

© Коллектив авторов, 2020  
УДК 579.61  
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15045>  
ISSN – 2073-8137

## **PSEUDOMONAS AERUGINOSA. АССИСТЕНТЫ И КОНКУРЕНТЫ В МИКРОБИОМЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛЕГКИХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ**

О. Л. Воронина<sup>1</sup>, Н. Н. Рыжова<sup>1</sup>, М. С. Кунда<sup>1</sup>, Е. И. Аксенова<sup>1</sup>,  
Н. А. Зигангирова<sup>1</sup>, Л. Н. Капотина<sup>1</sup>, С. А. Сайдакова<sup>1</sup>, Г. А. Данилина<sup>1</sup>,  
А. В. Лазарева<sup>2</sup>, Е. Л. Амелина<sup>3</sup>, В. П. Черневич<sup>2</sup>, О. И. Симонова<sup>2,5</sup>,  
Е. И. Кондратьева<sup>4</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1,5</sup>, А. Г. Чучалин<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup> Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова, Москва, Российская Федерация

<sup>5</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Российская Федерация

<sup>6</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Российская Федерация

## **PSEUDOMONAS AERUGINOSA. ASSISTANTS AND COMPETITORS IN THE MICROBIOME OF INFECTED OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS' LUNGS**

Voronina O. L.<sup>1</sup>, Ryzhova N. N.<sup>1</sup>, Kunda M. S.<sup>1</sup>, Aksenova E. I.<sup>1</sup>,  
Zigangirova N. A.<sup>1</sup>, Kapotina L. N.<sup>1</sup>, Saidakova S. A.<sup>1</sup>, Danilina G. A.<sup>1</sup>,  
Lasareva A. V.<sup>2</sup>, Amelina E. L.<sup>3</sup>, Chernevich V. P.<sup>2</sup>, Simonova O. I.<sup>2,5</sup>,  
Kondratyeva E. I.<sup>4</sup>, Gintsburg A. L.<sup>1,5</sup>, Chuchalin A. G.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Pulmonology Research Institute, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

<sup>5</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Federation

<sup>6</sup> N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

*Pseudomonas aeruginosa* является самым актуальным патогенным микроорганизмом при муковисцидозе (МВ). Целью работы было исследование цитотоксичности изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от российских пациентов с МВ, и анализ сопряжения наличия псевдомонадной инфекции с клиническими показателями пациентов и составом микробиоты. В выборке из 751 пациента *P. aeruginosa* выявлен у 45 %. 84 % изолятов с различными генотипами относились к ExoS-типу, характеризуя множественность и независимость источников заражения больных МВ. Выявление 7 ExoU изолятов, 5 из которых (ST235 и ST313) с высокой цитотоксичностью, подтверждает опасность инфицирования больных МВ внутрибольничными штаммами. Анализ микробиома легких показал, что *P. aeruginosa* находится в конкурентных отношениях с основными представителями «здорового» бактериома (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*), а также с микоплазмой и рядом таксонов *Proteobacteria*. Вместе с этим присутствие *P. aeruginosa* положительно коррелирует с грибами, энтеробактериями и моракселлой. Исследование сопряжения клинических показателей с составом микробиома подтверждает необходимость разработки антибактериального препарата избирательного действия в отношении патогенных для больных МВ микроорганизмов.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, цитотоксичность, микробиом, актинобактерии, грибы, спирометрия

*Pseudomonas aeruginosa* is the most relevant pathogen in cystic fibrosis (CF). The aim of our work was to study the cytotoxicity of *P. aeruginosa* isolated from Russian patients with CF and to analyze the association of the presence of pseudomonas infection with the clinical parameters of patients and the composition of the microbiota. In a cohort of 751 patients, *P. aeruginosa* was detected in 45 %. 84 % of isolates with different genotypes of the ExoS type, characterizing the multiplicity and independence of the sources of infection of CF patients. Identification of 7 ExoU isolates, 5 of which

(ST235 and ST313) had high cytotoxicity, confirms the risk of infection of CF patients with nosocomial strains. Analysis of the lung microbiome showed that *P. aeruginosa* is in competition with the main representatives of the «healthy» bacteriome (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*), as well as with mycoplasma and a number of *Proteobacteria* taxa. At the same time, the presence of *P. aeruginosa* positively correlates with fungi, enterobacteria, and moraxella. A study of the combination of clinical indicators with the composition of the microbiome confirms the need to develop an antibacterial drug of selective action against microorganisms pathogenic for patients with CF.

*Keywords:* *Pseudomonas aeruginosa*, cytotoxicity, microbiome, actinobacteria, fungi, spirometry

**Для цитирования:** Воронина О. Л., Рыжова Н. Н., Кунда М. С., Аксенова Е. И., Зигангирова Н. А., Капотина Л. Н., Сайдакова С. А., Данилина Г. А., Лазарева А. В., Амелина Е. Л., Черневич В. П., Симонова О. И., Кондратьева Е. И., Гинцбург А. Л., Чучалин А. Г. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. АССИСТЕНТЫ И КОНКУРЕНТЫ В МИКРОБИОМЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛЕГКИХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(2):186-191. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15045>

**For citation:** Voronina O. L., Ryzhova N. N., Kunda M. S., Aksenova E. I., Zigangirova N. A., Kapotina L. N., Saidakova S. A., Danilina G. A., Lasareva A. V., Amelina E. L., Chernevich V. P., Simonova O. I., Kondratyeva E. I., Gintsburg A. L., Chuchalin A. G. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. ASSISTANTS AND COMPETITORS IN THE MICROBIOME OF INFECTED OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS' LUNGS. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(2):186-191. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15045> (In Russ.)

МВ – муковисцидоз  
МОС<sub>50</sub> – максимальная объемная скорость на уровне 50 % форсированной жизненной емкости легких  
ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха в первую секунду  
CFTR – трансмембранный регулятор проводимости при муковисцидозе  
DMSO – диметилсульфоксид

ITS (Internal Transcribed Spacer) – спейсер между генами в опероне рибосомальной РНК  
MLST (MultiLocus Sequence Typing) – мультилокусное секвенирование  
OTU – операционная таксономическая единица  
ST (Sequence Type) – генотип в контексте генов MLST

**P***seudomonas aeruginosa*, известный, прежде всего, как возбудитель внутрибольничных инфекций, является самым актуальным патогенным микроорганизмом при муковисцидозе (МВ). По данным регистров больных МВ, хроническая инфицированность *P. aeruginosa* составляет от 40,8 % в Швеции до 62,2 % в Болгарии, 45,3 % в Бразилии, 44,6 % в США, 43,3 % в Израиле, 32,4 % в России [1–4], т. е. высокая вне зависимости от континента, уровня противоэпидемических мероприятий и медицинской помощи больным МВ, что позволяет предположить множественность и постоянное присутствие источников инфицирования. Международный консорциум по *P. aeruginosa* (IPC, International *P. aeruginosa* Consortium), созданный в 2014 г., взял на себя задачу коллекционирования и всестороннего исследования штаммов *P. aeruginosa* [5]. В 2019 г. базу данных 1763 геномов IPC пополнил 161 геном [6]. Такие темпы накопления данных позволили коллективу под руководством Hauser провести популяционное исследование 739 геномов [7], показавшее независимую эволюцию штаммов, секретирующих ExoU и ExoS эффекторы системы секреции III типа (T3SS). T3SS формирует структуру, пронизывающую клетку бактерии от цитоплазмы до наружной мембраны и продолжающуюся иглой для транслокации эффекторов в эукариотическую клетку [8]. Активность эффекторов ExoU – папатаин-подобной фосфолипазы А и ExoS – Rho ГТФазы и АДФ-рибозилтрансферазы приводит к некрозу или апоптозу клетки. Взаимосвязь цитотоксичности *P. aeruginosa* с эффекторами была доказана еще в 1997 г., так же как и клиническая значимость ExoU-штаммов [9]. Превалирование ExoU-изолятов в отделениях реанимации и интенсивной терапии было подтверждено Ballarini с соавт. [10], показавших также, что ExoU-тип штаммов не характерен для МВ центров.

Наше исследование было нацелено на проверку типа и уровня цитотоксичности изолятов *P. aeruginosa* у российских больных МВ, выявление тех ком-

понентов микробиоты нижних дыхательных путей, которые содействуют или препятствуют развитию псевдомонадной инфекции, а также показателей пациента, наиболее сильно сопряженных с изменениями в составе микробиоты, таких как возраст, респираторная функция и частота обострений со стороны дыхательного тракта.

**Материал и методы.** Образцы мокроты и трахеального аспирата пациентов получены из НИИ пульмонологии, НМИЦ здоровья детей, Детского клинического многопрофильного центра Московской области.

Цикл исследований биологических образцов пациентов, больных МВ и врожденным пороком развития легких, одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 1 от 17.05.2012).

Выделение ДНК из образцов проводили, как описано ранее [11]. Генотипирование микроорганизмов выполняли по методикам, обобщенным в [12]. Для выявления актинобактерий, в том числе нетуберкулезных микобактерий, амплифицировали и секвенировали фрагмент гена *groEL2*, кодирующего белок теплового шока Hsp65, с праймерами, предложенными Telenti с соавт. [13]. Для амплификации фрагментов генов схемы MLST (MultiLocus Sequence Typing) *Pseudomonas aeruginosa* (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>) модифицировали праймеры для 7 мишеней: *acsA*-F868 5'-GAGCGGGTCTTCGACTACCG, *mutL*-R984 5'-GGTGCCATAGAGGAAGTCATG-3'; *acsA*-R1408 5'-AGGAGTCGAGGATCACCAGG-3'; *nuoD*-F546 5'-CCAAGCAGGACCTGGAGCAG-3'; *aroE*-F150 5'-CTTCGAGCAGGGCAAGGGC-3'; *nuoD*-R1040 5'-ATGGCCTCGACCACCTTGTAG-3'; *aroE*-R7185'-CCAGGCCATCCAGGGTACG-3'; *pps*-F866 5'-TGAGCGACGCCGAGGTAC-3'; *gua*-F586 5'-CGCTTCGTCTCGACATCTG-3'; *pps*-R1422 5'-GTGACCGAGTTCTTGCGC-3'; *gua*-R1084 5'-CGACGTTGTGGTGCGACTTG-3'; *trpE*-F741 5'-CGTCGACGCGATGCCATC-3'; *mutL*-F438 5'-GACCAGCGTCGAGGTTCCGC-3'; *trpE*-R1320 5'-AATGGCGGTGCCATGTTGC-3'.

Для амплификации фрагментов генов *nuoD*, *acsA*, *ppsA*, *trpE* использовали программу: 95 °C – 3 мин; (95 °C – 30 с, 62 °C – 40 с, 72 °C – 1 мин) x 35; 72 °C – 5 мин; 4 °C – хранение. Для *guaA*, *mutL*, *aroE* температура отжига праймеров составила: 58 °C, 60 °C, 64 °C соответственно. При амплификации и секвенировании гена *aroE* в реакцию добавляли DMSO (5 %), при секвенировании этой мишени отжиг праймеров проводили при 60 °C.

Культуры *P. aeruginosa* выделяли, как описано ранее [14]. Для идентификации использовали MALDI-TOF масс-спектрометрию (Bruker MALDI Biotyper или MALDI-TOF-MS, в зависимости от лаборатории) и генотипирование (MLST). Новые генотипы и типированные штаммы регистрировали у куратора сайта *P. aeruginosa* PubMLST Jolley K. (номера id: 6892–6946).

Для определения генотипа ExoU/ExoS амплифицировали фрагменты генов эффекторов ExoU и ExoS системы секреции III типа по методике, предложенной Т. Аяаи с соавт. для мультиплексной ПЦР [15].

Цитотоксичность изолятов *P. aeruginosa* определяли на клетках CHO (Chinese Hamster Ovary cells) по выходу в среду инкубации фермента лактатдегидрогеназы, как описано в [16]. Время инкубации бактерий с клетками составило 5 часов при множественности инфекции 10.

Для характеристики микробиома образцов нижних дыхательных путей секвенирование гена *16S rDNA* и региона ITS1\_5.8S ITS2 и анализ результатов выполняли, как описано ранее [12]. Данные секвенирования депонировали в SRA (Sequence Read Archive) NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): BioProject accession number PRJNA544655, PRJNA590873 для микробиомов взрослых, PRJNA544933, PRJNA591432 – для микробиомов детей; PRJNA545010 – для фунгиома.

Для анализа сопряжения клинических показателей и состава микробиома использовали следующие данные выборки пациентов (95 образцов 2018 г. от 83 детей 4 мес. – 18 лет из НМИЦ здоровья детей): возраст, количество обострений в год, объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>), максимальную объемную скорость на уровне 50 % форсированной жизненной емкости легких (МОС<sub>50</sub>).

Спирометрию проводили на аппарате Master Screen (Cardinal Health) в соответствии с рекомендациями Американского торакального и Европейского респираторного обществ [17, 18], а также с Федеральными клиническими рекомендациями [19].

Для статистического анализа категориальных данных в программе XLSTAT 2019.3.2 [20] использовали таблицы сопряженности. Пациентов разделили на следующие группы: 1) по возрасту: 0–6, 7–12, 13–18 лет; 2) по степени дыхательной недостаточности в контексте ОФВ<sub>1</sub>: <40 %, 40–69 %, >70 %; 3) в контексте МОС<sub>50</sub>: <35 %, 35–70 %, >70 %; 4) по частоте обострений в год: 0–2 (редкие), 3–4 (частые), более 5 (очень частые). В группах частых и очень частых обострений количество обострений коррелировало с курсами внутривенной терапии. При редких обострениях чаще использовали таблетированные формы антибактериальных препаратов.

Нулевую гипотезу о независимости строк и столбцов таблицы сопряженности принимали или отвергали на основе критерия  $\chi^2$  Пирсона и величины уровня значимости  $p$ . Силу выявленного сопряжения проверяли на основе значений коэффициентов:  $\phi$  – коэффициентальность,  $V$  – Крамера,  $T$  – Чупрова,  $\tau$  – Гудман – Крускал (GKtau),  $\gamma$  – Гудман – Крускал,  $\tau$  – Кендалл,  $\tau$  – Стюарт.

Данные анализа микробиомов для 42 проб 19 пациентов 5 мес. – 38 лет, представленные таблицами обилия операционных таксономических единиц (ОТУ), исследовали с помощью XLSTAT 2019.3.2 [20]. Рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена и величину уровня значимости  $p$  при интервале доверия 95 % для таксонов разных филумов, присутствующих в образцах.

**Результаты и обсуждение.** В настоящее время база данных больных МВ, образцы которых прошли генотипирование микроорганизмов, насчитывает 751 пациента 1949–2019 г.р. (49 % – дети). У 45 % пациентов в нижних дыхательных путях хотя бы однократно был выявлен *P. aeruginosa* (такой же процент показал анализ детской части выборки). Для 55 изолятов было выполнено ExoU/ExoS генотипирование. 84 % культур относились к ExoS-типу, 7 культур к ExoU, в одном изоляте были обнаружены гены обоих эффекторов, в одном – отсутствовали оба гена. 7 культур ExoU-типа относились к 4 ST (3 – ST313, 2 – ST235, 1 – ST207, 1 – ST446). Цитотоксичность изолятов ST313, 235 составила 86–99 %, а изолятов ST207 и 446 – 6,5 и 0 % соответственно. Штаммы всех 4 генотипов известны как внутрибольничные, наиболее широко распространенным является ST235. Среди 3361 ST, зарегистрированных в *P. aeruginosa* PubMLST, этот генотип составляет 3,5 %. Для изолятов ExoS-типа (46 изолятов, 27 ST) цитотоксичность была существенно ниже, а у 40 % отсутствовала. Среднее значение цитотоксичности оставшихся 60 % изолятов ExoS составило 16 %, максимальное – 70 %. Таким образом, типичные внутрибольничные ExoU штаммы обнаружены лишь у отдельных пациентов с МВ, но их высокая цитотоксичность вызывает настороженность.

Взаимосвязь цитотоксичности *P. aeruginosa* и возраста пациентов мы оценили на выборке из 40 изолятов, представленных на рисунке 1. Как видно из данных рисунка, изоляты ExoU проявляют высокую цитотоксичность у пациентов разного возраста. Для изолятов ExoS отмечена тенденция роста цитотоксичности с возрастом пациентов до 24 лет с последующим снижением.

В микробиоценозе легких *P. aeruginosa* сосуществует с разными микроорганизмами. Взаимосвязь *P. aeruginosa* и представителей царства грибов оценили на выборке 95 образцов от 83 детей. Положительную корреляцию между присутствием грибов и *P. aeruginosa* подтвердил  $\chi^2=7,7$  (степень свободы,  $df=1$ ,  $p=0,006$ ), скорректированные отклонения составили 2,775. Следует отметить, что грибы, выявляемые молекулярными методами, относятся не только к традиционным для больных МВ классам аскомицетов *Eurotiomycetes* (*Aspergillus* spp.), *Saccharomycetes* (*Candida* spp.), но и таким, как *Ascomycetes* (*Exophiala dermatidis*), *Dothideomycetes* (*Phoma* spp., *Didymella* spp.), *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum*). В нашей выборке выявлены также базидиомицеты класса *Agaricomycetes*, например *Fomitopsis pinicola*, *Schizophyllum commune*. Последний (щелестник обыкновенный) известен с 1950 г. как возбудитель аллергического бронхолегочного микоза [21]. Массовое параллельное секвенирование позволяет определить весь спектр грибов в образце. Например, для образца 19N9, помимо доминирующего *Aureobasidium pullulans*, были выявлены представители следующих родов аскомицетов, присутствовавшие более чем в 1 % в фунгиоме: *Sarea*, *Oleoguttula*, *Candelariella*, *Exophiala*, *Xanthoria*.

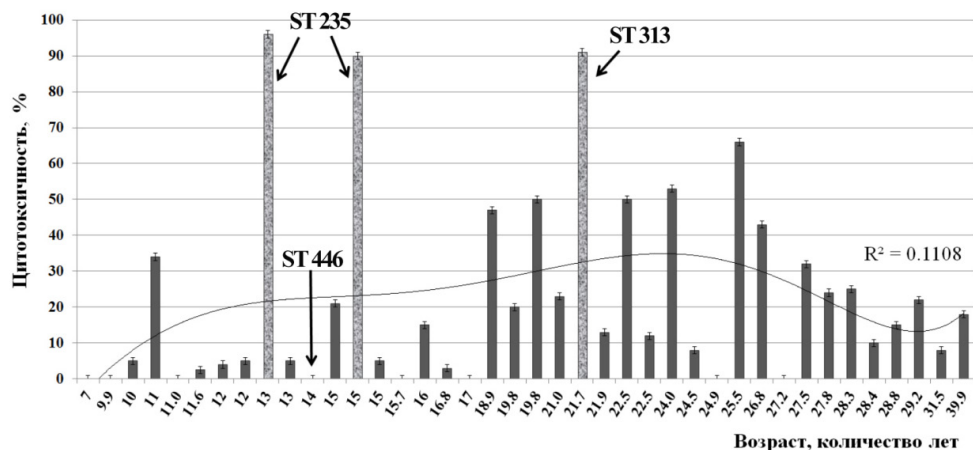


Рис. 1. Цитотоксичность изолятов *P. aeruginosa* у пациентов разного возраста с МВ: изоляты с эффектом *EcoU* – текстура; изоляты с эффектом *EcoS* – серая заливка. Для изолятов *EcoU* обозначены генотипы

Динамику изменения сообщества бактерий в образцах пациентов, у которых когда-либо выявляли *P. aeruginosa*, мы также оценили методом массового параллельного секвенирования. Анализ 42 проб пациентов 5 мес. – 38 лет показал отрицательную корреляцию между *P. aeruginosa* и *Actinobacteria* (коэффициент Спирмена = -0,503,  $p=0,001$ ), *Bacteroidetes* (-0,747,  $p<0,0001$ ), *Firmicutes* (-0,549,  $p=0,0002$ ), *Mycoplasma* (-0,381,  $p=0,013$ ) и рядом представителей *Proteobacteria*: *Campylobacter* (-0,400,  $p=0,009$ ), *Neisseriaceae* (-0,367,  $p=0,017$ ), *Haemophilus* (-0,356,  $p=0,021$ ), *Curvibacter* (-0,313,  $p=0,044$ ). Положительную корреляцию наблюдали между *P. aeruginosa* и двумя таксонами *Proteobacteria*: *Enterobacteriaceae* (0,333,  $p=0,032$ ) и *Moraxellaceae* (без *Acinetobacter*) (0,651,  $p<0,0001$ ).

Таким образом, *P. aeruginosa* находится в конкурентных отношениях с основными представителями «здорового» бактериома, а также с микоплазмой и рядом таксонов *Proteobacteria*, однако присутствие *P. aeruginosa* положительно коррелирует с грибами, энтеробактериями и моракселлой.

Для оценки сопряжения состава микробиома и показателей пациентов определили преобладающие бактерии в микробиомах выборки 95 образцов от 83 детей. Ими оказались *Proteobacteria*, *Firmicutes* (без *Staphylococcus*), *Prevotella*, *Staphylococcus*. Как видно из рисунка 2, с возрастом снижается количество пациентов с преобладающими *Firmicutes* и *Prevotella*, но возрастает число больных МВ с *Proteobacteria* и *Staphylococcus*. Наиболее сильное сопряжение с возрастом отмечено для трех таксонов, что подтверждают показатели скорректированных отклонений (остатков).

Число обострений хронического бронхолегочного процесса также ассоциировано с составом микробиома. Наиболее сильную отрицательную корреляцию продемонстрировали *Firmicutes*, количество детей с этим преобладающим таксоном рез-

ко снижается в группах частых и очень частых обострений. Пациенты с *Prevotella* есть только в группах с редкими и частыми, но не с очень частыми обострениями. Максимальное количество детей с преобладающими *Proteobacteria* сосредоточено в группе частых обострений. Для преобладающего *Staphylococcus* показана сильная положительная ассоциация с очень частыми обострениями.

Ассоциацию показателей респираторной функции с составом микробиома наиболее

ярко отражают 2 параметра: ОФВ<sub>1</sub> и МОС<sub>50</sub>. *Firmicutes* демонстрируют сильную положительную ассоциацию с легкой степенью бронхиальной обструкции (МОС<sub>50</sub>>70 %, ОФВ<sub>1</sub> >70 %). С умеренными и низкими значениями ОФВ<sub>1</sub> и МОС<sub>50</sub> корреляция *Firmicutes* отрицательная. *Proteobacteria*, напротив, имеют сильную отрицательную корреляцию с ОФВ<sub>1</sub> >70 %. Значения стандартизованных скорректированных остатков доказывают сильную положительную связь *Proteobacteria* с низкими значениями МОС<sub>50</sub>. И, наконец, *Staphylococcus* имеют самый высокий коэффициент, подтверждающий ассоциацию с низкими значениями МОС<sub>50</sub> и ОФВ<sub>1</sub> и отрицательную корреляцию с более высокими показателями функции внешнего дыхания.

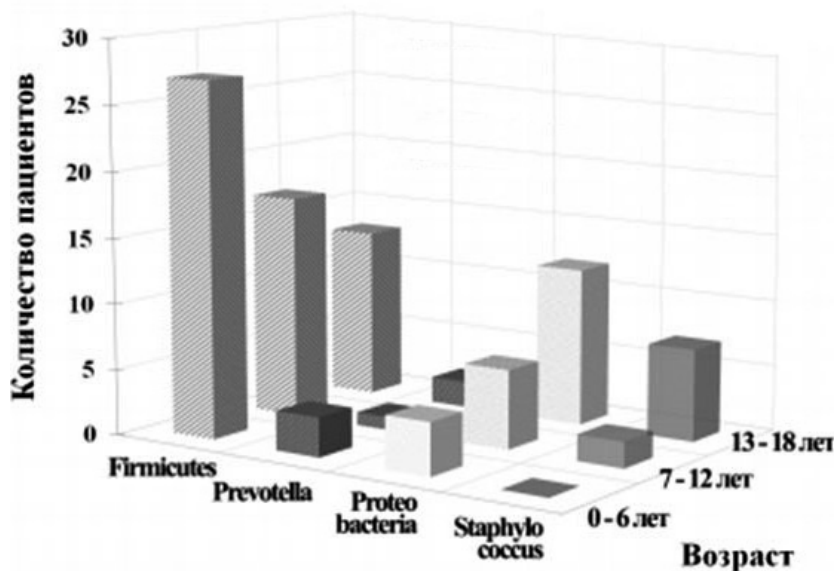


Рис. 2. Диаграммы результатов сопряжения преобладающего микроорганизма в микробиоме нижних дыхательных путей и возраста пациента

Рассмотрим, как меняется состав микробиома с возрастом, на примере пациента 48CF (рис. 3) с мутациями II/V класса в гене *CFTR*. Ранее на выборке взрослых пациентов мы показали достоверное отличие в составе микробиома у пациентов с мутациями II/II класса по сравнению с больными МВ с мутациями II/V класса [12]. Синтез полноценного *CFTR*, пусть

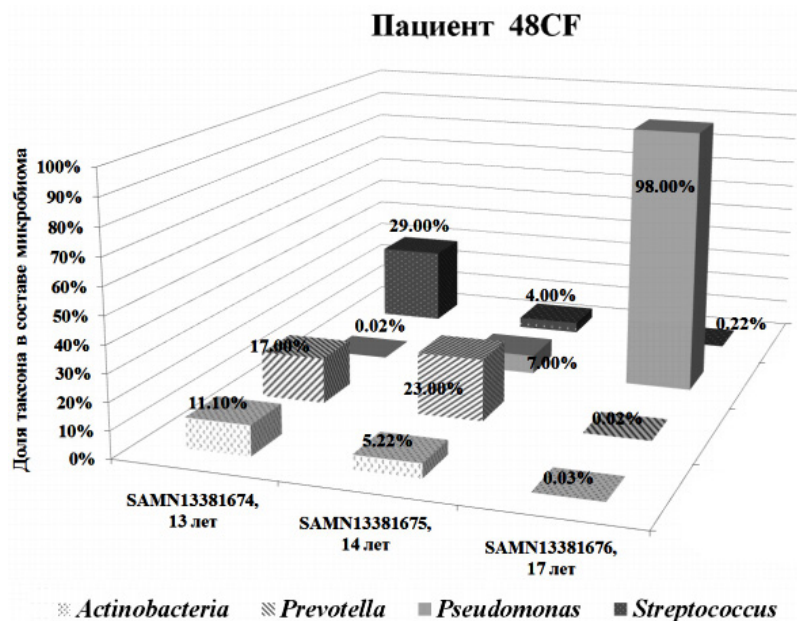


Рис. 3. Возрастные изменения в микробиоме пациента 48CF.

Примечание: SAMN13381674, SAMN13381675 и SAMN13381676 – номера образцов в биопроекте PRJNA591432, зарегистрированном в GenBank NCBI

и в сниженном количестве при мутации V класса, благотворно влияет на микробиоту легких до определенного возраста. На диаграмме можно видеть, что в образце 13-летнего пациента *Streptococcus*, *Prevotella* и *Actinobacteria* были в достаточном количестве, а *P. aeruginosa* отсутствовал. В 14 лет снизилось количество *Streptococcus* и *Actinobacteria*, возросла доля *Prevotella* и появился *P. aeruginosa*. Через 3 года *P. aeruginosa* превалировал в микробиоме, а бактерии остальных таксонов практически отсутствовали. Заметим, что у больных МВ с мутациями II/II класса *P. aeruginosa*, как преобладающий в микробиоме, выявляли уже в 3 (пациент 25N1) и 6 (24N4) месяцев, а с мутациями II/IV – в 3 года (38N22).

**Заключение.** *P. aeruginosa*, обнаруженный у 45 % выборки пациентов с МВ, преимущественно представлен ExoS штаммами разнообразных генотипов, что свидетельствует о независимых и множественных источниках заражения российских пациентов. Однако 7 выявленных ExoU изолятов, 5 из которых (ST235 и ST313) характеризуются высокой цитотоксичностью, подтверждают опасность инфи-

цирования больных МВ внутрибольничными штаммами при госпитализации.

В микробиоме нижних дыхательных путей *P. aeruginosa* находится в конкурентных отношениях с *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Mycoplasma* и некоторыми протеобактериями. В то же время энтеробактерии и моракселла, а также представители царства грибов положительно коррелируют с *P. aeruginosa*.

Высокое разнообразие как аско-, так и базидиомицетов, выявляемых молекулярными методами у пациентов с МВ, побудило создать в рамках ECFS (European Cystic Fibrosis Society) рабочую группу «ECFS Fungal Pathogen Working Group» (<https://www.ecfs.eu/ecfs-fungal-pathogens-wg>), в задачу которой входит разработка методик выявления, анализ влияния грибов на клинические параметры, отработка схем терапии. Однако дилемма «лечить или оставить» пока не разрешена в отношении грибов, о чем свидетельствует даже название статьи, опубликованной рабочей группой [22].

В отношении применения антибактериальных препаратов широкого спектра действия при МВ тоже есть сомнения. Снижение доли бактерий «здоровой» части микробиома с возрастом пациентов является, в том числе, результатом длительной антибиотикотерапии. Как показали наши предыдущие исследования микробиома больных МВ детского возраста, антибиотики и при стабильном состоянии пациента, и при обострении приводят к снижению доли *Actinobacteria* и *Bacteroidetes* [23], сокращая тем самым количество конкурентов *P. aeruginosa*. *Firmicutes* дольше выдерживают курсы антибиотикотерапии, поэтому *Staphylococcus* и может составлять конкуренцию *P. aeruginosa* даже у пациентов с очень частыми обострениями.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости разработки нового антибактериального препарата избирательного действия в отношении патогенных для больных МВ микроорганизмов.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

## Литература/References

- European Cystic Fibrosis Society Patient Registry Annual Data Report 2017. Zolin A., Orenti A., Naehrlich L., van Rens J., Fox A. [et al.]. 2019. Available at: <https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/annual-reports>. Accessed January 21, 2020.
- Cystic Fibrosis Foundation (US) Patient Registry Annual Data Report 2017. Available at: <https://www.cff.org/>. Accessed January 21, 2020.
- Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry 2011 Annual Report. Available at: <http://www.cysticfibrosisdata.org/data-registry/brazilian-cystic-fibrosis-registry>. Accessed January 21, 2020.
- Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2017 год. Под ред. А. Ю. Воронковой, Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой, С. А. Красовского [и др.]. М.: ИД Медпрактика-М, 2019. [Registry of Cystic Fibrosis Patients in the Russian Federation 2017 year. Ed. by Voronkova A. Y., Amelina E. L., Kashirskaya N. Y., Kondratyeva E. I., Krasovsky S. A. [et al.]. M.: ID Medpraktika-M, 2019. (In Russ.)].
- Freschi L., Jeukens J., Kukavica-Ibrulj I., Boyle B., Dupont M. J. [et al.]. Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front. Microbiol.* 2015;6:1036. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01036>
- Jeukens J., Emond-Rheault J. G., Freschi L., Kukavica-Ibrulj I., Levesque R. C. Major Release of 161 Whole-Genome Sequences from the International *Pseudomonas* Consortium Database. *Microbiol. Res. Ann.* 2019;8(13):e00013-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00013-19>
- Ozer E. A., Nnah E., Didelot X., Whitaker R. J., Hauser A. R. The Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Is Characterized by Genetic Isolation of exoU+ and exoS+ Lineages. *Genome Biol. Evol.* 2019;11(1):1780-1796. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz119>
- Finck-Barbançon V., Goranson J., Zhu L., Sawa T., Wiener-Kronish J. P. [et al.]. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* 1997;25(3):547-557. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4891851.x>

9. Enninga J., Rosenshine I. Imaging the assembly, structure and activity of type III secretion systems. *Cell Microbiol.* 2009;11(10):1462-1470. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01360.x>
10. Ballarini A., Scalet G., Kos M., Cramer N., Wiehlmann L. [et al.]. Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonucleotide-microarray. *BMC Microbiol.* 2012;12:152. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-152>
11. Voronina O. L., Kunda M. S., Ryzhova N. N., Aksenova E. I., Sharapova N. E. [et al.]. On Burkholderiales Order Microorganisms and Cystic Fibrosis in Russia. *BMC Genomics.* 2018,19(Suppl 3):74. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4472-9>
12. Voronina O. L., Ryzhova N. N., Kunda M. S., Loseva E. V., Aksenova E. I. [et al.]. Characteristics of the Airway Microbiome of Cystic Fibrosis Patients. *Biochemistry.* 2020;85(1):1-10. <https://doi.org/10.1134/S0006297920010010>
13. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E. C. [et al.]. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31(2):175-178.
14. Симонова О. И., Воронина О. Л., Горинова Ю. В., Амелина Е. Л., Буркина Н. И. [и др.]. Особенности лечения пациента с муковисцидозом при смешанном микробном инфицировании органов дыхания, в том числе *Pandoraea pnomenus*. *Российский педиатрический журнал.* 2016;19(2):113-122. [Simonova O. I., Voronina O. L., Gorinova Yu. V., Amelina E. L., Burkina N. I. [et al.]. Features of the treatment of the cystic fibrosis patient with mixt microbial respiratory infection, including *Pandoraea pnomenus*. *Rossiiskij pediatricheskij zhurnal. – Russian pediatric journal.* 2016;19(2):113-122. (In Russ.)]
15. Ajayi T., Allmond L. R., Sawa T., Wiener-Kronish J. P. Single-nucleotide polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(8):3526-3531.
16. Sheremet A. B., Zigangirova N. A., Zayakin E. S., Luyksaar S. I., Kapotina L. N. [et al.]. Small Molecule Inhibitor of Type Three Secretion System Belonging to a Class 2,4-disubstituted-4H-[1,3,4]-thiadiazine-5-ones Improves Survival and Decreases Bacterial Loads in an Airway *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice. *Biomed. Res. Int.* 2018;2018:5810767. <https://doi.org/10.1155/2018/5810767>
17. Quanjer P. H., Stanojevic S., Cole T. J., Baur X., Hall G. L. [et al.]. ERS Global Lung Function Initiative. ERS TASK FORCE REPORT. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur. Respir. J.* 2012;40:1324-1343.
18. Quanjer P. H., Stanojevic S., Cole T. J., Stocks J. Implementing GLLI-2012 regression equations. Available at: <http://www.ers-education.org/guidelines/global-lung-function-initiative/gli-2012-explained.aspx>. Accessed January 21, 2020.
19. Чучалин А. Г., Айсанов З. П., Чикина С. Ю., Черняк А. В., Калманова Е. Н. Федеральные клинические рекомендации Российского респираторного общества по использованию метода спирометрии. *Пульмонология.* 2014;(6):11-24. [Chuchalin A. G., Aysanov Z. P., Chikina S. Yu., Chernyak A. V., Kalmanova E. N. Federal guidelines of Russian Respiratory Society on spirometry. *Pul'monologiya. – Russian Pulmonology.* 2014;(6):11-24. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2017-0-3>
20. Addinsoft. XLSTAT statistical and data analysis solution. New York, USA. (2019). Available at: <https://www.xlstat.com>. Accessed January 21, 2020.
21. Chowdhary A., Randhawa H. S., Gaur S. N., Agarwal K., Kathuria S. [et al.]. *Schizophyllum commune* as an emerging fungal pathogen: a review and report of two cases. *Mycoses.* 2013;56(1):1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02190.x>
22. Singhal A., Ralhan A., Schwarz C., Hartl D., Hector A. Fungal Pathogens in CF Airways: Leave or Treat? *Mycopathologia.* 2018;183(1):119-137. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0184-y>
23. Рыжова Н. Н., Воронина О. Л., Лосева Э. В., Аksenova E. I., Кунда М. С. [и др.]. Микробиом респираторного тракта детей с муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение.* 2019;(2):19-28. [Ryzhova N. N., Voronina O. L., Loseva E. V., Aksenova E. I., Kunda M. S. [et al.]. Respiratory tract microbiome in children with cystic fibrosis. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie. – Siberian Medical Review.* 2019;(2):19-28. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.20333/2500136-2019-2-19-28>

#### Сведения об авторах:

Воронина Ольга Львовна, кандидат биологических наук, доцент, заведующая лабораторией; тел.: 89162248683; e-mail: olv550@gmail.com; ORCID: 0000-0001-7206-3594

Рыжова Наталья Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; тел.: 89491933001; e-mail: rynatalia@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-5361-870X

Кунда Марина Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; тел.: 89491933001; e-mail: markunda99@gmail.com; ORCID: 0000-0003-1945-0397

Аксенова Екатерина Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; тел.: 89491933001; e-mail: aksenova16@gmail.com; ORCID: 0000-0003-2704-6730.

Зигангирова Наиля Ахатовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом; тел.: 89491933001; e-mail: zigangirova@mail.ru; ORCID: 0000-0001-6719-9403

Капотина Лидия Николаевна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник; тел.: 89491933001; e-mail: lidiya.kapotina57@mail.ru; ORCID: 0000-0003-0159-5053

Сайдакова Станислава Андреевна, младший научный сотрудник; тел.: 89491933001; e-mail: 19ctasy94@mail.ru; ORCID: 0000-0002-5157-1415

Данилина Галина Алексеевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник; тел.: 89491933001; e-mail: gala-dan@mail.ru

Лазарева Анна Валерьевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией; тел.: 84959671420; e-mail: annalaz71@mail.ru; ORCID: 0000-0001-7149-5387

Амелина Елена Львовна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией; тел.: 84953956393; e-mail: eamelina@mail.ru; ORCID: 0000-0002-5356-9415

Черневич Вера Петровна, младший научный сотрудник; e-mail: verikin@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-6529-958X

Симонова Ольга Игоревна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением; тел.: 84959671420; e-mail: oisimonova@mail.ru; ORCID: 0000-0002-2367-9920

Кондратьева Елена Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела; тел.: 84951110303; e-mail: elenafpk@mail.ru; ORCID: 0000-0001-6395-0407

Гинцбург Александр Леонидович, доктор биологических наук, академик РАН; тел.: 89491933001; e-mail: gintsburg@gamaleya.org; ORCID: 0000-0002-6182-3866

Чучалин Александр Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН; тел.: 84997850608; e-mail: chuchalin@inbox.ru