

Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции лёгких у больных муковисцидозом

М.Ю. Чернуха¹, Л.Р. Аветисян¹, И.А. Шагинян¹, Г.В. Алексеева¹, Л.В. Авакян², Н.Ю. Каширская³, Н.И. Капранов³, С.Ю. Семькин², Е.А. Сиянова¹, О.С. Медведева¹, С.А. Красовский⁴, М.В. Усачева⁴, Е.И. Кондратьева³, Е.Л. Амелина⁴, А.Г. Чучалин⁴, А.Л. Гинцбург¹

¹ ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России, Москва, Россия

³ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Россия

⁴ НИИ пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

Цель работы — разработать алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции лёгких у больных муковисцидозом и апробировать его для мониторинга хронической инфекции у больных детей и взрослых. При разработке алгоритма использовали результаты собственных исследований за период 2008–2013 гг. и данные литературы. В динамике на протяжении двух лет были обследованы 251 ребенок и 26 взрослых, больных муковисцидозом. Для идентификации бактерий использовали бактериологические, биохимические и молекулярно-биологические методы исследования. Установлено, что микроорганизмы в клиническом материале в 2/3 случаев встре-

чаются в ассоциациях, при этом доминирующими у больных с тяжелым течением являются *Pseudomonas aeruginosa* (30,5%), *Burkholderia cepacia* complex (28,7%), *Staphylococcus aureus* (53,3%) и *Achromobacter xylosoxidans* (19%) и грибы рода *Candida* (57,5%). При микробиологическом мониторинге инфекции с интервалом от 3 мес. до 4 лет у 24 детей, больных МВ, с использованием разработанного алгоритма была выявлена хроническая инфекция у 18 пациентов, связанная с бактериями *Burkholderia cepacia* complex, у 6 — с *A. xylosoxidans*, у 5 — с *P. aeruginosa*, у 7 — с *S. aureus*.

Ключевые слова: муковисцидоз, алгоритм диагностики, смешанная инфекция.

Microbiological Diagnosis Algorithm for Chronic Lung Infection in Patients with Cystic Fibrosis

M.Yu. Chernukha¹, L.R. Avetisyan¹, I.A. Shaginyan¹, G.V. Alekseeva¹, L.V. Avakyan², N.Yu. Kashirskaya³, N.I. Kapranov³, S.Yu. Semykin², E.A. Siyanova¹, O.S. Medvedeva¹, S.A. Krasovskiy⁴, M.V. Usacheva⁴, E.I. Kondratieva³, E.L. Amelina⁴, A.G. Chuchalin⁴, A.L. Gintzburg¹

¹ Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

² Russian Children Clinical Hospital, Moscow, Russia

³ Scientific Center of Medical Genetics, Moscow, Russia

⁴ Pulmonology Research Institute, Moscow, Russia

The objective of this study was to develop algorithm of microbiological diagnosis for chronic lung infection in

patients with cystic fibrosis and implement it for monitoring of chronic infection in children and adults. Data from our own studies performed during the 2008–2013 and published data were used in the algorithm development. A total of 251 children and 26 adults with cystic fibrosis were examined over the two years. Pathogen identification

Контактный адрес:

Марина Юрьевна Чернуха

Эл. почта: chernukha@gamaleya.org

was performed by culture, biochemical, and DNA-based methods. Microorganisms associations were found to be responsible for $\frac{2}{3}$ cases of infection. The most prevalent pathogens in patients with severe course of the disease were the following: *Pseudomonas aeruginosa* (30.5%), *Burkholderia cepacia* complex (28.7%), *Staphylococcus aureus* (53.3%), *Achromobacter xylosoxidans* (19%), and *Candida* spp. (57.5%). Microbiological monitoring

(at intervals of 3 months to 4 years) using this algorithm in 24 children with cystic fibrosis revealed chronic infection due to *Burkholderia cepacia* complex (18 patients), *A. xylosoxidans* (6 patients), *P. aeruginosa* (5 patients), and *S. aureus* (7 patients).

Key words: cystic fibrosis, chronic infection, microbiological diagnosis.

Введение

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз (cystic fibrosis), является наследственным ауто-сомно-рецессивным заболеванием, частота распространенности которого среди белого населения составляет в среднем 1:2500–1:3500 новорожденных. Частота в России значительно ниже — около 1:10 000 новорожденных [1]. Болезнь поражает различные системы организма и имеет разнообразную симптоматику, однако продолжительность жизни, в основном, зависит от степени поражения органов дыхания условно-патогенными микроорганизмами, в связи с тем, что основной причиной летальных исходов у 90–95% больных муковисцидозом являются инфекционные процессы в легких, ведущие к развитию сердечно-легочной недостаточности. В 1958 г. медиана выживаемости больных муковисцидозом составляла 6 месяцев, в настоящее время с совершенствованием методов диагностики и возможностей современных методов лечения средняя ожидаемая продолжительность жизни в странах Европы и Америки превысила 40-летний рубеж, а в России в 2012 году, по данным Регистра Московского региона, составила более 39,5 лет [2].

Микроорганизмы, инфицирующие нижние дыхательные пути больного муковисцидозом, определяют лечение, качество жизни, перспективы для трансплантации и общую выживаемость. Точная и своевременная идентификация возбудителей инфекции дыхательных путей имеет важное значение для обеспечения своевременного начала лечения соответствующими антибиотиками с целью элиминации бактериальных патогенов и организации надлежащего инфекционного мониторинга профилактики распространения патогенных микроорганизмов среди больных МВ.

Очень часто правильная микробиологическая диагностика представляет трудности, так как микробная флора дыхательных путей у таких больных представлена часто ассоциациями, а некоторые микроорганизмы проявляют атипичные для своего вида фенотипические свойства, например ауксотрофные у *Pseudomonas aeruginosa* и SCV

(small colony variants — фенотип мелких колоний) у *Staphylococcus aureus*.

При изучении микрофлоры нижних дыхательных путей различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом, в международных исследованиях установлено, что доминирующими возбудителями инфекции легких у больных муковисцидозом являются *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *Haemophilus influenzae*, а также бактерии *Burkholderia cepacia* complex. Показано, что в первые годы жизни у больных муковисцидозом доминирует золотистый стафилококк, а затем основным возбудителем становится синегнойная палочка. Грибы *Aspergillus fumigatus* и представители рода *Candida* выделяют у больных муковисцидозом в более взрослом возрасте, особенно подвергавшихся многократному лечению антибиотиками.

В последнее время одной из главных причин, приводящих к летальному исходу, является инфекция, вызванная бактериями *B. cepacia*. По данным Регистра Москвы и Московской области, среди больных МВ *B. cepacia* complex встречается у 8,7% пациентов [3]. Этот возбудитель способен вызывать так называемый «*cepacia*-синдром» — некротизирующую пневмонию с септициемией, нередко приводящую к летальному исходу. Инфицирование больных муковисцидозом бактериями комплекса *B. cepacia* представляет особую опасность, так как данный микроорганизм обладает природной устойчивостью к широкому спектру антимикробных препаратов и быстро приобретает резистентность к новым антибиотикам. Такие свойства затрудняют проведение эрадикации бактерий комплекса *B. cepacia* в процессе лечения, способствуют длительной персистенции возбудителя, приводя к быстрому переходу острой инфекции нижних дыхательных путей в хроническую форму и к значительным нарушениям функций легких. Больные, инфицированные *B. cepacia*, являются источником инфекции и представляют опасность для других пациентов [4]. Кроме того, колонизация нижних дыхательных путей бактериями комплекса *B. cepacia* до последнего времени была противопоказанием для пересадки легких, являю-

щейся важной частью программы по увеличению продолжительности жизни у больных муковисцидозом.

Данные последних публикаций и собственные исследования подтверждают значимость в развитии хронической инфекции других видов *неферментирующих грамотрицательных бактерий* (НФГОБ), среди которых особое значение, в связи с большей частотой выделения по сравнению с другими микроорганизмами и фенотипическим сходством с бактериями комплекса *B. cepacia*, приобретает *Achromobacter xylosoxydans*.

Учитывая вышесказанное, целью работы являлась разработка алгоритма микробиологической диагностики хронической инфекции лёгких у больных муковисцидозом и апробация его для мониторинга хронической инфекции у больных детей и взрослых.

Материал и методы

Исследование проводили в два этапа.

За период с 2008 по 2009 гг. в динамике обследовано 84 ребенка, больных муковисцидозом (г. Москва и Московская область): 40 детей проходили лечение в отделении медицинской генетики РДКБ, 44 — находились на амбулаторном лечении в Московском центре муковисцидоза на базе ГДКБ № 13 им. Н. Ф. Филатова [5].

За период с 2012–2013 гг. было проведено микробиологическое исследование 369 образцов клинического материала, в том числе мокроты и мазков из зева от 167 детей с тяжелым течением муковисцидоза в стадии обострения, наблюдавшихся в РДКБ, и 26 образцов от 26 взрослых больных, наблюдавшихся в НИИ пульмонологии.

У 99 детей образцы брали до и после антибиотикотерапии с интервалом 15–30 дней. У 20 из них был проведен также микробиологический мониторинг с интервалом от 4 до 15 месяцев.

Для идентификации *S. aureus* использовали *желточно-солевой агар* (ЖСА) и 5% кровяной агар, тест на плазмокоагулазу, коммерческие тест-системы StaphyloTest 16 «Lachema» или BioMerieux API Staph. Определение бактерий *P. aeruginosa* проводили высевом на селективную среду — цитримид-агар, 5% кровяной агар, тест на оксидазу, наличие пигмента, характерного запаха (винограда или земляничного мыла), использовали коммерческую тест-систему API 20NE «BioMerieux». Энтеробактерии идентифицировали высевом на агары Эндо, Макконки, Гектоен (Himedia). Для идентификации бактерий *B. cepacia* использовали разработанный алгоритм идентификации и типирования [6], включающий два последовательных

этапа исследования: применение бактериологических, биохимических, других фенотипических методов (выявление гемолиза, способности образования биопленки) и молекулярно-биологических методов. Все штаммы были идентифицированы с помощью коммерческих тест-систем: API 20NE «BioMerieux», 24 NE «Lachema» в соответствии с инструкцией производителя. Рост на селективном агаре для *B. cepacia* (BCSA — *Burkholderia cepacia* selective agar) наблюдали при температуре 37 °C через 24 ч и при 30 °C через 48 ч.

Чувствительность к антимикробным препаратам определяли в соответствии с МУК 4.2.1890–04 методом серийных разведений в бульоне [7], с использованием АТВ-стрипов для стафилококков и синегнойной палочки «BioMerieux». Антибиотики были выбраны в соответствии с рекомендациями для лечения заболеваний, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями [8]. Генотипирование штаммов проводили методом RAPD-ПЦР со случайным олигонуклеотидным праймером, размером 10 нуклеотидов Sh1 (Short 1) — AATCGGGCTG. Для определения *B. cepacia* использовали ПЦР гена *recA*, специфичного для бактерий комплекса *B. cepacia*, с праймерами BCR1–5' TGACCGCCGAGAAGAGCAA и BCR25' CTCTTCTTCGTCATCGCCTC [6]. Определение геномвара проводили с помощью ПЦР с геномвар-специфическими праймерами согласно методам, описанным в работах 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 multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3165–3173. Для идентификации *Achromobacter xylosoxydans* использовали праймеры на locus 16S рДНК AX-F1–5'-GCAGGAAAGAAACGTCGCGGGT-3' и AX-B1–5'-ATTTCACATCTTTCTTTCCG-3' [9].

В отдельных случаях для подтверждения микробиологического диагноза использовали ПЦР-реалтайм, мультилокусное секвенирование, полное секвенирование генома [10].

Результаты исследования и обсуждение

Материалом при исследовании нижних дыхательных путей у больных МВ являются мокрота при кашле, мазок из зева после кашля, ларингеальный или назофарингеальный аспират, индуцированная гипертоническим раствором мокрота, *бронхоальвеолярный лаваж* (БАЛ), материал щеточной биопсии при бронхоскопии.

По данным A. C. Equi et al., чувствительность и специфичность результатов посевов мазка из зева после кашля по сравнению с результатами посевов спонтанной мокроты составляет 34 и 100% соответственно. Чувствительность показывает процент положительного результата, полученного методом посева мазка из зева, по сравнению с положительным результатом, полученным при посеве мокроты. Специфичность показывает процент отрицательного результата, полученного методом посева мазка из зева, по сравнению с отрицательным результатом, полученным при посеве мокроты [11].

В работе S. K. Kabra et al. сравнивали результаты, полученные при посеве мазков из зева после кашля, мазков из зева до и после физиотерапии и при посеве мокроты. Чувствительность для выделения *P. aeruginosa* была 40, 42 и 82%, а для *S. aureus* — 57, 50 и 100% соответственно при посеве мазков из зева после кашля, мазков из зева до и после физиотерапии. Специфичность была высокая — 99–100%, как для *P. aeruginosa*, так и для *S. aureus*. Таким образом, наиболее значимым исследованием для больных МВ является посев мокроты [12].

Установлено, что любая задержка, в частности хранение при комнатной температуре (20–25 °С), приводит к увеличению количества быстро растущих бактерий, что может привести к угнетению роста истинных патогенов, и наоборот, хранение в холодильнике (4 °С) может привести к гибели термофильных патогенных микроорганизмов.

Результаты исследований ученых по данному вопросу являются противоречивыми. Согласно Wong K, Roberts MC, Owens L, Fife M, Smith AL. Selective media for the quantification of bacteria in cystic fibrosis sputum. J Med Microbiol 1984; 17:113-119., Williams SG, Kauffman CA. Survival of *Streptococcus pneumoniae* in sputum from patients with pneumonia. J Clin Microbiol 1978; 7:3-5., хранение мокроты при температуре 4 °С в течение 48 часов не оказывает влияния на количественное содержание *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* или *S. pneumoniae*. Gould et al. установили, что в 8,7% образцов клинического материала *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis* и *S. pneumoniae* не выдерживают хранения при температуре 4 °С в течение 48 ч. Pye et al. показали, что в 24% образцов жизнеспособность *P. aeruginosa* была снижена в 10 раз. Согласно данным Pitt TL, Govan JRW. Pseudomonas cepacia in cystic fibrosis patients. PHLS Microbiol Digest 1993; 10:69-72, бактерии *B. cepacia* погибают в случае хранения мокроты при температуре 4 °С [13].

Перед посевом мокроту предварительно отмыывают в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия и гомогенизируют механическим спо-

собом — путем перемешивания в течение 10 мин. стерильными микробиологическими бусами или химическими методами — путем обработки дитиотреитолом.

Обязательным для установления диагноза хронической инфекции, вызванной ассоциацией возбудителей, является неоднократное в течение 6 месяцев выделение чистой культуры микроорганизмов (так называемый «золотой стандарт»). Поэтому посев мокроты осуществляют на универсальные среды: 5% кровяной и шоколадный агары с наложением на поверхность дисков с гентамицином и оптохином для выявления *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* и селективные среды для выделения *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *Candida* spp., *Enterobacteriaceae* и НФГБ (ЖСА, цетримидный агар, ВКСА, Сабуро, Эндо).

При анализе данных бактериологических посевов установлено, что микроорганизмы выделяются у 61,9% детей в возрасте до 1 года, у 92,9% — в возрасте 1–4 лет, у 93,8% — в возрасте 5–7 лет и в возрасте 8–14 и 15–18 у 100% детей. Это свидетельствует о том, что колонизация легких микроорганизмами у больных муковисцидозом начинается фактически с первых дней после рождения и достигает максимума уже к 5 годам жизни. При этом, если в группе детей до 1 года *S. aureus* выявляется только у 28,6% детей, а *P. aeruginosa* — у 19%, то в возрасте 5–7 лет золотистый стафилококк обнаруживается у 87,5% детей, а *P. aeruginosa* — у 31,2% детей. Таким образом, только в возрасте до 1 года более чем у 1/3 больных муковисцидозом нижние дыхательные пути еще не обсеменены микроорганизмами, в возрасте 1–4 лет нижние дыхательные пути обсеменены почти у всех больных (92,9%), а к 8–18 годам — у 100% больных. Хроническая стафилококковая, синегнойная или смешанная инфекция начинает диагностироваться у 25% детей уже в возрасте 1–4 лет, в возрасте 5–7 лет — у 50% больных, в возрасте 8–14 лет — у 65% и к 18 годам — у 80% больных муковисцидозом [5]. При этом установлено, что в 2/3 случаев хроническая инфекция легких осуществляется не монокультурой, а ассоциацией микроорганизмов, причем у госпитализированных больных, в отличие от амбулаторных, эти ассоциации представлены, как правило, не двумя, а тремя и более видами микроорганизмов. За рубежом эти показатели в два раза ниже — в 35% исследуемых образцов БАЛ выявляют рост двух микроорганизмов и в 10% случаев ассоциации представлены тремя и более видами микроорганизмов. Наиболее часто встречающейся ассоциацией является сочетание *P. aeruginosa* + *S. aureus* (18,2%), *P. aeruginosa* + *B. cepacia* (9,1%). В 18% случаев от

больных в составе микробных ассоциаций выделяли одновременно мукоидный и немучоидный фенотип *P. aeruginosa*. В составе ассоциаций, кроме *P. aeruginosa*, часто выявляются и другие представители НФГБ — *B. cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, что, вероятно, обусловлено тропизмом этих видов микроорганизмов к легочной ткани. Полученные данные послужили основанием для заключения, что для больных муковисцидозом характерным проявлением инфекционных осложнений является смешанная инфекция. Таким образом, при анализе микрофлоры детей, больных муковисцидозом, можно утверждать, что с увеличением возраста у больных формируются постоянные очаги хронической легочной инфекции, основными возбудителями которой являются *P. aeruginosa* и *S. aureus* [5].

Хроническая смешанная инфекция, как правило, представляет собой значительно большую проблему, чем моноинфекция — как для врачей, проводящих лечение инфекционного осложнения, так и для микробиологов и эпидемиологов. В экспериментах на мышах было показано, что смешанная инфекция, вызванная *P. aeruginosa* и *B. cepacia*, усиливает вирулентные свойства возбудителей, и в течение суток наблюдается гибель всех животных, т.е. доза заражения из LD_{50} превращается в LD_{100} [14, 15]. Полученные данные позволили выдвинуть предположение, что симбиотические взаимоотношения исследуемых бактерий *in vivo* также выражаются в увеличении продукции факторов патогенности и утяжелении инфекционного процесса у животных. Усиление вирулентности *in vivo* видов *P. aeruginosa* и *B. cepacia* свидетельствует о возможности взаимного использования компонентов регуляторной системы «Quorum sensing» близкородственными бактериями. В этом случае бактерии выбирают стратегию развития острой инфекции, что может быть одной из причин ухудшения клинического состояния больных муковисцидозом, страдающих смешанной инфекцией. Нами впервые установлено, что более 83% клинических штаммов *B. cepacia* способны формировать биопленку, колонизировать поверхности органов и тканей, формировать постоянные резервуары инфекции в госпитальной среде. Способность бактерий к формированию биопленки считается маркером возбудителя, который может вызывать хроническую инфекцию. Биопленки являются клинически важным состоянием бактерий в легочной ткани, потому что в таком состоянии бактерии устойчивы к эрадикации фагоцитами и их элиминации при лечении антибиотиками, при этом *минимальная подавляющая концентрация*

(МПК) антибиотика увеличивается в 100 и более раз [16].

На основании проведенных исследований, многолетнего опыта лаборатории и анализа данных зарубежных авторов нами разработан алгоритм микробиологической диагностики хронической легочной инфекции у больных МВ (рисунок) и апробирован при обследовании 167 детей и 26 взрослых с изучением 369 образцов мокроты, полученной у них.

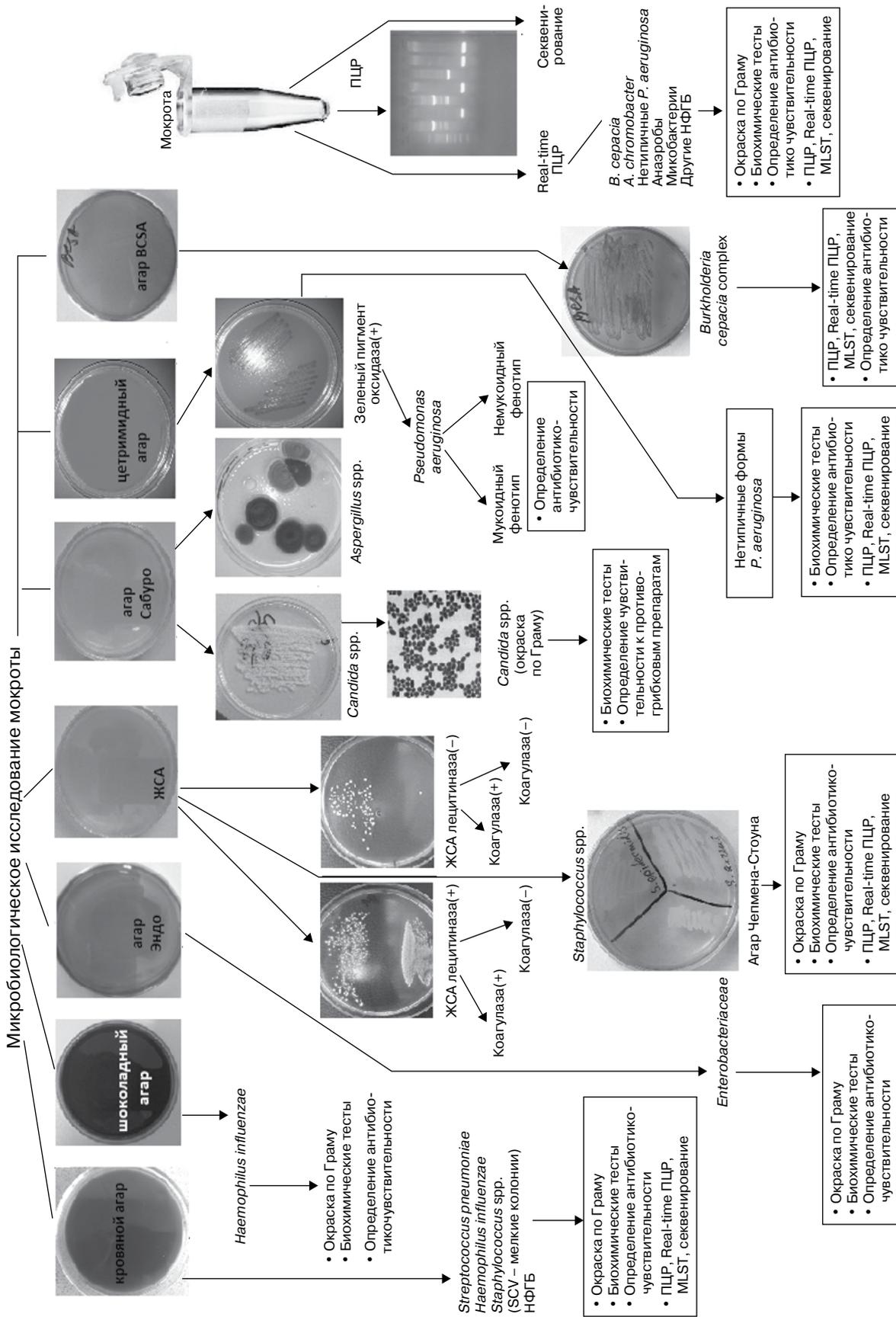
Результаты, полученные при апробации алгоритма исследования образцов клинического материала от больных муковисцидозом

При учете посева материала на элективные питательные среды было установлено, что микроорганизмы в клиническом материале встречаются в ассоциациях. При этом доминирующими микроорганизмами у больных с тяжелым течением МК являются: *P. aeruginosa* — у 51 больного ребенка (30,5%), *B. cepacia* complex — у 48 (28,7%), *S. aureus* — у 89 (53,3%) и *A. xylosoxidans* — у 15 (9%), грибы рода *Candida* — у 96 (57,5%). При этом грибы у 21 пациента были обнаружены только при вторичном посеве после антибиотикотерапии как наглядный результат влияния продолжительности антибиотикотерапии в максимальной дозе на появление грибов и необходимость их контроля при проведении данного вида терапии у больных с муковисцидозом.

Микроорганизмы почти в 100% случаях встречались в ассоциациях. У 8 больных высеивали из материала одновременно *B. cepacia*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Ассоциация *B. cepacia* и *P. aeruginosa* была у 18 больных, ассоциация *P. aeruginosa* и *S. aureus* — у 15 больных, *B. cepacia* и *S. aureus* — у 12 больных.

Идентификация золотистого стафилококка

Идентификацию стафилококков проводили на селективной среде ЖСА. На основании фенотипических свойств — наличия пигмента и лецитиназной активности 173 штамма стафилококков были отнесены к виду *S. aureus*. Для подтверждения принадлежности стафилококка к виду *S. aureus* необходимо использовать тест на коагулазу — фермент, образуемый определенными видами микроорганизмов рода *Staphylococcus*, который вызывает свертывание плазмы крови. Летициназоположительные стафилококки, характеризующиеся положительным тестом на коагулазу, были отнесены к виду *S. aureus*. Коагулазу продуцируют также *S. intermedius* и *S. hyicus*, которые



Алгоритм диагностики хронической легочной инфекции у больных МВ.

редко присутствуют в клиническом материале. В некоторых случаях идентификацию стафилококков до вида проводили с помощью коммерческой тест-системы Staph 16 (Lachema).

У больных МВ встречаются атипичные формы золотистого стафилококка, которые трудно выделять и идентифицировать общепринятыми методами из-за их замедленного роста и нетипичных для стафилококков свойств. Такие атипичные формы называют штаммами с фенотипом мелких колоний (small-colony variant – SCV). Бактерии медленно растут, в результате через 48 часов роста формируются очень маленькие без пигмента и гемолиза колонии, имеющие «fried-egg» фенотип («яичницы-глазуньи») или точечный фенотип, редко – мукоидный фенотип. SCV стафилококки имеют также другие атипичные, метаболически не свойственные нормальным стафилококкам свойства. Могут быть лецитиназоотрицательными, слабо коагулазоположительными, характеризоваться отсутствием фермента маннитола, ауксотрофными по гемину, тимидину и менадиону и характеризоваться возможностью возврата в родительскую форму. Они часто ассоциируются с персистентной инфекцией и обладают резистентностью к антибиотикам [17].

По данным С. Gómez-González et al., распространенность SCV *S. aureus* в клинических экзemplарах составляет приблизительно 1%, а среди больных муковисцидозом до 17%. SCV *S. aureus* может часто высеваться от пациентов, которые получали гентамицин или другие аминогликозиды [18]. Часто золотистый стафилококк может не идентифицироваться при смешанных инфекциях с *P. aeruginosa*: длительный рост *S. aureus* в присутствии экзопродукта 4-гидрокси-2-гептилхинолон-N-оксида бактерий *P. aeruginosa*, ингибирующего рост стафилококков, приводит к образованию SCV. Чаще SCV выделяется из нижних дыхательных путей больных МВ старших возрастных групп в ассоциации с *P. aeruginosa* [19].

Разные модели инфекции на животных показывают различный уровень вирулентности SCV по сравнению с типичным *S. aureus*. Моделирование септического артрита на мышах показывает, что SCV более вирулентны, чем типичные стафилококки. Модель эндокардита на кроликах не подтвердила различия в вирулентности у типичных и SCV стафилококков. На модели *Caenorhabditis elegans* было показано, что SCV менее вирулентны, чем первичные родственные изоляты [17].

Лабораторная диагностика и определение чувствительности к антибиотикам атипичных форм золотистого стафилококка могут иметь существенное значение для выбора тактики антимикробной

терапии стафилококковой инфекции у больных МВ.

В результате наших исследований были выделены 12 штаммов SCV. При этом в 6 случаях наблюдали смешанную инфекцию с *P. aeruginosa*. 4 из выделенных штамма были резистентными более чем к трём группам антибиотиков, у двух из которых выявлен ген *mecA*. Поэтому при выделении штаммов с SCV фенотипом необходимо подтвердить принадлежность к виду *S. aureus* с использованием молекулярно-генетических методов (ПЦР, MLST) и исследовать на антибиотикочувствительность.

Другим важным моментом в диагностике стафилококковой инфекции является идентификация *метициллинорезистентных стафилококков* (MRS), среди которых особый интерес представляют MRSA.

Определение чувствительности к антибиотикам 208 штаммов и выявление MRS проводили диско-диффузионным методом, 82 штамма из этих образцов проверяли также с помощью АТВ стрипов (BioMerieux). Результаты тестов показали, что 31 (15%) штамм устойчив к оксацилину. Тест на коагулазу показал, что 15 из них были коагулазоположительными, что позволило нам, учитывая также пигментообразование и лецитиназную активность, отнести их к MRSA, а остальные 16 штаммов – к метициллинрезистентным *коагулидоотрицательным стафилококкам* (КОС).

Определение чувствительности к антибиотикам 82 штаммов стафилококков с помощью АТВ стрипов показало, что 29 из них были резистентны менее чем к трем антибиотикам, 31 – к 3–5 антибиотикам, 22 – более чем к 5 антибиотикам. 71 из 82 (88,7%) штаммов был устойчив к гентамицину, 69 (84,1%) – к пеницилину, 50 (61%) – к эритромицину. К ванкомицину и линезолиду были чувствительны 100%, к рифампицину и фузидину – 97,9 и 93,8% штаммов соответственно.

С клинической точки зрения важно дифференцировать штаммы, имеющие ген *mecA*, обуславливающий резистентность ко многим антибиотикам, от штаммов с другими редко встречающимися механизмами резистентности. При стафилококковых инфекциях, вызванных штаммами, характеризующимися наличием гена *mecA*, терапия бета-лактамами антибиотиками (пенициллинами, цефалоспоридами, карбапенемами) неэффективна, кроме того, эти штаммы часто бывают резистентны практически ко всем другим классам антибиотиков, за исключением гликопептидов (ванкомицин, тейкопланин).

С помощью ПЦР гена *mecA* было установлено, что у 29 штаммов резистентность к оксацилину

обусловлена наличием гена *mecA*. Резистентность к оксациллину двух остальных штаммов можно объяснить гиперпродукцией β -лактамазы BOR-SA (borderline *S. aureus*), либо новой, модифицирующей способностью связывания пенициллина (MOD-SA) или наличием гена *mecC*, т.е. нового варианта гена *mecA*, идентичность которого с *mecA* составляет примерно 70%.

Так как способность к формированию биопленок свойственна штаммам, вызывающим хроническую инфекцию, нами было изучено формирование биопленок у 106 штаммов стафилококков. По способности формировать биопленки были разделены на три группы: первая — обладающие выраженной способностью к формированию биопленки; вторая — с умеренной способностью образовывать биопленки; третья — с низкой способностью или отсутствием способности формирования биопленки. Установлено, что из 106 изученных изолятов у 16 штаммов (15,1%) наблюдали выраженную способность к формированию биопленки, у 54 (50,9%) — умеренную, у 36 штаммов (40%) низкую.

Основным экзополисахаридом, продуцируемым *S. aureus* и *S. epidermidis*, с помощью которого происходит межклеточное взаимодействие при образовании биопленок, является *полисахарид межклеточной адгезии* (PIA), также известный как *поли-N-ацетилглюкозамин* (PNAG). Синтез PIA/PNAG кодируется *ica* опероном, состоящим из 4 генов: *icaA*, *icaB*, *icaC* и *icaD* [20]. Ключевыми продуктами являются трансмембранные протеины IcaA и IcaD, которые участвуют в синтезе PNAG. В связи с этим одним из направлений дальнейшего изучения штаммов стафилококков, выделенных от больных муковисцидозом, будет исследование на наличие генов *icaA* и *icaD*.

Таким образом, для точной идентификации видов стафилококков необходимо использовать комплекс бактериологических, биохимических, молекулярно-генетических методов.

Идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий

Среди микроорганизмов, вызывающих инфекцию у больных муковисцидозом, значительное место занимают грамотрицательные неферментирующие бактерии, общими признаками которых являются природная устойчивость ко многим антибиотикам, высокая резистентность к дезинфектантам и распространение в больничных стационарах от больного к больному с помощью рук и выделений медперсонала. Грамотрицательные неферментирующие бактерии принадлежат к нескольким родам, и условно могут быть разделены на **оксидазопо-**

ложительные — роды *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas*, группу бактерий WO-1 (weak oxidizer) со слабой оксидазной активностью, группу *Pseudomonas* подобных бактерий и **оксидазоотрицательные** — род *Acinetobacter*, виды *Chryseomonas luteola* и *Flavimonas oryzihabitans* [21].

Идентификация *Pseudomonas aeruginosa*. Род *Pseudomonas* (sensu stricto) включает 11 видов: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, *P. luteola*, *P. oryzihabitans*. Для больных муковисцидозом наиболее значимым является *P. aeruginosa*.

Типичные изоляты синегнойной палочки идентифицируют по таким свойствам, как пигментообразование, положительный тест на оксидазу, рост при 42 °C, характерный земляничный запах, рост на цетримидном агаре. При этом от больных МВ с хронической синегнойной инфекцией часто изолируют атипичные формы *P. aeruginosa*, которых трудно идентифицировать без применения молекулярно-генетических методов (ПЦР) [22].

При исследовании образцов мокроты от больных детей за период 2012–2013 гг. бактерии *P. aeruginosa* были выделены от 51 ребенка (30,5%). При этом от 25 детей была изолирована *P. aeruginosa* с мукоидным фенотипом, который характерен для хронической синегнойной инфекции легких. У 10 детей выделяли мукоидный и немуконидный фенотипы одновременно. От 16 детей были выделены и идентифицированы штаммы с немуконидным фенотипом. Муконидные штаммы при хронической инфекции резистентны к защитным силам организма и лечению антибиотиками, что обусловлено наличием таких факторов патогенности, как альгинат и рамнолипид, продукцию которых регулирует система *quorum sensing*, ответственная, помимо синтеза ряда факторов патогенности, и за образование биопленки [23].

Развитию хронической синегнойной инфекции предшествует инфицирование меняющимися штаммами *P. aeruginosa*, при этом штаммы отличаются друг от друга. Установление хронической инфекции происходит благодаря образованию биопленок и адаптации в легких больных МВ штаммов: они переходят в мукоидную форму, становятся гипермутабельными и соответственно резистентными к антибиотикам [24]. Поэтому дополнительными методами исследования хронической синегнойной инфекции у больных МВ могут быть изучение способности образовывать биопленку и выявление гипермутабельных штаммов.

Исследование чувствительности штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом, с помощью тест-системы АТВ и диско-диффузионным методом показало, что 100% штаммов *P. aeruginosa* были чувствительны к колистину, 85,5% — к цефтазидиму, 82% — к меропенему, 71% штаммов к имипенему, азлоциллину, левофлоксацину и тобрамицину, 75% штаммов — к офлоксацину и ципрофлоксацину, 97% — пиперациллину/тазобактаму, 92% — к пиперациллину.

82% штаммов *P. aeruginosa* были устойчивы к ампициллину/сульбактаму, 79% — к ко-тримоксазолу, 79% — к цефотаксиму, 62,5% — к цефтриаксону и 83% к левомецетину. (хлорамфениколу).

Современные схемы терапии с использованием ингаляционных форм тобрамицина и системной антибактериальной терапии показали высокую эффективность при первичном, интермиттирующем и хроническом высева *P. aeruginosa*. В связи с этим очень важно своевременно установить диагноз синегнойной инфекции и организовать мониторинг флоры мокроты [25].

Согласно нашим исследованиям [5], в группе детей до 1 года у 19% встречается *P. aeruginosa*, а в возрасте 5–7 лет *P. aeruginosa* встречается уже у 31,2% детей. С возрастом процент высева *P. aeruginosa* увеличивается.

Таким образом, учитывая колонизацию дыхательных путей *P. aeruginosa* в раннем детском возрасте, необходимо осуществлять мониторинг микрофлоры сразу после постановки диагноза муковисцидоза.

Идентификация *Achromobacter xylosoxidans*.

A. xylosoxidans — опортунистический патоген, оксидазо- и каталазоположительный грамотрицательный неферментирующий микроорганизм. Обладает природной резистентностью ко многим антибиотикам.

В последнее время хроническая инфекция, вызванная *Achromobacter xylosoxidans*, у больных муковисцидозом встречается часто. Согласно нашим данным, третьим по частоте встречаемости из НФГБ является *Achromobacter xylosoxidans*, который при исследовании образцов от больных детей за 2012–2013 гг. выделяли в 9% случаев.

Очень часто *A. xylosoxidans* ложно диагностируют как *B. cepacia* complex в связи с их фенотипическим сходством при культивировании на 5% кровяном агаре и ростом на ВКСА — селективной для *B. cepacia* среде. Для подтверждения принадлежности бактерии к виду *A. xylosoxidans* необходимо использовать тест-системы API 20 NE (BioMerieux) и ПЦР для выявления локуса в 16S рДНК со специфическими праймерами AX-F1 и AX-B1 [9].

Идентификация *Burkholderia cepacia* complex.

Продолжительность жизни пациентов с муковисцидозом ассоциирована с комплексом *B. cepacia*. Изучение данного возбудителя и поиск адекватных методов антибактериальной терапии являются предметом исследования последних лет. В отличие от терапии синегнойной инфекции, не разработано эффективных с высокой степенью доказательности схем антибактериальной терапии. Для РФ характерна высокая частота данной инфекции, в отличие от других стран, что обуславливает актуальность и необходимость организации идентификации возбудителя и мониторинга его антибиотикорезистентности [3].

В настоящее время *B. cepacia* complex включает 17 видов микроорганизмов: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia*, *B. anthina*, *B. ubonensis*, *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. metallica*, *B. contaminans*, *B. lata* [26].

Точная идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от больных МВ, является наиболее сложной задачей. Очень часто нетипичные по фенотипическим свойствам микроорганизмы ошибочно могут диагностироваться как другие виды микроорганизмов. Ложная идентификация *P. aeruginosa* или *B. cepacia* complex могут иметь нежелательные последствия, ведущие к выбору неправильной терапии и изоляции пациентов.

Например, в нашем исследовании два штамма атипичной *P. aeruginosa* и два штамма *A. xylosoxidans* были неправильно идентифицированы API 20NE как *B. cepacia*, 12 штаммов *B. cepacia* биохимическими тестами (Lachema) были неправильно идентифицированы как другие НФГБ. Около 3,4% штаммов биохимическими тестами не удалось идентифицировать вообще. Для окончательной точной идентификации были использованы молекулярно-генетические методы.

D. L. Kiska et al. показали в своей работе, что точность идентификации НФГБ с помощью четырех различных коммерческих тест-систем составляет 57–80%, а точность идентификации *B. cepacia* — 43–86%. При этом все тесты идентифицировали НФГБ, не являющиеся *B. cepacia*, как *B. cepacia* [27].

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. J Clin Microbiol 2005; 43:4070-4075, сравнивали результаты идентификации с помощью API 20NE 88

Таблица 1. Микробиологический мониторинг 24 детей, больных МВ

Микроорганизм	Интервал обследования	Хроническая инфекция	Штамм не менялся (RAPD-PCR)
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	2 мес. (4 года)	18	18
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2–14 мес.	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3–15 мес.	5	Нет данных
<i>Staphylococcus aureus</i>	4–15 мес.	7	4

Таблица 2. Микробиологическая эффективность антибиотикотерапии у детей с МВ

Микроорганизм	Число детей, у которых выделяли микроорганизм до антибиотикотерапии	Число детей, у которых выделяли микроорганизм после антибиотикотерапии, абс. (%)
<i>P. aeruginosa</i>	34	14 (41,2)
<i>S. aureus</i>	58	15 (24,2)
<i>B. cepacia</i> complex	36	у 27 (75,0)
<i>B. xylosoxidans</i>	9	5 (55,5)
<i>Candida</i> spp.	42	34 (80,9)

грамотрицательных оксидазоположительных палочек с результатами секвенирования 16S rRNA. Точность идентификации составляла 17%.

В связи с этим методы, основанные на ПЦР, в частности real-time ПЦР, могут быть незаменимыми в сложных ситуациях.

Для точной идентификации *B. cepacia* complex необходимо соблюдать следующую схему:

1) посев мокроты на 5% кровяной агар, ВССА с дальнейшим выделением чистой культуры;

2) исследование чистой культуры молекулярно-генетическими методами: ПЦР на *recA* ген [6];

3) исследование мокроты молекулярно-генетическими методами [28].

Идентификация анаэробной инфекции.

В результате процессов в легких при муковисцидозе, приводящих к нарушению мукоцилиарного очищения, изменяется газообмен в легких и могут создаваться анаэробные условия, что способствует возникновению анаэробной инфекции. Наши исследования показали, что причиной легочной инфекции могут быть также анаэробные микроорганизмы. У двух детей классические бактериологические методы не позволили идентифицировать возбудителя легочной инфекции. При исследовании мокроты с помощью real-time ПЦР были выявлены анаэробные микроорганизмы. Для выращивания и идентификации анаэробов необходимы специальные анаэробные условия (анаэрозат). При отсутствии анаэрозата методом выбора является ПЦР real-time, с помощью которой идентификация анаэробов возможна непосредственно в мокроте.

Мониторинг микрофлоры верхних дыхательных путей

Вторичный посев клинического материала от детей после антибиотикотерапии дал возможность оценить эффективность антибиотикотерапии у больных МВ. При этом было установлено, что у 41 ребенка при первичном посеве были выделены бактерии *P. aeruginosa*. Эффективность антибиотикотерапии проверяли у 34 больных, из которых у 14 (41,2%) выделяли *P. aeruginosa* и после проведенного лечения.

Из 62 детей, у которых при первичном посеве выделяли *S. aureus*, эффективность лечения проверяли у 58, из которых у 15 (26%) выделили *S. aureus* после антибиотикотерапии.

У 45 детей при первичном посеве идентифицировали бактерии *B. cepacia* complex (у 35 — *B. cenocepacia*, у 1 — *B. contaminans* и у 1 — *B. vietnamensis*). Результаты лечения проверяли у 36 больных, из которых у 27 (75%) повторно выделяли бактерии *B. cepacia* complex. Все 27 штаммов, выделенных повторно, относились к виду *B. cenocepacia*. Бактерии, принадлежавшие к видам *B. contaminans* и *B. vietnamensis*, не были выделены после проведенного лечения.

Из 9 детей, у которых при первичном посеве выделяли *A. xylosoxidans*, у 5 (55%) высевали этот вид микроорганизма после лечения антибиотиками.

У 42 детей при первичном посеве были выделены грибы рода *Candida*. У 34 из них выделяли грибы рода *Candida* при вторичном посеве после антибиотикотерапии. У 21 пациента при первом посеве не

выделяли грибы рода *Candida*. Однако повторно после антибиотикотерапии они были обнаружены.

Новые данные, касающиеся хронической инфекции у больных муковисцидозом, можно получить в результате постоянного мониторинга пациентов с использованием стандартизованных методов микробиологической диагностики, включая молекулярно-генетические методы.

Микробиологический мониторинг 24 детей, больных МВ, позволил выявить хроническую инфекцию у 18 больных, связанную с бактериями *Burkholderia cepacia* complex (интервал 2–12 мес. — 4 года), у 6 — с *A. xylosoxidans* (интервал 2–14 мес.), у 5 — с *P. aeruginosa* (интервал 3–15 мес.), у 7 — с *S. aureus* (интервал 4–15 мес.) (табл. 1).

При этом с помощью RAPD-PCR было установлено, что у 18 больных с хронической инфекцией, вызванной бактериями *B. cepacia* complex, штамм, выделенный в начале исследования, идентичен со штаммами, выделенными через 2 месяца и до 4 лет наблюдения, т.е. в 100% случаев при хронической инфекции, вызванной бактериями комплекса *B. cepacia*, штаммы не меняются. Смена штамма не наблюдалась у 6 больных с хронической *A. xylosoxidans* инфекцией, взятых под наблюдение, а также у 4 больных с хронической инфекцией, вызванной *S. aureus*. Эти данные свидетельствуют о персистенции штаммов доминирующих микроорганизмов у больного МВ и невозможности элиминировать их с помощью проводимой антибиотикотерапии (табл. 2).

В связи с этим при диагностике хронической инфекции необходимо проведение молекулярно-генетического мониторинга штаммов, выделенных через определенные интервалы времени.

Таким образом, эффект антибиотикотерапии при лечении синегнойной инфекции наблюдался у 58,8% больных муковисцидозом, в случаях золотистого стафилококка — у 75,8%, *B. cepacia* complex — у 27%, *A. xylosoxidans* — у 45%, грибов рода *Candida* — 19%. Отсутствие высева *B. cepacia* у 27% при повторном исследовании не является окончательным подтверждением элиминации данного микроорганизма в связи с вероятностью перехода этих бактерий в некультивируемое состояние. У 21 пациента грибы рода *Candida* были обнаружены только при вторичном посеве после антибиотикотерапии.

Полученные данные подтвердили необходимость применения комплекса бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов для диагностики хронической смешанной инфекции легких.

Выводы

1. Мониторинг микрофлоры нижних дыхательных путей необходимо начинать сразу после постановки диагноза МВ.

2. Для диагностики хронической инфекции нижних дыхательных путей клинические образцы необходимо брать при каждом посещении поликлиники (не реже 1 раза в 3 месяца) или во время госпитализации при обострениях.

3. Из всех клинических образцов мокрота является рекомендуемым материалом для регулярного исследования у больных МВ. Исследование мазка из зева проводят только при невозможности получить мокроту.

4. При постоянных отрицательных результатах посева мазка из зева, но при ухудшении функции легких необходимо исследовать индуцированную гипертоническим раствором мокроту или БАЛ.

5. Исследования мокроты следует проводить не позднее 2 ч после сбора; 2–3-часовое охлаждение не влияет на жизнеспособность микрофлоры мокроты; при удлинении сроков исследования образцы должны храниться в холодильнике при температуре 4 °С [29].

6. Результаты бактериологического исследования мокроты, посеянной позднее 2–3 часов после отбора, должны интерпретироваться с осторожностью.

7. Идентификацию типичных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* можно проводить на основании таких фенотипических свойств как пигментообразование, положительная оксидазная реакция, рост при 42 °С.

8. Наличие бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex и *Staphylococcus aureus* в образце должно учитываться независимо от количества.

9. Для выделения *S. aureus*, *H. influenzae*, *B. cepacia* complex и грибов бактериологи должны использовать селективные среды.

10. Комерческие тест-системы не должны использоваться для идентификации бактерий *B. cepacia* complex, а также *Pandoraea* spp., *Ralstonia* spp., *Burkholderia gladioli* [13].

11. Для подтверждения диагноза инфекции, вызванной *B. cepacia* complex, необходимо использовать ПЦР для гена *recA*.

12. Идентификацию атипичных бактерий *B. cepacia* complex, *S. maltophilia*, *Achromobacter* spp. и *P. aeruginosa* можно проводить только с использованием молекулярно-генетических методов.

13. Штаммы бактерий *B. cepacia* complex должны далее быть проверены на принадлежность к эпидемическому генотипу ST 709 [1].

14. Идентификация доминирующих микроорганизмов и определение их чувствительности к антибиотикам являются сложными задачами, поэтому все исследования должны проводиться в лабораториях,

оснащенных современным оборудованием, имеющих специалистов-бактериологов, владеющих современными молекулярно-генетическими методами.

Литература

1. Воронина О.Л., Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Кунда М.С., Аветисян Л.Р., Орлова А.А., Лунин В.Г., Капранов Н.И., Амелина Е.Л., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. Характеристика генотипов штаммов *Burkholderia cepacia* complex, выделенных от больных в стационарах Российской Федерации. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2013; 2:22-30.
2. Красовский С.А., Амелина Е.Л., Черняк А.В., Каширская Н.Ю., Никонова В.С., Воронкова А.Ю., Кондратьева Е.И., Самойленко В.А., Шерман В.Д., Капранов Н.И., Усачева М.В., Науменко Ж.К., Горинова Ю.В., Чучалин А.Г. Роль регистра Московского региона в ведении больных муковисцидозом. Пульмонология. 2013; 2:27-33.
3. Красовский С.А., Никонова В.С., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И., Черняк А.В., Капранов Н.И., Амелина Е.Л., Шерман В.Д., Самойленко В.А., Воронкова А.Ю., Шабалова Л.А., Симонова О.И., Усачева М.В., Черников В.В. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области. Вопросы современной педиатрии 2013; 1:24-30.
4. Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Капранов Н.И., Алексеева Г.В., Каширская Н.Ю., Аветисян Л.Р., Семейкин С.Ю., Данилина Г.А., Пивкина Н.В. Персистенция *Burkholderia cepacia* у больных муковисцидозом. Ж микробиол эпидемиол иммунобиол 2012; 4:93-8.
5. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Семейкин С.Ю., Аветисян Л.Р., Каширская Н.Ю., Пивкина Н.В., Данилина Г.А., Батов А.Б., Бусук Г.П. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. Ж микробиол эпидемиол иммунобиол 2010; 1:15-20.
6. Алексеева Г.В., Чернуха М.Ю., Шагинян И.А. Идентификация бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* с помощью ПЦР // «Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее применение в бактериологии». Учебно-методическое пособие для врачей-бактериологов, Москва, 2006, глава 2.7, С. 117-26.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2.1890-04. Москва, 2004 г.
8. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18(3):268-81.
9. Lambiase A, Catania MR, Del Pezzo M, Rossano F, Terlizzi V, Sepe A, Raia V. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(8):973-80.
10. Воронина О.Л., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Орлова А.А., Чернуха М.Ю., Лунин В.Г., Амелина Е.Л., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. Экспресс-диагностика микроорганизмов, поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. Клиническая лабораторная диагностика 2013; 11:53-8.
11. Equi AC, Pike SE, Davies J, Bush A. Use of cough swabs in a cystic fibrosis clinic. Arch Dis Child 2001; 85(5):438-9.
12. Kabra SK, Alok A, Kapil A, Aggarwal G, Kabra M, Lodha R, Pandey RM, Sridevi K, Mathews J. Can throat swab after physiotherapy replace sputum for identification of microbial pathogens in children with cystic fibrosis? Indian J Pediatr. 2004 Jan; 71(1):21-3.
13. Group, Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working. Laboratory Standards for Processing Microbiological Samples from People With Cystic Fibrosis. Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group, September 2010.
14. Чернуха М.Ю., Данилина Г.А., Шагинян И.А., Алексеева Г.В., Гинцбург А.Л. Роль регуляторной системы «quorum sensing» в образовании биопленок бактериями *Burkholderia cepacia* и *Pseudomonas aeruginosa*. Ж микробиол, эпидемиол, иммунобиол 2009; 4:39-43.
15. Чернуха М.Ю., Романова Ю.М., Малеев Г.В., Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. Роль регуляторной системы «Quorum sensing» в симбиотическом взаимодействии бактерий *Burkholderia cepacia* и *Pseudomonas aeruginosa* при смешанной инфекции. Журн микробиол 2006; 4:32-7.
16. Шагинян И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Батов А.Б. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик. Журн микробиол 2007; 1:3-9.
17. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. J Clin Microbiol 2007; 45(1):168-72.
18. Gómez-González C, Acosta J, Villa J, Barrado L, Sanz F, Orellana MA, Otero JR, Chaves F. Clinical and molecular

- characteristics of infections with CO₂-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2010; 48 (8):2878-84.
19. Hoffman LR, Déziel E, D'Argenio DA, Lépine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW, Miller SI. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 26, 2006; 103(52):19890-5.
 20. de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ. The ica Operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 2002; 40(2):382-8.
 21. Шагинян И. А., Чернуха М. Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2005; 7(3): 271-85.
 22. 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. J Clin Microbiol 2005; 43:4070-5.
 23. Erickson DL, Endersby R, Kirkham A, Stuber K, Vollman DD, Rabin HR, Mitchell I, Storey DG. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. Infect Immun 2002; 70(4):1783-90.
 24. Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. J Antimicrob Chemother 2008; 61(5):1053-6.
 25. Капранов Н. И., Каширская Н. Ю. «Муковисцидоз». Методические рекомендации. Издание четвертое переработанное и дополненное / под редакцией Капранова Н. И., Каширской Н. Ю. М.: 2011.-124 с.
 26. Sousa SA, Ramos CG, Leitão JH. *Burkholderia cepacia* complex: emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. Int J Microbiol 2011; 2011:607575.
 27. 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. J Clin Microbiol 1996; 34: 886-91.
 28. Воронина О. Л., Кунда М. С., Аксенова Е. И., Орлова А. А., Чернуха М. Ю., Лунин В. Г., Амелина Е. Л., Чучалин А. Г., Гинцбург А. Л. Экспресс-диагностика микроорганизмов, поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. Клиническая лабораторная диагностика 2013; 11:53-8.
 29. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535. Москва, 1985 г.
 30. Шагинян М. А., Чернуха М. Ю., Данилина Г. А., Алексеева Г. В., Гинцбург А. Л. Роль регуляторной системы «quorum sensing» в образовании биопленок бактериями *Burkholderia cepacia* и *Pseudomonas aeruginosa*. Ж микробиол эпидемиол иммунобиол, 2009; 4:39-43.