

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредители:

Синопальников А.И.; Пискунов Г.Г.; Козлов Р.С.; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Главный редактор:
Синопальников А.И.

Адрес редакции:

214019, Смоленская обл., г. Смоленск, ул. Кирова, д. 46А
Эл. почта: info@cmac-journal.ru

Адрес для корреспонденции:

214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: +7(4812)45-06-02

Издатель МАКМАХ:

214019, г. Смоленск, ул. Кирова 46А. www.iaacmac.ru

Адрес типографии:

214020, Россия, г. Смоленск, ул. Смольянинова, д. 1

Электронная версия журнала:

https://cmac-journal.ru

Подписка на сайте издателя:

https://service.iaacmac.ru

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Запись в реестре зарегистрированных СМИ: ПИ № ФС 77 – 86269 от 27.11.2023

Не распространяется через предприятия связи
Тираж 3000 экз.

Свободная цена

Дата выхода – 00.00.2025

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук
Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 №436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (Микробиологическая лаборатория ЕКДЛ SmartLab АО «Группа компаний «МЕДСИ»)

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2025.

Содержание

Болезни и возбудители

Гордеев А.Б., Бембеева Б.О., Нечаева О.В., Скоробогатый А.В., Денисов П.А., Изюмов Р.В., Николаева А.В., Зубков В.В., Бухарова М.В., Курочкина С.В., Устюжанин А.В., Савичева А.М., Шалепо К.В., Антонов Ю.В., Шумакова В.С., Припутневич Т.В.

428 Молекулярно-биологические особенности штаммов *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных женщин и рожениц в различных регионах Российской Федерации

Зубарева Н.А., Паршаков А.А., Голуб А.В., Золотухин К.Н., Козлов Р.С., Малкова О.Г., Молдованов А.В., Самородов А.В., Шаповалов К.Г., Шень Н.П.

442 Проблема сепсиса и антибиотикорезистентности глазами студентов медицинских вузов: результаты многоцентрового кросс-секционного опроса

Захаренкова П.В., Рачина С.А., Стрелкова Д.А., Авдеев С.Н., Пименов Н.Н., Захаренков И.А., Власенко А.Е., Фомичева А.А., Неклюдова Г.В., Прошкина А.А., Тарькина Е.В.

450 Влияние пандемии COVID-19 на повседневную жизнь и эмоциональное состояние медицинских работников: взгляд изнутри

Веселова Е.И., Перегудова А.Б., Тинькова В.В., Тюлькова Т.Е., Ловачева О.В., Казюлина А.А., Самойлова А.Г.

462 Молекулярно-генетические особенности возбудителей при неблагоприятном течении туберкулеза и ВИЧ-инфекции

Казюлина А.А., Панова А.Е., Байракова А.Л., Меренкова А.И., Соболев П.В., Тюлькова Т.Е., Самойлова А.Г.

466 Диагностика и определение резистентности нетуберкулезных микобактерий как основа для принятия клинических решений

Антибиотикорезистентность

Эйдельштейн М.В., Шек Е.А., Леонов В.В., Шайдуллина Э.Р., Романов А.В., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Скленева Е.Ю., Азизов И.С., Дехнич А.В., Козлов Р.С.

475 Структура популяции *Pseudomonas aeruginosa* в Российской Федерации: роль клонов «высокого риска» в распространении карбапенемаз и устойчивости к карбапенемам

Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Медведева О.С., Воронкова А.Ю., Красовский С.А., Кондратьева Е.И.

485 Генетические детерминанты антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с хронической инфекцией легких при муковисцидозе

Опыт работы

Кутловская Е.Н., Виноградова А.Г., Лютова Е.Ю., Белорус О.В., Бикбулатова Л.Н., Меньшаков В.В., Захарова М.Г., Новиков С.В., Кузьменков А.Ю. и рабочая группа по мониторингу АМП

494 Региональная система автоматической валидации микробиологических заключений и мониторинга антимикробной резистентности: опыт Ямало-Ненецкого автономного округа

Умпелева Т.В., Цвиренко А.С., Кильдюшева Е.И., Премыслева Г.Е., Скорняков С.Н., Вахрушева Д.В.

506 Сопоставление микробных профилей мокроты и бронхиальных смывов пациентов с туберкулезом легких по данным ПЦР-исследования

Новокович Ю.С., Сапунова И.Д., Мезенцева Н.И., Радионова В.В., Глотов О.С., Асеев М.В., Глотов А.С.

516 Исследование контрольных материалов ФСВОК, предназначенных для ПЦР-диагностики, в оценке качества выявляемости бактерий методом NGS секвенирования гена 16S рРНК

Смирнова С.С., Авдюнин Д.Д., Холманских М.В., Стагильская Ю.С., Жуйков Н.Н., Итани Т.М.

524 Генетическая характеристика изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных в реанимационном отделении инфекционного госпиталя в период пандемии COVID-19

Сопоставление микробных профилей мокроты и бронхиальных смывов пациентов с туберкулезом легких по данным ПЦР-исследования

Умпелева Т.В., Цвиренко А.С., Кильдюшева Е.И., Премыслева Г.Е., Скорняков С.Н., Вахрушева Д.В.

Уральский НИИ фтизиопульмонологии – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Контактный адрес:

Татьяна Валерьевна Умпелева
Эл. почта: tumpeleva@yandex.ru

Ключевые слова: туберкулез легких, микробиота, мокрота, бронхиальный смыв, ПЦР.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Сопоставить профили микробиоты мокроты и бронхиальных смывов у пациентов с туберкулезом легких, полученные с использованием метода ПЦР, и дать оценку клинической значимости полученных микробных профилей.

Материалы и методы. Проведено сопоставление результатов исследования мокроты и бронхиальных смывов с использованием ПЦР тест-систем «Бакскрин УПМ» и «Фемофлор 16» (ООО «ДНК-Технология», Россия) у 51 пациента с туберкулезом легких.

Результаты. Проведенные исследования показали, что как в мокроте, так и в бронхиальных смывах у большинства пациентов выявлялись следующие доминирующие таксоны микроорганизмов: представители родов *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Haemophilus*. В большинстве случаев наличие микроорганизмов в образцах бронхиальных смывов соответствовало их наличию и количеству в мокроте. Наличие условно-патогенных микроорганизмов в образцах бронхиальных смывов в количестве, превышающем таковое в мокроте, может свидетельствовать об их размножении в легких и, как следствие, клинической значимости. При локализации туберкулезного процесса в нижних долях легких профили микробиоты мокроты и бронхиальных смывов не совпадают чаще, чем при верхнедолевой локализации процесса. Уменьшение доли «доминирующих» таксонов в бронхиальных смывах ассоциировано с большей продолжительностью лечения туберкулеза.

Выводы. Образцы бронхиальных смывов являются предпочтительным видом клинического материала для поиска взаимосвязи между особенностями микробиоты и вариантами клинического течения туберкулеза.

Original Article

Comparison of microbial profiles of sputum and bronchial washes in patients with pulmonary tuberculosis using PCR data

Umpeleva T.V., Tsvirenko A.S., Kildyusheva E.I., Premysleva G.E., Skornyakov S.N., Vakhrusheva D.V.

Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Yekaterinburg, Russia

Contacts:

Tatiana V. Umpeleva
E-mail: tumpeleva@yandex.ru

Key words: pulmonary tuberculosis, microbiota, sputum, bronchial wash, PCR.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To compare microbiota profiles of sputum and bronchial washes in patients with pulmonary tuberculosis obtained using PCR and to assess clinical significance of obtained microbial profiles.

Materials and methods. We compared the results of sputum and bronchial washes using PCR-based test systems «Backscreen UPM» and «Femoflor 16» (DNA-Technology, Russia) in 51 patients with pulmonary tuberculosis.

Results. The analysis revealed that the following dominant taxa of microorganisms were detected both in sputum and bronchial washes in the majority of patients: representatives of the genera *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, and *Haemophilus*. In most cases, the presence or absence of microorganisms in bronchial flush samples corresponded to their presence and abundance in sputum. The presence of opportunistic microorganisms in bronchial washes at levels exceeding those in sputum may indicate their proliferation in the lungs, highlighting their clinical significance. Cluster analysis revealed that in the case of localization of the tuberculosis process in the lower lobes of the lungs, the profiles of sputum and bronchial washes do not coincide more often than in the case of upper lobe localization of the process. A lower proportion of “dominant” taxa in bronchial washes was associated with a longer duration of tuberculosis treatment.

Conclusions. Bronchial washes are the preferred type of clinical material for searching the relationship between microbiota characteristics and variants of the clinical course of tuberculosis.

Введение

Современные исследования респираторной микробиоты позволили установить, что в разных отделах респираторного тракта создается особая, специфическая комбинация физиологических параметров (температуры, pH, давления газов), которые определяют структуру микробного сообщества каждого отдела. У большинства здоровых людей микробиота нижних отделов респираторного тракта имеет сходство по структуре с микробиотой ротоглотки, хотя и содержит меньше резидентных микроорганизмов (бактерий, грибов, вирусов) [1–3]. Состав микробного сообщества нижних отделов определяется темпами иммиграции, размножения и элиминации представителей микробиоты. В бактериальной составляющей наиболее распространенными родами являются: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Haemophilus* [4, 5]. Микробиота легких обеспечивает устойчивость к колонизации респираторными патогенами и участвует в создании и поддержании гомеостаза иммунной системы в легких [2]. Заболевания легких приводят к изменению баланса физиологических параметров и, как следствие, к изменению структуры легочного микробного сообщества (изменение состава, увеличение численности отдельных таксонов), которое может приобретать существенные отличия от микробиома ротоглотки [6–8]. Изменения микробиоты дыхательных путей, выявленные у пациентов с туберкулезом легких, позволяют предположить, что она может играть значительную роль в различных патофизиологических процессах, происходящих при туберкулезе [2]. Этот факт позволяет считать микробиоту легких потенциальной мишенью для изменения тактики и улучшения результатов лечения пациентов с различной патологией легких, в том числе с туберкулезом [9–12].

При туберкулезе легких клиническая значимость других микроорганизмов (помимо *Mycobacterium tuberculosis*) изучена недостаточно, и их вклад в патогенез заболевания не учитывается. Оценка качественного и количественного состава микробиоты легких при туберкулезе основана преимущественно на результатах анализа мокроты как наиболее доступного вида биоматериала [13–16]. Однако мокрота легко контаминируется микроорганизмами, обитающими в верхних дыхательных путях, что приводит к невозможности достоверно оценить по мокроте микробный состав очага инфекции, расположенного в нижних дыхательных путях [17]. С этой точки зрения материал, полученный непосредственно из нижних отделов респираторного тракта при проведении бронхоскопии, может являться наиболее репрезентативным для изучения микробиоты легких при туберкулезе [12, 18–21]. Вместе с тем, в процессе бронхоскопии также существует риск контаминации образцов микроорганизмами из ротоглотки и контаминации ДНК микроорганизмов с поверхности бронхоскопа (в случае использования молекулярно-генетических методов детекции) [22].

Еще одним важным фактором, влияющим на результаты исследования микробиоты, является выбор метода

исследования. Современная тенденция – использование молекулярно-генетических методов, результат которых в меньшей степени зависит от культуральных особенностей микроорганизмов [23, 24].

Цель исследования – сопоставить профили микробиоты мокроты и бронхиальных смывов у пациентов с туберкулезом легких, полученные с использованием метода ПЦР и дать оценку клинической значимости микробных профилей.

Материалы и методы

В выборку был включен диагностический материал, полученный от пациентов с установленным диагнозом туберкулез легких, госпитализированных в УНИИФ – филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России для прохождения обследования и лечения, подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании, имеющих показания для проведения плановой бронхоскопии, выделяющих мокроту.

Сбор образцов клинического материала

Утреннюю порцию мокроты собирали в стерильные пробирки на 50 мл и сразу доставляли в лабораторию при комнатной температуре. Материал для исследования (250 мкл) отбирали непосредственно после доставки образца в лабораторию и до момента исследования хранили при -80°C .

Отбор бронхиальных смывов производили в ходе плановой бронхоскопии методикой мини-лаважа. Через канал видеобронхоскопа Pentax-1970K (Pentax, Япония) в просвет интересующего бронха (зона поражения) вводили подогретый до 37°C физиологический раствор в объеме 60 мл. Затем производили отбор бронхиального содержимого через аспирационный канал с помощью эндоскопической вакуумной помпы Unimat 30 (Karl Storz, Германия) в стерильную накопительную емкость для трахеобронхиальной санации (40 мл). У 40 пациентов образцы были взяты из сегментарных бронхов верхних долей, у 11 пациентов – из сегментарных бронхов нижних долей. Доставка образцов в лабораторию осуществлялась при комнатной температуре сразу после взятия, и в течение часа производили отбор материала (1 мл) для исследования методом ПЦР, до момента исследования образцы хранили при -80°C .

Молекулярно-генетические исследования

Непосредственно перед этапом выделения ДНК для проведения ПЦР-исследования образцы размораживали при комнатной температуре. Далее проводили обработку материала реагентом «Амплитуб-Преп» (НПК «Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Выделение ДНК проводили наборами «Проба-НК плюс» (ООО «ДНК-технология», Россия) согласно инструкции производителя. Проведение ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для идентификации микобакте-

рий туберкулезного комплекса производили набором «Амплитуб-РВ» (НПК «Синтол», Россия) согласно инструкции производителя, с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Выявление ДНК других микроорганизмов производили с использованием наборов на основе ПЦР-РВ: «Бакскрин УПМ» (ООО «ДНК-технология», Россия), который предназначен для количественного выявления ДНК условно-патогенных бактерий, вызывающих нозокомиальные и внебольничные инфекции, и «Фемофлор 16» (ООО «ДНК-технология», Россия), который предназначен для исследования биоценоза урогенитального тракта у женщин. Амплификация ДНК проводилась на приборах DTprime 5 (ООО «ДНК-технология», Россия). Выбор данных тест-систем был обусловлен тем, что перечень детектируемых ими видов микроорганизмов сходен с таковым в респираторном тракте в норме и при развитии патологии, описанным в литературе. Поскольку предназначение тест-системы «Фемофлор 16» не соответствовало его применению в исследовании, при интерпретации результатов учитывали только данные о количестве выявленных микроорганизмов и не учитывали раздел «Заключение», в котором приводится интерпретация результатов. Проведенное ранее сопоставление результатов исследования бронхиальных смывов методами ПЦР («Фемофлор 16» и «Бакскрин УПМ») и 16S рРНК секвенирования [25] позволило скорректировать перечень таксонов, детектируемых в респираторных образцах. Так, при интерпретации результатов ПЦР из группы *Gardnerella vaginalis* + *Prevotella bivia* + *Porphyromonas* spp. была исключена *Gardnerella vaginalis*, вид *Prevotella bivia* заменен на род *Prevotella* spp., который являлся доминантным в этой группе. Из группы *Sneathia* spp. + *Leptotrichia* spp. + *Fusobacterium* spp. исключена *Sneathia* spp. Исследования с использованием наборов «Фемофлор 16» и «Бакскрин УПМ» проводились только в научных целях и не выдавались лечащим врачам.

Степень контаминации бронхоскопов ДНК микроорганизмов или человека была оценена путем ПЦР-исследования контрольных образцов смывов с канала бронхоскопа (через канал бронхоскопа пропускали стерильный физиологический раствор в объеме 40 мл и собирали в стерильные пробирки объемом 50 мл). Всего были отобраны смывы с трех бронхоскопов, исследование проводили по той же методике, что и для образцов клинического материала.

Бактериологические методы выявления *M. tuberculosis*

Люминесцентную микроскопию для выявления кислотоустойчивых микроорганизмов проводили с использованием биологического микроскопа PRIMO STAR (Carl Zeiss, Германия). Посев клинического материала осуществляли на плотные (среда Левенштейна – Йенсена) и жидкие (среда Миддлбука 7Н9) среды. Для инкубации пробирок с жидкой питательной средой была использована автоматизированная система Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, США).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы BioStat Pro v.7.6.5. Для сравнения двух групп использовали значение медианы [интерквартильный размах]. Различия между группами оценивали путем расчета критерия Манна – Уитни и критерия χ^2 , различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для сопоставления бактериальных профилей использовали кластерный анализ. Для определения оптимального количества кластеров проводили иерархическую кластеризацию, далее проводили K-мерную кластеризацию.

Результаты

В ходе исследования были отобраны и проанализированы образцы мокроты и бронхиальных смывов 51 пациента (у каждого пациента брали оба вида биоматериала). Пациенты различались по продолжительности лечения туберкулеза: 5 (9,8%) пациентов были вновь выявленными (нелеченые или леченые менее 1 мес.), 24 (47,1%) пациента получали противотуберкулезную терапию от 1 до 12 мес., остальные 22 (43,1%) пациента – более 12 мес. Количество пациентов, получавших лечение по режимам лекарственно-чувствительного туберкулеза, туберкулеза, вызванного возбудителем с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и пре-широкой лекарственной устойчивостью (пре-ШЛУ) в соответствии с клиническими рекомендациями «Туберкулез у взрослых» (2024 г.), составляло 7 (13,7%), 12 (23,5%) и 32 (62,7%) соответственно.

Наличие бактериовыделения (выявление *M. tuberculosis* хотя бы один раз за всю историю лечения) было зафиксировано у 43 (84,3%) пациентов. Диагноз диссеминированного туберкулеза легких был поставлен 4 (7,8%) пациентам, инфильтративного туберкулеза – 33 (64,7%) пациентам, фиброзно-кавернозного и кавернозного туберкулеза – 11 (21,6%) пациентам, очагового туберкулеза/туберкулемы – 2 (3,9%) пациентам, цирротического туберкулеза – 1 (1,9%) пациенту.

Контроль качества взятия материала (КВМ), отражающий количество клеток человека в образце, для мокроты составил $1,9 \times 10^6$ [$6,3 \times 10^5$; $3,1 \times 10^6$] клеток/мл, для бронхиальных смывов – $1,4 \times 10^5$ [$5,3 \times 10^4$; $3,9 \times 10^5$] клеток/мл. У одного пациента значение КВМ в образце бронхиального смыва составило $5,0 \times 10^3$ клеток/мл. Согласно инструкции теста «Фемофлор 16», интерпретация результатов исследования производится при КВМ $> 10^4$, меньшее значение может интерпретироваться как некачественный отбор материала – в этом случае необходимо было взять новый образец. Образцы от этого пациента были исключены из выборки, процент выбраковки составил 1,9%.

Исследование трех образцов контрольных смывов, отобранных с бронхоскопов после процедуры дезинфекции высокого уровня, выявило показатель общего числа бактериальных клеток только в двух образцах в количестве $3,1 \times 10^2$ и $3,9 \times 10^2$ клеток/мл. ДНК чело-

века выявлено не было; микроорганизмы, входящие в перечень детектируемых таксонов, выявлены не были.

Общее число бактериальных клеток в образцах бронхиальных смывов составило $4,0 \times 10^5$ [$9,5 \times 10^4$; $1,5 \times 10^6$] клеток/мл, а в мокроте – $4,0 \times 10^8$ [$1,5 \times 10^8$; $6,4 \times 10^8$] клеток/мл. Можно выделить четыре группы микроорганизмов, которые выявлялись практически у всех пациентов как в мокроте, так и в бронхиальном смыве: *Streptococcus* spp., *Prevotella* spp. + *Porphyromonas* spp., *Megasphaera* spp. + *Veillonella* spp. + *Dialister* spp., *Haemophilus* spp. (Таблица 1). При этом их содержание в бронхиальном смыве было на 3–4 порядка меньше, чем в мокроте.

Девять групп микроорганизмов были выявлены в мокроте более, чем у половины пациентов. Отмечено, что при наличии их ДНК в мокроте, она могла отсутствовать в бронхиальном смыве, но при отсутствии в мокроте ДНК этих микроорганизмов так же не выявлялась и в бронхиальном смыве (за исключением одного пациента, в бронхиальном смыве которого была выявлена ДНК *Eubacterium* spp. в количестве $2,0 \times 10^3$ клеток/мл при ее отсутствии в мокроте) (Таблица 2).

Для микроорганизмов группы, включающей *Leptotrichia* spp. + *Fusobacterium* spp., группы *Lachnobacterium* spp. + *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. отмечено, что при их высоком содер-

Таблица 1. Доминирующие таксоны микроорганизмов в образцах мокроты и бронхиальных смывов у пациентов с туберкулезом легких по данным ПЦР-исследования

Микроорганизмы	Мокрота		Бронхиальный смыв	
	Количество пациентов	Количество клеток/мл (медиана [ИКР])	Количество пациентов	Количество клеток/мл (медиана [ИКР])
<i>Streptococcus</i> spp.	50	$1,7 \times 10^8$ [$3,8 \times 10^7$; $3,5 \times 10^8$]	49	$5,3 \times 10^4$ [$1,6 \times 10^4$; $3,9 \times 10^5$]
<i>Prevotella</i> spp. + <i>Porphyromonas</i> spp.	50	$3,5 \times 10^7$ [$3,9 \times 10^6$; $1,9 \times 10^8$]	48	$5,7 \times 10^4$ [$1,0 \times 10^4$; $3,9 \times 10^5$]
<i>Megasphaera</i> spp. + <i>Veillonella</i> spp. + <i>Dialister</i> spp.	50	$1,9 \times 10^7$ [$3,4 \times 10^6$; $6,3 \times 10^7$]	47	$2,5 \times 10^4$ [$4,5 \times 10^3$; $2,2 \times 10^5$]
<i>Haemophilus</i> spp.	48	$1,0 \times 10^7$ [$1,7 \times 10^6$; $2, \times 10^7$]	44	$5,7 \times 10^3$ [$1,1 \times 10^3$; $2,8 \times 10^4$]

Таблица 2. Таксоны микроорганизмов в образцах мокроты и бронхиальных смывов, выявленные более, чем у половины пациентов с туберкулезом легких, по данным ПЦР- исследования

Микроорганизмы	ДНК микроорганизма выявляется только в мокроте		ДНК микроорганизма выявляется и в мокроте, и в бронхиальном смыве		P
	Количество пациентов	Количество клеток/мл в мокроте (медиана [ИКР])	Количество пациентов	Количество клеток/мл в мокроте (медиана [ИКР])	
<i>Candida</i> spp.	39	$5,0 \times 10^4$ [$1,8 \times 10^4$; $5,1 \times 10^5$]	11	$2,5 \times 10^5$ [$1,4 \times 10^5$; $5,1 \times 10^5$]	0,15
Enterobacterales	20	$1,0 \times 10^6$ [$9,9 \times 10^4$; $1,2 \times 10^6$]	29	$1,0 \times 10^6$ [$2,6 \times 10^5$; $4,6 \times 10^6$]	0,25
<i>Staphylococcus</i> spp.	31	$2,5 \times 10^3$ [$6,2 \times 10^2$; $7,3 \times 10^3$]	16	$4,7 \times 10^3$ [$2,1 \times 10^3$; $2,3 \times 10^4$]	0,17
<i>Leptotrichia</i> spp. + <i>Fusobacterium</i> spp.	13	$3,2 \times 10^5$ [$6,3 \times 10^4$; $6,3 \times 10^5$]	35	$1,9 \times 10^7$ [$2,4 \times 10^6$; $4,5 \times 10^7$]	0,002
<i>Lachnobacterium</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp.	16	$7,5 \times 10^5$ [$2,7 \times 10^4$; $2,8 \times 10^6$]	32	$5,7 \times 10^6$ [$9,5 \times 10^5$; $2,6 \times 10^7$]	0,01
<i>Lactobacillus</i> spp.	36	$3,6 \times 10^4$ [$1,2 \times 10^4$; $3,9 \times 10^5$]	12	$2,5 \times 10^6$ [$1,2 \times 10^6$; $6,9 \times 10^6$]	< 0,01
<i>Eubacterium</i> spp.	33	$3,5 \times 10^4$ [$1,3 \times 10^4$; $1,9 \times 10^5$]	14	$1,8 \times 10^5$ [$3,9 \times 10^4$; $2,5 \times 10^5$]	0,12
<i>Mobiluncus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	32	$3,9 \times 10^4$ [$1,1 \times 10^4$; $3,2 \times 10^5$]	15	$1,2 \times 10^5$ [$6,3 \times 10^4$; $8,2 \times 10^5$]	0,03
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	24	$1,9 \times 10^4$ [$1,2 \times 10^3$; $1,3 \times 10^5$]	19	$3,2 \times 10^6$ [$1,9 \times 10^5$; $1,4 \times 10^7$]	< 0,01

жании в мокроте (10^6 – 10^7 клеток/мл) они так же выявлялись и в бронхиальном смыве, а при более низком их количестве в мокроте (10^4 – 10^5 клеток/мл) эти бактерии в бронхиальном смыве отсутствовали ($p < 0,01$). Для группы, включающей *Mobiluncus* spp. + *Corynebacterium* spp. прослеживалась та же закономерность ($p = 0,03$).

Для бактерий *Staphylococcus* spp., Enterobacterales, *Eubacterium* spp. и грибов рода *Candida* такой зависимости не отмечено ($p > 0,12$). Их количество в мокроте не коррелировало с наличием и количеством в бронхиальном смыве, при этом следует отметить их более низкое содержание в образцах мокроты (10^3 – 10^6 клеток/мл) по сравнению с вышеперечисленными микроорганизмами.

ДНК *M. tuberculosis complex* была выявлена и в мокроте, и в бронхиальном смыве у 20 (40%) пациентов, только в бронхиальном смыве – у 16 (32%) пациентов. При этом отмечено, что подтверждение результатов ПЦР-исследования бронхиальных смывов бактериологическими методами (посев и/или микроскопия) коррелирует с количеством детектированной ДНК *M. tuberculosis complex*: при значении более $1,0 \times 10^3$ [$3,1 \times 10^2$; $3,3 \times 10^3$] клеток/мл наблюдаются положительные результаты бактериологических методов ($p = 0,02$).

Остальные микроорганизмы были выявлены менее, чем у половины пациентов, как в образцах мокроты, так и в образцах бронхиальных смывов (Рисунок 1). Только у трех пациентов в образцах бронхиальных смывов была детектирована ДНК условно-патогенных микроорганизмов в количестве, превышающем 10^5 клеток/мл.

У первого пациента выявлена ДНК *Stenotrophomonas maltophilia* в количестве $1,5 \times 10^5$ клеток/мл в образце бронхиального смыва при содержании ДНК этой бактерии в мокроте, соответствующем $1,0 \times 10^3$ клеток/мл. Данный пациент находился на лечении с диагнозом «инфильтративный туберкулез легких», отбор материала был произведен на 29-м месяце противотуберкулезной терапии по режиму лекарственно-чувствительного туберкулеза (выделена культура *M. tuberculosis* с лекарственной чувствительностью). За время химиотерапии пациенту была проведена резекция С1-2 левого легкого, проведено лечение методами коллапсотерапии.

У второго пациента выявлена ДНК *Streptococcus pneumoniae* в количестве $1,0 \times 10^5$ клеток/мл в образце бронхиального смыва при содержании в мокроте $6,4 \times 10^4$ клеток/мл. Пациент с диагнозом «фиброзно-кавернозный туберкулез легких», с чувствительной культурой *M. tuberculosis*, длительность лечения по режиму лекарственно-чувствительного туберкулеза 13 мес. с включением в схему левофлоксацина через 9 мес. после начала противотуберкулезной терапии.

У третьего пациента выявлена *Klebsiella oxytoca* в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток/мл в образце бронхиального смыва при содержании в мокроте $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Пациент с диагнозом «фиброзно-кавернозный туберкулез легких», с МЛУ возбудителя, длительность лечения (химиотерапия + коллапсотерапия) на момент отбора материала – 34 мес.

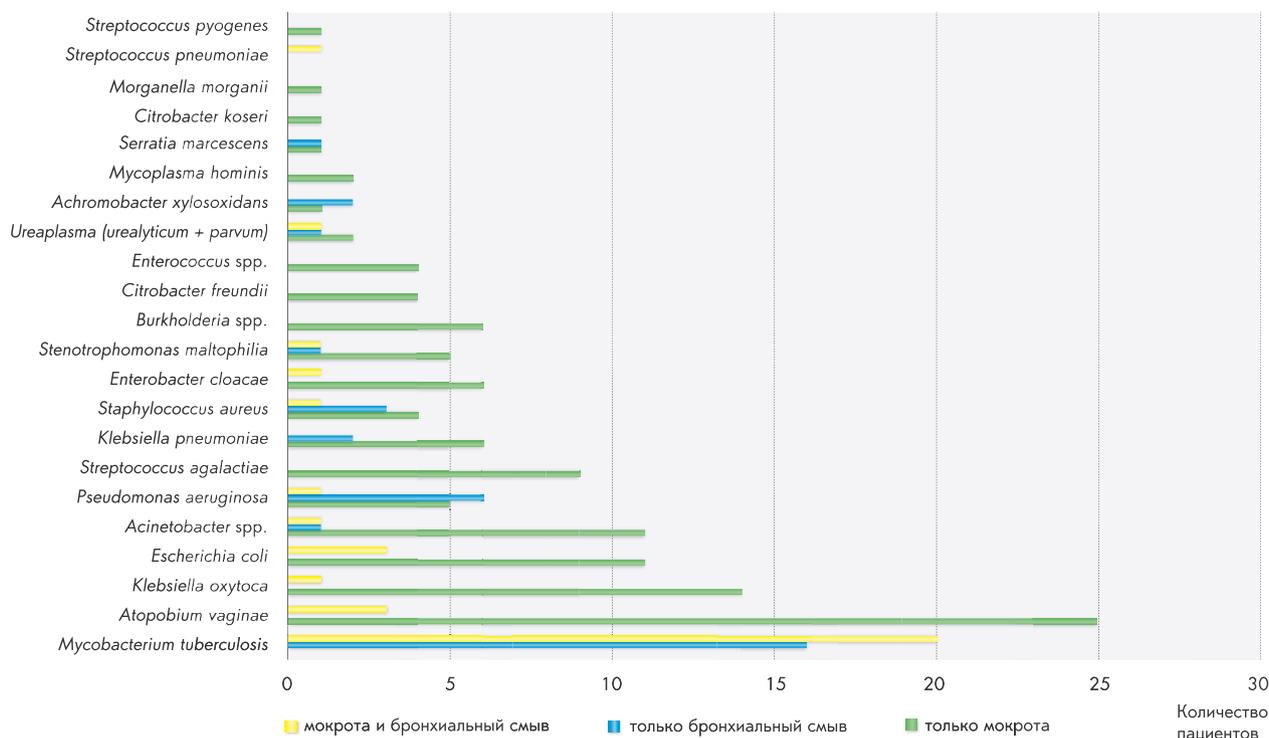


Рисунок 1. Количество пациентов с туберкулезом легких с положительными результатами ПЦР исследования на наличие патогенных/условно-патогенных бактерий в образцах мокроты и бронхиальных смывах

Таблица 3. Распределение пациентов с туберкулезом легких по принадлежности образцов мокроты и бронхиальных смывов к четырем бактериальным кластерам

		Бронхиальный смыв				Сумма
		Кластер 1	Кластер 2	Кластер 3	Кластер 4	
Мокрота	Кластер 1	3	1	0	2	6
	Кластер 2	1	4	2	0	7
	Кластер 3	8	0	13	8	29
	Кластер 4	1	1	0	6	8
	Сумма	13	6	15	16	50

Для микроорганизмов, детектированных только в образцах мокроты, отмечено, что их количество не превышало $4,3 \times 10^5$ клеток/мл.

Только в бронхиальных смывах (при отрицательном результате в мокроте, взятой в тот же день), были выявлены 7 таксонов микроорганизмов в количестве до $1,9 \times 10^3$ клеток/мл.

Для сопоставления бактериальных профилей мокроты и бронхиальных смывов, построенных на основе результатов исследования тест-системами «Бакскрин УПМ» и «Фемофлор 16» (включали только доли доминантных групп микроорганизмов, которые были выявлены более, чем у половины пациентов, относительно общего количества бактериальных клеток), был прове-

ден кластерный анализ, который позволил выделить четыре кластера.

Характеристика первого кластера: около 40% бактерий остались неидентифицированными, присутствовали равные доли *Streptococcus* spp. и *Prevotella* spp. + *Porphyrromonas* spp. Второй кластер: около 25% бактерий остались неидентифицированными, кластер характеризовался более высокой долей *Haemophilus* spp. Третий кластер: доминирование *Streptococcus* spp. Четвертый кластер: доминирование облигатно анаэробных бактерий (*Prevotella* spp. + *Porphyrromonas* spp.). В четвертом кластере суммарная доля бактерий превысила 100%, что может быть связано с особенностями выполнения исследования: выделенный образец ДНК

Микроорганизм	Номер кластера			
	1	2	3	4
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	1,29	0,07	0,66	1,64
<i>Mobiluncus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	0,15	0,38	0,09	0,08
<i>Lachnobacterium</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp.	2,83	1,21	1,80	5,25
<i>Megasphaera</i> spp. + <i>Veillonella</i> spp. + <i>Dialister</i> spp.	6,90	6,30	9,23	18,05
<i>Leptotrichia</i> spp. + <i>Fusobacterium</i> spp.	7,02	0,50	4,62	6,51
<i>Eubacterium</i> spp.	0,62	0,01	0,07	0,51
<i>Prevotella</i> spp. + <i>Porphyrromonas</i> spp.	16,17	11,62	10,45	50,30
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,21	0,93	1,06	0,24
<i>Streptococcus</i> spp.	11,30	15,07	15,07	29,33
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,07	0,24	0,17	0,03
<i>Haemophilus</i> spp.	3,49	29,6	4,85	1,27
Enterobacterales	3,91	3,09	1,17	0,20
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,27	0,03	0,03	0,34

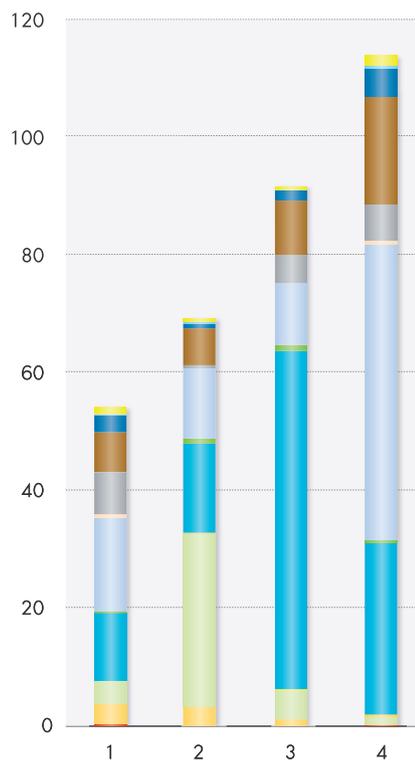


Рисунок 2. Характеристика четырех кластеров, построенных на результатах исследования тест-системами «Бакскрин УПМ» и «Фемофлор 16» образцов мокроты и бронхиальных смывов больных туберкулезом легких. В таблице указаны центры кластеризации (доля конкретного микроорганизма) в каждом из кластеров

разносился по 32 пробиркам для проведения ПЦР, возможны были флюктуации в количестве ДНК, попавшей в пробирку для определения общего бактериального количества, и в остальные пробирки (Рисунок 2).

В Таблице 3 проведено сопоставление кластеров, рассчитанных для бактериальных профилей образцов мокроты и бронхиальных смывов у одних и тех же пациентов. Совпадения кластеров установлены для 26 (52%) пациентов. Большинство совпадений – 13 (26%) относятся к кластеру 3 (и в мокроте, и в образцах бронхиальных смывов доминировали *Streptococcus* spp.). Также для кластера 3, доминирующего в образцах мокроты, можно отметить наибольший процент расхождений: по 8 (16%) образцов бронхиальных смывов, взятых у этих же пациентов, были отнесены к кластерам 1 и 4.

Анализируя факторы, ассоциированные с принадлежностью бактериальных профилей мокроты и бронхиальных смывов к разным кластерам, мы отметили, что в случае совпадения профилей 24 (92,4%) бронхиальных смыва были отобраны из верхних долей легких, а в случае расхождения – только 15 (62,5%) ($p = 0,02$). Из 11 пациентов, у которых смывы были получены из нижнедолевых бронхов, только у 2 (18,2%) было отмечено совпадение кластера мокроты и бронхиального смыва.

Также установлено, что пациенты, образцы бронхиальных смывов от которых были сгруппированными в кластер 1, имели большую продолжительность лечения – 24 [15; 35] мес., по сравнению с пациентами, образцы бронхиальных смывов от которых были сгруппированными в кластер 3 – 4,2 [1,9; 7,7] мес. и кластер 4 – 5,5 [2,7; 9,1] мес. ($p = 0,01$).

Обсуждение

Понимание роли респираторной микробиоты при туберкулезе может открыть новые персонализированные подходы, которые позволят повысить эффективность лечения и сократить сроки химиотерапии. В данной работе мы провели сопоставление результатов исследования мокроты (как наиболее распространенного вида биоматериала) и бронхиальных смывов (как материала, наиболее приближенного к очагу поражения) с использованием тест-систем на основе ПЦР-РВ.

Качество отбора образцов является важным фактором, непосредственно влияющим на результат исследования. В своей работе мы использовали тест-систему «Фемофлор 16», в которой заложена возможность количественного определения ДНК человека как маркера контроля взятия материала. Несмотря на то что предназначение набора «Фемофлор 16» не соответствовало его использованию в данном исследовании, мы показали, что количество этого маркера варьировало в образцах бронхиальных смывов, полученных от разных пациентов и, следовательно, ДНК человека должна быть использована в качестве маркера качества отбора респираторных образцов.

Согласно данным литературы, исследование микробиоты нижних отделов респираторного тракта ста-

вит ряд вопросов: сложно дифференцировать микроорганизмы, которые могут присутствовать в легких из-за пассивного проникновения путем микроаспирации из верхних дыхательных путей, без размножения в легких и попавшие в образец при прохождении бронхоскопа через верхние дыхательные пути. Предполагается, что перенос микроорганизмов из верхних отделов в нижние приведет к пропорциональному увеличению их количества в образцах, полученных из легких. Напротив, микроорганизмы, которые размножаются в нижних дыхательных путях, будут больше представлены в образцах бронхиальных смывов по сравнению с образцами, полученными из верхних отделов [22].

Наши результаты позволили установить, что, как в мокроте, так и в бронхиальных смывах у большинства пациентов выявлялись следующие доминирующие таксоны микроорганизмов: представители родов *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Haemophilus*, что соответствует данным литературы [5, 6]. Также были выявлены таксоны микроорганизмов, включая условно-патогенные виды, которые преимущественно детектировались в образцах мокроты, но могли отсутствовать в образцах бронхиальных смывов. В большинстве случаев наличие или отсутствие микроорганизмов в образцах бронхиальных смывов соответствовало их наличию и количеству в мокроте (зависимость не найдена для *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriales*, *Eubacterium* spp. и грибов рода *Candida*). Таким образом, можно предположить, что данные микроорганизмы преимущественно попадают в нижние отделы респираторного тракта путем аспирации и/или с поверхности бронхоскопа во время отбора образцов. В единичных случаях условно-патогенные микроорганизмы выявлялись только в образцах бронхиальных смывов, но не в мокроте, но их количество не превышало $1,9 \times 10^3$ клеток/мл, что может соответствовать уровню контаминации бронхоскопа, и эти результаты требуют осторожной интерпретации.

Напротив, ДНК *M. tuberculosis* чаще выявлялась в образцах бронхиальных смывов по сравнению с образцами мокроты, однако низкая концентрация бактерий в образце могла являться следствием контаминации бронхоскопа. В данном случае один из предлагаемых подходов – предварительный отбор и исследование контрольных смывов с бронхоскопов перед каждым взятием проб у пациента – может быть использован в сложных диагностических случаях [22].

У трех пациентов в образцах бронхиальных смывов была выявлена ДНК *S. maltophilia*, *S. pneumoniae* и *K. oxytoca* в количестве, превышающем/сопоставимом с таковым в мокроте. В данных случаях мы можем предположить клиническое значение выявленных микроорганизмов. Все пациенты принадлежали к кластеру 1, ассоциированному с более продолжительными сроками лечения туберкулеза.

Использование инструментов кластерного анализа позволило разделить все образцы на 4 кластера, в зависимости как от общего количества детектированных бактериальных таксонов, так и от представленно-

сти определенных таксонов в образцах. Для образцов мокроты был более характерен (58% образцов) кластер, отличающийся высокой долей *Streptococcus* spp. (57,5%), что можно объяснить доминированием этого таксона в ротовой полости. Ранее было отмечено, что доля *Streptococcus* spp. в ротовой полости у пациентов с туберкулезом легких выше, чем в группе здоровых лиц [26]. В метаанализе, обобщающем данные молекулярно-генетических исследований респираторных образцов, также отмечена более высокая доля *Streptococcus* spp. в образцах, полученных от пациентов с туберкулезом легких, по сравнению с группой здоровых лиц [27].

Для образцов бронхиальных смывов отмечено более равномерное распределение по кластерам, которые, возможно, более адекватно отражают структуру микробного сообщества в очаге инфекции, нежели образцы мокроты. Так, мы выявили, что при локализации туберкулезного процесса в нижних долях легких профили мокроты и бронхиальных смывов не совпадают чаще, чем при верхнедолевой локализации.

Таким образом, если предположить наличие явлений микроаспирации и/или контаминации образцов при прохождении бронхоскопа через верхние дыхательные пути, различие в бактериальных профилях мокроты и бронхиального смыва говорит о неравномерности этих процессов и, в ряде случаев, об уникальности микробного сообщества в разных отделах легких при туберкулезе, которое может определяться наличием и степенью поражения легочной ткани, и, как следствие, созданием уникальных условий для размножения определенных таксонов микроорганизмов.

Найденная зависимость более длительного лечения туберкулеза у пациентов с профилями бронхиальных смывов, отнесенных к кластеру 1 (около 40% микроорганизмов которого не входят в перечень доминантных таксонов, идентифицированных использованными наборами), ставит вопрос о необходимости расширения возможностей тест-систем для выявления дополнительных таксонов микроорганизмов и определения их клинической значимости.

Более короткие сроки лечения были характерны для пациентов, у которых в образцах бронхиальных смывов доминировали *Streptococcus* spp. и *Prevotella* spp. + *Porphyromonas* spp. (основываясь на данных литературы и собственных результатах, полученных с использова-

нием 16S рПНК секвенирования, можно утверждать, что в этой группе доминирующим компонентом должна являться *Prevotella* spp.). Предполагается, что комменсальные стрептококки – бактерии с хорошим адаптационным потенциалом – могут создавать защиту от патогенных микроорганизмов [28]. Представителям рода *Prevotella*, с одной стороны, приписывают протективную функцию [29], но также обсуждается связь высоких количеств *Prevotella* spp. с воспалением [3, 30]. Таким образом, микробные профили с доминированием *Streptococcus* spp. и *Prevotella* spp., полученные от пациентов на ранних сроках химиотерапии туберкулеза, с одной стороны, могут трактоваться как свидетельствующие о положительном прогнозе лечения для данной категории пациентов, а с другой – как результат влияния длительных курсов химиотерапии на представленность отдельных таксонов микроорганизмов. Уточнение этих предположений требует проведения дополнительных исследований.

Заключение

В данной работе проведено сопоставление состава микробных сообществ мокроты и бронхиальных смывов у пациентов с туберкулезом легких при исследовании методом ПЦР. Результаты исследования позволили предположить, что использование образцов бронхиальных смывов как материала, приближенного к очагу инфекции, позволяет получить более объективные данные о микробном профиле, особенно в случаях туберкулеза с локализацией в нижних отделах легких.

Предварительные данные указывают на возможную ассоциацию между определенными профилями микробиоты респираторного тракта, полученными при исследовании бронхиальных смывов, и особенностями течения туберкулеза, однако чтобы уточнить эти закономерности, необходимы дополнительные исследования с использованием большей выборки пациентов.

Полученные данные могут служить основой для разработки молекулярно-генетических подходов, направленных на оценку состава респираторной микробиоты при туберкулезе и других заболеваниях легких.

Исследование проводилось в рамках государственного задания на выполнение НИР (регистрационный № 124020900009-9).

Литература

- Man W., de Piters, Binkowska J., Bogaert D. Early life microbiota and respiratory tract infections. *Cell Host Microbe*. 2020;28(2):223-232. DOI: 10.1016/j.chom.2020.07.004
- Man W., de Steenhuijsen Piters, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15:259-270. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.14
- Huffnagle G.B., Dickson R.P., Lukacs N.W. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol*. 2017;10(2):299-306. DOI: 10.1038/mi.2016.108
- Natalini J.G., Singh S., Segal L.N. The dynamic lung microbiome in health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21:222-235. DOI: 10.1038/s41579-022-00821-x
- Li R., Li J., Zhou X. Lung microbiome: new insights into the pathogenesis of respiratory diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):19. DOI: 10.1038/s41392-023-01722-y
- Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B. Homeostasis and its disruption in the lung microbiome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(10):1047-1055. DOI: 10.1152/ajplung.00279.2015
- Venkataraman A., Bassis C.M., Beck J.M., Young V.B. Curtis J.L., Huffnagle G.B., Schmidt T.M. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *mBio*. 2015;6. DOI: 10.1128/mbio.02284-14
- Morris A., Beck J.M., Schloss P.D., Campbell T.B., Crothers K., Curtis J.L., et al. Lung HIV Microbiome Project. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(10):1067-1075. DOI: 10.1164/rccm.201210-1913OC
- Xiao G., Cai Z, Guo Q., Ye T., Tang Y., Guan P., et al. Insights into the unique lung microbiota profile of pulmonary tuberculosis patients using metagenomic next-generation sequencing. *Microbiol Spectr*. 2022;10:e01901-21. DOI: 10.1128/spectrum.01901-21
- Chotirmall S.H., Bogaert D., Chalmers J.D., Cox M.J., Hansbro P.M., Huang Y.J., et al. Therapeutic targeting of the respiratory microbiome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022;206(5):535-544. DOI: 10.1164/rccm.202112-2704PP
- Zhou Y., Liu M., Liu K., Wu G., Tan Y. Lung microbiota and potential treatment of respiratory diseases. *Microb Pathog*. 2023;181:106197. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.106197
- Fabrizzi A., Amedei A., Lavorini F., Renda T., Fontana G. The lung microbiome: clinical and therapeutic implications. *Intern Emerg Med*. 2019;14(8):1241-1250. DOI: 10.1007/s11739-019-02208-y
- Ticlla M.R., Jerry H., Hellen H., Mohamed S., Francis M., Rutaiwa L.K., et al. The sputum microbiome in pulmonary tuberculosis and its association with disease manifestations: a cross-sectional study. *Front Microbiol*. 2021;12:633396. DOI: 10.3389/fmicb.2021.633396
- Kateete D.P., Mbabazi M.M., Nakazzi F., Katabazi F.A., Kigozi E., Ssengoobaet W., et al. Sputum microbiota profiles of treatment-naïve TB patients in Uganda before and during first-line therapy. *Sci Rep*. 2021;11(1):24486. DOI: 10.1038/s41598-021-04271-y
- Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Zakharova J.V., Lavryashina M.B., Larionov A.V., et al. Composition of bacterial microbiome in sputum of patients with localized forms of pulmonary tuberculosis. *Pul'monologiya*. 2023;33(5):645-656. Russian. (Дружинин В.Г., Баранова Е.Д., Деменков П.С., Захарова Ю.В., Лавряшина М.Б., Ларионов А.В. и соавт. Состав бактериального микробиома мокроты у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легких. Пульмонология. 2023;33(5):645-656.) DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-5-645-656
- Musisi E., Wyness A., Eldirdiri S., Dombay E., Mtafya B., Ntinginya N.E., et al. Effect of seven anti-tuberculosis treatment regimens on sputum microbiome: a retrospective analysis of the HIGHRIF study 2 and PanACEA MAMS-TB clinical trials. *Lancet Microbe*. 2023;4(11):e913-e922. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00191-X
- Belizário J., Garay-Malpartida M., Faintuch J. Lung microbiome and origins of the respiratory diseases. *Curr Res Immunol*. 2023;4:100065. DOI: 10.1016/j.crimmu.2023.100065
- Hu Y., Cheng M., Liu B., Dong J., Sun L., Yang J., et al. Metagenomic analysis of the lung microbiome in pulmonary tuberculosis – a pilot study. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):1444-1452. DOI: 10.1080/22221751.2020.1783188
- Xia X., Chen J., Cheng Y., Chen F., Lu H., Liu J., et al. Comparative analysis of the lung microbiota in patients with respiratory infections, tuberculosis, and lung cancer: a preliminary study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:1024867. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1024867
- Zhou H., Pei Y., Xie Q., Nie W., Liu X., Xia H., et al. Diagnosis and insight into the unique lung microbiota of pediatric pulmonary tuberculosis patients by bronchoalveolar lavage using metagenomic next-generation sequencing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14:1492881. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1492881
- Zheng L., Liu C., Wang H., Zhang J., Mao L., Dong X., et al. Intact lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid are both suitable for the evaluation of murine lung microbiome in acute lung injury. *Microbiome*. 2024;12(1):56. DOI: 10.1186/s40168-024-01772-6
- Charlson E.S., Bittinger K., Chen J., Diamond J.M., Li H., Collman R.G., Bushman F.D. Assessing bacterial populations in the lung by replicate analysis of samples from the upper and lower respiratory tracts. *PLoS One*. 2012;7(9):e42786. DOI: 10.1371/journal.pone.0042786
- Carney S.M., Clemente J.C., Cox M.J., Dickson R.P.,

- Huang Y.J., et al. Methods in lung microbiome research. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020;62(3):283-299. DOI: 10.1165/rcmb.2019-0273TR
24. Buslaev V.Yu., Matskova L.V., Minina V.I., Druzhinin V.G. Analysis of the microbiome of human lungs and respiratory system in lung disorders: a review. *Zhurnal Sibirskogo Federal'nogo Universiteta. Biologiya.* 2022;15(3):396-421. Russian. (Буслаев В.Ю., Мацкова Л.В., Минина В.И., Дружинин В.Г. Анализ микробиоты легких и респираторного тракта человека при заболеваниях легочной системы (обзор). *Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология.* 2022;15(3):396-421.) DOI: 10.17516/1997-1389-0395
25. Umpeleva T.V., Tsvirenko A.S., Premysleva G.E., Kildyusheva E.I., Skornyakov S.N., Vakhrusheva D.V. Results of the study of respiratory microbiota of patients with pulmonary tuberculosis using RT-PCR and 16S rRNA sequencing methods. *Problems of medical mycology.* 2025;27(2):269. Russian. (Умпелева Т.В., Цвиренко А.С., Премыслева Г.Е., Кильдюшева Е.И., Скорняков С.Н., Вахрушева Д.В. Результаты исследования респираторной микробиоты пациентов с туберкулезом легких методами ПЦР-ПВ и 16S рРНК секвенирования. *Проблемы медицинской микологии.* 2025;27(2):269.)
26. Shahzad M., Saeed M., Amin H., Binmadi N., Ullah Z., Bibi S., et al. The oral microbiome of newly diagnosed tuberculosis patients; a pilot study. *Genomics.* 2024;116(2):110816. DOI: 10.1016/j.ygeno.2024.110816
27. Eshetie S., van Soolingen D. The respiratory microbiota: new insights into pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):92. DOI: 10.1186/s12879-019-3712-1
28. Passali D., Passali G.C., Vesperini E., Cocca S., Visconti I.C., Ralli M., et al. The efficacy and tolerability of *Streptococcus salivarius* 24SMB and *Streptococcus oralis* 89a administered as nasal spray in the treatment of recurrent upper respiratory tract infections in children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(Suppl. 1):67-72. DOI: 10.26355/eurrev_201903_17352
29. Horn K.J., Schopper M.A., Drigot Z.G., Clark S.E. Airway *Prevotella* promote TLR2-dependent neutrophil activation and rapid clearance of *Streptococcus pneumoniae* from the lung. *Nat Commun.* 2022;13(3321). DOI: 10.1038/s41467-022-31074-0
30. Segal L.N., Alekseyenko A.V., Clemente J.C., Kulkarni R., Wu B., Gao Z., et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome.* 2013;1(19). DOI: 10.1186/2049-2618-1-19