

© ВОРОНИНА О. Л., РЫЖОВА Н. Н., КУНДА М. С., АКСЕНОВА Е. И., ШАРАПОВА Н. Е., АМЕЛИНА Е. Л., ЛАЗАРЕВА А. В., ЧЕРНЕВИЧ В. П., СИМОНОВА О. И., ЖУХОВИЦКИЙ В. Г., ЖИЛИНА С. В., СЕМЬКИН С. Ю., ПОЛИКАРПОВА С. В., АШЕРОВА И. К., ОРЛОВ А. В., КОНДРАТЕНКО О. В.

УДК 579.61

DOI: 10.20333/2500136-2019-2-80-88

## ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ИЗМЕНЕНИИ РАЗНООБРАЗИЯ БУРКХОЛДЕРИЙ, ИНФИЦИРУЮЩИХ РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

О. Л. Воронина<sup>1</sup>, Н. Н. Рыжова<sup>1</sup>, М. С. Кунда<sup>1</sup>, Е. И. Аксенова<sup>1</sup>, Н. Е. Шарапова<sup>1</sup>, Е. Л. Амелина<sup>2</sup>, А. В. Лазарева<sup>3</sup>, В. П. Черневич<sup>3</sup>, О. И. Симонова<sup>3</sup>, В. Г. Жуховицкий<sup>4</sup>, С. В. Жилина<sup>4</sup>, С. Ю. Семькин<sup>5</sup>, С. В. Поликарпова<sup>6</sup>, И. К. Ашерева<sup>7</sup>, А. В. Орлов<sup>8</sup>, О. В. Кондратенко<sup>9</sup>

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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва 115682, Российская Федерация

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, 119296, Российская Федерация

<sup>4</sup>Морозовская детская городская клиническая больница, Москва 115093, Российская Федерация

<sup>5</sup>Российская детская клиническая больница, Москва 119571, Российская Федерация

<sup>6</sup>Городская клиническая больница №15 имени О. М. Филатова, Москва 111539, Российская Федерация

<sup>7</sup>Ярославской области детская клиническая больница №1, Ярославль 150003, Российская Федерация

<sup>8</sup>Детская Городская Больница Святой Ольги, Санкт-Петербург 194156, Российская Федерация

<sup>9</sup>Самарский государственный медицинский университет, Самара 443099, Российская Федерация

**Цель исследования.** Буркхолдерии – наиболее опасные микроорганизмы для пациентов с муковисцидозом (МВ). Трансмиссивность буркхолдерий приводит к перекрестному инфицированию и формированию эпидемических штаммов. Совместные усилия врачей, специалистов лабораторной диагностики, ученых способствовали внедрению в практику противоэпидемических мер. Целью данного исследования стал анализ результатов принятых мер на выборке часто госпитализируемых пациентов с МВ в период 2014–2018 гг.

**Материал и методы.** Образцы мокроты и аспирата от 670 пациентов, изолированные культуры буркхолдерий стали объектом исследования с применением микробиологических методов, масс-спектрометрии (MicroFlex, Bruker) а также молекулярно-генетических подходов для генотипирования штаммов буркхолдерий. Данные MLST (Multi Locus Sequence Typing) проанализированы с использованием алгоритма goeBURST для установления родства российских генотипов с генотипами, депонированными в базу данных PubMLST.

**Результаты.** Установлено увеличение видового разнообразия буркхолдерий в последние годы. Бактерии видов *B. gladioli*, *B. stabilis* были обнаружены в нижних дыхательных путях пациентов с МВ. *B. multivorans*, разнообразная в группе взрослых, не зарегистрирована в период наблюдений у детей. Увеличилось разнообразие генотипов, выявляемых буркхолдерий. 5 генотипов 709, 710, 728, 208,903 являются общими для детской и взрослой возрастных групп. Отмечена тенденция к снижению количества случаев инфицирования штаммом эпидемического генотипа 709. Опасение в детской группе вызывает высокая частота встречаемости генотипов 208 и 241.

**Заключение.** Данные, полученные на выборке, включающей 87 % пациентов, зарегистрированных как хронически инфицированных буркхолдерией, показали эффективность противоэпидемических мер, а также совместных усилий врачей, специалистов лабораторной диагностики и ученых по своевременной диагностике буркхолдерий с применением современных микробиологических и молекулярно-генетических методов.

**Ключевые слова:** муковисцидоз, *Burkholderia*, мультилокусное секвенирование, генотип, эпидемический штамм.

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

**Для цитирования:** Воронина ОЛ, Рыжова НН, Кунда МС, Аксенова ЕИ, Шарапова НЕ, Амелина ЕЛ, Лазарева АВ, Черневич ВП, Симонова ОИ, Жуховицкий ВГ, Жилина СВ, Семькин СЮ, Поликарпова СВ, Ашерева ИК, Орлов АВ, Кондратенко ОВ. Основные тенденции в изменении разнообразия буркхолдерий, инфицирующих российских больных муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(2):80-88. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-80-88

## MAJOR TENDENCIES IN BURKHOLDERIA DIVERSITY CHANGES, INFECTING RUSSIAN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

O. L. Voronina<sup>1</sup>, N. N. Ryzhova<sup>1</sup>, M. S. Kunda<sup>1</sup>, E. I. AksenoVA<sup>1</sup>, N. E. Sharapova<sup>1</sup>, E. L. Amelina<sup>2</sup>, A. V. Lasareva<sup>3</sup>, V. P. Chernevich<sup>3</sup>, O. I. Simonova<sup>3</sup>, V. G. Zhukhovitsky<sup>4</sup>, S. V. Zhilina<sup>4</sup>, S. Yu. Semykin<sup>5</sup>, S. V. Polikarpova<sup>6</sup>, I. K. Asherova<sup>7</sup>, A. V. Orlov<sup>8</sup>, O. V. Kondratenko<sup>9</sup>

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

<sup>2</sup>Pulmonology Scientific Research Institute, Moscow 115682, Russian Federation

<sup>3</sup>National Medical Research Center for Children's Health, Moscow 119296, Russian Federation

<sup>4</sup>Morozov Children's City Clinical Hospital, Moscow 115093, Russian Federation

<sup>5</sup>Russian Children's Clinical Hospital, Moscow 119571, Russian Federation

<sup>6</sup>O. M. Filatov City Clinical Hospital N15, Moscow 111539, Russian Federation

<sup>7</sup>Yaroslavl Oblast Children's Clinical Hospital N1, Yaroslavl 150003, Russian Federation

<sup>8</sup>Saint Olga Children's City Clinical Hospital, Saint Petersburg 194156, Russian Federation

<sup>9</sup>Samara State Medical University, Samara 443099, Russian Federation

**The aim of the research.** Burkholderia is the most dangerous microorganism for patients with cystic fibrosis (CF). Burkholderia transmissibility leads to cross-infection and epidemic strains formation. Joint efforts of doctors, laboratory diagnostics specialists, scientists make certain contribution in the implementation of anti-epidemic measures into practice. The purpose of this study was to analyse the results of the measures that are often taken for patients hospitalized with CF during 2014-2018.

**Materials and methods.** Sputum and aspirate samples from 670 patients, isolated Burkholderia cultures became the object of research, that was analysed by means of microbiological methods, mass spectrometry (MicroFlex, Bruker) and molecular genetic approaches for genotyping of Burkholderia strains. MLST (Multi Locus Sequence Typing) data were analysed using goeBURST algorithm to determine identity between Russian genotypes and genotypes deposited in the PubMLST database.

**Results.** There is an increase in Burkholderia species diversity noted during recent years. *B. gladioli* and *B. stabilis* bacteria were found in the lower respiratory tract in patients with CF. *B. multivorans*, diverse in the group of adults, was not registered in children during observation period. Genotypes diversity detected by Burkholderia has increased as well. 5 genotypes 709, 710, 728, 208,903 are general both for children and adults' groups. There was a tendency in the decrease of number of cases of infection with epidemic genotype 709 strain. High incidence of genotypes 208 and 241 causes certain anxiety in a group of children.

**Conclusion.** The data obtained on sampling, including 87 % of patients registered as chronically infected with Burkholderia, showed the effectiveness of anti-epidemic measures, as well as the joint efforts of doctors, laboratory diagnostics specialists and scientists in timely Burkholderia diagnosis by means of microbiological and molecular genetic methods.

**Key words:** cystic fibrosis, *Burkholderia*, multilocus sequencing, genotype, epidemic strain.

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

**Citation:** Voronina OL, Ryzhova NN, Kunda MS, Aksenova EI, Sharapova NE, Amelina EL, Lasareva AV, Chernevich VP, Simonova OI, Zhukhovitsky VG, Zhilina SV, Semykin SYu, Polikarpova SV, Asherova IK, Orlov AV, Kondratenko OV. Major tendencies in burkholderia diversity changes, infecting Russian patients with cystic fibrosis. *Siberian Medical Review*.2019;(2):80-88. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-80-88

## Введение

*Burkholderia cepacia complex* (Всс) – неферментирующие грамотрицательные бактерии, оказывающие наиболее сильное угнетающее действие на функцию дыхания при инфицировании больных муковисцидозом (МВ) [1]. Количество пациентов, инфицированных буркхолдериями, в разных странах мира определяется не только уровнем противоэпидемических мероприятий, но и частотой встречаемости МВ в конкретной стране. Среди 34 стран, представленных в регистрах разного уровня, по численности населения (322,6 млн.), количеству больных МВ (29887) и количеству инфицированных Всс (717) лидируют США, но степень инфицирования составляет только 2,4 % [2]. В Бразилии, единственной стране Южной Америки, опубликовавшей регистр больных МВ, при численности 202 млн. количество наблюдаемых пациентов с МВ составляет 1520, среди которых 163 инфицированных, что составляет уже 10,4 % [3]. В Российской Федерации зарегистрировано 174 пациента, хронически инфицированных Всс, что составляет 6 % больных МВ, представленных в регистре РФ 2016 [4].

Особое внимание в конце 20 века было обращено на предотвращение распространения эпидемических штаммов Всс. В Канаде в 2001 [5], в Чехии в 2002 [6] обеспечили полную изоляцию при госпитализации пациентов с МВ, инфицированных буркхолдериями, в особенности эпидемическими штаммами, что привело к снижению уровня инфицирования бактериями этого рода, отсутствию новых случаев инфицирования эпидемическими штаммами, росту разнообразия вновь выявляемых буркхолдерий. Однако ощутимые результаты были констатированы только в 2015-2018 гг.

В РФ организация отдельных палат для больных МВ в стационарах стала возможной в 2015 г. для взрослых пациентов. В настоящее время 12 индивидуальных, оснащенных оборудованием палат действует в НМИЦ здоровья детей, Морозовская ДГКБ обеспечивает госпитализацию пациентов с МВ в отдельные боксы. При амбулаторном приеме врачи соблюдают усиленные меры инфекционного контроля.

Проведение школ по МВ, работа специализированных секций на конференциях, обучение микробиологов, в том числе при поддержке благотворительных фондов, координация действий врачей, специалистов лабораторной диагностики и сотрудников Национальных исследовательских центров способствовали усиленному контролю за буркхолдерной инфекцией.

Анализу результатов этих усилий по наблюдениям 2014-2018 гг. посвящено наше исследование.

## Материал и методы

В выборку регулярно обследуемых пациентов с МВ вошли 670 человек 1949-2018 г. р., средний возраст – 18 лет. Взрослые (18 лет и более) составили 50 % выборки. Забор образцов мокроты и трахеального аспирата осуществляли специалисты лечебных учреждений, в которые госпитализировали пациентов. Изоляты буркхолдерий получали сотрудники микробиологических лабораторий из организаций, участвовавших в исследовании, по методикам, описанным ранее [7].

Идентификацию культур бактерий выполняли на основе биохимических подходов [7], а также с помощью масс-спектрометра MicroFlex (Bruker, Германия) [7].

Выделение ДНК из биологических образцов и изолятов проводили по методикам, описанным ранее [8].

Генотипирование буркхолдерий по экспресс-схеме выполняли, согласно [9]. Для уточнения новых

генотипов анализировали все локусы схемы MLST (Multi Locus Sequence Typing), используя оригинальный протокол с нашими модификациями [10].

Новые аллели и генотипы буркхолдерий регистрировали у куратора сайта Всс PubMLST Charlotte Peeters [11]. Номера id последних зарегистрированных генотипов: 2885-2891, 2893-2895.

Основной микроорганизм биологического образца определяли на основе амплификации и секвенирования фрагмента гена 16S rDNA, как описано ранее [12]. Для идентификации последовательностей использовали BLAST NCBI (The National Center for Biotechnology Information).

Анализ родства генотипов *B. cepacia*, выделенных от российских пациентов, провели с использованием алгоритма гоеBURST [13] и визуализовали в виде сети с помощью программы PHYLOViZ-2 [14]. В анализ включили 261 генотип *B. cepacia*, представленный в базе данных Всс PubMLST (09-11-2018).

### Результаты и обсуждение

#### Видовое разнообразие Всс в выборке больных МВ

В проанализированной выборке в образцах из нижних дыхательных путей буркхолдерия была детектирована у 152 пациентов. В период с 2014 г. по настоящее время основным видом являлась *B. cepacia* (84 %), *B. multivorans* составила 7 %, *B. gladioli* – 3 %, *B. contaminans* – 3 %, *B. stabilis* – 2 %, *B. cepacia* – 1 %.

Рассмотрим, как меняется видовой состав буркхолдерий в двух возрастных группах пациентов: взрослой (2000 г. р. и старше) и детской. На рис. 1А возрастные группы разделены синей вертикальной чертой. На фоне преобладающей *B. cepacia* слева от черты видны желтые столбики *B. multivorans*, а вот в детской группе этот вид не представлен. В тоже время зеленые столбики *B. gladioli* чаще встречаются в правой части рисунка. *B. stabilis* и *B. contaminans* представлены единичными случаями в обеих частях, а *B. cepacia* есть только в детской группе.

#### Генотипы Всс, выявленные в выборке

Все Всс, детектированные во взрослой группе, были отнесены к 17 генотипам (ST). Такое же количество генотипов было обнаружено в детской группе. Построение диаграммы Венна (рис. 1В) показало, что в группах есть 5 общих генотипов: 4 относятся к *B. cepacia*, 1 – к *B. gladioli*.

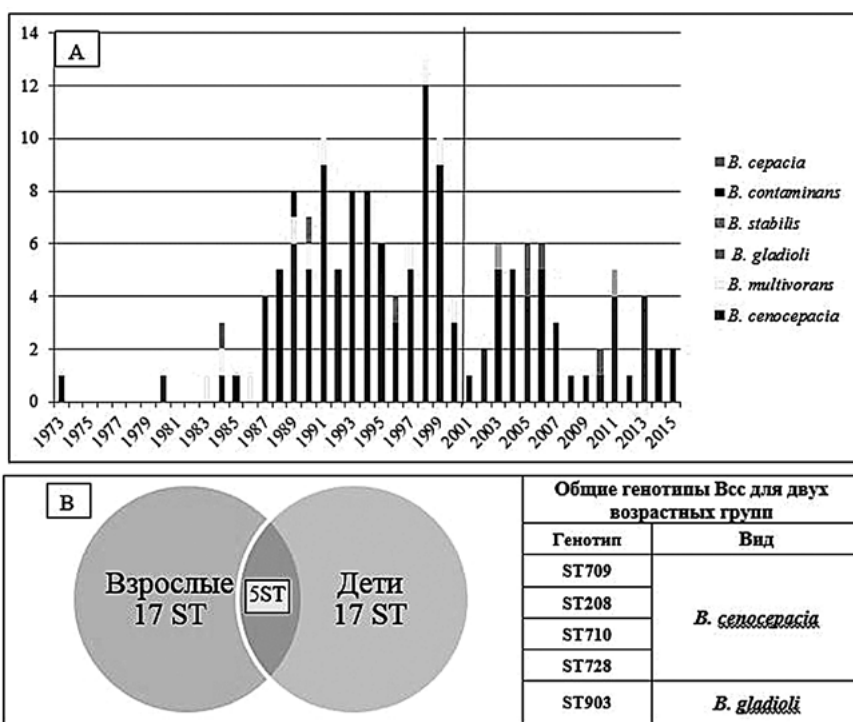


Рисунок 1. Разнообразие буркхолдерий у пациентов разного возраста с муковисцидозом.

А – Видовое разнообразие буркхолдерий в зависимости от возраста пациента; В – диаграмма Венна. Сравнение генотипов буркхолдерий в группах детей и взрослых.

Figure 1. Burkholderia variety in patients with cystic fibrosis of different age.

A – Burkholderia species diversity of depending on patient's age; B – Venn diagram. Comparison of Burkholderia genotypes in groups of children and adults.

Рассмотрим подробнее генотипы *B. cepacia*.

ST709 – наиболее известный эпидемический генотип. ST709 по-прежнему не отмечен в ДФО, но встречается во всех остальных ФО. Его доля во взрослой группе – 80 %, а в детской существенно ниже – 55 % (рис. 2). Как видно на рис. 3, в детской группе ST709 имеет тенденцию к снижению, но небольшой подъем наблюдается в группе 2002-2006 г.р. Из данных рисунка 2А следует, что основной вклад в долю инфицирования ST709 младших детей внесли случаи Кемерово. Возраст самого младшего инфицированного ребенка на момент забора образца составил 1 год 10 мес. Среди детей с хронической инфекцией ST709 пациенты ЦФО (Белгород) и ПФО (Волгоград). Для пациента ЮФО (Карачаево-Черкесия) доказана эрадикация своевременно обнаруженной буркхолдерии ST709.

Следующий общий для групп генотип – 208, характерный для ПФО и ЮФО. Его доля в детской группе составляет 16 %, что на 5 % выше, чем во взрослой (рис.2). Генотипы 728 и 710 представлены единичными случаями в детской группе. Внутрибольничный ST728 во взрослой группе встречается чаще, причем 2 случая связаны с ДФО. ST710 во взрослой группе отмечен у самых возрастных пациентов: 1973 и 1980 г.р. Последний из указанных пациентов был вылечен от инфекции

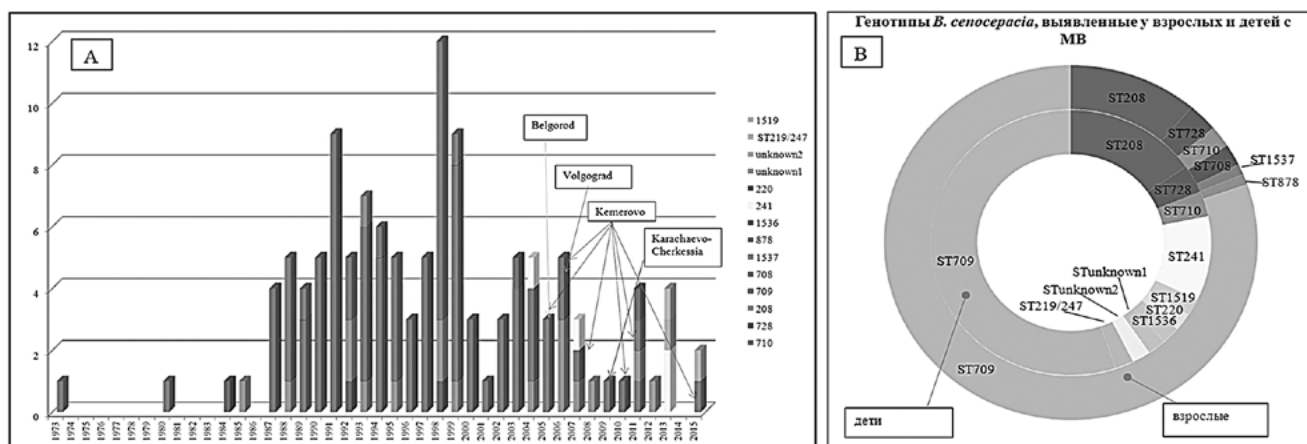


Рисунок 2. Генотипы *B. cepacia* у пациентов разного возраста с муковисцидозом.  
 А – Распределение генотипов *B. cepacia* по годам рождения пациентов; В – Доля выявленных генотипов в двух возрастных группах.  
 Figure 2. *B. cepacia* genotypes in patients with cystic fibrosis of different age.  
 А – Distribution of *B. cepacia* genotypes according to patient's birth year; В – Proportion of the detected genotypes in two age groups.

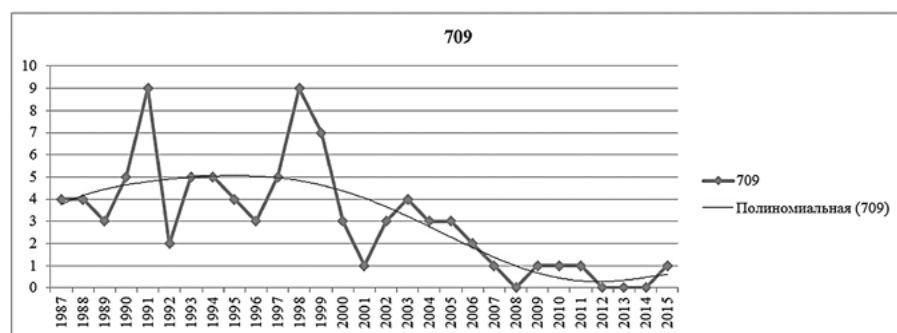


Рисунок 3. Количество выявленных в выборке случаев инфицирования ST709 по годам рождения пациентов с МВ.  
 Figure 3. Number of ST709 infections detected in sampling by patient with CF birth year.

врачами НИИ Пульмонологии, что было подтверждено разными методами анализа, в том числе исследованием микробиома нижних дыхательных путей [8].

Во взрослой группе отмечено 3 дополнительных генотипа *B. cepacia*: 708, 878 и 1537.

ST708, ранее отмеченный как внутрибольничный наряду с ST728 [15], детектирован у двух пациентов: 1989 и 1999 г.р (оба ЦФО), как единственный генотип *B. cepacia*. У одного пациента ST708 идентифицировали наряду с ST709 после операции по трансплантации легких, в дальнейшем в образцах от этого пациента наблюдали только ST709. Аналогичный случай появления ST708, как дополнительного к ST709 после госпитализации пациента мы отмечали ранее у больного с МВ 2002 г.р. (ПФО) [15]. Заметим, что через 2 года в образцах этого пациента присутствовал только ST709.

Следующий генотип 878 первоначально был установлен у ребенка с врожденным пороком развития легких (СЗФО), а затем у пациента с МВ (СФО). Таким образом, у пациентов можно констатировать независимое инфицирование.

ST1537 – новый генотип, выявленный у больного, регулярно посещающего Китай.

В детской группе еще 7 генотипов относятся к виду *B. cepacia*. Наибольший интерес среди них представляет ST241, доля которого 10%. Все инфицированные пациенты из ДФО, причем из Амурской области. В тоже время у пациента из Хабаровского края детектирован новый генотип 1536.

Обратим внимание на другой новый генотип – 1519. Первоначально он был определен как внутрибольничный у прооперированного пациента РДКБ, поступившего с диагнозом мальформация подключичной вены. Затем такой же генотип был установлен у *B. cepacia*, выявленной у пациента с МВ 2015 г.р. (ЦФО). Своевременное лечение привело к эрадикации бактерии у этого пациента.

Остальные генотипы за исключением ST220, не были типированы подробно, поскольку буркхолдерия была отмечена у пациентов однократно в небольших количествах, а случаи были признаны транзитными.

Проанализируем взаимосвязь российских генотипов *B. cepacia* с известными генотипами этого вида, представленными в PubMLST Vcc (рис. 4). Диаграмма eBURST помещает генотипы 708, 241 и 728 в самый крупный клональный комплекс (Clonal Complex, CC) 234, включающий эпидемический генотип 28. ST709 и 208 находятся в ветвях CC32, также образованного эпидемическим генотипом. Здесь же новый генотип 220. Дальше по диаграмме отстоят ST710 – генотип, который ранее был синглтоном, и новые ST.

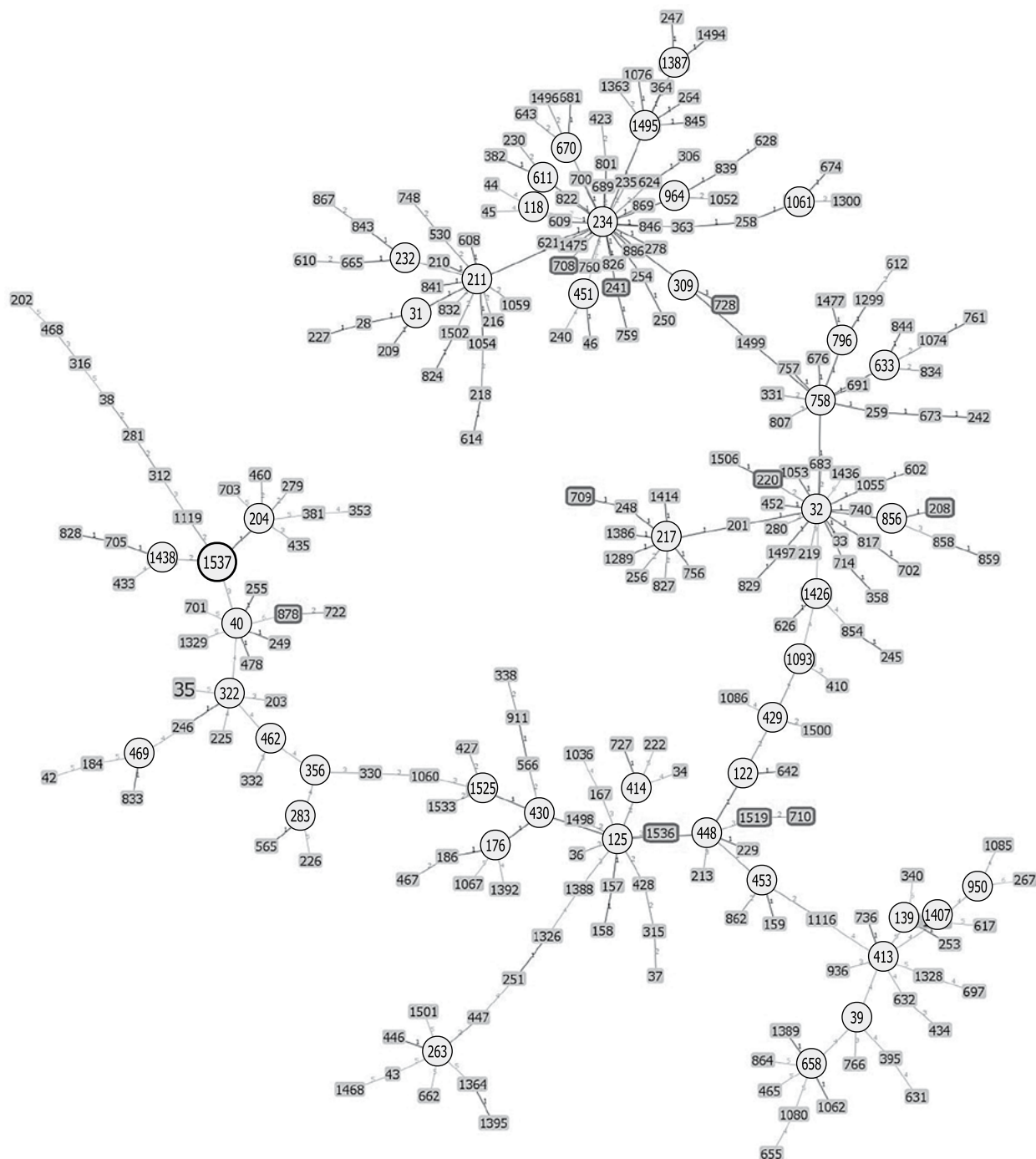


Рисунок 4. eBURST диаграмма, построенная для 261 генотипа *B. cenocepacia*, представленного в базе данных Bcc PubMLST (09.11.2018).

Светло-серые круги – клонообразующие ST; жирные контуры – ST, выявленные у российских пациентов. Цифры на соединительных линиях обозначают количество локусов, отличающих соседние генотипы.

Figure 4. eBURST diagram, constructed for 261 *B. cenocepacia* genotypes, presented in Bcc PubMLST database (09/11/2018). Light gray circles – clone-forming ST; bold contours – ST, detected in Russian patients. Figures on the connecting lines indicate the number of loci that distinguish neighbouring genotypes.

Отметим, что новый ST1519 отличается от ST710 по двум локусам (Double Locus Variant, DLV): *gltB* и *lepA*, так же как и от ближайшего клонообразующего ST448, который, в свою очередь, через новый ST1536 соединен с известным CC125. Генотип 1536 является TLV генотипа 125 по локусам *atpD*, *phaC* и *trpB*.

Самые удаленные от клонов с эпидемическими генотипами – ST878, входящий в CC40, и ST1537, сам являющийся клонообразующим, и соединяющий CC204 и CC1438. ST1537 отличается от ST204 по одному локусу *gyrB* (SLV).

Таким образом, только один новый для российских пациентов генотип 220 относится к клональным комплексам известных эпидемических штаммов.

#### Генотипы *B. multivorans*

*B. multivorans*, встречающаяся только в группе взрослых пациентов, представлена 7 генотипами: 712, 439, 835, 195, 783, 659, 1079. Из них только ST712 детектирован дважды в анализируемый период: у пациентов 1986 г.р. (ЦФО) и 1998 г.р. (ПФО), т.е. пациенты были инфицированы независимо друг от друга. Генотип 1079 – последний из идентифицированных *B. multivorans* – обнаружен у пациента 1983 г. р. (ЦФО), первый образец от которого поступил на анализ в 2015. В том же году ST1079 был зарегистрирован в Великобритании у пациента с МВ [11]. Отметим, что ST659 и 783 так же зарегистрированы в Европе (Бельгия, Германия) [11], ST439 и 195 – межконтинентальные. Генотип 835 зарегистрирован только в России.

#### Генотипы *B. gladioli*

*B. gladioli* впервые была идентифицирована у российского пациента в 2016г. у пациента 1984 г.р. (ЦФО) [8], когда *B. gladioli* ST903 вытеснила *B. multivorans* ST711. В 2018 было зарегистрировано 3 случая инфицирования *B. gladioli*, и все в группе детей с МВ: ST903 был выявлен у пациента 2010 г.р. (ЦФО), ST965 у больного 2005 г.р. (ПФО), ST629 у пациента 2006 г. р. (ПФО). Таким образом, только ST903 встречается у пациентов обеих возрастных групп. Заметим, что ST903 – генотип межконтинентальный и регистрируется чаще других *B. gladioli* у больных с МВ в разных странах. ST965 впервые идентифицирован исследователями из Великобритании. ST629 обнаружен в Германии.

#### Генотипы *B. contaminans*

*B. contaminans* во взрослой возрастной группе представлена генотипом 102, зарегистрированным у больных с МВ из СЗФО, а ранее отмеченным у внутрибольничных штаммов [15]. В детской группе в 2018 г. детектировано 3 случая инфицирования *B. contaminans* ST482: пациент 2008 г.р. (ЦФО, ранее ПФО), 2014 г.р. (ЮФО), 2014 г.р. (ПФО). У двух первых пациентов в результате антибиотикотерапии, проведенной ингаляционно и внутривенно, была констатирована эрадикация *B. contaminans* ST482.

#### Генотипы *B. stabilis*

*B. stabilis* ранее была отмечена среди внутрибольничных штаммов [15]. В 2017 г. впервые этот вид был зарегистрирован у пациента с МВ, переехавшего из Украины в Россию. ST653, зарегистрированный у больного 1996 г.р., затем как транзитный был отмечен у пациента 1990 г.р. (СФО). В 2018 новый генотип 627 детектирован у штамма, выделенного от пациента 2005 г.р. (ЦФО).

Следует отметить, что оба генотипа ранее были зарегистрированы в Чешской Республике (2005 и 2007 гг., соответственно) [11], а ST653 еще раньше –

в Бельгии [11]. Обнаружение *B. stabilis* ST653 у пациентов из разных ФО свидетельствует об источнике этого штамма в окружающей среде.

Обращает на себя внимание, что инфицирование *B. stabilis* сопряжено с инфицированием *Mycobacteroides abscessus* у пациентов 1996 и 2005 г. р. У взрослого пациента *M. abscessus* появился на фоне *B. stabilis* ST653, а у ребенка наоборот *M. abscessus* и *Escherichia coli* предшествовали *B. stabilis* ST627.

#### Генотипы *B. cepacia*

*B. cepacia* зарегистрирована у российских пациентов в СЗФО в 2016 г. У первого пациента бактерия была представлена двумя генотипами: 438 и его SLV – 1083. В 2017 г. у второго пациента из СЗФО был выявлен ST1083.

#### Летальные исходы в группе пациентов с МВ, инфицированных *Bcc*

Во взрослой группе пациентов с МВ, инфицированных *Bcc*, в анализируемый период было зарегистрировано 20 летальных исходов: пациенты 1984-1998 г.р. У 85 % пациентов была хроническая инфекция *B. cenocepacia* (ST709, 208, 708, 728), у 55 % – *B. cenocepacia* ST709. Один из пациентов с *B. cenocepacia* ST709 перенес операцию по трансплантации легких в январе 2016 г., и врачи более 1,5 лет боролись за его жизнь. *B. cenocepacia* ST709 была идентифицирована в бронхоальвеолярном лаваже сразу после пересадки, а дальше, периодически отступая на второй план, детектировалась постоянно, отсутствуя только в одном образце в ноябре 2016 г.

Два пациента были инфицированы *B. multivorans* разных генотипов: 439 и 195. У пациента с *B. multivorans* ST439 наблюдалась также сердечная недостаточность.

В отношении пациента 1995 г. р. (СЗФО) с *B. contaminans* ST102 следует отметить, что к инфекции *Bcc* со временем присоединилась *M. abscessus*.

#### Трансплантации у пациентов, инфицированных *Bcc*

В анализируемый период было проведено 7 трансплантаций у пациентов, инфицированных *Bcc* (табл.): 6 в группе взрослых, 1 у ребенка. 6 пациентов живы. У ребенка в образце, взятом через 9 месяцев после операции, бургхолдерия отсутствовала.

Анализ *Bcc* в новых легких 5 взрослых пациентов показал, что у пациента 1992 г.р. *Bcc* не было сразу после операции, а также по прошествии 8 месяцев. У двух пациентов после операции была идентифицирована бургхолдерия прежнего генотипа, однако у больного 1987 г.р. через 3 мес. *Bcc* сменил *Stenotrophomonas spp.*, у пациента 1995 г.р. на смену бургхолдерии пришла *Klebsiella pneumoniae*, детектированная и сразу после операции. У пациента 1997 г. р. первую проверку провели через год после операции и обнаружили *Bcc* ST709 на фоне преобладавших энтерококков, а через 2,5 г. после операции состав основных выявленных микроорганизмов был типичным

**Пациенты с *Vcc*, перенесшие трансплантацию легких**

***Patients with Vcc who have undergone lung transplantation***

Таблица

Table

Пациент	Дата трансплантации	Год рождения	Vcc ST	Vcc после пересадки	Статус
1	май 2015	1987	709	есть, далее <i>Stenotrophomonas spp.</i>	жив
2	сентябрь 2018	1988	709	нет, через 3 мес. <i>Vcc ST709</i>	жив
3	январь 2016	1991	709	есть	умер в 2017
4	май 2017	1992	728	нет	жив
5	январь 2016	1995	208	есть, далее <i>Klebsiella pneumoniae</i>	жив
6	январь 2015	1997	709	нет, через год <i>Vcc ST709</i>	жив
7	сентябрь 2016	2003	1083	нет	жив

Случаи *Vcc* у пациентов РДКБ были собраны, благодаря микробиологической лаборатории клиники, а также стремлению врачей полностью охарактеризовать возбудителей инфекций.

3 случая связаны с *V. seopseracia*. В двух из них обнаружен внутрибольничный генотип 728. Пациент 6 мес. (ЮФО) с дисплазией мочевыводящих путей поступил в РДКБ в июне 2015 в экстренном порядке. Ранее он был прооперирован в боль-

для МВ: *V. seopseracia ST709*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida dubliniensis*. У пациента, прооперированного в сентябре 2018, через 3 месяца состав микробиоты соответствовал дооперационному: *V. seopseracia ST709*, *Candida albicans*. Случай с летальным исходом описан выше. Таким образом, ответ на вопрос «Как помочь новым легким в противостоянии *Vcc*?» требует дальнейшего наблюдения за микробиотой легких прооперированных пациентов.

*Детская группа. Хроническая инфекция.*

*Случаи эрадикации Vcc*

Анализ детской группы пациентов с МВ, у которых детектировали *Vcc*, показал, что хронически инфицированными могут быть признаны 75 % больных. В когорте хронически инфицированных лидирует ST709 – 56 %, далее – ST208 (17 %), на третьем месте ST241 – 8 %. В единичных случаях причиной хронической инфекции стали *V. seopseracia ST710*, 728, 1536; *V. seracia ST1083*; *V. gladioli ST629*, 965, *V. contaminans ST482*.

У 4 пациентов показана эрадикация *Vcc*. У одного пациента вследствие трансплантации легких, у троих в результате антибиотикотерапии. Подбор антибактериальных препаратов был индивидуальным, но сочетал внутривенную и ингаляционную терапию. Наиболее тревожным был случай выявления *V. seopseracia ST709* у ребенка 2011 г.р. (ЮФО). Эффективность своевременного лечения показало дальнейшее наблюдение в течение 2-х лет. По данным классических и молекулярно-генетических методов, *Vcc* в образцах из нижних дыхательных путей пациента отсутствует.

2 случая признаны достоверно транзиторными, поскольку дальнейшее длительное наблюдение не показало повторных случаев обнаружения *Vcc*. Остальные пациенты подлежат более длительному контролю после первых случаев детектирования *Vcc* для характеристики стадии инфицирования.

*Vcc при других нозологиях*

Врожденный порок развития легких – группа нозологий, наиболее близких МВ по изменениям в легких. Однако из 42 пациентов, вошедших в группу наблюдения, только 1 был инфицирован *V. seopseracia ST878*, что было обсуждено выше.

нице по месту жительства. Таким образом, источником инфекции мог быть местный стационар. Второй пациент 2 мес. (ЮФО) с диагнозом врожденный obstructивный уретерогидронефроз поступил в декабре 2015. У него в моче также выявили *V. seopseracia ST728*. В третьем случае у ребенка, поступившего в 2 г. 10 мес. (ЮФО) с диагнозом мальформация подключичной вены, в послеоперационный период обнаружена *V. seopseracia* нового генотипа 1519. Следует отметить, что позднее *V. seopseracia* такого же генотипа была выявлена у пациента с МВ в возрасте 2 г. 9 мес. (ЦФО), не госпитализировавшегося в РДКБ в последнее время, т.е. эпидемиологическая связь между этими случаями отсутствует.

У двух пациентов была обнаружена *V. contaminans ST102*, ранее также отмеченная как причина внутрибольничной инфекции [15]. Оба пациента очень тяжелые. Первый в возрасте 3 мес. с сепсисом, двусторонней пневмонией, тромбозом правой подключичной артерии, второй 10 лет с энцефаломieloполирадикулоневритом с поражением ствола мозга, тетраплегией, нарушением дыхательной функции. Бактерия была выявлена в бронхоальвеолярном лаваже в обоих случаях.

Таким образом, при тяжелых диагнозах контроль буркхолдерной инфекции в стационарах остается актуальным. Среди возбудителей нозокомиальных инфекций также появился новый генотип *V. seopseracia* 1519.

**Заключение**

Наблюдение за выборкой часто госпитализируемых пациентов, в которую вошло большинство из больных МВ с зарегистрированной *Vcc* инфекцией (152 из 174), показало, что усилия специалистов привели к снижению количества пациентов, инфицированных эпидемическим штаммом *V. seopseracia ST709*. В то же время генотипы 208, 241 остаются актуальными для детской группы пациентов.

Совершенствование диагностики буркхолдерий способствовало своевременному лечению и недопущению хронизации инфекции у детей. Для трех случаев доказана эрадикация *Vcc*: два пациента,



инфицированные *B. contaminans* ST482, один – *B. cenocepacia* ST709. Следует отметить, что у взрослого хронически инфицированного пациента для эрадикации инфекции *B. cenocepacia* ST710 потребовалась длительная комплексная терапия [8], а случаи эрадикации буркхолдерии эпидемического генотипа 709 у взрослых пациентов отсутствуют.

Увеличилось разнообразие видов и генотипов буркхолдерий, выявляемых у пациентов, что свидетельствует об отсутствии перекрестного инфицирования.

Однако буркхолдерии – естественные обитатели окружающей среды. Больные МВ могут контактировать с ними ежедневно, поэтому возможна транзитная инфекция. Рекомендованный регулярный контроль микробиоты дыхательных путей в специализированных лабораториях будет способствовать своевременной терапии и предотвращению хронизации инфекции.

### Литература/References

1. Mahenthalingam E. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2014;15(1):13–5. DOI:10.1016/j.prrv.2014.04.006
2. Cystic Fibrosis Foundation (US) Patient Registry Annual Data Report 2017. Accessed March 13, 2019. <https://www.cff.org/>
3. Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry 2011 Annual Report. Accessed March 13, 2019. <http://www.cysticfibrosisdata.org/data-registry/brazilian-cystic-fibrosis-registry>
4. Красовский СА, Черняк АВ, Воронкова АЮ, Амелина ЕЛ, Каширская НЮ, Кондратьева ЕИ, Гембицкая ТЕ. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2016 год. М.: Медпрактика-М; 2018. 64 с. [Krasovsky SA, Chernyakh AV, Voronkova AY, Amelina EL, Kashirskaya NY, Kondratyeva EI, Gembitskaya TE. Registry of Cystic Fibrosis Patients in The Russian Federation. 2016 year. Moscow: Medpraktika-M; 2018. 64 p.]
5. Zlosnik JE, Zhou G, Brant R, Henry DA, Hird TJ, Mahenthalingam E, Chilvers MA, Wilcox P, Speert DP. Burkholderia species infections in patients with cystic fibrosis in British Columbia, Canada. 30 years' experience. *Annals of the American Thoracic Society*. 2015;12(1):70–8. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201408-395OC
6. Fila L, Dřevínek P. Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis in the post-epidemic period: multilocus sequence typing-based approach. *Folia Microbiologica (Praha)*;62(6):509–514. DOI: 10.1007/s12223-017-0523-x
7. Симонова ОИ, Воронина ОЛ, Горинова ЮВ, Амелина ЕЛ, Буркина НИ, Лазарева АВ, Кунда МС, Рыжова НН, Черневич ВП. Особенности лечения пациента с муковисцидозом при смешанном микробном инфицировании органов дыхания, в том числе, *Pandoraea pnomemusa*. *Российский педиатрический*

*журнал*. 2016; 19(2): 113–122. [Simonova OI, Voronina OL, Gorinova YuV, Amelina EL, Burkina NI, Lasareva AV, Kunda M.S., Ryzhova N.N., Chernevich V.P. Features of the treatment of the cystic fibrosis patient with mixt microbial respiratory infection, including *Pandoraea pnomemusa*. *Russian Pediatric Journal*. 2016; 19(2): 113–122. (In Russian)]

8. Voronina OL, Kunda MS, Ryzhova N. N., Aksenova EI, Sharapova NE, Semenov AN, Amelina EL, Chuchalin AG, Gintsburg AL. On Burkholderiales Order Microorganisms and Cystic Fibrosis in Russia. *BMC Genomics*. 2018, 19(3):74. DOI 10.1186/s12864-018-4472-9

9. Воронина ОЛ, Кунда МС, Аксенова ЕИ, Орлова АА, Чернуха МЮ, Лунин ВГ, Амелина ЕЛ, Чучалин АГ, Гинцбург АЛ. Экспресс диагностика микроорганизмов, поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (11):53–58. [Voronina OL, Kunda MS, Aksenova EI, Orlova AA, Chernukha MY, Lunin VG, Amelina EL, Chuchalin AG, Gintsburg AL. The express diagnostic of microorganisms affecting respiratory tract of patients with mucoviscidosis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2013;(11):53–58. (In Russian)]

10. Spilker T, Baldwin A, Bumford A, Dowson CG, Mahenthalingam E, LiPuma JJ. Expanded multilocus sequence typing for Burkholderia species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;(7): 2607–2610.

11. The Main Site PubMLST is hosted at The Department of Zoology, University of Oxford, UK, Accessed March 13, 2019. <http://pubmlst.org>

12. Voronina OL, Kunda MS, Ryzhova NN, Aksenova EI, Semenov AN, Lasareva AV, Amelina EL, Chuchalin AG, Lunin VG, Gintsburg AL. The variability of the order Burkholderiales representatives in the healthcare units. *BioMed Research International*. 2015;(2015):680210. DOI:10.1155/2015/68021

13. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(5):1518–1530.

14. Nascimento M, Sousa A, Ramirez M, Francisco AP, Carriço JA, Vaz C. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*. 2017;33(1):128–129. DOI:10.1093/bioinformatics/btw582

15. Воронина ОЛ, Чернуха МЮ, Шагинян ИА, Кунда МС, Аветисян ЛР, Орлова АА, Лунин ВГ, Авакян ЛВ, Капранов НИ, Амелина ЕЛ, Чучалин АГ, Гинцбург АЛ Характеристика генотипов штаммов *Burkholderia cepacia* complex, выделенных от больных в стационарах российской федерации. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013, (2): 20–28. [Voronina O L, Chernukha MYu, Shaginyan IA, Kunda MS, Avetisyan LR, Orlova AA, Lunin VG, Avakyan LV,



Kapranov NI, Amelina EL, Chuchalin AG, Gintsburg AL. Characterization of Genotypes for Burkholderia cepacia Complex Strains Isolated from Patients in Hospitals of the Russian Federation. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2013, 28(2): 64–73. (In Russian)]

### Сведения об авторах

Воронина Ольга Львовна, к.б.н., доцент, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(916)2248683; e-mail: olv550@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Рыжова Наталья Николаевна, к.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: rynatalia@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Кунда Марина Сергеевна, к.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: markunda99@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Аксенова Екатерина Ивановна, к.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: aksenova16@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

Шарапова Наталья Евгеньевна, к.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: natasharapova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8384-2822>

Амелина Елена Львовна, к.м.н., Научно-исследовательский институт пульмонологии, адрес: Российская Федерация, 115682, г. Москва, Ореховый бульвар, д. 28; тел.: +7(495)3956393; e-mail: eamalina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5356-9415>

Лазарева Анна Валерьевна, к.м.н., Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, адрес: Российская Федерация, 119296, г. Москва, Ломоносовский просп., д. 2/62; тел.: +7(495)9671420; e-mail: annalaz71@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7149-5387>

Черевич Вера Петровна, Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, адрес: Российская Федерация, 119296, г. Москва, Ломоносовский просп., д. 2/62; тел.: +7(495)9671420; e-mail: verikin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6529-958X>

Симонова Ольга Игоревна, д.м.н., профессор, Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, адрес: Российская Федерация, 119296, г. Москва, Ломоносовский просп., д. 2/62; тел.: +7(495)9671420; e-mail: oisimonova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2367-9920>

Жуховицкий Владимир Григорьевич, к.м.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: zhukhovitsky@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4653-2446>

Жилина Светлана Владимировна, к.м.н., Морозовская детская городская клиническая больница, адрес: Российская Федерация, 115093, г. Москва, 4-й Добрынинский пер., д. 1/9; тел.: +7(495)9598800; e-mail: svzhilin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0084-1013>

Семькин Сергей Юрьевич, к.м.н., Российская детская клиническая больница, адрес: Российская Федерация, 119571, г. Москва, Ленинский пр., д. 117; тел.: +7(495)4341000; e-mail: dr.semykin@mail.ru

Поликарпова Светлана Вениаминовна, к.м.н., Городская клиническая больница №15 имени О. М. Филатова, адрес: Российская Федерация, 111539, г. Москва, ул. Вешняковская, д. 23; тел.: +7(495) 3757101; e-mail: spolikarpova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3201-0804>

Ашерова Ирина Карловна, к.м.н., Ярославской области детская клиническая больница №1, адрес: Российская Федерация, 150003, г. Ярославль, пр. Ленина, д. 12/76; тел.: +7(4852)305163; e-mail: irina\_asheroval@mail.ru

Орлов Александр Владимирович, к.м.н., Детская Городская Больница Святой Ольги, адрес: Российская Федерация, 194156, Санкт-Петербург, ул. Земледельческая, д. 2; тел.: +7(812)2955000; e-mail: orlovcf@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2069-7111>

Кондратенко Ольга Владимировна, к.м.н., Самарский государственный медицинский университет, адрес: Российская Федерация, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89; тел.: +7(846)3321634; e-mail: helga1983@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7750-9468>

### Author information

Olga L. Voronina, Cand.Biol.Sci., Assistant Professor, N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(916)2248683; e-mail: olv550@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Natalia N. Ryzhova, Cand.Biol.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: rynatalia@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Marina S. Kunda, Cand.Biol.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: markunda99@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Ekaterina I. Aksenoval, Cand.Biol.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: aksenova16@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

Natalia E. Sharapoval, Cand.Biol.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: natasharapoval@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8384-2822>

Elena L. Amelina, Cand.Med.Sci., Pulmonology Scientific Research Institute, Address: 28, Orekhovy bulvar, Moscow, Russian Federation 115682; Phone: +7(495)3956393; e-mail: eamalina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5356-9415>

Anna V. Lasareval, Cand.Med.Sci., National Medical Research Center for Children's Health, Address: 2/62, Lomonosovsky Pr., Moscow, Russian Federation 119296; Phone: +7(495)9671420; e-mail: annalaz71@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7149-5387>

Vera P. Chernevich, National Medical Research Center for Children's Health, Address: 2/62, Lomonosovsky Pr., Moscow, Russian Federation 119296; Phone: +7(495)9671420; e-mail: verikin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6529-958X>

Olga I. Simonoval, Dr.Med.Sci., Professor, National Medical Research Center for Children's Health, Address: 2/62, Lomonosovsky Pr., Moscow, Russian Federation 119296; Phone: +7(495)9671420; e-mail: oisimonoval@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2367-9920>

Vladimir G. Zhukhovitsky, Cand.Med.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: zhukhovitsky@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4653-2446>

Svetlana V. Zhilina, Cand.Med.Sci., Morozov Children's City Clinical Hospital, Address: 1/9, 4th Dobrynsky Per., Moscow, Russian Federation 115093; Phone: +7(495)9598800; e-mail: svzhilin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0084-1013>

Sergey Y. Semykin, Cand.Med.Sci., Russian Children's Clinical Hospital, Address: 117, Leninsky Pr., Moscow, Russian Federation 119571; Phone: +7(495)4341000; e-mail: dr.semykin@mail.ru

Svetlana V. Polikarpoval, Cand.Med.Sci., O.M. Filatov City Clinical Hospital N15, Address: 23, Veshnyakovskaya Str., Moscow, Russian Federation 111539; Phone: +7(495)3757101; e-mail: spolikarpoval@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3201-0804>

Irina R. Asheroval, Cand.Med.Sci., Yaroslavl Oblast Children's Clinical Hospital N1, Address: 12/76, Lenina Pr., Yaroslavl, Russian Federation 150003; Phone: +7(4852)305163; e-mail: irina\_asheroval@mail.ru

Alexandr V. Orloval, Cand.Med.Sci., Saint Olga Children's City Clinical Hospital, Address: 2, Zemledelcheskaya, Saint Petersburg, Russian Federation 194156; Phone: +7(812)2955000; e-mail: orlovcf@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2069-7111>

Olga V. Kondratenkov, Cand.Med.Sci., Assistant Professor, Samara State Medical University, Address: 28, Chapayevskaya, Samara, Russian Federation, 443099; Phone: +7(846)3321634; e-mail: helga1983@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7750-9468>

Поступила 30.12.2019 г.

Принята к печати 13.02.2019 г.

Received 30 December 2019

Accepted for publication 13 February 2019