

© АВЕТИСЯН Л. Р., ЧЕРНУХА М. Ю., ШАГИНЯН И. А., МЕДВЕДЕВА О. С., БУРМИСТРОВ Е. М., РУСАКОВА Е. В., ЖУХОВИЦКИЙ В. Г., ПОЛЯКОВ Н. Б., КОЗЛОВА Е. А., БУДЗИНСКИЙ Р. М.

УДК. 579.61

DOI: 10.20333/2500136-2019-2-70-79

ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Л. Р. Аветисян¹, М. Ю. Чернуха¹, И. А. Шагинян¹, О. С. Медведева¹, Е. М. Бурмистров¹, Е. В. Русакова¹, В. Г. Жуховицкий¹, Н. Б. Поляков¹, Е. А. Козлова¹, Р. М. Будзинский²

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва 123098, Российская Федерация

² Медико-генетический научный центр, Москва 115522, Российская Федерация

Цель исследования. Обосновать применение комплексного подхода с использованием современных методов идентификации микроорганизмов для микробиологической диагностики ХИЛ у больных муковисцидозом и подтвердить его эффективность.

Материал и методы. Исследованы 2300 мазков из зева и образцов мокроты от больных МВ и штаммы *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bcc* и *Achromobacter spp.*, выделенные от больных МВ с 2006 по 2018гг. Использовали бактериологические, биохимические и молекулярно-генетические методы, а также MALDI-TOF.

Результаты. Показано, что применение только классических бактериологических методов не обеспечивают достоверную этиологическую диагностику. Установлено, что наиболее трудно с помощью бактериологических методов является идентификация бактерий *Achromobacter spp.* и *Burkholderia cepacia complex*. В результате исследования с помощью MALDI-BIOTYPERTM был идентифицировано 90 видов бактерий, которые были выделены из зева и мокроты больных муковисцидозом. Изоляты *Achromobacter spp.*, выделенные от российских больных МВ, с помощью MALDI-BIOTYPERTM были отнесены к *A. ruhlandii*, *A. xylosoxidans*, *A. insolitus*, *A. piechaudii*, *A. insuavis*, *A. spanius*, среди которых 76 % принадлежали к виду *A. ruhlandii* и 7,2 % к виду *A. xylosoxidans*. Для дифференциации бактерий *Bcc* и *Achromobacter spp.* до вида необходимо использовать мультилокусное секвенирование (MLST) или однолокусное секвенирование генов *nrda765*, *gltB*, *blaOXA* (для *Achromobacter spp.*) и *gyrB*, *hisA*, *fur* (для *Bcc*). С помощью MLST среди изолятов *Burkholderia cepacia complex* (*Bcc*) были идентифицированы 4 вида: *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. contaminans* и *B. multivorans*. Из них 83,3 % принадлежали к виду *B. cenocepacia*. В результате MLST штаммов *P. aeruginosa* удалось установить, что среди больных МВ циркулирует международный эпидемический клон – ST235, который был причиной госпитальных инфекций в медицинских учреждениях различных стран. MLST позволило выявить генотипы *B. cenocepacia* ST709 и ST208, *A. ruhlandii* ST36 и *S. aureus* ST8 и подтвердить их эпидемическую значимость для больных МВ в России.

Заключение. Комплексный подход с использованием MALDI-TOF, амплификации и секвенирования специфических генов, 16S rRNA секвенирования, MLST и секвенирования полного генома (WGS) позволяет идентифицировать возбудителей с максимальной достоверностью, а также установить их эпидемическую значимость.

Ключевые слова: муковисцидоз, хроническая инфекция легких, микробиологическая диагностика, MALDI-TOF, молекулярно-генетические методы, комплексный подход.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Аветисян ЛР, Чернуха МЮ, Шагинян ИА, Медведева ОС, Бурмистров ЕМ, Русакова ЕВ, Жуховицкий ВГ, Поляков НБ, Козлова ЕА, Будзинский РМ. Применение современных методов в микробиологической диагностике хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(2):70-79. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-70-79

APPLICATION OF MODERN METHODS IN MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF CHRONIC INFECTION OF LUNGS IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

L. R. Avetisyan¹, M. Yu. Chernukha¹, I. A. Shaginyan¹, O. S. Medvedeva¹, E. M. Burmistrov¹, E. V. Rusakova¹, V. G. Zhukhovitsky¹, N.B. Polyakov¹, E.A. Kozlova¹, R. M. Budzinskiy²

¹N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow 123098, Russian Federation

² Research Centre for Medical Genetics, Moscow 115522, Russian Federation

The aim of the research is to justify the use of integrated approach, using modern methods of identification of microorganisms for microbiological diagnosis of chronic infection of lungs in patients with cystic fibrosis and to confirm its effectiveness.

Material and methods. 2300 throat swabs and sputum samples from patients with CF and *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bcc* and *Achromobacter spp.* strains, received from patients with CF during 2006 – 2018, were examined. Bacteriological, biochemical and molecular genetic methods, as well as MALDI-TOF were used.

Results. It has been proved that the use of only classical bacteriological methods does not provide reliable etiological diagnosis. It is found that using identification of bacteria *Achromobacter* spp. and *Burkholderia cepacia* complex by means of bacteriological methods is the most difficult. As a result of the study, 90 species of bacteria were identified using MALDI-BIOTYPERTm, which were taken from pharynx and sputum of patients with CF. *Achromobacter* spp. isolates, taken from Russian patients with CF, using MALDI-BIOTYPERTm, were considered to be *A. ruhlandii*, *A. xylosoxidans*, *A. insolitus*, *A. piechaudii*, *A. insuavis*, *A. spanius*, 76 % among which belonged to *A. ruhlandii* species and 7.2 % – to *A. xylosoxidans* species. To differentiate *Bcc* and *Achromobacter* spp. bacteria up to the species, it is necessary to use multilocus sequencing (MLST) or single-locus sequencing of *nrdA765*, *gltB*, *blaOXA* genes (for *Achromobacter* spp.) and *gyrB*, *hisA*, *fur* (for *Bcc*). Using MLST the following 4 species were identified among *Burkholderia cepacia* complex (*Bcc*) isolates: *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. contaminans* and *B. multivorans*. 83.3 % of which belonged to *B. cenocepacia* species. MLST strains of *P. aeruginosa* made it possible to establish the fact that there was an international epidemic clone, ST235, circulating among CF patients, which caused hospital infections in medical institutions in various countries. MLST helped to reveal genotypes of *B. cenocepacia* ST709 and ST208, *A. ruhlandii* ST36 and *S. aureus* ST8 and to confirm their epidemic significance for CF patients in Russia.

Conclusion. Integrated approach using MALDI-TOF, amplification and sequencing of specific genes, 16S rRNA sequencing, MLST and full genome sequencing (WGS) allows to identify pathogens with maximum confidence, as well as their epidemiological significance.

Key words: cystic fibrosis, chronic lung infection, microbiological diagnostics, MALDI-TOF, molecular genetic methods, integrated approach.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Avetisyan LR, Chernukha MYu, Shaginyan IA, Medvedeva OS, Burmistrov EM, Rusakova EV, Zhukhovitsky VG, Polyakov NB, Kozlova EA, Budzinskiy RM. Application of modern methods in microbiological diagnosis of chronic infection of lungs in patients with cystic fibrosis. *Siberian Medical Review*.2019;(2):70-79. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-70-79

Введение

Хроническая инфекция легких (ХИЛ), которая диагностируется у 9,5 % детей в возрасте до 1 года, а к 18 годам – у 80 % больных муковисцидозом (МВ), является основным фактором, определяющим тяжесть клинического течения и прогноз заболевания у больных муковисцидозом [1]. В связи с этим, контроль инфекционного процесса при МВ, включающий предупреждение инфицирования, колонизации и формирования хронической инфекции нижних дыхательных путей, а также предупреждение обострения и развития цепадия-синдрома, является одним из основных направлений в борьбе с инфекционными осложнениями у больных МВ.

Для контроля инфекционного процесса при МВ необходим постоянный микробиологический мониторинг, в основе которого лежит лабораторная диагностика. Точная и своевременная идентификация возбудителей ХИЛ у больных МВ имеет большое значение для своевременного начала лечения соответствующими антибиотиками и организации надлежащего инфекционного контроля для профилактики распространения патогенных микроорганизмов среди больных МВ.

В настоящее время в России не все бактериологические лаборатории, используя стандартные схемы исследования материала из дыхательных путей, способны проводить точную микробиологическую диагностику. Трудности в диагностике обусловлены тем, что микробная флора дыхательных путей у таких больных представлена часто ассоциациями. Анализ историй болезней 114 больных МВ детей показал, что при 191 микробиологическом обследовании в 59,4 % случаях наблюдали ассоциации из различных видов бактерий [1]. Сложность диагностики обусловлена также тем, что ряд видов, вызывающих ХИЛ у больных МВ, могут проявлять атипичные для своего вида фенотипические свойства, например, фенотип мелких колоний *S. aureus*, *S. maltophilia* и *P. aeruginosa*

[2], отсутствие лецитиназной активности у *S. aureus*, отсутствие пигмента у *P. aeruginosa* и др. [3] Кроме того, часто происходит ложная идентификация некоторых близкородственных неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов (НФМО) биохимическими тестами или анализаторами из-за схожести фенотипических свойств. Была определена точность идентификации НФМО для четырех различных коммерческих тест систем, которая составляла 57 – 80 %, а точность идентификации бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* (*Bcc*) 43 – 86 % [4]. Сравнение результатов идентификации НФМО с помощью тест системы API 20NE 88 с результатами секвенирования 16S rDNA, показали, что точность идентификации НФМО с помощью биохимических тестов составляла 17 % [5].

В связи с этим возникает необходимость применения различных методов как классических бактериологических, так и новых молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методов идентификации микроорганизмов, позволяющих рационально и максимально достоверно провести диагностику смешанной хронической инфекции легких.

Цель данной работы: обосновать применение комплексного подхода с использованием современных методов идентификации микроорганизмов для микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных муковисцидозом и продемонстрировать его эффективность.

Материал и методы

В работе с больными соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (Сеул, 2008). Все участники /законные их представители добровольно подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования утвержден этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Минздрава России.

За период с 2008 по 2018 было исследовано 2300 мазков из зева и образцов мокроты от больных МВ. Материалом исследования также были штаммы *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bcc* и *Achromobacter spp.* из собранной в лаборатории коллекции, которые были выделены от больных МВ в период с 2006 по 2018 гг.

Культуральный метод идентификации включал посев материала на универсальные питательные среды – 5 % кровяной агар и шоколадный агар, селективные среды – желточно-солевой агар (ЖСА), среду Эндо и среду Сабуро, цетримидный агар и BCSA (*Burkholderia cepacia* селективный агар). Посевы инкубировали при 35-37°C в течение 24-48 часов. Для выявления медленно растущих микроорганизмов (некоторых НФМО) инкубацию увеличивали при комнатной температуре до 5-7 суток. После выделения чистой культуры дальнейшую идентификацию выделенной культуры проводили с использованием стандартных схем идентификации и различных биохимических тест-систем (Enterо 24 “Lachema”, API 20NE “BioMerieux”, StaphyloTest 16 “Lachema”, BioMerieux API Staph и др.) согласно инструкции производителя, а также с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии (технология MALDI-BIOTYPERS™) (MALDI – matrix-assisted laser desorption ionization или метод «матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации») и молекулярно-генетическими методами.

Пробоподготовку и масс-спектрометрический анализ проводили как описано в статье М. Ю. Чернуха и соавт. [6].

Для выделения ДНК из культуры и из клинического материала использовали набор «ДНК-сорб-А» или «ДНК-сорб-В» (Амплисенс). Для идентификации бактерий с помощью ПЦР использовали праймеры BCR1–BCR2 — для *Bcc*, Burkf (f)–CeMuVi-16-2 – универсальный для *Bcc*, *Achromobacter spp.* и *S. maltophilia*, SM1-SM4 – *S. maltophilia*, AX-F1 – AX-B1 – *Achromobacter spp.*, PA-SS-F-PA-SS-R – *P. aeruginosa* и clfA-clfA1 – *S. aureus*.

Результаты ПЦР регистрировали с помощью электрофореза в 1,5 % – 2 % агарозном геле, приготовленном на 1-кратном трис-ацетатном (1xTAE) буфере.

Мультилокусное секвенирование *P. aeruginosa* проводили по методике В. Curran et al. [7]. Для проведения MLST *Bcc* использовали модифицированную схему Т. Spilker et al. [8]. Секвенирование 16S rDNA проводили как описано в статье О. Л. Воронина и др. [9].

Полногеномное секвенирование (WGS) *S. aureus*, *Bcc*, *P. aeruginosa*, *Achromobacter spp.* проводили на платформе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit и чипами 316v1 (Life Technologies Thermo Fisher, США) по протоколу производителя. (www.thermofisher.com/ru/ru/home/references/protocols.html).

Результаты и обсуждение

Для установления диагноза хронической инфекции обязательным является неоднократное в течение 6 месяцев обнаружение патогена в биологическом материале из дыхательных путей. При этом «золотым

стандартом» является культуральный метод – посев на питательные среды, выделение чистой культуры и дальнейшая идентификация.

Для выделения чистой культуры из биологического материала, кроме приведенных в приказе сред, мы использовали специальные селективные среды для выделения *Bcc* и *P. aeruginosa* – BCSA и цетримидный агар. BCSA применяли для выделения и учета бактерий *Bcc*, так как на 5 % кровяном агаре при низких концентрациях *Bcc* в материале и наличии ассоциаций из различных видов микроорганизмов бактерии *Bcc* невозможно выделить. В 35 % случаев бактерии *Bcc* нами были выявлены только на среде BCSA: на среде Эндо и кровяном агаре даже после длительной инкубации бактерии *Bcc* не выросли. Исследование, проведенное в США, показало, что 14 из 15 (95 %) лабораторий, которые использовали BCSA, выделяли *Bcc* из образцов мокроты, в то время как из 100 лабораторий, которые не использовали в своей работе селективную среду, только 22 (22 %) выделяли бактерии *Bcc* ($p < 0,0001$) [10].

Эти данные показывают необходимость использования BCSA при исследовании биоматериала от больных МВ. Кроме того, на BCSA мы выделяли также *Burkholderia gladioli*, *S. maltophilia*, *Serratia marcescens* и *Achromobacter spp.*, устойчивые к колистину. После выделения чистой культуры проводили исследование микроорганизмов с использованием фенотипических методов по принятым схемам, в основе которых лежат бактериоскопическое и биохимическое исследование с использованием различных сред, тест-систем и бактериологических анализаторов. Применение только классических фенотипических методов (бактериоскопических и бактериологических) позволяют легче всего нам удалось идентифицировать грамположительные кокки, *Enterobacteriaceae*, некоторые НФМО, такие как *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* и *Acinetobacter spp.*, за исключением атипичных по фенотипу бактерий. Например, в наших исследованиях 2 штамма атипичной *P. aeruginosa*, 5 штаммов *S. maltophilia* и 13 штаммов *A. ruhlandii* были неправильно идентифицированы как *Bcc*. 6 штаммов атипичной *P. aeruginosa*, 11 штаммов *A. ruhlandii*, 3 штамма *A. piechaudii* и 13 штаммов *Bcc* биохимическими тестами были неправильно идентифицированы как другие НФМО. Около 3,4 % штаммов не удалось идентифицировать биохимическими тестами. Аналогичная ситуация была описана и зарубежными исследователями, в частности с касающаяся дифференциации бактерий *P. aeruginosa* с *A. xylooxidans* или *S. maltophilia* [11], *S. aureus* и *S. pneumoniae* [12], *Bcc* и *Alcaligenes spp.*, *Ralstonia pickettii*, *Stenotrophomonas* и *Pandora* [13]. Ложная идентификация может иметь нежелательные последствия, ведущие к выбору неправильной терапии и неправильной тактики профилактики.

В связи с этим для окончательной точной идентификации нами были использованы MALDI-BIOTYPERS™ и молекулярно-генетические методы.

Идентификация при помощи масс-спектрометрии (MALDI-BIOTYPER™)

С помощью MALDI-BIOTYPER™ были проанализированы культуры, выделенные из биологического материала от 250 пациентов с МВ [7]. В результате удалось идентифицировать 50 видов НФМО и установить, что наиболее трудно идентифицировать фенотипическими методами бактерии, принадлежащие к роду *Achromobacter*, *Bcc* и некоторые редко встречающиеся НФМО.

С помощью MALDI-BIOTYPER™ изоляты *Achromobacter spp.*, выделенные от российских больных МВ, были отнесены к *A. ruhlandii*, *A. xylosoxidans*, *A. insolitus*, *A. piechaudii*, *A. insuavis*, *A. spanius*, среди которых 76% принадлежали к виду *A. ruhlandii* и 7,2% к виду *A. xylosoxidans*.

Надо отметить, что первоначально у 23 пациентов бактериологическими методами *A. ruhlandii* был идентифицирован как НФМО, у 8 – как бактерии *Bcc*, у 2 – как *Acinetobacter lwoffii*, у 1 – как *Acinetobacter haemolyticus*.

В 2-х случаях MALDI-BIOTYPER™ ошибочно идентифицировал штаммы как *A. ruhlandii*, которые в дальнейшем были определены с помощью полногеномного секвенирования как *A. xylosoxidans*.

Среди НФМО наиболее значимыми для больных МВ, представляющими трудность для идентификации классическими методами, являются виды микроорганизмов, входящие в *Burkholderia cepacia complex*.

С помощью MALDI-BIOTYPER™ были идентифицированы *Bcc* 4 видов: *B. cenosepacia*, *B. cepacia*, *B. contaminans* и *B. multivorans*. Из них 83,3% принадлежали к виду *B. cenosepacia*. Кроме того, от 3 детей нами была выделена культура, которая была идентифицирована с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии как *Burkholderia gladioli*, не входящая в *Bcc*.

После внесения в локальную библиотеку MALDI-BIOTYPER™ вида *B. contaminans* 3 штамма *Bcc*, которые WGS определил как *B. cepacia*, MALDI-BIOTYPER™ ошибочно идентифицировал как *B. contaminans*.

С помощью МАЛДИ масс-спектрометрии выделенные от российских больных МВ бактерии рода *Pseudomonas* были отнесены к 11 видам. Из них 72% принадлежали к *P. aeruginosa*, среди которых было 12 с атипичным фенотипом, 2 из которых бактериологическим методом были идентифицированы как *Bcc*, 3 – *Pseudomonas montelii*, 1 – *Pseudomonas mendocina*, 6 – как НФМО. 29 изолятов, идентифицированных бактериологическим методом как *P. aeruginosa* были также идентифицированы в MALDI-BIOTYPER™ как *P. aeruginosa*.

Таким образом, наименьшее количество ложной идентификации при использовании классических бактериологических методов среди доминирующих бактерий наблюдали при определении бактерий *P. aeruginosa*.

Кроме того, некоторые бактерии первоначально идентифицированные нами как НФМО с помощью MALDI-BIOTYPER™ были идентифицированы как *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter ursingii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Rothia mucilaginosa*, *Delftia acidovorans*, *Leclercia adecarboxylata*, *Elizabethkingia miricola*, *Ochrobactrum anthropi*, *Kocuria kristinae*, *Comomonas testosteroni*, *Corynebacterium falsenii*, *Moraxella catarrhalis*, *Eikinella corrodens*, *Chryseobacterium indologenes*, *Arthrobacter aurescens*, *Aeromonas caviae*, *Brevundimonas diminuta*, *Sphingomonas paucimobilis*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas talaasi*, *B. gladioli*, *Wautersiella falsenii*, *Trichosporon mycotoxinivorans*. При этом этиологическое значение этих микроорганизмов в настоящее время не ясно.

Использование MALDI-BIOTYPER™ позволило выявить разнообразие микроорганизмов, колонизирующих дыхательные пути больных МВ, что невозможно сделать только классическими методами. Основными возбудителями, являющимися представителями НФМО и имеющими клиническое и эпидемиологическое значение для больных МВ, требующими подтверждения идентификации более точными методами, были представители рода *Achromobacter* и *Bcc*. При этом MALDI-BIOTYPER™ позволяет определить бактерии *Bcc* до рода, а также некоторые виды *Bcc* (*B. cenosepacia* и *B. multivorans*), но, как показали наши исследования, допускает ошибки при идентификации *B. contaminans*: 3 штамма *B. cepacia* прибором MALDI-BIOTYPER™ были идентифицированы как *B. contaminans*. Достоверная идентификация бактерий рода *Achromobacter* до вида с помощью MALDI-BIOTYPER™, несмотря на наличие в его базе 6905 видов микроорганизмов (MALDI biotyper compass explorer версия 4.1 build 30) также затруднена. В нашем исследовании несколько штаммов *A. ruhlandii* были ошибочно идентифицированы как *A. xylosoxidans*. В таких случаях возникает необходимость идентификации молекулярно-генетическими методами (MLST, амплификацией и секвенированием специфических генов).

В результате исследования с помощью MALDI-BIOTYPER™ нами было идентифицировано 90 видов бактерий, которые были выделены из зева и мокроты больных муковисцидозом.

Молекулярно-генетические методы исследования на этапе идентификации Полимеразная цепная реакция

В связи с тем, что наиболее трудной с помощью классических бактериологических методов является идентификация бактерий *Achromobacter spp.* и *Bcc*, в случае отсутствия в лаборатории прибора MALDI-BIOTYPER™, для идентификации этих микроорганизмов необходимо применять молекулярно-генетические методы.

Наиболее простым и дешевым является ПЦР (или реал-тайм ПЦР) с использованием праймеров, комплементарных специфическим последовательностям ДНК возбудителей, то есть амплификация специфических для данного микроорганизма генов.

В связи с тем, что наиболее часто встречающимися у больных МВ и клинически наиболее значимыми микроорганизмами являются *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bcc*, *Achromobacter* spp., *S. maltophilia*, нами предложено для идентификации атипичных форм этих микроорганизмов использовать ПЦР с праймерами, с уже известной чувствительностью и специфичностью [14, 15, 16, 17, 18].

При этом, при дифференциации *Bcc*, *Achromobacter* spp., *S. maltophilia* можно применить мультиплекс ПЦР (триплекс), то есть ПЦР в одной пробирке.

Чем больше праймеров в мультиплексной ПЦР, тем чувствительность и специфичность данного метода более низкая. Для этого нами предложена система в виде ПЦР-панели, где возможно проведение ПЦР одновременно в 3 пробирках при одинаковых условиях амплификации в виде схемы: 1-ая пробирка (триплекс) с праймерами Burkf (f)-CeMuVi-16-2, AX-F1 – AX-B1 и SM1-SM2 для идентификации бактерий *Bcc*, *Achromobacter* spp. и *S. maltophilia*; 2-я (дуплекс) – PA-SS-F-PA-SS-R и ClfA-ClfA1 для идентификации *P. aeruginosa* и *S. aureus*; 3-я – BCR1-BCR2 – для подтверждения принадлежности культуры к *Bcc* (рис. 1).

Мультиплекс (дуплекс, триплекс) ПЦР в виде панели с теми же праймерами можно использовать в качестве экспресс-диагностической тест-системы на первом этапе микробиологического исследования одновременно с посевом, что обеспечит одновременную экспресс-диагностику инфекций, вызванных *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bcc*, *Achromobacter* spp., *S. maltophilia* у больных МВ с помощью детекции геномной ДНК указанных возбудителей в тотальной ДНК, полученной непосредственно из биологического материала больного (рис. 2).

Наличие полос определенной массы указывает на присутствие возбудителя в биологическом материале.

Диагностическая чувствительность при содержании в биологическом материале достаточного количества копий искомой ДНК для *S. aureus*, *P. aeruginosa*,

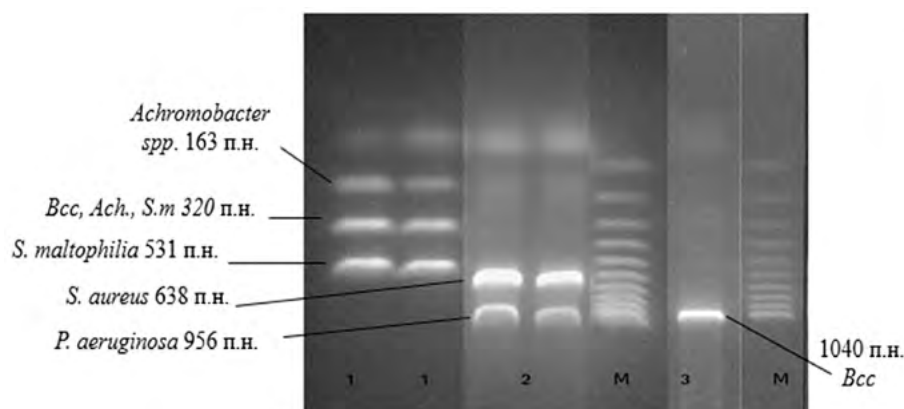


Рисунок 1. Электрофоретическая картина мультиплексной ПЦР со смесью равных концентраций ДНК *Bcc*, *Achromobacter* spp., *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *S. maltophilia*.

1-2 ряды (1) – 3 полосы соответствуют амплифицированным участкам ДНК *Achromobacter* spp. – 163 п.н., *Bcc*, *Achromobacter* spp. и *S. maltophilia* – 320 п.н., *S. maltophilia* – 531 п.н.; 3-4 ряды (2) – 2 полосы соответствуют участкам ДНК *P. aeruginosa* – 956 п.н. и *S. aureus* – 638 п.н.; 5 ряд (M) – маркер молекулярного веса; 6 ряд (3) – полоса соответствует ДНК *Bcc* – 1040 п.н.

Figure 1. Electrophoretic picture of multiplex PCR with a mixture of equal concentrations of *Bcc* DNA, *Achromobacter* spp., *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. maltophilia*.

1-2 rows (1) – 3 bands correspond to amplified DNA areas of *Achromobacter* spp. – 163 bp, *Bcc*, *Achromobacter* spp. and *S. maltophilia* – 320 bp, *S. maltophilia* – 531 bp; 3-4 rows (2) – 2 bands correspond to *P. aeruginosa* DNA sections – 956 bp. and *S. aureus* – 638 bp; 5 row (M) – molecular weight marker; 6 row (3) – the band corresponds to DNA of *Bcc* – 1040 bp.

Achromobacter spp., бактерий *Bcc* и *S. maltophilia* – 90-99,9 % в зависимости от вида возбудителя.

Невысокая аналитическая чувствительность указывает на то, что данный метод должен быть скрининговым и результаты необходимо подтверждать культуральным методом.

Секвенирование специфических генов и MLST для идентификации бактерий *Bcc* и *Achromobacter* spp

При наличии секвенатора вид возбудителя ХИЛ можно определить с помощью амплификации и секвенирования фрагмента гена 16S рибосомальной РНК (16S rDNA) или других специфических генов. Этот метод также можно использовать для идентификации ДНК микроорганизмов, непосредственно полученной из биологического материала.

В связи с тем, что как классическими бактериологическими методами, так и с использованием MALDI-BIOTYPER™ и ПЦР, идентификация некоторых возбудителей, имеющих клиническое значение для больных МВ, например, *Bcc* и *Achromobacter* spp., достоверно возможна только до рода, для окончательной видовой идентификации можно применить секвенирование 16S rDNA или других специфических участков ДНК, а также MLST.

Надо отметить, что секвенирование 16S rDNA некоторых микроорганизмов, в частности бактерий

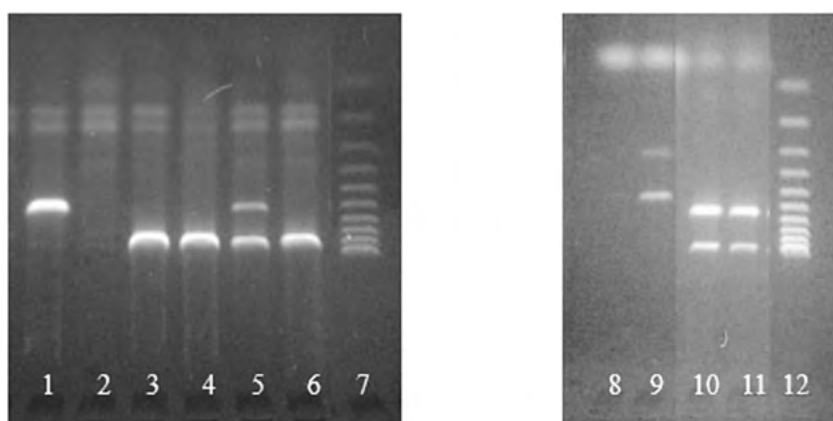


Рисунок 2. Электрофоретическая картина мультиплексной ПЦР с тотальной ДНК, полученной из мокроты.

1 – полоса соответствует амплифицированному участку ДНК *S. aureus*, то есть показывает наличие в мокроте *S. aureus*; 2 и 8 – в мокроте отсутствуют искомые ДНК; 3, 4, 6 – наличие в мокроте ДНК *P. aeruginosa*; 5, 10, 11 – присутствие в мокроте одновременно *S. aureus* и *P. aeruginosa*; 9 – наличие в мокроте *S. maltophilia*; 7 и 12 – маркер молекулярного веса.

Figure 2. Electrophoretic picture of multiplex PCR with total DNA taken from sputum.

1 – the band corresponds to amplified area of *S. aureus* DNA, i.e., it indicates the presence of *S. aureus* in sputum; 2 and 8 – there is no desired DNA in sputum; 3, 4, 6 – there is *P. aeruginosa* in sputum; 5, 10, 11 – there are *S. aureus* and *P. aeruginosa* simultaneously in sputum; 9 – there is *S. maltophilia* in sputum; 7 and 12 – molecular weight marker.

рода *Achromobacter*, не позволяет их дифференцировать до вида, так как данный участок у разных видов *Achromobacter spp.* имеет 99 % идентичность [19, 21]. Об этом свидетельствуют также результаты нашего исследования (совместно с лабораторией анализа геномов ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи) мокроты с использованием секвенирования 16S rDNA тотальной ДНК, при котором во всех случаях был поставлен диагноз *A. xylosoxidans*. Дальнейшее исследование выделенных изолятов в сотрудничестве с коллегами из ФГБУ «НМИЦАГиП им. В. И. Кулакова» показало, что часть изолятов, идентифицированных первоначально путем секвенирования 16S rDNA как *A. xylosoxidans*, с помощью MALDI-BIOTYPER™ были идентифицированы как *A. ruhlandii*. В связи с этим были секвенированы полные геномы 3 представителей из этих штаммов. Результаты секвенирования полного генома этих штаммов показали, что они относились к *A. ruhlandii*. В связи с тем, что 16S rDNA секвенирование не позволяет различать виды бактерий рода *Achromobacter*, то при необходимости для дифференциации до вида нужно в алгоритм идентификации включить амплификацию и секвенирование других генов, предложенных различными авторами – *nrda*765 [19], *gltB* [21], *blaOXA* [20]. Последний позволяет дифференцировать некоторые виды бактерий рода *Achromobacter*, в том числе наиболее распространенные в России, а также дифференцировать *Bcc* от *Achromobacter spp.*

При отсутствии возможности секвенировать можно проводить рестрикцию амплифицированного участка гена *blaOXA* с помощью рестриктазы *AraI*, что также может дифференцировать *blaOXA*-258, и *blaOXA*-114, то есть *A. xylosoxidans* от *A. ruhlandii* [20].

Таким образом, достоверно дифференцировать виды *Achromobacter* можно амплификацией и секвенированием генов *nrda*, *gltB* и схеме MLST, предложенной Spilker [22].

При дифференциации бактерий *Bcc* как и *Achromobacter spp.* секвенирование 16S rDNA также не позволяет полностью различать виды, входящие в комплекс *Bcc*, из-за большого сходства данного гена у разных видов (98 до 99 %) [23]. Амплификация *recA* гена является высокоспецифичным методом при идентификации *Bcc*. Предложенный метод ПДРФ данного гена с использованием рестриктазы *HaeIII* [24], который способен определить первые пять геномоваров (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *Burkholderia stabilis* и *Burkholderia vietnamiensis*), также имеет ограничения в связи

с появлением новых видов, которые невозможно дифференцировать с помощью этого метода [25]. Максимально достоверно дифференцировать виды бактерий *Bcc* может амплификация и секвенирование *recA* гена и MLST по 7 генам домашнего хозяйства [26]. С помощью MLST (совместно с лабораторией анализа геномов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи») нами было выявлено, что среди российских больных МВ встречаются 5 видов *Bcc*: *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. cepacia*, *B. contaminans* и *B. vietnamiensis*.

MLST позволяет не только определить вид возбудителя, но и определить сиквенс-типы, что имеет огромное значение при проведении эпидемиологических исследований. Так, в результате MLST штаммов *P. aeruginosa* нам удалось установить, что среди больных МВ циркулирует международный эпидемический клон – ST235, который был причиной госпитальных инфекций в медицинских учреждениях различных стран, в том числе и в России [27]. MLST позволило генотипы *B. cenocepacia* ST709 и ST208, *A. ruhlandii* ST36 и *S. aureus* ST8 признать эпидемически значимыми в отношении больных МВ в России и показать их высокую трансмиссивную способность.

Для дифференциации различных видов *Bcc* в алгоритм исследования можно также включить предложенное Tabacchioni et al. однолокусное секвенирование: амплификация и дальнейшее секвенирование *gyrB* фрагмента ДНК размером 1900 п.н. [28],

hisA (биосинтез гистидина) фрагмента ДНК гена размером 442 п.н. [29], *fur* гена, кодирующего белок регулирующий захват железа [23]. Несмотря на высокую достоверность и скорость определения патогенов с помощью одно- или мультилокусного секвенирования, данная методика доступна не всем лабораториям, что ограничивает ее широкое применение в РФ.

Использование (при возможности) на начальном этапе микробиологического исследования мокроты методов молекулярной диагностики, позволяющих определить возбудителей непосредственно в биологическом материале, позволит быстро начать этиотропную терапию, а также проводить адекватные противоэпидемические мероприятия.

Результаты проведенного нами исследования подтвердили необходимость использования комплексного подхода, то есть применения как классических микробиологических, так и молекулярно-генетических методов при диагностике инфекции у больных МВ. Так, исследование мокроты 34 больных МВ детей классическим микробиологическим методом и молекулярно-генетическим методом – секвенированием *16S rDNA* тотальной ДНК, полученной непосредственно из мокроты (совместно с лабораторией анализа геномов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи) показало, что молекулярно-генетическим методом в основном были идентифицированы микроорганизмы, которые преобладали в пробе мокроты и концентрация которых составляла 10^3 КОЕ/мл и выше, в то время как классическим микробиологическим методом с использованием селективных сред выявляли также микроорганизмы в концентрации 10 КОЕ/мл и менее. С другой стороны, в некоторых пробах мокроты молекулярно-генетическим методом выявлены анаэробные микроорганизмы, например, *Prevotella spp.*, которые были идентифицированы также другими авторами как постоянные члены сообщества нижних дыхательных путей у людей с МВ всех возрастов и стадий заболевания [30]. Есть предположение о провоспалительном действии анаэробов, что подтверждается резким увеличением их концентрации в период обострения. Точно определить клиническое значение этих бактерий на сегодня не представляется возможным [30]. В ряде случаев в пробах мокроты молекулярно-генетическим методом выявлены также некоторые аэробные микроорганизмы (*Achromobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*), которые не были выявлены нами классическим методом. Кроме того, некоторые НФМО были ложно-идентифицированы биохимическими тестами (*Bcc*, *Moraxella lacunata*), что также было обнаружено молекулярно-генетическим методом. В свою очередь, культуральный метод обеспечивает количественное определение наличия возбудителей, что дает возможность судить более точно об этиологической значимости выделенных микроорганизмов, оценить динамику микрофлоры и эффективность проводимой антибиотикотерапии.

Кроме того, позволяет выделять чистую культуру, оценивать чувствительность к антибиотикам, изучать различные биологические свойства, а также их изменчивость в процессе персистенции в легких больного МВ. Это важно с практической точки зрения, так как для правильного подбора антибиотиков при лечении обострения, важно понять, обусловлена ли ХИЛ циркуляцией в организме одного генотипа или меняющимися генотипами, что можно определить с помощью генотипирования выделенных в динамике изолятов возбудителей различными методами: RAPD-PCR, типированием гена, обеспечивающего синтез коагулазы у *S. aureus*, MLST, spa типированием. Последние позволяют определить распространенность эпидемически значимых клонов возбудителей среди больных МВ в России.

Также культуральный метод позволяет учитывать все морфотипы бактерий при проявлении возбудителем фенотипической гетерогенности на твердой питательной среде, когда разные колонии одного и того же вида (или одного генотипа) могут иметь разную морфологию (например, мукоидный и немуккоидные фенотипы) или обуславливать разную чувствительность к антибиотикам, что имеет важное значение при выборе антибиотикотерапии.

Таким образом, с помощью комплексного подхода при диагностике ХИЛ, нами было показано, что у больных МВ ХИЛ является динамическим процессом, который обусловлен меняющимися генотипами или длительной персистенцией одного генотипа с высокой степенью фенотипической и генотипической изменчивости, что доказано с помощью входящих в алгоритм микробиологической диагностики различных методов.

Заключение

Для проведения достоверной этиологической диагностики необходимо применить комплексный подход и включить в алгоритм микробиологического исследования биоматериала из дыхательных путей больного МВ не только классические бактериологические методы, но и современные молекулярно-генетические методы, а также методы идентификации микроорганизмов с помощью масс-спектрометрии.

При этом культуральный метод («золотой стандарт» диагностики, позволяющий точно установить факт наличия возбудителя в материале) и метод ПЦР, предназначенные для рутинной идентификации, обеспечивают идентификацию бактерий с достоверностью 40-99% в зависимости от возбудителя (табл.).

Применение на последующих этапах дополнительных методов – MALDI-BIOTYPERS™, амплификации и секвенирования специфических генов, *16S rDNA* секвенирования, MLST и секвенирования полного генома (WGS) позволяет идентифицировать возбудителей с максимальной достоверностью.

Точность идентификации микроорганизмов при использовании различных методов

Table

Accuracy of microorganisms' identification by means of various methods

Методы идентификации	Микро-биологический	Молекулярно-генетический – ПЦР со специфическими праймерами	MALDI-BIOTYPER™	MLST	Секвенирование 16SrDNA, 23SrDNA и др.	WGS
Микроорганизм						
<i>S. aureus</i>	70-80 %	90-99 %	99,9%		Окончательная идентификация	
<i>P. aeruginosa</i>	80-90 %	90-99 %	99,9 %			
<i>B. ceracia complex</i>	43-86 %	90-99 %	95-99 %			
<i>Achromobacter spp.</i>	57-80 %	90-99 %	95-99 %			
<i>S. maltophilia</i>	90-99 %	90-99 %	99,9 %			
Другие НФМО	57-80 %	90-99 %	90-95 %			

Примечание: максимум и минимум точности идентификации согласно данным различных авторов, включая результаты представленного исследования.

Note: maximum and minimum accuracy of identification according to data from various authors, including the results of the presented research.

Литература/ References

1. Шагинян ИА, Капранов НИ, Чернуха МЮ, Алексеева ГВ, Семькин СЮ, Аветисян ЛР, Каширская НЮ, Пивкина НВ, Данилина ГА, Батов АБ, Бусуек ГП. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010;(1):15-20. [Shaginyan IA, Kapranov NI, Chernukha MYu, Alexeeva GV, Semikin SYu, Avetisyan LR, Kashirskaya NYu, Pivkina NV, Danilina GA, Batov AB, Busuek GP. Microbial landscape of the lower respiratory tract in different age groups of children suffering from cystic fibrosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2010;(1):15-20. (In Russian)]

2. Сиянова ЕА, Чернуха МЮ, Аветисян ЛР, Шагинян ИА, Прилипов АГ, Усачев ЕВ, Кондратьева ЕИ, Припутневич ТВ, Гордеев АБ, Каширская НЮ, Капранов НИ, Ильенкова НА, Красовский СА, Шерман ВД, Воронкова АЮ, Амелина ЕЛ, Усачева МВ. Мониторинг хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. *Педиатрия*. 2018; 97 (2): 77-86. [Syanova EA, Chernuha MYu, Avetisyan LR, Shaginyan IA, Prilipov AG, Usachev EV, Kondrateva EI, Priputnevich TV, Gordeev AB, Kashirskaya NYu, Kapranov NI, Ilenkova NA, Krasovskiy SA, Sherman VD, Voronkova AYU, Amelina EL, Usacheva MV. Monitoring of chronic lung infection in patients with cystic fibrosis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatrics*. 2018; 97 (2): 77-86. (In Russian)]

3. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of

Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998;177(4):1023-9.

4. Kiska DL, Kerr A, Jones MC, Caracciolo JA, Eskridge B, Jordan M, Miller S, Hughes D, King N, Gilligan PH. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other Gram-negative non-fermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; (34): 886-891. DOI:1128/JCM.43.8.4070-4075.2005

5. Wellinghausen N, Köthe J, Wirths B, Sigge A, Poppert S. Superiority of molecular techniques for identification of Gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):4070-5.

6. Чернуха МЮ, Шагинян ИА, Жуховицкий ВГ, Аветисян ЛР, Кулястова ДГ, Сиянова ЕА, Медведева ОС, Поляков НБ, Соловьев АИ, Грумов ДА, Кондратьева ЕИ, Каширская НЮ, Капранов НИ, Шерман ВД, Воронкова АЮ, Никонова ВС, Амелина ЕЛ, Красовский СА, Усачева МВ. Применение системы MALDI Biotyper и алгоритма микробиологической диагностики для идентификации неферментирующих микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей у больных муковисцидозом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19(4):327-334. [Chernuha MYu, Shaginyan IA, Zhikhovitsky VG, Avetisyan LR, Kuliastova DG, Syanova EA, Medvedeva OS, Poliakov NB, Soloviev AI, Grumov DA, Kondrateva EI, Kashirskaya NYu, Kapranov NI, Sherman VD, Voronkova AYU, Nikonova VS, Amelina EL, Krasovskiy SA, Usacheva MV. Use of the MALDI Biotyper system and the microbiological diagnosis algorithm for identification of nonfermenting bacteria isolated from respiratory

- tract in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;19(4):327-334. (In Russian)]
7. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(12):5644-9. DOI:1128/JCM.42.12.5644-5649.2004
 8. Zueter AR, Rahman ZA, Abumarzouq M, Harun A. Expanded Multilocus Sequence Typing for *Burkholderia* Species. *BMC Infectious Diseases*. 2018; 18(1):5. DOI:10.1186/s12879-017-2912-9
 9. Воронина ОЛ, Кунда МС, Аксенова ЕИ, Орлова АА, Чернуха МЮ, Лунин ВГ, Амелина ЕЛ, Чучалин АГ, Гинцбург АЛ. Экспресс-диагностика микроорганизмов, поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (11): 53-57. [Voronina OL, Kunda MS, Aksenova EI, Orlova AA, Tchernukha MYu, Lunin VG, Amelina EL, Tchutchalin AG, Ginzburg AL. The express diagnostic of microorganisms affecting respiratory tract of patients with mucoviscidosis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2013; (11): 53-57. (In Russian)]
 10. Tablan OC, Carson LA, Cusick LB, Bland LA, Martone WJ, Jarvis WR. Laboratory proficiency test results on use of selective media for isolating *Pseudomonas cepacia* from simulated sputum specimens of patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987; 25(3):485-7.
 11. Kidd TJ, Ramsay KA, Hu H, Bye PTP, Elkins MR, Grimwood K, Harbour C, Marks GB, Nissen MD, Robinson PJ, Rose BR, Sloots TP, Wainwright CE, Bell SC, ACPinCF Investigators 2009. Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(5):1503-9. DOI:10.1128/JCM.00014-09
 12. Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremmer N, Sarles J, Raoult D, Rolain JM. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2008; 3(8):e2908. DOI: 10.1371/journal.pone.0002908
 13. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(9):4009-15.
 14. Ramette A, LiPuma JJ, Tiedje JM. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(3):1193-201
 15. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(5):2074-9.
 16. Whitby PW, Carter KB, Burns JL, Royall JA, LiPuma JJ, Stull TL. Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(12):4305-9.
 17. Liu L, Coenye T, Burns JL, Whitby PW, Stull TL, LiPuma JJ. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylooxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(4):1210-3.
 18. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(9):3332-8.
 19. Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2013;12(3):298-301. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.10.002
 20. Papalia M, Almuzara M, Cejas D, Traglia G, Ramirez MS, Galanternik L, Vay C, Gutkind G, Radice M. OXA-258 from *Achromobacter ruhlandii*: a Species-Specific Marker. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(5):1602-5. DOI: 10.1128/JCM.03043-12
 21. Воронина ОЛ, Кунда МС, Рыжова НН, Аксенова ЕИ, Семенов АН, Лазарева АВ, Семькин СЮ, Амелина ЕЛ, Симонова ОИ, Красовский СА, Лунин ВГ, Баранов АА, Чучалин АГ, Гинцбург АЛ. Разнообразие и опасность *Achromobacter* spp., поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. *Пульмонология*. 2015;25(4):389-402. [Voronina OL, Kunda MS, Ryzhova NN, Aksenova EI, Semenov AN, Lazareva AV, Semykin SY, Amelina EL, Simonova OI, Krasovskiy SA, Lunin VG, Baranov AA, Chuchalin AG, Gintsburg AL. Diversity and hazard of respiratory infection of *Achromobacter* spp. in cystic fibrosis patients. *Russian Pulmonology*. 2015;25(4):389-402. (In Russian)]
 22. Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. A multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(9):3010-5. DOI: 10.1128/JCM.00814-12
 23. Lynch KH, Dennis JJ. Development of a Species-Specific fur Gene-Based Method for Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(2):447-55.
 24. Mahenthalingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, Vandamme P. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(9):3165-73.
 25. Moore JE, Millar BC, Xu J, Crowe M, Redmond AO, Elborn JS. Misidentification of a genomovar of *Burkholderia cepacia* by *recA* restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Pathology*. 2002;55(4):309-11.

26. Cesarini S, Bevivino A, Tabacchioni S, Chiarini L, Dalmastri C. RecA gene sequence and Multilocus Sequence Typing for species-level resolution of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;49(5):580-8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02709.x

27. Аветисян ЛР, Воронина ОЛ, Чернуха МЮ, Кунда МС, Габриелян НИ, Лунин ВГ, Шагинян ИА. Персистенция штаммов *Pseudomonas aeruginosa* среди пациентов ФНЦ трансплантологии и искусственных органов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2012;(4):99-104. [Avetisyan LR, Voronina OL, Chernukha MYu, Kunda MS, Gabrielyan NI, Lunin VG, Shaginyan IA. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* strains in patients of Federal Scientific Center of Transplantology and Artificial Organs. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2012;(4):99-104. (In Russian)]

28. Tabacchioni S, Ferri L, Manno G, Mentasti M, Cocchi P, Campana S, Ravenni N, Taccetti G, Dalmastri C, Chiarini L, Bevivino A, Fani R. Use of the gyrB Gene to Discriminate Among Species of the *Burkholderia cepacia* Complex. *FEMS. Microbiological Letters*. 2008; 281(2):175-82. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01105.x

29. Papaleo MC, Perrin E, Maida I, Fondi M, Fani R, Vandamme P. Identification of species of the *Burkholderia cepacia* complex by sequence analysis of the hisA gene. *Journal of Medical Microbiology*. 2010;59(10):1163-70. DOI: 10.1099/jmm.0.019844-0

30. Sherrard LJ, Bell SC, Tunney MM. The role of anaerobic bacteria in the cystic fibrosis airway. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2016;22(6):637-43. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000299

Сведения об авторах

Аветисян Лусине Ремуальдовна, к.м.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; тел.: +7(903)1231611; e-mail: lusavr@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9053-2515>

Чернуха Марина Юрьевна, д.м.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; тел.: +7(499)1935594; e-mail: chernukha@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0002-2349-8556>

Шагинян Игорь Андроникович, д.м.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; тел.: +7(499)1936117; e-mail: shaginyan@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-2951-1755>

Медведева Ольга Сергеевна, м.н.с., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; тел.: +7(499)1935594; e-mail: olg.medwedewa@mail.ru

Бурмистров Егор Михайлович, м.н.с., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; тел.: +7(499)1935594; e-mail: chetusha2006@gmail.com

Русакова Екатерина Владимировна, д.м.н., профессор, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; e-mail: rusakovaev5@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3561-1499>

Жуховицкий Владимир Григорьевич, к.м.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; тел.: +7(962)9382276; e-mail: Zhukhovitsky@rambler.ru

Поляков Никита Борисович, научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; тел.: +7(926)2346524; e-mail: polyakovnb@gmail.com

Козлова Виктория Александровна, младший научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098 г. Москва, ул. Гамалеи 18; тел.: +7(906)0442502; e-mail: viktorija29-05@mail.ru

Будзинский, научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115478, г. Москва, Москворечье, стр. 1; тел.: +7 (910) 9089230; e-mail: smileBRM@yandex.ru

Author information

Lusine R. Avetisyan, Cand.Med.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(903)1231611; e-mail: lusavr@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9053-2515>

Marina Yu. Chernukha, Dr.Med.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7 (499)1935594; e-mail: chernukha@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0002-2349-8556>

Igor A. Shaginyan, Dr.Med.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(499)1936117; e-mail: shaginyan@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-2951-1755>

Olga S. Medvedeva, Junior Researcher at Laboratory of Molecular Epidemiology of Nosocomial Infections, N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(499)1935594; e-mail: olg.medwedewa@mail.ru

Egor M. Burmistrov, Junior Researcher at Laboratory of Molecular Epidemiology of Nosocomial Infections, N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(499)1935594; e-mail: chetusha2006@gmail.com

Ekaterina V. Rusakova Professor, Dr.Med.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(903)2519610; e-mail: rusakovaev5@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3561-1499>

Vladimir G. Zhukhovitsky, Cand.Med.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(962)9382276; e-mail: Zhukhovitsky@rambler.ru

Nikita B. Polyakov, Researcher at laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(926)2346524; e-mail: polyakovnb@gmail.com

Viktorija A. Kozlova, Junior Researcher at laboratory of detection and ultrastructural analysis of microorganisms, N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(906)0442502; e-mail: viktorija29-05@mail.ru

Roman M. Budzinskiy, Researcher, Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115478; Phone: +7(910)908-92-30; e-mail: smileBRM@yandex.ru

Поступила 29.12.2018 г.

Принята к печати 13.02.2019 г.

Received 29 December 2018
Accepted for publication 13 February 2019