

© БОЧАРОВА Ю.А., 2023

Бочарова Ю.А.

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ ОСНОВНЫХ ЛЕГОЧНЫХ ПАТОГЕНОВ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГАОУ ВО Российский Национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

Муковисцидоз (кистозный фиброз) - наследственное заболевание, характеризующееся множественным поражением органов и систем, включая респираторный тракт, репродуктивную и пищеварительную системы. Наиболее частым проявлением муковисцидоза является нарушение бронхиальной секреции, сопровождающееся развитием бронхообструкции и хроническим инфекционным процессом в дыхательных путях (лёгочная болезнь). К патогенам, имеющим приоритетное клиническое значение в патогенезе лёгочной болезни, относят Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Burkholderia cepacia complex (BCC), Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter spp., нетуберкулёзные виды рода Mycobacterium (НТМ). Обзор посвящён микробиологической диагностике при лёгочной болезни у пациентов с муковисцидозом, описаны задачи и особенности методов выделения, идентификации, генетического типирования и оценки антимикробной резистентности (АМР) приоритетных лёгочных патогенов. Поиск литературы проведён с использованием базы данных PubMed, Российской научной электронной библиотеки eLIBRARY, поисковых систем Европейского общества микробиологии и инфекционных болезней (ESCMID), Европейского общества муковисцидоза (ECFS). Особенностью диагностики S. aureus является необходимость поиска морфотипа «малых колоний» (SCV-морфотип), метициллин-резистентных изолятов, штаммов с необычным резистентным фенотипом. При диагностике P. aeruginosa, помимо фенотипической оценки АМР, следует анализировать наличие генов β-лактамаз. При выделении H. influenzae, SCV-морфотипа S. maltophilia и BCC важно учитывать особые требования к составу питательных сред и условиям культивирования. Достоверную идентификацию большинства видов BCC и Achromobacter можно провести только на основе технологий секвенирования. Особенности выделения и идентификации НТМ является длительное время культивирования и необходимость применения технологий секвенирования для верификации видовой принадлежности. При диагностике S. aureus, P. aeruginosa, Achromobacter spp. следует детектировать штаммы, относящиеся к эпидемическим клонам.

Ключевые слова: муковисцидоз/кистозный фиброз; Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa; Haemophilus influenzae; Burkholderia cepacia complex; Stenotrophomonas maltophilia; Achromobacter spp.; нетуберкулёзные виды рода Mycobacterium.

Для цитирования: Бочарова Ю.А. Особенности диагностики основных легочных патогенов при муковисцидозе (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2023; 68 (12): 751-760.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-751-760>

Для корреспонденции: Бочарова Юлия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории молекулярной микробиологии; e-mail: ivrin7@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.09.2023
Принята к печати 19.09.2023
Опубликовано 00.12.2023

Bocharova Yu.A.

DIAGNOSTIC FEATURES OF MAJOR RESPIRATORY PATHOGENS IN CYSTIC FIBROSIS (REVIEW OF LITERATURE)

Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease affecting multiple organs including respiratory tract, reproductive and digestive systems. The most common manifestation of CF is altered fluid transport across airway epithelium leading to bronchial obstruction and chronic respiratory infections (lung disease). The list of major respiratory pathogens in CF includes Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Burkholderia cepacia complex (BCC), Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter spp., nontuberculous mycobacteria (NTM). This review aims to describe microbiological diagnostics features (including isolation, identification, typing, antibiotic susceptibility testing features) of lung disease in CF patients. A literature search was performed in PubMed database, Russian scientific electronic library eLIBRARY, search systems of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), European Cystic Fibrosis Society (ECFS). The main diagnostic feature of S. aureus is the need for searching the small colony variant (SCV) morphotype and methicillin-resistant isolates. In P. aeruginosa diagnostics, not only phenotypic antibiotic susceptibility testing, but also beta-lactamases genes detection should be performed. For H. influenzae, S. maltophilia SCV-morphotype and BCC isolation special requirements for the culture medium composition and cultivation conditions need to be considered. The most BCC and Achromobacter species can be identified only based on gene sequencing. Isolation and identification features of NTM are long cultivation time and the need for species affiliation verifying using sequence technologies. Moreover, in S. aureus, P. aeruginosa, Achromobacter spp. diagnostics, the isolates belonging to the epidemic clones should be detected, since such isolates can impact patient outcomes and pose the threat to other CF patients.

Key words: cystic fibrosis; Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa; Haemophilus influenzae; Burkholderia cepacia complex; Stenotrophomonas maltophilia; Achromobacter spp.; nontuberculous mycobacteria.

For citation: Bocharova Yu.A. Diagnostic features of major respiratory pathogens in cystic fibrosis (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2023; 68 (12): 751-760 (in Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-751-760>

For correspondence: Bocharova Yu.A., MD, PhD, Leading researcher of the Laboratory of Molecular Microbiology; e-mail: ivrin7@gmail.com

Information about author:

Bocharova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0003-0197-0255>.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (Project ID 20-15-00235).

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 04.09.2023

Accepted 19.09.2023

Published 00.12.2023

Введение. Муковисцидоз (МВ) или, согласно новой версии международной классификации болезней, кистозный фиброз, - врождённое заболевание, обусловленное мутациями в гене белка CFTR (муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости) [1]. Поломки CFTR ведут к нарушению транспорта ионов хлора через мембрану и значительным патологическим изменениям на уровне слизистых оболочек лёгких, поджелудочной железы, кишечника, почек [2]. Это сопровождается угнетением местного иммунитета, экспансией условно-патогенной микрофлоры и глобальными метаболическими расстройствами, что в итоге приводит к катастрофическому сокращению жизни пациентов. Медиана возраста смерти пациентов с МВ в 2020 году в Европейском Союзе составила 33,0 года, в России - 15,5 лет [3, 4]. Главной причиной смертности при МВ является нарушение лёгочной функции вследствие инфекционного поражения бронхолёгочного аппарата [4]. Несмотря на успешные результаты от внедрения новых корректоров CFTR-протеина (элексакафтор/тезакафтор/ивакафтор) [5], МВ ещё долгое время будет оставаться актуальной проблемой здравоохранения. Это связано с возрастными ограничениями применения корректоров, а также с тем, что корректоры CFTR-протеина способны восстанавливать функцию трансмембранного регулятора проводимости не при всех типах мутаций гена CFTR.

Считается, что в рамках мультидисциплинарного подхода к лечению МВ, мероприятия, направленные на эрадикацию респираторных патогенов, играют важнейшую роль. Основой эрадикации является грамотная микробиологическая диагностика. Хотя основные диагностические процедуры описаны в национальных руководствах, ряд вопросов, касающихся масс-спектрометрической диагностики, применения генетических методов оценки, выявления внутривидовых клонов высокого эпидемического риска, требуют детализации.

В целом, актуальные практически значимые цели микробиологической диагностики при работе с муковисцидозными патогенами направлены на: 1) таксономическую идентификацию патогена, 2) оценку антимикробной резистентности (АМР), 3) предсказание опасности изолированного патогена - индивидуальный прогноз для пациента и прогнозирование эпидемиологической опасности для окружающих. При идентификации бактерий в ряде случаев важно обращать внимание не только на видовую принадлежность, но и на их отношение к клонам с особым эпидемическим риском, которые могут иметь негативное прогностическое значение при МВ. Это особенно актуально для *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Иногда достаточно определения принадлежности патогена лишь к внутриродовой

группе, что логично делать при определении представителей *Burkholderia cepacia* complex (см. ниже). Оценка чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) вызывает спорные вопросы в случаях, когда фенотипические методы пытаются заменить молекулярно-генетическим тестированием. Такие ситуации требуют тщательного анализа. Что касается предсказания опасности изолированного агента, то нужно помнить не только о его угрозе для конкретного пациента, но и о прогнозировании эпидемиологической опасности этого патогена для окружающих (пациентов, иммунокомпromетированных родственников и т. д.).

Цель: на основе анализа данных из современных научных источников определить конкретные задачи и методические подходы рациональной микробиологической диагностики при лёгочной болезни у пациентов с муковисцидозом. Идея обзора акцентирована на современных представлениях об идентификации, оценке АМР и задачах молекулярно-генетического тестирования приоритетных лёгочных патогенов при МВ для клинической и эпидемиологической практики.

Бактерии, имеющие наибольшее клиническое значение в патогенезе лёгочной болезни при муковисцидозе. Согласно данным мировой статистики, перечень наиболее опасных для МВ-пациентов бактерий включает: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* complex (BCC), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp., нетуберкулёзные виды рода *Mycobacterium* [3].

Staphylococcus aureus. *S. aureus* часто выявляется в респираторных образцах, их обнаружение может наблюдаться более, чем у 50% пациентов с МВ [7]. Установлено, что у 40% МВ-пациентов изоляты *S. aureus* имели нормальный фенотип, примерно у 6% пациентов присутствовали одновременно *S. aureus* нормального фенотипа и популяции, рост которых описан как феномен «малых колоний» (SCV, от англ. «small colony variants»), у 2% пациентов выделены исключительно *S. aureus* SCV-фенотипа [8]. Изоляция *S. aureus* нормального фенотипа обычно не представляет труда и рутинно выполняется в течение 24-48 часов при 35 °С. Обнаружение SCV-популяции является более сложным. Для их выявления рекомендуется увеличить время инкубации до 72 часов [9]. Особые требования для выявления стафилококков SCV-фенотипа касаются питательных сред. Для выделения стафилококков нормального фенотипа успешно используются селективные среды с повышенной концентрацией натрия хлорида (6,5-10,0%), содержащие маннит, а для выявления лецитиназной активности - фосфатидилхолин (лецитин), либо хромогенные агары, эффективность которых в настоящее время достигает 100% [10]. Стафилококки

SCV-фенотипа часто являются ауксотрофами по гемину, жирным кислотам, аминокислотам (тимидину), поэтому могут не расти на маннитол-солевых, желточно-солевых и хромогенных агарах. Для их роста рекомендуется использовать 5% кровяной (колумбийский) агар или сердечно-мозговой агар с добавлением 10 мкг/мл налидиксовой кислоты, 10 мкг/мл полимиксина В и 2 мкг/мл гентамицина [9, 11].

Идентификация *S. aureus* SCV-фенотипа имеет свои особенности. В отличие от «нормальных» вариантов *S. aureus*, SCV-стафилококки могут не образовывать пигмент, не обладать лецитиназной и коагулазной активностью, не восстанавливать нитраты, могут быть каталазоотрицательными. Перечисленные дефекты не позволяют идентифицировать их при помощи селективных и хромогенных сред, при помощи стандартных биохимических панелей. Поэтому методом выбора для видовой идентификации бактерий в условиях клинической микробиологической лаборатории является MALDI ToF масс-спектрометрия, обеспечивающая достоверные результаты, независимо от культурального фенотипа *S. aureus* [12]. Несмотря на сложности культивирования и идентификации SCV-стафилококков, их поиск должен тщательно выполняться при каждом исследовании респираторных образцов при МВ. Главная причина этого - негативные свойства SCV-бактерий, основными из которых являются широкий спектр резистентности к различным группам АМП и фенотип персистера [8, 13]. Присутствие штаммов SCV-фенотипа *S. aureus* в респираторных образцах коррелирует с негативным прогнозом течения МВ [14].

Традиционно при оценке чувствительности к АМП повышенное внимание акцентируется на выявлении метициллин-резистентных *S. aureus* (MRSA), элиминация которых представляет более сложную задачу, чем борьба с чувствительными стафилококками. Определение MRSA может осуществляться не только при помощи теста с цефокситином, но и при помощи (1) MALDI ToF масс-спектрометрии на основе обнаружения характерного масс-пика $mz=2413$, соответствующего специфическому для MRSA пептиду PSM-mec, (2) хромогенных сред (например, CHROMagar™ MRSA (CHROMagar, Франция)), (3) ПЦР-тестирования (см. ниже). При оценке АМП пристальное внимание должно уделяться штаммам *S. aureus* с «необычным резистентным фенотипом», который подразумевает устойчивость как минимум к одному из следующих АМП: ванкомицину, тейкопланину, телаванцину, далбаванцину, оритаванцину, даптомицину, линезолиду, тедизолиду, хинупристин-далфопристину, тигециклину, эравакиклину, омадациклину [15]. Резистентность к перечисленным АМП часто сочетается с фенотипами множественной, экстремальной устойчивости и даже панрезистентности, что несёт повышенную угрозу для жизни пациентов.

Значение молекулярно-генетической детекции и оценки *S. aureus* при помощи коммерческих наборов для ПЦР зависит от функциональной значимости конкретного набора. Применение наборов, позволяющих выявить лишь присутствие *S. aureus* в респираторных образцах (например, «БакСкрин УПИМ» (ДНК-Технология)), «Staphylococcus aureus TaqMan PCR Detection Kits» (Norgen Biotek Corp., Канада), «Staphylococcus PCR detection Kit» (Atila BioSystems, США)) не

несёт дополнительной полезной информации по сравнению с культуральной изоляцией стафилококка. Более информативными являются результаты, полученные при помощи ПЦР-наборов, позволяющих детектировать MRSA на основе обнаружения генов *nuc*, *mecA/mecC* и региона SCCmec/orfX (например, GeneProof MRSA PCR Kit 9 (GeneProof, Czech Republic)). Принадлежность изолята к MRSA-типу является не только критерием выбора антибиотикотерапии для конкретного пациента, но служит негативным прогностическим фактором развития устойчивости этого изолята к ванкомицину, линезолиду, даптомицину [16] и индикатором эпидемиологической опасности [17].

MRSA-варианты тесно связаны с клональными характеристиками *S. aureus*. Большинство нозокомиальных изолятов MRSA принадлежит к 6-ти клональным комплексам (CC): CC₁, CC₅, CC_{8/239}, CC₂, CC₃₆, CC₄₅ [18]. Перечисленные клональные комплексы отличаются повышенной опасностью, широким распространением по всему миру, расцениваются в качестве клонов повышенного эпидемиологического риска. Для госпитальной эпидемиологии было бы полезным включать в план мероприятий исследования, направленные на поиск штаммов из клонов повышенного эпидемиологического риска, которые определяются с помощью мультилокусной сиквенс-типирования (MLST). Технологической основой таких исследований является полногеномное секвенирование либо Сенгер-секвенирование семи генов генерального метаболизма (house-keeping genes) *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* [19].

***Pseudomonas aeruginosa*.** Среди взрослых пациентов с МВ хроническая синегнойная инфекция обнаруживается у 17-83%, среди детей в возрасте до 18 лет - у 2-43%. Доля пациентов с интермиттирующей инфекцией примерно одинакова в детской и взрослой возрастных группах и достигает 26%. Хронически инфицированными считаются пациенты, у которых более чем в 50% респираторных образцов, собранных за последние 12 месяцев, обнаруживалась *P. aeruginosa*. Данный критерий (модифицированный критерий Лидса) применим и для определения хронического инфицирования другими лёгочными патогенами при МВ, за исключением нетуберкулёзных микобактерий [3].

Для индикации *P. aeruginosa* используют хромогенные питательные среды (CHROMagar™ *Pseudomonas* (CHROMagar, Франция), chromID *P. aeruginosa* (bioMérieux, Франция) и др.), селективные среды с добавлением негативных селективных агентов (цетримид, налидиксовая кислота, триклозан (*Pseudomonas* CN selective agar (Oxoid Ltd., Великобритания), *Pseudomonas aeruginosa* Agar (Bio-Rad, США) и др.), селективные среды с добавлением положительного селективного агента - ацетамида. Селективные среды обладают низкой специфичностью (примерно 30% для сред с негативными селективным агентом и менее 26% для сред с ацетамидом), тогда как специфичность хромогенных сред достигает 70% [20].

Колонии штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ, часто могут иметь мукоидный морфотип. Колонизация пациента мукоидными штаммами значительно ухудшает прогноз лёгочной болезни. При этом мукоидные изоляты важно отличать от слизистых колоний. Слизистые колонии формируются при длитель-

ной инкубации на средах с глюколатом или высоким содержанием углерода, и способность к формированию слизистых колоний - свойство всех штаммов *P. aeruginosa*. Мукоидный морфотип выявляется на простых питательных средах и формируется штаммами, отличительной особенностью которых является способность обильно продуцировать полиуронид и альгинат [21]. В результате эволюции *P. aeruginosa* в лёгких пациентов с МВ может возникнуть SCV-морфотип. Он характеризуется повышенной устойчивостью к АМП и ассоциирован со значительным ухудшением функции лёгких [22].

«Золотым стандартом» для видовой идентификации *P. aeruginosa* является MALDI-ToF масс-спектрометрия [23]. Результаты идентификации, получаемые с использованием автоматических биохимических тест-систем, менее достоверны и не всегда соответствуют результатам, полученным при помощи масс-спектрометрии. Коэффициенты конгруэнтности для тест-систем TDR-300B (Mindray, Китай) и VITEK2 (bioMérieux, Франция) при сравнении с результатами масс-спектрометрии составляют 81% и 92%, соответственно [24].

Для выявления эпидемических клонов *P. aeruginosa* применяют MLST-типирование, в основе которого лежит анализ последовательностей консервативных генов *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, *trpE*. К эпидемическому клону относят клоны высокого эпидемического риска (ST₂₃₅, ST₃₀₈ и др.) и эпидемические МВ-специфические клоны (AUST-01/ST₆₄₉, Ливерпульский эпидемический штамм (ST₁₄₆/ST₆₈₃) и др.). Представители этих клонов часто характеризуются высоким уровнем устойчивости к АМП, колонизация такими штаммами ухудшает прогноз течения лёгочной болезни при МВ [6, 25].

Перечень АМП, чувствительность к которым определяют для штаммов *P. aeruginosa* в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), включает пиперациллин, пиперациллин-тазобактам, тикарциллин-клавуланат, цефепим, цефидерокол, цефтазидим, цефтазидим-авибактам, цефтолозан-тазобактам, дорипенем, имипенем, имипенем-релебактам, меропенем, меропенем-ваборбактам, азтреонам, ципрофлоксацин, левофлоксацин, амикацин, тобрамицин, колистин. Институт клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) рекомендует дополнительно оценивать чувствительность к нетилмицину, офлоксацину, гатифлоксацину [26, 27]. В дополнение к фенотипической оценке АМП штаммы *P. aeruginosa* рекомендуется тестировать на носительство карбапенемаз. Для их детекции используют фенотипические (например, MBL E-тест, метод инактивации карбапенемаз), и молекулярно-генетические методы - выявление генов β-лактамаз при помощи ПЦР в реальном времени [27]. Существуют коммерческие наборы для ПЦР, предназначенные для детектирования генов β-лактамаз. Набор АмплиСенс MDR MBL-FL (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) позволяет выявлять гены карбапенемаз VIM, IMP, NDM; при помощи набора EasyScreen ESBL/CPO Detection Kit (Genetic Signatures, Австралия) можно определить гены 15-ти групп, включая VIM, IMP, NDM, IMI, GES.

Haemophilus influenzae. Стойкий инфекционно-

воспалительный процесс в нижних отделах респираторного тракта, вызванный *H. influenzae*, регистрируется примерно у 28% детей с МВ в первые 5 лет жизни и снижается до 10% при взрослении [28].

За последние годы не наблюдается значительно прогресса в методах изоляции и идентификации *H. influenzae*: по-прежнему, средами выбора являются шоколадные агары, обогатённые, как минимум, двумя факторами роста - НАД/НАДФ (V фактор) и гемином (X фактор). Методом выбора для идентификации *H. influenzae* является MALDI ToF масс-спектрометрия.

Эпидемиология гемофильной инфекции при МВ имеет свои особенности, которые могут повлиять на диагностические алгоритмы более глубокого исследования изолятов *H. influenzae*. Если при обсуждении немуковисцидозной гемофильной инфекции в качестве наиболее опасного варианта возбудителя подразумеваются штаммы *H. influenzae* серотипа b, то среди патогенетически значимых респираторных изолятов при МВ отсутствует доминирующий серотип и даже преобладают нетипируемые или бескапсульные штаммы, доля которых может составлять более 90% изолятов [29]. Принадлежность *H. influenzae* к лидирующим (ST₆, ST₃) или спорадическим клональным комплексам тоже не имеет клинического значения при МВ. На всём протяжении гемофильного поражения лёгких при МВ регистрируется многократная смена различающихся по серотипу/сиквенс-типу штаммов *H. influenzae*, персистирующая инфекция в течение многих лет одним штаммом встречается лишь в редких случаях [30]. Такая картина заставляет ещё раз вспомнить афоризм, приписываемый Луи Пастеру «Микроб - ничто, субстрат - все!». С практической точки зрения это означает, что определение серотипа при муковисцидозе имеет лишь эпидемиологическое значение для определения опасности носителя *H. influenzae* для окружающих.

Поиск индикаторных для *H. influenzae* факторов патогенности (генов адгезинов *hmw1A*, *hmw2A*, *hia*), наличие которых коррелирует с опасностью немуковисцидозных изолятов, у МВ-штаммов тоже не имеет смысла, поскольку они не играют ключевой роли в патогенезе лёгочной болезни при МВ [29, 31].

Определение и интерпретация чувствительности к АМП для *H. influenzae* является техникой на уровне искусства. Сложности процедуры заключаются не только в особых требованиях для питательной среды (бульон либо агар Мюллера-Хинтона + 5% лизированной лошадиной крови и 20 мг/л β-NAD), но и в существовании технических неопределённостей (Area of Technical Uncertainty) в интерпретации пограничных результатов для множества АМП, включая пиперациллин-тазобактам, цефепим, цефотаксим, цефподоксим, цефтолозан-тазобактам, цефтриаксон, цефуросим, имипенем [26]. Для определения чувствительности к макролидам не используются фенотипические методы. Рекомендуется проводить тестирование, направленное на выявление генетических детерминант устойчивости к макролидам.

Парадокс гемофильного поражения респираторного аппарата при МВ заключается в том, что при понимании отдельных вопросов диагностики и патогенеза инфекционного процесса отсутствует единая стратегия элиминации *H. influenzae* и профилактики гемофильной инфекции.

***Burkholderia cepacia* complex.** Бактерии *Burkholderia cepacia* complex (ВСС) колонизируют до 6,7% пациентов с МВ в возрасте менее 18 лет и до 13,8% взрослых пациентов [3,4]. Обнаружение бактерий ВСС является крайне негативным прогностическим признаком, поскольку ВСС часто становятся причиной развития «серасия»-синдрома - прогрессирующего поражения лёгких и бактериемии, летальность при котором достигает 75% [32]. Большинство штаммов ВСС дают видимый рост на плотных питательных средах в течение 48 часов, однако для некоторых изолятов требуется более длительная инкубация - до 10 дней [33]. Для выявления ВСС в респираторных образцах используют селективные питательные среды, содержащие в качестве селективных агентов АМП: колистин, гентамицин, ванкомицин [34]. К селективным средам для ВСС относятся *Burkholderia cepacia* selective agar (BCSA; bioMérieux, Франция), BD *Cepacia* medium (Becton-Dickinson, США), MAST *Cepacia* medium (MAST laboratories, Великобритания). Применяют хромогенные среды: CHROMID В. *cepacia* Agar (bioMérieux, Франция), CHROMagar В. *cepacia* (CHROMagar, Франция).

Некоторые штаммы ВСС могут иметь необычный морфотип колоний. К необычным морфотипам относят (1) мукоидные, (2) SCV, (3) блестящие колонии. Интенсивность выработки изолятом экзополисахарида, который определяет формирование мукоидного морфотипа, зависит от питательной среды, используемой для культивирования. Для оценки способности штаммов ВСС вырабатывать экзополисахарид оптимальными являются среды с дрожжевым экстрактом либо с повышенной концентрацией маннитола [35, 36]. Морфотип SCV почти никогда не встречается в чистой культуре, а только в сочетании с нормальным морфотипом. При этом доля SCV в смешанной культуре не превышает 25%, в связи с чем этот морфотип часто не регистрируется при диагностике. Среди необычных морфотипов ВСС именно SCV является наиболее неблагоприятным с точки зрения влияния на течение лёгочной болезни при МВ [37]. Блестящий морфотип чаще характеризуется сниженной вирулентностью [38].

Варианты ВСС разделяют на десять генетически близких подгрупп - геномоваров: геномовар I (*Burkholderia cepacia*), геномовар II (*Burkholderia multivorans*), геномовар III (*Burkholderia cenocepacia*), геномовар IV (*Burkholderia stabilis*), геномовар V (*Burkholderia vietnamiensis*), геномовар VI (*Burkholderia dolosa*), геномовар VII (*Burkholderia ambifaria*), геномовар VIII (*Burkholderia anthina*), геномовар IX (*Burkholderia pyrrocinia*), геномовар X (*Burkholderia ubonensis*). Дополнительно к ВСС относят ряд видов, не объединённых в геномовары. *Burkholderia contaminans* и *Burkholderia lata* объединены в отдельную подгруппу - группа К [26, 39]. Биохимические тест-системы, в том числе автоматические, не позволяют достоверно идентифицировать бактерии ВСС. MALDI ToF масс-спектрометрия даёт более точные результаты. Масс-спектрометр VITEK MS (bioMérieux, Франция) идентифицирует комплекс ВСС, однако не позволяет надёжно дифференцировать виды внутри комплекса. Система для MALDI ToF масс-спектрометрии MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) достоверно определяет принадлежность изолята к ВСС, идентифицирует виды *B. cenocepacia* и

B. vietnamiensis с достоверностью более 95%, но не позволяет надёжно идентифицировать другие виды комплекса. Для дифференциации видов внутри комплекса ВСС используют генетические методы. В частности, определяют уникальную для каждого вида последовательность гена *hisA* - гена фермента, участвующего в синтезе гистидина [40]. Основой эпидемиологических исследований является MLST-типирование, схема которого основана на определении последовательностей семи генов: *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC*, *trpB*. Для более глубокого эпидемиологического анализа используют методы средней идентичности нуклеотидов (average nucleotide identity (ANI)) и цифровой ДНК-ДНК гибридизации [39]. Описан ряд глобально распространённых эпидемических сиквенс-типов ВСС, включая ST₁₆, ST₂₈ (ET₁₂) [41]. Существуют сиквенс-типы, специфичные для определённых географических регионов. На территории Российской Федерации распространён сиквенс-тип ST₇₀₉, на территории Чехии - высококонтагиозный сиквенс-тип ST₃₂ [42, 43].

Бактерии ВСС обладают широким спектром природной резистентности. Они природно устойчивы к ампициллину, амоксициллину-клавуланату, ампициллину-сульбактаму, тикарциллину, тикарциллину-клавуланату, пиперациллину, пиперациллину-тазобактаму, цефотаксиму, цефтриаксону, азтреонаму, эртапенему, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, триметоприму, фосфомицину, аминогликозидам, полимиксинам [44]. В соответствии с рекомендациями CLSI, бактерии ВСС следует тестировать на чувствительность всего к нескольким АМП: цефтазидим, меропенем, левофлоксацин, миноциклин, триметоприм-сульфаметоксазол [27].

***Stenotrophomonas maltophilia*.** Бактерии *S. maltophilia* обнаруживают в респираторных образцах 16 - 19% пациентов с МВ [3, 4]. *S. maltophilia* считают маркером тяжелого течения легочной болезни. У инфицированных пациентов регистрируют более частые обострения заболевания, более часто возникают показания к госпитализации и назначению курсов антибиотиков внутривенно [45].

Селективная среда для выделения *S. maltophilia* - VIA-агар - была предложена К.Г. Керг и соавторами [46]. Она содержит ванкомицин, имипенем, амфотерицин В и индикаторную систему маннит/бромтимоловый синий. Позднее были предложены другие варианты селективных сред. Например, среда ВС (шоколадный агар с бацитрацином (Bacitracin-Chocolate agar) с помещенным на нее диском с имипенемом также может быть использована для выделения *S. maltophilia*. Однако, среда ВС обладает меньшей чувствительностью по сравнению с VIA-агаром [47]. В настоящее время на основе VIA-агара разработаны коммерческие питательные среды (например, *Stenotrophomonas* Selective Agar, HiMedia, Индия).

Особую сложность представляет выявление SCV-колоний - опасного морфотипа, резистентного ко многим антибиотикам, включая триметоприм-сульфаметоксазол. SCV-штаммы *S. maltophilia* могут быть аукострофами по гемину, метионину, тимидину и не растут на средах, обычно используемых для культивирования грам-отрицательных бактерий. Для их выделения следует использовать кровяной или шоколадный агар.

Биохимические тест-системы не дают надежных ре-

зультатов при идентификации штаммов *S. maltophilia* и могут идентифицировать их как BCC, *Achromobacter xylosoxidans*, *P. aeruginosa* или *Bordetella bronchiseptica*. Для надежной видовой идентификации применяют MALDI-TOF масс-спектрометрию или генетические методы, основанные на определении видоспецифической последовательности гена 23S рРНК [48]. Схема определения сиквенс-типа включает анализ последовательностей генов *atpD*, *gapA*, *guaA*, *mutM*, *nuoD*, *ppsA* и *recA*. MLST-анализ штаммов *S. maltophilia* не всегда является информативным, так как *S. maltophilia* отличается высокой генетической гетерогенностью и отсутствием преобладающих эпидемических клонов [49]. Тем не менее, определение сиквенс-типа может быть полезным при расследовании вспышек инфицирования [48].

Перечень препаратов, к которым *S. maltophilia* обладает природной устойчивостью, затрагивает почти все классы антибиотиков. Рекомендациями EUCAST предусмотрено исследование чувствительности только к триметоприму-сульфаметоксазолу. Рекомендации CLSI устанавливают критерии для интерпретации результатов определения чувствительности к триметоприму-сульфаметоксазолу, левофлоксацину, миноциклину, цефидероколу. Критерии интерпретации результатов тестирования чувствительности к тикарциллину-клавуланату, цефтазидиму и хлорамфениколу установлены только для метода микроразведений в бульоне [26, 27].

***Achromobacter* spp.** Доля пациентов с МВ, у которых выявляются *Achromobacter* spp., достигает 22% среди взрослых и 8% среди детей младше 18 лет [3, 4]. Несмотря на невысокую распространённость, виды *Achromobacter* являются предметом серьёзных исследований, поскольку они оказывают значительное влияние на течение лёгочной болезни. В частности, у пациентов, респираторный аппарат которых колонизирован ахромобактериями, наблюдается более быстрое снижение функции лёгких [50].

Achromobacter spp. обычно культивируют на простых питательных средах. Но для более эффективной изоляции ахромобактерий предложена селективная среда MCXVAA [51]. Она получила название по аббревиатуре названий её компонентов: агара МакКонки (*MacConkey agar*) с добавлением ксилозы (*Xylose*), ванкомицина (*Vancomycin*), азтреонама (*Aztreonam*), амфотерицина В (*Amphotericin B*).

Идентификация *Achromobacter* spp. при помощи классических микробиологических методов затруднительна из-за их биохимической схожести с другими неферментирующими бактериями (*P. aeruginosa*, BCC, *Acinetobacter* spp.). MALDI-ToF масс-спектрометрия позволяет достоверно идентифицировать ахромобактерии на уровне рода, но не всегда позволяет идентифицировать вид. Это связано с тем, что в базы данных систем для масс-спектрометрии включено небольшое количество видов *Achromobacter* [52]. Для рутинной клинической практики не обязательно идентифицировать ахромобактерии до вида, однако для эпидемиологических исследований необходимо определение видовой и сиквенс-типовой принадлежности изолята. Видовую идентификацию проводят при помощи генетических методов на основании определения последовательности гена *nrdA*, для определения сиквенс-типа дополнительно оценивают последовательность шести

генов: *nusA*, *rpoB*, *eno*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* [52].

В респираторных образцах от МВ-пациентов наиболее часто обнаруживают виды *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter ruhlandii*. Именно к виду *A. ruhlandii* относятся представители эпидемических клонов ахромобактерий, включая датский эпидемический штамм DES, российский эпидемический штамм ST₃₆ [53, 54].

Выбор АМП, к которым следует определять чувствительность ахромобактерий, зависит от уровня идентификации. В случае если достоверно идентифицирован вид *A. xylosoxidans*, в соответствии с рекомендациями EUCAST, определяют чувствительность к пиперациллину-тазобактаму, меропенему, триметоприму-сульфаметоксазолу [26]. Перечень основных АМП для случаев, когда идентифицирован другой вид или идентификация проведена только до рода, определяется рекомендациями CLSI (таблица 1G «Other Non-Enterobacterales») и включает цефтазидим, пиперациллин-тазобактам, триметоприм-сульфаметоксазол, гентамицин, тобрамицин. В таких случаях оценку чувствительности к АМП проводят только при помощи метода микроразведений в бульоне [27].

Нетуберкулёзные виды *Mycobacterium* spp. Среди почти 200 представителей рода *Mycobacterium* описано более 50 видов, вызывающих нетуберкулёзное поражение лёгких у пациентов с МВ. Эти виды с отличающимися тинкториальными и биохимическими свойствами, различными культуральными предпочтениями и профилями природной АМР объединены в одну группу «нетуберкулёзные микобактерии» исключительно по клинико-патогенетическим критериям.

Эксперты считают, что выявление и клиническая роль нетуберкулёзных микобактерий (НТМ) при МВ требуют улучшения и уточнения [55]. Показатели стойкого инфицирования бронхо-лёгочного аппарата НТМ расцениваются в качестве одного из самых важных индикаторов здоровья МВ-пациентов. В разных регионах мира этот показатель варьирует от 2% до 28% [56]. Такие различия между показателями инфицирования могут свидетельствовать об отсутствии стандартов диагностики МВ-ассоциированных микобактериозов. Статистически обоснованный тренд роста инфицирования, зарегистрированный за последние 12 лет [55] также может быть не объективным отражением заболеваемости, а следствием улучшения качества диагностических технологий.

Практически выгодными являются две классификации НТМ. Первая определяет бактериологическую диагностику, основанную на культивировании, и базируется на разделении возбудителей микобактериозов человека по скорости роста на две группы - быстрорастущие (видимый рост на питательных средах в течение 7 суток) и медленно растущие (рост более 7 суток) [57]. К быстрорастущим микобактериям с наиболее выраженным клиническим значением при МВ принадлежат группы: 1) *Mycobacterium chelonae/Mycobacterium abscessus* group (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium immunogenum*, *Mycobacterium franklinii*), 2) *Mycobacterium fortuitum* group (*Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium septicum*, *Mycobacterium porcinum*), 3) *Mycobacterium mucogenicum* group (*Mycobacte-*

rium mucogenicum), 4) *Mycobacterium smegmatis* group (*Mycobacterium smegmatis*), 5) пигментированные микобактерии (*Mycobacterium cosmeticum*, *Mycobacterium bacteremicum*) [58]. Относительно участия в лёгочной болезни при МВ представителей *Mycobacterium mageritense/Mycobacterium wolinskyi* group верифицированные данные отсутствуют. Наиболее актуальными для МВ среди медленно растущих микобактерий являются виды *Mycobacterium avium* complex (новое название - *Mycobacteroides abscessus* complex), включающий *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium chimaera* [59], *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium colombiense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense* [58, 60-62].

Другая классификация, используемая в генодиагностике и основанная на генетических критериях и частоте изоляции в лабораториях, подразделяет НТМ на общие (common mycobacteria или GenoType CM) и дополнительные (additional species или GenoType AS) [63]. Доказанным клиническим значением для пациентов с МВ обладают следующие виды генотипа GenoType CM: *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *Mycobacterium interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*. Перечень значимых для МВ видов GenoType AS включает: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *Mycobacterium cellatum*, *M. smegmatis*, *Mycobacterium lentiflavum*, *M. szulgai*, *Mycobacterium hemophilum*.

Клинические рекомендации настаивают на скрининге МВ-пациентов на носительство НТМ один-два раза в год. Для изоляции быстрорастущих микобактерий можно использовать среды, применяющиеся в рутинной практике, включая универсальные кровяные и хромогенные агары, культивирование на которых проводится в течение 7 сут. Изоляция медленно растущих бактерий требует применения специальных сред - Левенштейна-Йенсена, Миддлбука, Финн-2. Культивирование следует проводить до появления видимого роста, при отсутствии роста - в течение 28 сут. Основная причина ложноотрицательных результатов при культивировании связана с тем, что микобактериозы чаще всего развиваются в виде микст-инфекции, при которой выделяются *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Burkholderia* spp. и другие микроорганизмы. Присутствующие в исследуемом материале бактерии часто подавляют рост НТМ на питательных средах, снижая качество диагностики [64].

Практически доступный способ идентификации, основанный на MALDI ToF масс-спектрометрии, позволяет достоверно определить группу НТМ и с 90%-ной вероятностью - видовую принадлежность изолята [65]. Более точная видовая идентификация должна проводиться при помощи секвенирования генов *hsp65* (ген белка теплового шока), *rpoB* (ген β -субъединицы РНК-полимеразы), *erm* (ген метилазы, обеспечивающей рибосомальную резистентность к эритромицину), генов 16S- или 23S-РНК [66].

Клиническая интерпретация положительного культурального исследования имеет особенности. Однократное обнаружение НТМ не является основанием для постановки диагноза микобактериоза лёгких [67]. Диа-

гноз ставится, если регистрируются положительные результаты одного или нескольких дополнительных посевов с выделением одного и того же вида микобактерий в течение 6 мес. Позитивным может считаться только результат, при котором материал для исследования получен строго из бронхолёгочного аппарата и не был контаминирован слюной, слизью из глотки и носоглотки. Диагноз микобактериоза должен быть подтверждён инструментальными методами исследования (предпочтительна компьютерная томография лёгких).

Диагноз микобактериоза лёгких может быть поставлен на основе однократного гистологического обнаружения гранулематозного воспаления, сопряжённого с положительным высевом НТМ либо с детекцией НТМ-специфичной ДНК молекулярно-генетическими методами (см. ниже) [67].

Коммерчески доступные наборы для молекулярно-генетической диагностики НТМ разработаны на основе: 1) мультиплексной ПЦР в сочетании с ДНК-гибридизацией (пример - набор DR. TBDR/NTM IVD Kit производства DR. Chip Corporation, Тайвань, способный идентифицировать 15 видов туберкулёзных микобактерий и наиболее актуальных НТМ); 2) линейной ДНК-гибридизации (line probe assay). К числу наиболее известных «line probe»-наборов следует отнести стрипы для твёрдофазной реверс-гибридизации GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия) [63] и Speed-Oligo Mycobacteria (Vincel, Испания) [68]. Набор GenoType Mycobacterium CM/AS, основанный на гибридизации специфических фрагментов генов 23SPHK, позволяет идентифицировать 21 вид НТМ с чувствительностью не менее 97% и специфичностью от 92 до 99%, ещё 19 видов определяются в пределах группы. Набор Speed-Oligo Mycobacteria, определяющий специфичность спейсеров 16S-23S рибосомальных РНК-генов, позволяет с достаточной достоверностью (специфичность и чувствительность более 90%) идентифицировать лишь 9 видов НТМ.

Протоколы оценки чувствительности НТМ к АМП, разработанные Институтом клинических лабораторных стандартов США (The Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI), предполагают использование различных схем для быстро- и медленно растущих микобактерий [69]. Для быстрорастущих НТМ разработаны критерии для тестирования чувствительности к амикацину, тобрамицину, кларитромицину, доксициклину, цефокситину, имипенему, линезолиду, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, триметоприм-сульфаметоксазолу. Изоляты *M. avium* complex тестируют на чувствительность к кларитромицину, линезолиду, моксифлоксацину. Для других видов медленно растущих НТМ определяется резистентность к амикацину, кларитромицину, линезолиду, ципрофлоксацину, этамбутолу, моксифлоксацину, рифабутину, рифампицину, триметоприм-сульфаметоксазолу. Тестирование следует проводить методом серийных разведений.

Существование эпидемически важных клонов, которые имеют повышенную опасность для развития микобактериозов у МВ-пациентов, доказано для представителей *M. abscessus* group. Сиквенс-типы ST₁ и ST₂₃ являются распространёнными в Азии, ST₇ - в Канаде [70, 71]. Нозокомиальное заражение МВ-пациентов НТМ является относительно редким, но возможным

событием [72]. Пациенты с микобактериозами могут представлять потенциальную эпидемиологическую угрозу для других пациентов с МВ.

Заключение. Проведённый анализ литературы позволил обозначить реперные точки в диагностике приоритетных респираторных патогенов, определяющих течение лёгочной болезни при МВ. При работе с *S. aureus* ключевыми задачами являются выявление SCV-фенотипа, MRSA-штаммов, штаммов с необычным резистентным фенотипом, эпидемиологически опасных клональных комплексов. Изучение *P. aeruginosa* должно быть сосредоточено на определении характера инфицирования (интермиттирующее или хроническое), оценке фенотипической резистентности, поиске генов карбапенемаз и определении эпидемиологически опасных сиквенс-типов. Обнаружение *H. influenzae* требует использования специальных питательных сред высокого качества, при выявлении *H. influenzae* акцент должен быть сделан на определении профиля АМР. При изоляции ВСС-штаммов необходимо учитывать особые требования к питательным средам и времени культивирования. Достоверная видовая идентификация большинства представителей ВСС возможна лишь на основе технологий секвенирования. Рекомендуется MLST-типирование обнаруженных ВСС-изолятов. При поиске *S. maltophilia* следует использовать селективные питательные среды. Принадлежность изолятов к *Achromobacter* spp. возможно установить только на основе MALDI-ToF масс-спектрометрии, видовую идентификацию можно провести только на основе секвенирования. Выбор спектра АМП для изучения АМР-профиля ахромобактерий зависит от качества таксономической идентификации. Главная проблема диагностики НТМ связана с длительностью культивирования медленно-растущих видов. Верификация видовой идентификации НТМ возможна лишь на основе секвенирования индикаторных генов, включая *hsp65*, *rpoB*, *erm*, генов 16S/23SPHK.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 5-8, 10-17, 19-53, 55-71 см. REFERENCES)

4. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2020 год. Данные с сайта Всероссийской ассоциации для больных муковисцидозом. Available at: https://api.med-gen.ru/site/assets/files/51107/site_registre_2020.pdf (дата обращения: сентябрь 2023 г.)
9. Чуркина Л.Н., Бидненко С.И., Ванечутте М., Авдеева Л.В., Макушенко А.С., Лютко О.Б. и др. Алгоритм идентификации атипичных форм стафилококков (SSCVs) - возбудителей хронических гнойно-воспалительных процессов у людей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013; 58(11-12): 26-30.
18. Гончаров А.Е., Зуева Л.П., Суворов А.Н., Глазовская Л.С., Брусина Е.Б., Азизов И.С. и др. Ведущие эпидемиологически значимые клоны золотистого стафилококка, циркулирующие в географически удаленных регионах Евразии. *Медицинский альманах*. 2014; 4(34): 27-30.
54. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Семенов А.Н., Лазарева А.В. и др. Разнообразие и опасность *Achromobacter* spp., поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. *Пульмонология*. 2015; 25 (4): 389-402.

REFERENCES

1. Anderson M.P., Sheppard D.N., Berger H.A., Welsh M. J. Chloride

- channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am. J. Physiol.* 1992; 263(1 Pt 1): L1-14. DOI: 10.1152/ajplung.1992.263.1.L1.
2. Polgreen P.M., Alejandro P.C. Clinical phenotypes of cystic fibrosis carriers. *Annu. Rev. Med.* 2022; 73: 563-74. DOI: 10.1146/annurev-med-042120-020148.
3. ECFS Patient Registry. Annual Data Report. 2021. European Cystic Fibrosis Society. Available at: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/Annual%20Report_2021_09Jun2023.pdf (accessed September 2023)
4. Russian Association for patients with cystic fibrosis. Available at: https://api.med-gen.ru/site/assets/files/51107/site_registre_2020.pdf (accessed September 2023). (in Russian)
5. Hernandez L.C., Moreno R.M.G., Cartagena M.N.B., Pelaez A., Sole A., Fernandez A.A. et al. Experience with elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in patients with cystic fibrosis and advanced disease. *Arch. Bronconeumol.* 2023; S0300-2896(23):00176-X. DOI: 10.1016/j.arbres.2023.05.017.
6. Del Barrio-Tofino E., Lopez-Causape C., Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020; 56(6): 106196. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106196.
7. Erfanimesh S., Emaneini M., Modaresi M.R., Feizabadi M.M., Halimi S., Beigverdi R. et al. Distribution and characteristics of bacteria isolated from cystic fibrosis patients with pulmonary exacerbation. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2022; 2022: 5831139. DOI: 10.1155/2022/5831139.
8. Besier S., Smaczny C., von Mallinckrodt C., Krahl A., Ackermann H., Brade V. et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(1): 168-72. DOI: 10.1128/JCM.01510-06.
9. Churkina L.N., Bidnenko S.I., Vaneechoutte M., Avdeeva L.V., Makushenko A.S., Lutko O.B. et al. Algorithm of Identification of Atypical Variants of Staphylococci, Pathogens of Chronic Pyoinflammatory Processes in Humans. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2013; 58(11-12): 26-30. (in Russian)
10. Dyon-Tafari V., Josse J., Safrani-Lahyani J., Assant-Trouillet S., Chiganne M., Vincent F. et al. Clinical evaluation of three chromogenic media for the isolation of *Staphylococcus aureus* in respiratory samples in patients with cystic fibrosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2021; 99(1): 115201. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115201.
11. Millette G., Seguin D.L., Isabelle C., Chamberland S., Lucier J.F., Rodrigue S. et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants from airways of adult cystic fibrosis patients as precursors of adaptive antibiotic-resistant mutations. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12(6): 1069. DOI: 10.3390/antibiotics12061069.
12. Ota Y., Matsumoto T., Sugano M., Honda T. Identification of clinical thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* by using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rinsho Byori*. 2015; 63(6): 683-7.
13. Keim K.C., George I.K., Reynolds L., Smith A.C. The clinical significance of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Lab. Med.* 2023; 54(3): 227-34. DOI: 10.1093/labmed/lmac101.
14. Wolter D.J., Emerson J.C., McNamara S., Buccat A.M., Qin X., Cochrane E. et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(3): 384-91. DOI: 10.1093/cid/cit270.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes Tables v3.2. Available at: <https://www.eucast.org> (accessed September 2023).
16. Alghamdi B.A., Al-Johani I., Al-Shamrani J.M., Alshamrani H.M., Al-Otaibi B.G., Almazmomi K. et al. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi. J. Biol. Sci.* 2023; 30(4): 103604. DOI: 10.1016/j.sjbs.2023.103604.
17. Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 2007; 298(15): 1763-71. DOI: 10.1001/jama.298.15.1763.
18. Goncharov A.E., Zueva L.P., Suворov A.N., Glazovskaya L.S., Brusina E.B., Azizov I.S. et al. Leading *Staphylococcus aureus* epidemic clones circulating in different geographic regions of Eurasia. *Meditinskiy al manakh*. 2014; 4(34): 27-30. (in Russian)
19. Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin.*

- Microbiol.* 2000; 38(3): 1008-15. DOI: 10.1128/jcm.38.3.1008-1015.2000.
20. Weiser R., Donoghue D., Weightman A., Mahenthiralingam E. Evaluation of five selective media for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a strain panel from clinical, environmental and industrial sources. *J. Microbiol. Methods.* 2014; 99: 8-14. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.01.010.
 21. Govan J.R.W. Characteristics of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and *in vivo*. In: Gacesa P., Russell N.J., eds. *Pseudomonas Infection and Alginates*. Springer, Dordrecht; 1990: 50–75. DOI: 10.1007/978-94-009-1836-8_4.
 22. Malone J.G. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infect. Drug. Resist.* 2015; 29(8): 237-47. DOI: 10.2147/IDR.S68214.
 23. Baillie S., Ireland K., Warwick S., Wareham D., Wilks M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry: rapid identification of bacteria isolated from patients with cystic fibrosis. *Br. J. Biomed. Sci.* 2013; 70(4): 144-8. DOI: 10.1080/09674845.2013.
 24. Moehario L.H., Tjoa E., Putranata H., Joon S., Edbert D., Robertus T. Performance of TDR-300B and VITEK®2 for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* in comparison with VITEK®MS. *J. Int. Med. Res.* 2021; 49(2):300060521989893. DOI: 10.1177/0300060521989893.
 25. Parkins M.D., Somayaji R., Waters V.J. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31(4): e00019-18. DOI: 10.1128/CMR.00019-18.
 26. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2023. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1. Available at: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints (accessed September 2023).
 27. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2023. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Available at: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed September 2023).
 28. Thornton C.S., Parkins M.D. Microbial epidemiology of the cystic fibrosis airways: past, present, and future. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2023; 44(02): 269-86. DOI: 10.1055/s-0042-1758732.
 29. Cardines R., Giufre M., Pompilio A., Fiscarelli E., Ricciotti G., Di Bonaventura G. et al. *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. *Int. J. Med. Microbiol.* 2012; 302(1): 45-52. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.08.003.
 30. Roman F., Canton R., Perez-Vazquez M., Baquero F., Campos J. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(04): 1450-9. DOI: 10.1128/jcm.42.4.1450-1459.2004.
 31. Fluit A.C., Bayjanov J.R., Benaissa-Trouw B.J., Rogers M.R., Diez-Aguilar M., Canton R. et al. Whole-genome analysis of *Haemophilus influenzae* strains isolated from persons with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* 2022; 71(8): 001570. DOI: 10.1099/jmm.0.001570.
 32. Branstetter J.W., Yarbrough A., Poole C. Management of cepacia syndrome with a combination of intravenous and inhaled antimicrobials in a non-cystic fibrosis pediatric patient. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 2020; 25(8): 730-4. DOI: 10.5863/1551-6776-25.8.730.
 33. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group. 2022. Available at: <https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/2023-01/CF%20Lab%20Standards%20FINAL.pdf> (accessed September 2023).
 34. Marrs E.C.L., Perry A., Pery J.D. Evaluation of three culture media for isolation of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory samples of patients with cystic fibrosis. *Microorganisms.* 2021; 9(12): 2604. DOI: 10.3390/microorganisms9122604.
 35. Cuzzi B., Herasimenka Y., Silipo A., Lanzetta R., Liut G., Rizzo R. et al. Versatility of the *Burkholderia cepacia* complex for the biosynthesis of exopolysaccharides: a comparative structural investigation. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94372. DOI: 10.1371/journal.pone.0094372.
 36. Zlosnik J.E., Hird T.J., Fraenkel M.C., Moreira L.M., Henry D.A., Speert D.P. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(4): 1470-3. DOI: 10.1128/JCM.02273-07.
 37. Cooper V.S., Staples R.K., Traverse C.C., Ellis C.N. Parallel evolution of small colony variants in *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Genomics.* 2014; 104(6 Pt A): 447-52. DOI: 10.1016/j.ygeno.2014.09.007.
 38. Bernier S.P., Nguyen D.T., Sokol P.A. A LysR-type transcriptional regulator in *Burkholderia cenocepacia* influences colony morphology and virulence. *Infect. Immun.* 2008; 76(1): 38-47. DOI: 10.1128/IAI.00874-07.
 39. Jin Y., Zhou J., Zhou J., Hu M., Zhang Q., Kong N. et al. Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biol. Direct.* 2020; 15(1): 6. DOI: 10.1186/s13062-020-0258-5.
 40. Devanga Ragupathi N.K., Veeraraghavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2019; 18(1): 7. DOI: 10.1186/s12941-019-0306-0.
 41. Pope C.E., Short P., Carter P.E. Species distribution of *Burkholderia cepacia* complex isolates in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in New Zealand. *J. Cyst. Fibros.* 2010; 9(6): 442-6. DOI: 10.1016/j.jcf.2010.08.011.
 42. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., AksenoVA E.I., Sharapova N.E., Semenov A.N. et al. On Burkholderiales order microorganisms and cystic fibrosis in Russia. *BMC Genomics.* 2018; 19(Suppl. 3): 74. DOI: 10.1186/s12864-018-4472-9.
 43. Dedeckova K., Kalferstova L., Strnad H., Vavrova J., Drevinek P. Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 2013; 12(5): 475-81. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.12.007.
 44. EUCAST Expected Resistant Phenotypes Version 1.2. January 2023. Available at: https://www.eucast.org/expert_rules_and_expected_phenotypes/expected_phenotypes (accessed September 2023).
 45. Berdah L., Taytard J., Leyronnas S., Clement A., Boelle P.Y., Corvol H. *Stenotrophomonas maltophilia*: a marker of lung disease severity. *Pediatr. Pulmonol.* 2018; 53(4): 426-30. DOI: 10.1002/ppul.23943.
 46. Kerr K.G., Denton M., Todd N., Corps C.M., Kumari P., Hawkey P.M. A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 15(7): 607-10. DOI: 10.1007/BF01709373.
 47. Denton M., Hall M.J., Todd N.J., Kerr K.G., Littlewood J.M. Improved isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from the sputa of patients with cystic fibrosis using a selective medium. *Clin. Microbiol. Infect.* 2000; 6(7): 397-8. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2000.00098.x.
 48. Said M.S., Tirhani E., Lesho E. *Stenotrophomonas maltophilia*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. PMID: 34283489.
 49. Esposito A., Pompilio A., Bettua C., Crocetta V., Giacobazzi E., Fiscarelli E. et al. Evolution of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis lung over chronic infection: a genomic and phenotypic population study. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1590. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01590.
 50. Marsac B., Berdah L., Thouvenin G., Sermet-Gaudelus I., Corvol H. *Achromobacter xylosoxidans* airway infection is associated with lung disease severity in children with cystic fibrosis. *ERJ Open Res.* 2021; 7(2): 00076-2021. DOI: 10.1183/23120541.
 51. Amoureux L., Bador J., Fardeheb S., Mabilie C., Couchot C., Massip C. et al. Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(23): 7142-9. DOI: 10.1128/AEM.02293-13.
 52. Isler B., Kidd T.J., Stewart A.G., Harris P., Paterson D.L. *Achromobacter* infections and treatment options. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2020; 64(11): e01025-20. DOI: 10.1128/AAC.01025-20.
 53. Gabrielaite M., Nielsen F.C., Johansen H.K., Marvig R.L. *Achromobacter* spp. genetic adaptation in cystic fibrosis. *Microb. Genom.* 2021; 7(7): 000582. DOI: 10.1099/mgen.0.000582.
 54. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., AksenoVA E.I., Semenov A.N., Lazareva A.V. et al. Diversity and hazard of respiratory infection of *Achromobacter* spp. in cystic fibrosis patients. *Pul'monologiya.* 2015; 25(4): 389-402. (in Russian)
 55. Prieto M.D., Alam M.E., Franciosi A.N., Quon B.S. Global burden of nontuberculous mycobacteria in the cystic fibrosis population: A systematic review and meta-analysis. *ERJ Open Res.* 2023; 9(1): 00336-2022. DOI: 10.1183/23120541.00336-2022.
 56. Lipuma J.J. The changing microbial epidemiology in cystic fibro-

- sis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(2): 299-323. DOI: 10.1128/cmr.00068-09.
57. Stahl D.A., Urbance J.W. The division between fast-and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *Journal of bacteriology.* 1990; 172(1): 116-24. DOI: 10.1128/jb.172.1.116-124.1990.
58. Turenne C.Y. Nontuberculous mycobacteria: insights on taxonomy and evolution. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 72: 159-68. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.01.017.
59. van Ingen J., Turenne C.Y., Tortoli E., Wallace R.J. Jr, Brown-Elliott B.A. A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018; 68(11): 3666-77. DOI: 10.1099/ijsem.0.003026.
60. Candido P.H.C., Nunes L.D.S., Marques E.A., Folescu T.W., Coelho F.S., de Moura V.C.N. et al. Multidrug-resistant nontuberculous mycobacteria isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(8): 2990-2997. DOI: 10.1128/jcm.00549-14.
61. Zhou Y., Mu W., Zhang J., Wen S.W., Pakhale S. Global prevalence of non-tuberculous mycobacteria in adults with non-cystic fibrosis bronchiectasis 2006–2021: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2022; 12(8): e055672. DOI: 10.1136/bmjopen-2021-055672.
62. Espinosa-del-Barrio L., Boira I., Esteban V., Chiner E. *Mycobacterium malmoense* infection in a patient with adult cystic fibrosis: a case report. *Arch. Bronconeumol.* 2023; 59(8): 540-1. DOI: 10.1016/j.arbres.2023.03.021.
63. Russo C., Tortoli E., Menichella D. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of Mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(2): 334-9. DOI: 10.1128/jcm.44.2.334-339.2006.
64. Zemanick E.T., Hoffman L.R. Cystic fibrosis: microbiology and host response. *Pediatr. Clin. North. Am.* 2016; 63(4): 617-36. DOI: 10.1016/j.pcl.2016.04.003.
65. Rodriguez Temporal D., Zvezdanova M.E., Benedi P., Marin M., Blazquez Sanchez M., Ruiz Serrano M.J. et al. Identification of Nocardia and non-tuberculous Mycobacterium species by MALDI-ToF MS using the VITEK MS coupled to IVD and RUO databases. *Microb. Biotechnol.* 2023; 16(4): 778-83. DOI: 10.1111/1751-7915.14146.
66. Piersimoni C., Scarparo C. Pulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect. Dis.* 2008; 8(5): 323-34. DOI: 10.1016/S1473-3099(08)70100-2.
67. Daley C.L., Iaccarino J.M., Lange C., Cambau E., Wallace R.J. Jr, Andrejak C. et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(4): 905-13. DOI: 10.1093/cid/ciaa1125.
68. Griffith D.E. Nontuberculous Mycobacterial disease: a comprehensive approach to diagnosis and management. 1st Ed. Berlin: Springer; 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-93473-0.
69. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd ed. Available at: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m24/> (accessed September 2023).
70. Cheng A., Sun H.Y., Tsai Y.T., Lu P.L., Lee S.S.J., Lee Y.T. et al. Longitudinal non-cystic fibrosis trends of pulmonary *Mycobacterium abscessus* disease from 2010 to 2017: spread of the “globally successful clone” in Asia. *ERJ Open Res.* 2021; 7(1): 00191-2020. DOI: 10.1183/23120541.00191-2020.
71. Waglechner N., Tullis E., Stephenson A.L., Waters V., McIntosh F., Ma J. et al. Genomic epidemiology of *Mycobacterium abscessus* in a Canadian cystic fibrosis centre. *Sci. Rep.* 2022; 12: 16116. DOI: 10.1038/s41598-022-19666-8.
72. Gross J.E., Caceres S., Poch K., Hasan N.A., Jia F., Epperson L.E. et al. Investigating Nontuberculous Mycobacteria transmission at the Colorado Adult Cystic Fibrosis Program. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2022; 205(9): 1064-74. DOI: 10.1164/rccm.202108-1911OC.