

## Применение системы MALDI Biotyper и алгоритма микробиологической диагностики для идентификации неферментирующих микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей у больных муковисцидозом

Чернуха М.Ю.<sup>1</sup>, Шагинян И.А.<sup>1</sup>, Жуховицкий В.Г.<sup>1,4</sup>, Аветисян Л.Р.<sup>1</sup>, Кулястова Д.Г.<sup>1</sup>, Сиянова Е.А.<sup>1</sup>, Медведева О.С.<sup>1</sup>, Поляков Н.Б.<sup>1</sup>, Соловьев А.И.<sup>1</sup>, Грумов Д.А.<sup>1</sup>, Кондратьева Е.И.<sup>2</sup>, Каширская Н.Ю.<sup>2</sup>, Капранов Н.И.<sup>2</sup>, Шерман В.Д.<sup>2</sup>, Воронкова А.Ю.<sup>2</sup>, Никонова В.С.<sup>2</sup>, Амелина Е.Л.<sup>3</sup>, Красовский С.А.<sup>3</sup>, Усачева М.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:

Марина Юрьевна Чернуха

Эл. почта: chernukha08@mail.ru

Ключевые слова: масс-спектрометрия, MALDI Biotyper, неферментирующие микроорганизмы, *Achromobacter ruhlandii*, *Burkholderia cepacia* complex, *P. aeruginosa*.

Целью работы было сравнение MALDI Biotyper и алгоритма микробиологической диагностики для идентификации неферментирующих микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей у больных муковисцидозом. Использовали разработанный алгоритм идентификации и типирования, включающий бактериологические, биохимические, молекулярно-биологические методы и систему MALDI Biotyper. В результате проведенных исследований удалось идентифицировать 47 видов неферментирующих микроорганизмов и установить, что наиболее трудной является идентификация микроорганизмов, принадлежащих к роду *Achromobacter* и *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). Она требует применения комплекса бактериологических, биохимических, молекулярно-биологических методов, а также системы MALDI Biotyper, которая позволяет более точно и быстро идентифицировать роды и виды микроорганизмов. Представители рода *Achromobacter* были выделены от 89 взрослых пациентов и детей с муковисцидозом, среди которых 82,7% принадлежали виду *Achromobacter ruhlandii* и 10,6% – виду *Achromobacter xylosoxidans*. Были идентифицированы 60 штаммов Bcc трёх видов, из них 32 штамма Bcc от взрослых пациентов и 28 от детей, 83,3% которых принадлежали виду *B. cenocepacia*. От взрослых пациентов и детей с муковисцидозом из Москвы выделяли *B. cenocepacia*, из Санкт-Петербурга – *B. contaminans*, *B. cepacia*, из Хабаровска – *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. contaminans*. От детей и взрослых были выделены 57 штаммов 11 видов рода *Pseudomonas*, из них 41 изолят (71,9%) был идентифицирован как *P. aeruginosa*, среди которых было 8 изолятов с атипичным фенотипом. Более простой представляется идентификация другого представителя неферментирующих микроорганизмов – *P. aeruginosa*, за исключением выделения штаммов с атипичным фенотипом, но и в этом случае использование масс-спектрометрии имеет решающее значение.

## Use of the MALDI Biotyper system and the microbiological diagnosis algorithm for identification of non-fermenting bacteria isolated from respiratory tract in cystic fibrosis patients

Chernukha M.Yu.<sup>1</sup>, Shaginyan I.A.<sup>1</sup>, Zhukhovitskiy V.G.<sup>1,4</sup>, Avetisyan L.R.<sup>1</sup>, Kulyastova D.G.<sup>1</sup>, Siyanova E.A.<sup>1</sup>, Medvedeva O.S.<sup>1</sup>, Polyakov N.B.<sup>1</sup>, Solovyov A.I.<sup>1</sup>, Grumov D.A.<sup>1</sup>, Kondratieva E.I.<sup>2</sup>, Kashirskaya N.Yu.<sup>2</sup>, Kapranov N.I.<sup>2</sup>, Sherman V.D.<sup>2</sup>, Voronkova A.Yu.<sup>2</sup>, Nikonova V.S.<sup>2</sup>, Amelina E.L.<sup>3</sup>, Krasovskiy S.A.<sup>3</sup>, Usachyova M.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Contacts:

Marina Yu. Chernukha

E-mail: chernukha08@mail.ru

Key words: mass spectrometry, MALDI Biotyper, non-fermenting bacteria, *Achromobacter ruhlandii*, *Burkholderia cepacia* complex, *P. aeruginosa*.

The objective of this study was to compare the MALDI Biotyper system and the microbiological diagnosis algorithm for identification of non-fermenting bacteria isolated from respiratory tract in cystic fibrosis patients. The identification and typing algorithm, including bacteriologic, biochemical, and molecular methods as well as the MALDI Biotyper system was used. Using this algorithm, a total of 47 species of non-fermenting microorganisms was identified. The identification of microorganisms belonging to *Achromobacter* genus and *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) proved to be the most difficult and require a combination of the methods listed above. *Achromobacter* species were isolated from 89 adults and children with cystic fibrosis, of which 82.7% and 10.6% belonged to *Achromobacter ruhlandii* and *Achromobacter xylosoxidans*, respectively. A total of 60 strains (3 species) of Bcc were isolated (32 strains – from adults and 28 strains – from children), of which 83.3% belonged to *B. cenocepacia*. The Bcc species were isolated from adult and pediatric patients with cystic fibrosis in Moscow (*B. cenocepacia*), Saint-Petersburg (*B. contaminans*, *B. cepacia*) and Khabarovsk (*B. cepacia*, *B. cenocepacia*, and *B. contaminans*). A total of 57 strains (11 species) of *Pseudomonas* spp. were isolated from adults and children, of which 41 strains (71.9%) were identified as *P. aeruginosa* (including 8 strains with atypical phenotype). *P. aeruginosa* proved to be an easier non-fermenting microorganism to be identified (except for isolates with atypical phenotype, where the use of MALDI-TOF mass spectrometry is critical).

## Введение

Общепринятые методы лабораторной диагностики, которые используются в клинических лабораториях, включают в себя фенотипические, бактериологические и биохимические методы, в том числе реализованные в виде автоматизированных систем. Также, при необходимости, применяются различные молекулярно-биологические методы. Хотя некоторые из используемых методов успешно применяются для экспресс-диагностики, большинство из них зависят от скорости роста микроорганизмов, в частности, при исследовании их биохимических свойств. Идентификация возбудителей хронической инфекции легких у больных муковисцидозом является особенно трудной, поскольку микрофлора дыхательных путей у таких пациентов представлена ассоциациями микроорганизмов, которые могут иметь атипичные для своего вида свойства (ауксотрофные *Pseudomonas aeruginosa* и SCV (small colony variants – фенотип мелких колоний) *S. aureus*). Особую опасность для больных муковисцидозом представляют неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы – *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), *Stenotrophomonas maltophilia*, роды *Achromobacter*, *Acinetobacter*.

Ранее в лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи был разработан алгоритм идентификации возбудителей хронической инфекции легких у больных муковисцидозом [1]. Данный алгоритм позволяет правильно идентифицировать различные виды микроорганизмов, однако время анализа в значительной степени зависит от времени роста исследуемых клинических изолятов.

В современных бактериологических лабораториях в настоящее время для идентификации микроорганизмов используется система MALDI Biotyper. Это современный, быстрый и рентабельный метод, реализованный на базе масс-спектрометра с времяпролетным (TOF)<sup>1</sup> масс-анализатором и источником ионизации MALDI<sup>2</sup>. Хотя первые публикации, касающиеся этого метода, появились несколько лет назад [2-4], до сих пор в клинических лабораториях не полностью используются его потенциальные возможности. Основой этого метода является определение масс-спектрального профиля или «белкового паттерна» множества бактериальных белков в диапазоне от 2 до 20 кДа. Масс-спектры (масс-листы) анализируемых штаммов сравниваются с базой данных, содержащей белковые профили референтных штаммов различных видов микроорганизмов, используя определенный статистический алгоритм, что позволяет осуществлять идентификацию бактерий на различных таксономических уровнях. Преимуществом метода является то, что время проведения анализа не связано с временем роста микроорганизмов или биохимических реакций, поэтому является экспресс-методом диагностики. MALDI Biotyper позволяет очень быстро, в течение нескольких минут провести идентификацию по сравнению с традиционными методами [3, 4]. Исследования, связанные с MALDI Biotyper, были посвящены идентификации наиболее часто встречающихся родов микроорганизмов и дрожжеподобных грибов [5], а также сравнению с рутинными методами идентификации бактерий

<sup>1</sup> TOF – time of flight (время полета).

<sup>2</sup> MALDI – Matrix-assisted laser desorption ionization. Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации является «мягким» методом ионизации, что позволяет переводить в газовую фазу молекулы белков и других термолабильных биополимеров без их разложения.

[6], биохимическими методами, включая автоматизированные системы (Vitek), и секвенированием 16S рPHK. Однако в настоящее время нет работ, посвященных идентификации неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, в частности, бактерий Bcc, рода *Achromobacter*, вида *S. maltophilia* и других, наиболее часто выделяемых из дыхательных путей у больных муковисцидозом и имеющих клиническое и эпидемиологическое значение.

Целью нашей работы было сравнение MALDI Biotyper и алгоритма микробиологической диагностики для идентификации неферментирующих микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей у больных муковисцидозом.

## Материалы и методы

Для исследования были взяты штаммы неферментирующих микроорганизмов, выделенных из биологического материала – мазков из ротоглотки и мокроты от пациентов с муковисцидозом, направленных на исследование из Республиканской детской клинической больницы (Москва), Медико-генетического научного центра (Москва), НИИ пульмонологии (Москва), отделения пульмонологии Детской больницы Святой Ольги (Санкт-Петербург), детского отделения пульмонологии Красноярска. *P. aeruginosa* идентифицировали с помощью посева на селективную среду – цитримид-агар, 5% кровяной агар, теста на оксидазу, наличия пигмента, характерного запаха (винограда или земляничного мыла), коммерческой тест-системы API 20NE (BioMerieux, Франция). Энтеробактерии идентифицировали путём посева на агары Эндо, МакКонки, Гектоэн энтерик (HiMedia, Индия). Для идентификации бактерий Bcc, *Achromobacter* spp. и других неферментирующих микроорганизмов использовали разработанный алгоритм идентификации и типирования [1], включающий два последовательных этапа: с использованием бактериологических, биохимических и других фенотипических методов (выявление гемолиза) и молекулярно-биологических методов. Все штаммы были идентифицированы с помощью коммерческих тест-систем: API 20NE (BioMerieux, Франция), 24 NE (Lachema, Чехия) в соответствии с инструкцией производителя. Рост на селективном агаре для Bcc (BCSA) наблюдали при температуре 37°C через 24 ч и при температуре 30°C через 48-96 ч. Для определения Bcc использовали ПЦР на ген *recA*, специфичного для Bcc, с праймерами BCR1 – 5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA и BCR2 – 5'-CTCTTCTCGTCCATCGCCTC. Определение геномвара проводили с помощью ПЦР с геномвар-специфическими праймерами согласно методам, описанным в работах Bauernfeind и соавт. [6] и Mahenthiralingam и соавт. [7]. Для идентификации *Achromobacter xylosoxidans* использовали праймеры на локус 16S рPHK AX-F1 – 5'-GCAGGAAAGAAACGTCGCGGGT-3' и AX-B1 – 5'-ATTTACATCTTTCTTCCG-3' [8].

### Методика масс-спектрометрического анализа

После выделения чистой культуры бактериальные изоляты выращивали 24 часа при температуре 37°C. Экстракцию белков исследуемых культур микроорганизмов проводили с использованием 96% этанола и 70% водного раствора муравьиной кислоты по стандартному операционному протоколу, рекомендованному компанией Bruker Daltonics для проведения

MALDI-TOF прямого белкового профилирования неспорообразующих микроорганизмов. Биологический материал (3-5 колоний) собирали с поверхности агара пластиковой микробиологической петлей объемом 1 мкл и ресуспендировали в 300 мкл деионизированной воды. Далее к суспензии добавляли 900 мкл 96% этанола, полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали со скоростью 13000 об/мин в течение 2 минут. Полученный в результате центрифугирования супернатант тщательно отбирали, остатки этанола высушивали на воздухе. К полученному осадку добавляли от 5 до 40 мкл 70% муравьиной кислоты в зависимости от размера осадка и равный объем 100% ацетонитрила. Полученную смесь центрифугировали со скоростью 13000 об/мин в течение 2 минут. Полученный супернатант (1 мкл), содержащий белковый экстракт, наносили на 386-луночную стальную мишень и высушивали при комнатной температуре. Далее на поверхность высушенного экстракта наносили 1 мкл раствора матрицы (насыщенный раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты ( $\alpha$ -HCCA) с 50% ацетонитрилом и 2,5% трифторуксусной кислотой (TFA)) и также высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия), оснащенном Nd:YAG-лазером (355 нм) в линейном режиме в диапазоне от 2000 до 20 000 Th, детектировали положительно заряженные ионы, при следующих настройках ионного источника: напряжение на IS1 – 25 кВ, IS2 – 21,75 кВ. Сбор спектров осуществляли в ручном или автоматическом режиме. В качестве калибровочного стандарта использовали бактериальный калибровочный стандарт Bruker (BTS, содержащий типичный профиль пептидов и белков *Escherichia coli* штамма DH5 alpha с дополнительными белками (РНКаза А [M+H]<sup>+</sup>13683.2 Da, Myoglobin [M+H]<sup>+</sup>16952.3 Da).

## Результаты и обсуждение

В рамках микробиологического мониторинга хронической инфекции легких у больных муковисцидозом проводили исследование образцов мокроты и мазков из ротоглотки с мая 2016 г. по август 2017 г. Было изучено 700 проб от детей и 80 проб от взрослых пациентов с использованием бактериологических и биохимических методов. При выделении неферментирующих микроорганизмов и фенотипическом сходстве культур с бактериями Всс, рода *Achromobacter*, а также микроорганизмов с атипичными свойствами проводили исследования с помощью молекулярно-генетических методов и MALDI-TOF. С помощью MALDI-TOF были проанализированы пробы от 70 взрослых пациентов с муковисцидозом, направленных на исследование из НИИ пульмонологии (Москва), и от 178 детей, среди которых из Медико-генетического научного центра (Москва) – 157 пациентов, из отделения пульмонологии Детской больницы Святой Ольги (Санкт-Петербург) – 9 пациентов, из детского отделения пульмонологии Красноярска – 3 пациента, Новосибирска – 5 пациентов, Хабаровска – 4 пациента.

Из мокроты пациентов были выделены 5 видов *Achromobacter* spp. Идентифицированы 33 штамма *Achromobacter ruhlandii* от взрослых пациентов, 43 штамма от детей из Москвы, 5 – Санкт-Петербурга, 2 – Новосибирска, 2 – Красноярска, 1 – Хабаровска (Таблица 1). *A. xylosoxidans* выделен от 3 взрослых и 8 детей (7 из Москвы и 1 из Санкт-Петербурга). *Achromobacter insolitus* определили у одного ребенка из Красноярска; *Achromobacter piechaudii* у 3 пациентов из

Москвы и 1 из Санкт-Петербурга; *Achromobacter insuavis* у 2 детей из Москвы (Таблица 2).

Были выделены 60 штаммов Всс 3-х видов, из них 32 штамма от взрослых пациентов и 28 штаммов от детей. От взрослых пациентов и детей из Москвы выделяли *B. cenocepacia*, из Санкт-Петербурга – *B. contaminans*, *B. serapia*, из Хабаровска – *B. serapia*, *B. cenocepacia*, *B. contaminans* (Таблица 3).

От детей и взрослых были изолированы 57 штаммов 11 видов рода *Pseudomonas*, из них 41 изолят был идентифицирован как *P. aeruginosa*, среди которых было 8 с атипичным фенотипом. *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas monteilii* были изолированы от 8 больных детей (Таблица 4).

Другие неферментирующие микроорганизмы 28 видов были выделены преимущественно от детей. *Stenotrophomonas maltophilia* были изолированы из мокроты 2 взрослых пациентов и 30 детей из Москвы, Санкт-Петербурга и Новосибирска. Бактерии рода *Acinetobacter* 7 видов выделены из 27 образцов от детей, в том числе *Acinetobacter baumannii* из 6 образцов, *Acinetobacter pittii* из 12 образцов, *Acinetobacter junii* и *Acinetobacter ursingii* – из 3 образцов каждый.

Представители рода *Achromobacter* – грамотрицательные неферментирующие микроорганизмы, способные вызывать оппортунистические инфекции, оксидазо- и каталазоположительные, обладающие природной устойчивостью ко многим антибиотикам. Род *Achromobacter* в настоящее время включает 20 видов [9]. До описания новых видов микроорганизмы рода *Achromobacter* идентифицировали как *A. xylosoxidans*. В последнее десятилетие наблюдается рост количества пациентов с хронической инфекцией легких, вызванной *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. piechaudii*, *A. ruhlandii*, *A. spanius*, *A. insolitus*, *A. marplatensis*, *A. animicus*, *A. mucicolens*, *A. pulmonis*, *A. spiritinus*, *A. aegrifaciens*, *A. anxifer*, *A. dolens*, *A. insuavis*, *A. sedimentum*, *A. agilis*, *A. deleyi*, *A. kerstersii*, *A. pestifer*. Частота высева представителей этого рода у больных муковисцидозом составляет от 8% до 12,8%. В Российской Федерации в зависимости от возраста и тяжести течения по разным данным составляет от 9% до 25% [1, 10]. Среди представителей рода *Achromobacter* наиболее часто выделяются *A. ruhlandii* – 58,5%, *A. xylosoxidans* – 35,4%, реже *A. marplatensis* – 3%, *A. pulmonis* – 1,5%, *A. dolens* – 1,5%.

Очень часто *A. ruhlandii* и *A. xylosoxidans* ложно диагностируют как Всс из-за фенотипического сходства с Всс при культивировании на 5% кровяном агаре и ростом на ВССА – селективной для Всс среде. Для подтверждения принадлежности бактерии к роду *Achromobacter* необходимо использовать тест-системы API 20 NE (BioMerieux, Франция) и ПЦР для выявления локуса в 16S рПНК со специфическими праймерами AX-F1 и AX-B1 [8]. Эти микроорганизмы обладают природной резистентностью ко многим антибиотикам. Из 104 образцов микроорганизмов, отданных на контроль, 86 были идентифицированы с помощью MALDI Biotyper как *A. ruhlandii*, которые были выделены от 56 детей и 33 взрослых пациентов с муковисцидозом. Из них 52 предварительно с помощью бактериологических и биохимических методов, а также ПЦР идентификации были отнесены к роду *Achromobacter*, а затем с помощью MALDI Biotyper определили вид *A. ruhlandii*. У 23 пациентов бактериологически *A. ruhlandii* был идентифицирован как NF (неферментирующий микроорганизм), у 8 – как Всс, у 2 – как *Acinetobacter lwoffii*, у 1 – как *Acinetobacter haemolyticus* (Таблицы 1 и 2). У 5 пациентов бактериологически был поставлен диагноз Всс, при проведении ПЦР был подтвержден род

*Achromobacter*, а с помощью MALDI Biotyper определен вид *A. ruhlandii*. У 11 пациентов с помощью бактериологических методов удалось идентифицировать только как NF, при проведении ПЦР определить род *Achromobacter*, а с помощью MALDI Biotyper вид *A. ruhlandii*. В одном случае бактериологически и при проведении ПЦР микроорганизм был идентифицирован как Bcc, а с помощью MALDI Biotyper определили вид *A. ruhlandii* (Таблица 1).

Кроме *Achromobacter ruhlandii* с помощью MALDI Biotyper были идентифицированы другие виды рода *Achromobacter*. *Achromobacter insolitus* был первоначально идентифицирован с помощью бактериологических и ПЦР методов как *Achromobacter* spp. и выделен от одного ребенка с муковисцидозом из Красноярска. *Achromobacter piechaudii* выявлен с помощью MALDI Biotyper, и бактериологическими и ПЦР методами идентифицирован как *Achromobacter* spp. у одного ребенка из Санкт-Петербурга, у одного взрослого, направленного из НИИ пульмонологии, и двух детей, направленных из Медико-генетического научного центра, идентифицированно перед анализом на MALDI Biotyper как NF. *Achromobacter xylosoxidans* был идентифицирован как *Achromobacter* spp. бактериологически и с помощью ПЦР у 3 взрослых и 1 ребенка. У одного взрослого пациента *Achromobacter xylosoxidans* первоначально был идентифицирован бактериологически и биохимически как *Acinetobacter radioresistens*, и у одного ребенка *Achromobacter xylosoxidans* был идентифицирован бактериологически и биохимически как *Achromobacter* spp. (Таблица 2).

Таким образом, доминирующими представителями неферментирующих микроорганизмов, требующими подтверждения идентификации более точными методами, были представители рода *Achromobacter*, выделенные от 89 детей и взрослых с муковисцидозом, среди которых 82,7% принадлежали к виду *Achromobacter ruhlandii* и 10,6% к виду *Achromobacter xylosoxidans*, высевавшихся в ассоциации с микроорганизмами, принадлежащими к другим видам: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. oryzihabitans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Acinetobacter junii*, *Neisseria subflava*, *Enterococcus* spp., *S. viridans*, *Lactobacillus* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* spp.

Среди неферментирующих микроорганизмов наиболее значимыми и особо опасными для больных муковисцидозом, представляющими трудность для идентификации являются виды, входящие в *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). Продолжительность и качество жизни пациентов с муковисцидозом зависит от развития легочной инфекции, вызванной бактериями Bcc. Изучение данных возбудителей и поиск адекватных методов антибактериальной терапии является предметом исследования последних лет. В отличие от терапии синегнойной инфекции, пока не разработано эффективных с высокой степенью доказательности схем антибактериальной терапии. Для РФ, в отличие от других стран, характерна высокая частота данной инфекции, что обуславливает актуальность и необходимость организации идентификации Bcc и мониторинга их антибиотикорезистентности [11].

В настоящее время Bcc включает в себя 20 видов: *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*, *B. pseudomultivorans*, *B. stagnalis*, *B. territorii* [12]. Точная идентификация неферментирующих грамотрицательных микро-

Таблица 1. Результаты идентификации бактерий вида *Achromobacter ruhlandii*

	Результат идентификации бактериологическими и биохимическими методами	ПЦР	MALDI Biotyper	Количество идентифицированных образцов
1.	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	34
2.	ННФ	–	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	21
3.	Bcc	–	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	7
4.	Bcc	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	5
5.	ННФ	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	11
6.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	–	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	2
7.	Bcc	Bcc	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	1
8.	<i>Achromobacter</i> spp.	–	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	1
9.	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	–	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	1
10.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	–	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	1
11.	ННФ	–	<i>Achromobacter ruhlandii</i> или <i>Achromobacter spanius</i>	1
12.	ННФ	–	<i>Achromobacter ruhlandii</i> или <i>Achromobacter insuavis</i>	1

ННФ – неидентифицируемые неферментирующие микроорганизмы.

Таблица 2. Результаты идентификации бактерий видов *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter piechandii*, *Achromobacter insuavis*

	Результат идентификации бактериологическими и биохимическими методами	ПЦР	MALDI Biotyper	Количество идентифицированных образцов
1.	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter insolitus</i>	1
2.	ННФ	–	<i>Achromobacter piechandii</i>	3
3.	<i>Achromobacter</i> spp.	–	<i>Achromobacter piechandii</i>	1
4.	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	4
5.	<i>Achromobacter</i> spp.	–	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2
6.	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	–	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1
7.	ННФ	–	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	3
8.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	–	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1
9.	ННФ	–	<i>Achromobacter insuavis</i>	1
10.	<i>Achromobacter</i> spp.	–	<i>Achromobacter insuavis</i>	1

ННФ – неидентифицируемые неферментирующие микроорганизмы.

организмов Всс от больных муковисцидозом является наиболее сложной задачей. Очень часто нетипичные по фенотипическим свойствам микроорганизмы ошибочно могут диагностироваться как другие виды микроорганизмов. Ложная идентификация *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp., Всс может иметь нежелательные последствия, ведущие к выбору неправильной терапии и изоляции пациентов. Для точной идентификации Всс необходимо соблюдать следующую схему: посев мокроты на 5% кровяной агар и ВССА с дальнейшим выделением чистой культуры; исследование чистой культуры молекулярно-генетическими методами: ПЦР на ген *tesA* [13]; исследование мокроты молекулярно-генетическими методами [14], подтверждение с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии, имеющей в программе библиотеку геномных видов Всс, характерную для данной территории. Идентификация коллекции штаммов Всс с помощью бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов показала, что в России распространены клоны 5 геномных видов Всс – *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. contaminans*. Поэтому в дополнение к имеющимся в библиотеке референтным штаммам *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia*, *B. anthina*, *B. seminalis*, *B. metallica*, *B. lata* был внесен штамм, идентификация которого была подтверждена мультилокусным сиквенс-типированием (MLST) как *B. contaminans*.

Бактерии Всс были идентифицированы в образцах от 28 детей и 32 взрослых пациентов, 83,3% которых принадлежали к виду *B. cenocepacia*. В одном случае от одного взрослого пациента были выделены 2 вида разных по фенотипу колоний неферментирующих микроорганизмов, которые были идентифицированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии как *B. cenocepacia*. В другом случае от одного взрослого пациента были высеяны 4 разных по фенотипу колоний, которые при проведении ПЦР были идентифицированы как *B. cenocepacia* и *Achromobacter xylosoxidans*, а MALDI-TOF масс-спектрометрия показала принадлежность к виду *B. cenocepacia*. Бактерии *B. cenocepacia* были выделены от пациентов из Москвы, *B. contaminans* – из Санкт-Петербурга и Хабаровска (Таблица 3). Таким образом, для идентификации микроорганизмов Всс необходимо использование комплекса бактериологических, биохимических, молекулярно-генетических (ПЦР, MLST) методов и MALDI-TOF масс-спектрометрии, которую при наличии в библиотеке характерных для данного региона штаммов можно использовать для экспресс-диагностики, что важно для соблюдения эпидемиологической безопасности и обеспечения эффективного лечения. MALDI-TOF масс-спектрометрию удобно использовать для мониторинга хронических инфекций, вызванных Всс, когда у определённого больного уже известен микробиологический статус.

Первоначальная классификация рода *Pseudomonas*, состоящего из 5 соответствующих рПНК групп, подверглась радикальному пересмотру, закончившемуся изменением классификации многих видов рода *Pseudomonas* и объединением в отдельные роды. Эти роды включают в себя *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* и *Brevundimonas*. Род *Pseudomonas* (sensu stricto) включает в себя соответствующую рПНК группу 1 и объединяет 11 видов: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, *P. luteola*, *P. oryzihabitans*. Многие виды пока ещё относятся к роду *Pseudomonas*, хотя последние филоге-

Таблица 3. Результаты идентификации бактерий *Burkholderia cepacia* complex (Всс)

	Результат идентификации бактериологическими и биохимическими методами	ПЦР	MALDI Biotyper	Количество идентифицированных образцов
1.	Всс	Всс	<i>B. metallica</i> – в библиотеке отсутствовал штамм <i>B. contaminans</i> <b><i>B. contaminans</i></b> – в библиотеку внесён штамм <i>B. contaminans</i>	2
2.	Всс	Всс	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	22
3.	Всс	Всс	<i>B. cepacia</i> – в библиотеке отсутствовал штамм <i>B. contaminans</i> , <b><i>B. contaminans</i></b> – в библиотеку внесён штамм <i>B. contaminans</i>	1
4.	Всс	Всс	<i>B. cepacia</i> – в библиотеке отсутствовал штамм <i>B. contaminans</i> , <b><i>B. contaminans</i></b> – в библиотеку внесён штамм <i>B. contaminans</i>	1
5.	Всс	Всс	<i>B. cenocepacia</i> – в библиотеке отсутствовал штамм <i>B. contaminans</i> , <b><i>B. contaminans</i></b> – в библиотеку внесён штамм <i>B. contaminans</i>	1
6.	<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter</i> spp.	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	1
7.	Всс	Всс – <i>Achromobacter</i> spp. +	<b><i>B. contaminans</i></b>	1
8.	Всс?	<i>B. cenocepacia</i>	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	3
9.	ННФ	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	1
10.	ННФ	–	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	2
11.	Всс?	–	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	18
12.	Всс?	Всс	<i>B. seminalis</i> – в библиотеке отсутствовал штамм <i>B. contaminans</i> , <b><i>B. contaminans</i></b> – в библиотеку внесён штамм <i>B. contaminans</i>	1
13.	Всс?	Всс	<b><i>B. contaminans</i></b> или <b><i>B. cepacia</i></b>	4
14.	<i>Ochrobactum anthropi</i>	–	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	1
15.	Всс?	–	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	1

Всс? – по фенотипическим свойствам предположительно бактерии *Burkholderia cepacia* complex.

ННФ – неидентифицируемые неферментирующие микроорганизмы.

нетические исследования, основанные на изучении 16S рПНК последовательностей, определяют их отношение к новому или другому уже существующему роду. Для больных муковисцидозом наиболее значимым является вид *P. aeruginosa*. Синегнойная палочка обнаруживается в легких у детей с муковисцидозом уже в возрасте 1-4 года с частотой 31%, а среди больных старше 18 лет – в 60% случаев [15]. С увеличением возраста у больных формируется хроническая смешанная инфекция, вызванная *P. aeruginosa*, *S. aureus* и

другими микроорганизмами, которая к 18 годам обнаруживается у 80% пациентов [16].

Идентификация большинства изолятов синегнойной палочки не составляет трудностей для микробиологов и осуществляется с помощью изучения таких свойств, как наличие пигмента, положительный тест на оксидазу, рост при температуре 42°C, характерный земляничный запах, культивирование на цетримидном агаре. Сложности при идентификации возникают в случаях выделения от больных муковисцидозом с хронической синегнойной инфекцией *P. aeruginosa* с атипичным фенотипом – SCV (фенотип мелких колоний), без запаха и пигмента, которые трудно идентифицировать без применения молекулярно-генетических методов (ПЦР) [17]. Бактериологическими методами и MALDI-TOF масс-спектрометрией изучены 27 штаммов с атипичным фенотипом, выделенные от 12 детей и 11 взрослых. От одного взрослого выделено 4 различных фенотипа колоний, от двух детей по 2 фенотипически различных штамма. Два микробиологически подтвержденных штамма *P. aeruginosa* были также идентифицированы с помощью системы MALDI Biotyper как *P. aeruginosa*. Семь атипичных по фенотипу штаммов *P. aeruginosa* (по фенотипическим свойствам предположительно бактерии *P. aeruginosa*), Bcc (по фенотипическим свойствам предположительно бактерии *Burkholderia ceracia* complex), ННФ (неидентифицируемые неферментирующие микроорганизмы) были с помощью MALDI Biotyper идентифицированы как *P. aeruginosa*. Три штамма, идентифицированные бактериологическими и биохимическими методами как *P. monteilii*, с помощью MALDI Biotyper были определены как *P. aeruginosa*. У 2 пациентов *P. fragi* и у одного больного *P. putida* были идентифицированы бактериологическими, биохимическими методами и с помощью MALDI Biotyper. В одном случае лактозоположительные колонии при проведении MALDI-TOF масс-спектрометрии были идентифицированы как *P. aeruginosa*. Один штамм, идентифицированный как неферментирующий микроорганизм, бактериологическими и биохимическими методами был идентифицирован как *P. luteola*, один идентифицированный как *P. koreensis* с помощью MALDI Biotyper – *P. fluorescens*, и один штамм Bcc с помощью MALDI Biotyper определен как *P. koreensis* (Таблица 4). Таким образом, идентификация бактерий *P. aeruginosa* не представляет трудностей, за исключением фенотипически атипичных микроорганизмов, для идентификации которых в клинических условиях может помочь MALDI Biotyper.

Исследовали 126 штаммов бактерий, имеющих атипичные фенотипические свойства – с SCV фенотипом, отсутствием гемолиза, пигмента, имеющие нетипичную микроскопическую структуру. От взрослых пациентов были выделены 3 штамма *S. maltophilia* и 1 штамм *S. marcescens*. Остальные 122 штамма были выделены от детей, что может быть связано с взятием материала из ротоглотки стерильным тампоном. У взрослых пациентов исследовали мокроту. Таким образом, выделенные микроорганизмы, скорее всего, были представителями верхних дыхательных путей детей, кроме представителей рода *Acinetobacter*, принадлежащих к 7 видам, выделенных от 27 детей, и *S. maltophilia*, высеянных из 29 образцов – неферментирующих микроорганизмов, которые способны вызывать инфекционные процессы в легких [16] (Таблица 5). Этиологическое значение остальных 20 видов обнаруженных неферментирующих микроорганизмов в настоящее время остаётся неясным.

Таблица 4. Результаты идентификации бактерий рода *Pseudomonas*

	Результат идентификации бактериологическими и биохимическими методами	MALDI Biotyper	Количество идентифицированных образцов
1.	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	24
2.	<i>P. aeruginosa</i> ?	<i>P. aeruginosa</i>	5
3.	<i>P. aeruginosa</i> ? Bcc?	<i>P. aeruginosa</i>	2
4.	ННФ	<i>P. aeruginosa</i>	4
5.	<i>Pseudomonas monteilii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	3
6.	<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>P. aeruginosa</i>	1
7.	<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>P. fragi</i>	2
8.	Лактозоположительные колонии	<i>P. aeruginosa</i>	1
9.	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>P. putida</i> <i>P. monteilii</i>	1
10.	ННФ	<i>P. luteola</i>	1
11.	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>P. fluorescens</i>	1
12.	Bcc?	<i>P. koreensis</i>	1
13.	<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>P. fulva</i>	1
14.	<i>P. aeruginosa</i> ?	<i>P. marginalis</i>	1
15.	<i>P. aeruginosa</i> ?	<i>P. putida</i>	1
16.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fulva</i>	1
17.	ННФ	<i>P. putida</i>	1
18.	ННФ	<i>P. poae</i>	1
19.	ННФ	<i>P. koreensis</i>	1
20.	ННФ	<i>P. talaasi</i>	1
21.	<i>P. aeruginosa</i> ?	<i>P. monteilii</i>	2
22.	Лактозоотрицательные колонии	<i>P. aeruginosa</i>	1

Bcc? – по фенотипическим свойствам предположительно бактерии *Burkholderia ceracia* complex.

ННФ – неидентифицируемые неферментирующие микроорганизмы.

*P. aeruginosa*? – по фенотипическим свойствам предположительно бактерии *P. aeruginosa*.

Таблица 5. Результаты идентификации атипичных по фенотипу бактерий, выделенных из дыхательных путей больных муковисцидозом, и решение вопроса о принадлежности их к различным видам неферментирующих микроорганизмов

	Результат идентификации бактериологическими и биохимическими методами	MALDI Biotyper	Количество идентифицированных образцов
1.	<i>Acinetobacter junii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
2.	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
3.	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>	6
4.	ННФ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
5.	ННФ	<i>Acinetobacter ursingii</i>	3
6.	ННФ	<i>Acinetobacter junii</i>	3
7.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>	2
8.	ННФ	<i>Acinetobacter pittii</i>	4
9.	ННФ	<i>Acinetobacter schindleri</i>	1
10.	ННФ	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1
11.	Лактозоотрицательные колонии	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1
12.	<i>Suttonella indologenes</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>	3
13.	<i>Rothia mucilaginosa</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>	1
14.	ННФ	<i>Rothia mucilaginosa</i>	3

Продолжение табл. 5

	Результат идентификации бактериологическими и биохимическими методами	MALDI Biotyper	Количество идентифицированных образцов
15.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12
16.	ННФ	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13
17.	Всс	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5
18.	Лактозоотрицательные колонии	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2
19.	<i>Comomonas testosteroni</i>	Не идентифицирован	1
20.	<i>Comomonas testosteroni</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	1
21.	ННФ	<i>Delftia acidovorans</i>	1
22.	Лактозоотрицательные колонии	<i>E. coli</i>	6
23.	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	5
24.	ННФ	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1
25.	ННФ	<i>Elizabethkingia miricola</i>	2
26.	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1
27.	ННФ	<i>Bacillus firmus</i>	1
28.	ННФ	<i>Serratia marcescens</i>	3
29.	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	1
30.	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Bacillus spp.</i>	1
31.	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus flexus</i>	1
32.	ННФ	<i>Bacillus pumilus</i>	1
33.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	1
34.	ННФ	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1
35.	ННФ	<i>Kocuria kristinae</i>	1
36.	Лактозоотрицательные колонии	<i>Serratia marcescens</i>	2
37.	ННФ	<i>Comomonas testosteroni</i>	1
38.	Лактозоположительные колонии	<i>Ochrobactrum spp.</i>	1
39.	Всс	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1
40.	ННФ	<i>Corynebacterium falsenii</i>	2
41.	ННФ	<i>Corynebacterium callune</i>	1
42.	ННФ	<i>Moraxella atarrhalis</i>	1
43.	<i>Acinetobacter junii</i>	<i>Moraxella lacunata</i>	1
44.	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
45.	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
46.	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
47.	Лактозоотрицательные колонии	<i>Enterobacter cloacae</i>	4
48.	Лактозоотрицательные колонии	<i>Citrobacter braakii</i>	1
49.	ННФ	<i>Eikenella corrodens</i>	1
50.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Chryseobacterium gleum</i>	1
51.	ННФ	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1
52.	<i>Neisseria spp.</i>	<i>Neisseria perflava</i>	2
53.	<i>Neisseria spp.</i>	<i>Neisseria flavescens</i>	3
54.	<i>Neisseria spp.</i>	<i>Neisseria mucosa</i>	1

Окончание табл. 5

	Результат идентификации бактериологическими и биохимическими методами	MALDI Biotyper	Количество идентифицированных образцов
54.	ННФ	<i>Neisseria perflava</i>	2
55.	ННФ	<i>Arthrobacter aurescens</i>	1
56.	ННФ	<i>Morganella morganii</i>	1
57.	ННФ	<i>Aeromonas caviae</i>	1
58.	ННФ	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1
59.	ННФ	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1

ННФ – неидентифицируемые неферментирующие микроорганизмы.

## Заключение

В результате проведенных исследований удалось идентифицировать 47 видов неферментирующих микроорганизмов и установить, что наиболее трудной является идентификация неферментирующих микроорганизмов, принадлежащих к роду *Achromobacter* и Всс. Она требует применения комплекса бактериологических, биохимических, молекулярно-биологических методов, а также системы MALDI Biotyper, которая позволяет более точно и быстро идентифицировать роды и виды микроорганизмов и при мониторинге инфекций быстро установить диагноз, имея ретроспективные данные о микробиологическом статусе пациента. Более простой представляется идентификация другого неферментирующего микроорганизма – *P. aeruginosa*, за исключением случаев выделения атипичных по фенотипу бактерий, когда использование MALDI-TOF масс-спектрометрии имеет решающее значение. Идентификация бактерий *Acinetobacter spp.* и *S. maltophilia* с использованием MALDI Biotyper также не представляет трудностей и даёт возможность точно и быстро идентифицировать микроорганизмы с атипичным фенотипом.

## Литература

- Chernukha M.Yu., Avetisyan I.R., Shaginyan I.A., et al. Microbiological Diagnosis Algorithm for Chronic Lung Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2014;16(4):278-290. Russian. (Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А. и соавт. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции лёгких у больных муковисцидозом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014;16(4):278-290.).
- Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analyt Chem*. 1975;500(2):219-225.
- Demidov E.A., Starostin K.V., Popik V.M., Peltek S.E. MALDI-ToF Mass Spectrometry in Microorganism Identification. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*. 2013;17(4/1):758-764. Russian. (Демидов Е.А., Старостин К.В., Попик В.М., Пельтек С.Е. Применение МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/1):758-764.).
- Priputnevitch T.V., Melkumyan A.R., Burmenskaya O.V., et al. Use of MALDI-TOF Mass-Spectrometry and Quantitative PCR for Rapid Diagnosis of Sepsis. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2014;16(1):4-9. Russian. (Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В. и соавт. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014;16(1):4-9.).
- Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem*. 2015;61(1):100-111.
- Bauernfeind A., Schneider I., Jungwirth R., Roller C. Discrimination of

- Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* genomovars I, III, and IV by PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1335-1339.
7. Mahenthiralingam E., Bischof J., Byrne S.K., et al. 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;38:3165-173.
  8. Lambiase A., Catania M.R., Del Pezzo M., et al. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(8):973-980.
  9. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Available at: [www.bacterio.net/achromobacter.html](http://www.bacterio.net/achromobacter.html).
  10. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., et al. Diversity and hazard of respiratory infection of *Achromobacter* spp. in cystic fibrosis patients. *Pul'monologija.* 2015;25(4):389-401. Russian. (Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н. и соавт. Разнообразие и опасность *Achromobacter* spp., поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. Пульмонология. 2015;25(4):389-401.)
  11. Krasovskii S.A., Nikonova V.S., Kashirskaya N.Y., et al. Clinical and Genetic, Microbiological and Functional Characteristics of Moscow and Moscow Region Patients with Cystic Fibrosis. *Voprosy sovremennoj pediatrii.* 2013;12(1):24-30. Russian. (Красовский С.А., Никонова В.С., Каширская Н.Ю. и соавт. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области. Вопросы современной педиатрии. 2013;12(1):24-30.)
  12. Sousa S.A., Ramos C.G., Leitão J.H. *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. *Int J Microbiol.* 2011;2011. pii: 607575.
  13. Alexeeva G.V., Chernukha M.Yu., Shaginyan I.A. Identification of *Burkholderia cepacia* complex bacteria with PCR. In guidance manual for bacteriologists: Polymerase chain reaction (PCR) and its application in bacteriology. Moscow, 2006. 142 p. Russian. (Алексеева Г.В., Чернуха М.Ю., Шагинян И.А. Идентификация бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* с помощью ПЦР. Учебно-методическое пособие для врачей-бактериологов «Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее применение в бактериологии». Москва, 2006. 142 с.)
  14. Voronina O.L., Kunda M.S., Aksenova E.I., et al. The express diagnostic of microorganisms affecting respiratory tract of patients with mucoviscidosis. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika.* 2013;11:53-58. Russian. (Воронина О.Л., Кунда М.С., Аксенова Е.И. и соавт. Экспресс диагностика микроорганизмов поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;11:53-58.)
  15. Shaginyan I.A., Kapranov N.I., Chernukha M.Yu., et al. Microbial landscape of the lower respiratory tract in different age groups of children suffering from cystic fibrosis. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii.* 2010;1:15-20. Russian. (Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю. и соавт. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010;1:15-20.)
  16. Chernukha M.Yu., Shaginyan I.A. Microbiology of chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. In: *Cystic fibrosis.* M.: Medpraktika-M, 2014. 672 p. Russian. (Чернуха М.Ю., Шагинян И.А. Микробиология хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. В книге «Муковисцидоз». М.: Медпрактика-М, 2014. 672 с.)
  17. 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.