволил выявить эпидемиологические особенности ХСИ, прогенотипировано от 2 до 6 изолятов, полученных от одного пациента в течение мониторинга. Показано, что ХСИ на фоне МВ может быть вызвана как циркуляцией штаммов с одним генотипом, так и штаммами *S. aureus* с различными генотипами, меняющимися друг друга или персистирующими одновременно. Период смены генотипа варьировал от 14 суток – это было минимальное время, необходимое для смены генотипа, до 4-х лет и 2-х месяцев – максимальное время циркуляции одного и того же генотипа в легочной ткани пациента с МВ. Генотипирование изолятов *S. aureus*, полученных из одного образца мокроты, показало их генетическую гетерогенность. У 7 пациентов были выделены одновременно более 1 генотипа *S. aureus*, которые также характеризовались различной чувствительностью к АБП. Можно заключить, что для ХСИ при МВ характерна генетическая гетерогенность популяции *S. aureus*.

Была проанализирована фенотипическая гетерогенность (разный фенотип бактериальных клеток с одинаковым генотипом, выделенных одновременно) изолятов от 22 пациентов, что позволило выявить ряд закономерностей и особенностей. Так, одновременно от одного пациента получали до 3 различных по фенотипу штаммов *S. aureus*. Четверо пациентов были колонизированы *MRSA* и *MSSA* с общим генотипом, а у 7 пациентов одновременно присутствовали резистентные и чувствительные *S. aureus* одного генотипа. Бактериальные патогены с резистентностью к одному-двум антибиотикам из разных групп выявлены среди 11 пациентов. Установлено, отсутствие корреляции между резистентностью *S. aureus* к антибиотикам и их персистенцией. Из 43 пациентов трое имели ХСИ, вызванную мультирезистентным клоном *MSSA*, и трое - *MRSA*, среди остальных пациентов ХСИ вызвана персистенцией клона чувствительного ко всем антибиотикам или резистентным к одному или двум препаратам.

При исследовании резистентности к АБП установлено, что 83 (35%, ДИ: 29,2%; 41,3%) штамма *S. aureus*, полученных от детей с МВ, были мультирезистентными.

Процент резистентности выделенных изолятов к разным АБП приведен на рисунке 1. В процессе мониторинга наблюдали изменчивость микрофлоры в течении хронической стафилококковой инфекции, проявляющуюся в смене генотипа *S. aureus* и/или в транзиторной колонизации *S. aureus* с помощью генетических методов. Анализ генотипически одинаковых штаммов *S. aureus*, полученных от одного пациента в разные периоды ХСИ, показал изменение антибиотикочувствительности в процессе их персистенции. При этом наблюдали как приобретение резистентности *S. aureus*, так и потерю. Приобретение резистентности наблюдали по отношению к амоксициллину, цефалексину, цефотаксиму, эритромицину, азитромицину, тетрациклину, клиндамицину, гентамицину.



**Рисунок 1** - Характеристика резистентности изолятов *S. aureus*, полученных от пациентов с МВ, к антибиотикам.

Установлены отличия бактерий *S. aureus*, вызывающих ХСИ у пациентов с МВ и изолятов, выделенных от амбулаторных больных с острой инфекцией. Исследование показало, что 108 изолятов (34,6%, ДИ: 29,5%; 40,1%) *S. aureus* при МВ оказались мультирезистентными, а при острой инфекции мультирезистентными были 54 изолята (18,0%, ДИ: 14,1%; 22,7%), ( $p < 0,05$ ). Отличием изолятов *S. aureus*, персистирующих при МВ, является мультирезистентность к АБП, которая служит маркером ХСИ. При МВ 8,0% изолятов *S. aureus* были *MRSA*, а при ОПИ частота *MRSA* составила 15,3% ( $p < 0,05$ ). Все штаммы *MRSA* были чувствительными к тейкопланину, хинупрестину и ванкомицину. Исследование 65 штаммов *MRSA* продемонстрировало, что все штаммы кроме двух имели ген *mecA*, ген *mecC* не был обнаружен ни у одного штамма.

### Выявление генетического разнообразия *S. aureus*

С целью генетического разнообразия и возможных источников *S. aureus*, циркулирующих среди пациентов с МВ, проведено генотипирование методом ПЦР-ПДРФ коагулазного гена (*coa*) и RAPD - PCR. В результате рестрикции 199 штаммов распределились по 20 кластерам с количеством штаммов от 2 (10-й кластер, 12-й, 13-й и с 15-го по 20-й кластеры) до 51 штамма (Таблица 7). В 1-й кластер вошли 49 штаммов от 24 пациентов из Москвы, Хабаровского края, Красноярского края, Башкортостана, Самарской области, Ставропольского края. 2-й кластер составило 51 штамм от 24 больных МВ из разных регионов РФ (Москвы и Московской области,

Нижегородской области, Алтайского края, Красноярского края, Краснодарского края, Камчатского края, Липецкой области, Мурманской области, Санкт-Петербурга, Ставропольского края, Тамбовской области, Чувашской республики, Ямало-Ненецкого АО). Этот кластер стал самым многочисленным. 25 штаммов от 15 пациентов были *MRSA*. Среди 37,5% (ДИ: 24,2%; 53,0%) пациентов с *MRSA* выявлена колонизация генотипом 2-го кластера. Полногеномное секвенирование 4 изолятов 2-го кластера показало, что они относятся к ST8 клонального комплекса 8 (CC8) (spa тип t008 и t024). Анализ 72 штаммов *MRSA* на присутствие SCCmec-элементов выявил, что 9 штаммов имели III тип SCCmec-кассеты и 31 штамм - IV тип (9 штаммов с IVa, 1 - IVb, 21 - IVc). В остальных штаммах тип кассеты с помощью ПЦР не был идентифицирован. Штаммы *S. aureus*, содержащие PVL, не обнаружены.

**Таблица 7 - Распределение *S. aureus* по кластерам при МВ**

№ кластера	Количество штаммов <i>S. aureus</i>	Количество больных с <i>S. aureus</i>	Количество штаммов с <i>MRSA</i>	Количество больных с <i>MRSA</i>
1	49	24	3	3
2	51	24	25	15
3	20	8	0	0
4	17	8	1	1
5	16	11	7	7
6	8	7	0	0
7	3	2	0	0
8	4	2	0	0
9	3	3	3	3
10	2	2	2	2
11	5	5	5	5
12	2	2	2	2
13	2	2	0	0
14	5	2	1	1
15	2	1	1	1
16-20	2	1	0	0

Таким образом, ХСИ встречается в 53,4% при тяжелом течении МВ, у 78,4% при легком и среднетяжелом и обусловлена как циркуляцией в дыхательных путях больного конкретного генотипа, так и разными генотипами, персистирующими одновременно или сменяющими друг друга. В дыхательном тракте пациентов с МВ обнаружены сиквенс-типы *S. aureus*, характерные для населения России. Установлено, что эпидемическим для российских пациентов является *MRSA* ST8 с SCCmec IV типом. Больные МВ являются источником *MRSA*, что должно учитываться при организации специализированной и амбулаторно-поликлинической медицинской помощи.

## Выводы

1. Заболеваемость муковисцидозом в Краснодарском крае составила 11,0-15,8 на 100000 новорожденных в 2011-2018 гг., число пациентов, выявленных по неонатальному скринингу - 61% от всех наблюдающихся в 2018 году. Установлены наиболее часто встречающиеся варианты нуклеотидной последовательности гена *CFTR* пациентов с муковисцидозом в крае: F508del -62,9%, CFTRdele2,3 - 5,6%, 2184insA - 2,8%, L138ins-2,1%, G542X- 2,1%, W1282X - 2,1%, 2143delT - 1,4%. Зарегистрирована высокая частота генотипа F508del/ F508del (42,9%) и низкое число «мягких» генотипов (7,8%).
2. Клиническая характеристика пациентов с муковисцидозом Краснодарского края согласно регистрам 2011, 2015 и 2018 года по функции внешнего дыхания соответствовала общероссийским показателям, нутритивный статус до 2015 года был ниже, чем в РФ, выявлена низкая частота осложнений, что свидетельствовало о гиподиагностике последних.
3. Структура микрофлоры дыхательных путей пациентов с муковисцидозом Краснодарского края характеризовалась низкой частотой инфицирования *S. aureus*, ростом хронической инфекции, вызванной *P. aeruginosa* с 2011 по 2015 год. Наблюдается снижение чувствительности мукоидного фенотипа *P. aeruginosa* ко всем  $\beta$ -лактамным антибиотикам, включая карбапенемы (меропенем с 73% до 58%), цефалоспорины (цефтазидим с 93% до 42%, цефоперазон/сульбактам с 93% до 67%), уреидопенициллины (пиперациллин/тазобактам с 93% до 67%), а также к аминогликозидам (тобрамицин с 53% до 29%) и фторхинолонам (ципрофлоксацин с 93% до 42%).
4. Показана значимость данных регистров пациентов Краснодарского края для усовершенствования медицинской помощи. Благодаря анализу данных регистра, в крае были внедрены методы профилактики перекрестной инфекции, амбулаторный этап оказания помощи, увеличен объем муколитической терапии ( $p < 0,05$ ), что привело к снижению числа лиц с интермиттирующей инфекцией *P. aeruginosa* с 25,0% до 11,69% ( $p = 0,003$ ), повышению функции легких (прирост ОФВ<sub>1</sub> с 71,6% до 89,0%,  $p = 0,007$ ; увеличение ФЖЕЛ с 76,67% до 90,0%,  $p = 0,024$ ) на фоне снижения объема антибактериальной терапии ( $p < 0,001$ ).
5. Установлено, что хроническая стафилококковая инфекция в РФ встречается в 53,4% при тяжелом течении муковисцидоза со структурными изменениями в легких и у 78,4% у пациентов без структурных изменений. В 5% случаев *S. aureus* наблюдаются в монокультуре, в 35,3% ассоциирована с синегнойной инфекцией.
6. Штаммы *S. aureus*, выделенные у пациентов с муковисцидозом в РФ характеризуются фенотипической гетерогенностью, в том числе, по отношению к антимикробным препаратам. Препаратами выбора в терапии стафилококковой инфекции являются ингибиторзащищенные пенициллины, фторхинолоны, цефалоспорины.
7. Хроническая стафилококковая инфекция при муковисцидозе вызвана *S. aureus*, как госпитального, так и внегоспитального происхождения. Эпидемическим для

российских пациентов является штамм *MRSA* ST8 с SCCmec IV типом. Наиболее активными антимикробными препаратами в отношении *MRSA* являются ванкомицин, тейкопланин и хинупристин.

### **Практические рекомендации**

1. Регистр пациентов с МВ является для регионов инструментом повышения качества и эффективности медицинской помощи, поэтому необходима дальнейшая работа по ведению регистра в Краснодарском крае.
2. С целью профилактики перекрестной инфекции продолжить совершенствование амбулаторного этапа оказания медицинской помощи.
3. На основе изучения характеристики микробиологического пейзажа дыхательного тракта детей с МВ за период 2010-2020 годы разработаны рекомендации по антибактериальной терапии патологии дыхательного тракта в Краснодарском крае.
4. Рекомендован мониторинг *S. aureus* инфекции в связи со сменой штаммов и изменением чувствительности к антибиотикам. *MSSA* должны рассматриваться, как фактор риска дальнейшего формирования хронической *MRSA* инфекции и мультирезистентных штаммов *S. aureus*.
5. Не рекомендуется назначение антибактериальных препаратов для терапии ХСИ и, напротив, антибиотикотерапия рекомендована для терапии обострений хронического бронхита и ОРИ.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

#### **Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ:**

1. М.М. Хачиян, В.Ю. Брисин, А.А. Татульян, Е.И. Кондратьева. Анализ антибиотикорезистентности у детей на примере регионального центра муковисцидоза // Кубанский научный медицинский вестник №5(134) 2012, 73-76// DOI:10.25207/1608-6228-2014-7-77-83.
2. М. М. Хачиян, Е. И. Кондратьева, С. А. Красовский, А. В. Черняк, Е. И. Клещенко, В. Ю. Брисин. Характеристика муковисцидоза в Краснодарском Крае по данным европейского регистра за 2011 год. // Кубанский научный медицинский вестник №7 (149) 2012, 77-83// DOI:10.25207/1608-6228-2014-7-77-83.
3. Е.И. Кондратьева, С.А. Красовский, М.М. Хачиян, В.Ю. Брисин, Н.А. Ильенкова, В.В. Чикунов, Д. Э. Лягуша, А.Ю. Воронкова, А.В. Черняк, В.Д. Шерман, Ю.В.Горинова. Характеристика муковисцидоза в разных регионах России// Практическая пульмонология, №3, 2018, 20-27.
4. Л.Р. Аветисян, О.С. Медведева, М.Ю. Чернуха, И.А. Шагинян, Е.Е. Тихомиров, А.Г. Прилипов, Е.В. Русакова, М.М. Хачиян, Е.И. Кондратьева, А.Ю. Воронкова, В.Д. Шерман, С.А. Красовский, М.В. Афанасьева. Эпидемиологические и микробиологические особенности хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной *Staphylococcus aureus*// Педиатрия, журнал имени Г.Н. Сперанского, том 99, номер № 2, 2020, 102-111. (Scopus) //DOI: 10.24110/0031-403X-2020-99-2-102-111.
5. Е.И. Кондратьева, Е.В. Лошкова, М.М. Хачиян, Г.Н. Янкина, Е. Д. Николаева. Особенности течения и эрадикации полирезистентной инфекции *Pseudomonas aeruginosa* при муковисцидозе: клиническое наблюдение// Медицинский совет, № 16, 2021, 24-27.(Scopus)

### Публикации в других изданиях:

6. *Хачиян М.М.,* Брисин В.Ю., Татульян А.А., Кондратьева Е.И. Анализ антибиотикорезистентности у детей на примере регионального центра муковисцидоза// Сборник материалов XVII съезда педиатров России «Актуальные вопросы педиатрии» Москва, 14-17 февраля 2013г.С.703.
7. *М. М. Хачиян,* Е. И. Кондратьева, С. А. Красовский, А. В. Черняк, Е. И. Клещенко, В. Ю. Брисин. Микробиологический статус больных муковисцидозом в Краснодарском Крае по данным Европейского регистра за 2011 год// Сборник материалов XIII Российского конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» Москва, 21-23 октября 2014г.147-148 // DOI:10.25207/1608-6228-2014-7-77-83.
8. В.Д. Шерман, А.Ю. Воронкова, В.С. Никонова, Л.А. Шабалова, Н.Е. Шелепнева, Ю.В.Горинова, А.А. Шевлякова, Т.И. Сафонова, Т.Ю. Корнеева, Т.А. Протасова, Ю.А. Кондакова, Н.И. Романенко, И.К. Ашерова, *М.М. Хачиян,* В.Ю. Брисин, О.И. Голубцова, П.И. Павлов, Н.А. Ильенкова, В.В. Чикунов, Е.В. Бойцова, Л.Е. Коновалова, И.Д. Успенская, Л.П. Назаренко, И.И. Смирнова, О.Н. Одиноква, Г.В. Байкова, Л.С. Козырева. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации за 2011 год// Научно- практический журнал «Пульмонология» приложение № 3, 2014, 40с. //DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-3.
9. С.А.Красовский, Н.Ю.Каширская,Е.Л. Амелина, Е.И.Кондратьева, В.Д.Шерман, А.Ю.Воронкова, В.С.Никонова, А.В.Черняк, Л.А.Шабалова, Ю.В.Горинова, А.А.Шевлякова, Т.И.Сафонова, Т.Ю.Корнеева, Т.А.Протасова, Ю.А.Кондакова, Н.И.Романенко, И.К.Ашерова, *М.М. Хачиян,* В.Ю.Брисин, О.И.Голубцова, П.И.Павлов, Н.А.Ильенкова, В.В.Чикунов, Е.В.Бойцова, Л.Е.Коновалова, И.Д.Успенская, Л.П.Назаренко, Т.Е.Гембицкая, И.И. Смирнова, О.Н.Одиноква, Г.В.Байкова, Л.С.Козырева, В.В.Щадрина, Н.Б.Мерзлова, Д.Ф.Сергиенко, М.А.Скачкова, М.Г.Рыбалкина, Т.Г.Васильева, С.В.Воронин, В.Д.Дыбовская, А.А.Дьячкова, О.И.Симанова, Е.В.Стародубцева. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации за 2012 год// Научно - практический журнал «Пульмонология» приложение № 5 , 2014, 58с.// DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-5.
10. С.А. Красовский, А.В. Черняк, Н.Ю. Каширская, Е.И. Кондратьева, Е.Л. Амелина, И.К. Ашерова, Г.В. Байкова, Е.В. Бойцова, В.Ю. Брисин, Т.Г. Васильева, С.В. Воронин, А.Ю. Воронкова, О.И. Голубцова, Ю.В. Горинова, Н.А. Ильенкова, Л.С. Козырева, Ю.А. Кондакова, Л.Е. Коновалова, Т.Ю. Корнеева, Н.Б. Мерзлова, Л.П. Назаренко, В.С. Никонова, О.Н. Одиноква, П.И. Павлов, Т.А. Протасова, Н.И. Романенко, М.Г. Рыбалкина, Т.И. Сафонова, Д.Ф. Сергиенко, М.А. Скачкова, И.И. Смирнова, И.Д. Успенская, *М.М. Хачиян,* Л.А. Шабалова, В.В. Шадрина, А.А. Шевлякова, Н.Е. Шелепнева, В.Д. Шерман, В.В. Чикунов, Н.И. Капранов. Муковисцидоз в России: создание национального регистра// Педиатрия, журнал имени Г.Н. Сперанского, том 93, номер № 4, 2014, 44с.
11. S. Krasovskiy, E. Amelina, E. Kondratyeva, A. Cherniak, A. Voronkova, V. Sherman, N. Kashirskaya, N. Kapranov, L. Shabalova, V. Nikonova, I. Asherova, E. Boitsova, V. Brisin , *M.Khachiyan.* 224 Nutritional status of patients with cystic fibrosis in Russia// Journal of Cystic Fibrosis June 2015, 14(1):S116 //DOI:10.1016/S1569-1993(15)30399-4.

### Список сокращений и условных обозначений

АБП – антибактериальный препарат

АБТ – антибактериальная терапия

БП – биопленка

ГР– гипертонический раствор

ИМТ – индекс массы тела

МВ – муковисцидоз

МЗСД – муковисцидоззависимый сахарный диабет

ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха за 1 секунду

РФ – Российская Федерация

ФВД – функция внешнего дыхания

ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

ХИЛ – хроническая инфекция легких

ХСИ – хроническая стафилококковая инфекция

CFTR – ген муковисцидозного трансмембранного регулятора

CFTR – Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

MRSA – метициллин устойчивый золотистый стафилококк

MSSA – метициллин чувствительный золотистый стафилококк