

3
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Glareola nordmanni J.G.Fischer, 1842
Степная тиркушка
Черкасов А.Ю.



2020

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Коллектив авторов, 2020

УДК 579.61

А.В. Вальшев, К.Л. Чертков, Н.А. Вальшева

НОВЫЕ ВИДЫ КОРИНЕБАКТЕРИЙ И ИХ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

В обзоре представлены данные о новых видах коринебактерий, описанных после выхода второго издания Bergey's Manual of Systematic Bacteriology в 2012 г. Указаны источники выделения штаммов и нозологические формы заболеваний, которые вызываются этими видами.

Ключевые слова: *Corynebacterium*, таксономия, номенклатура, инфекция.

A.V. Valyshev, K.L. Chertkov, N.A. Valysheva

NEW SPECIES OF CORYNEBACTERIA AND THEIR CLINICAL SIGNIFICANCE

Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS), Orenburg, Russia

This review focuses on the new species of corynebacteria described after release in 2012 of the second edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sources of strains and nosological forms of diseases caused by these species are provided.

Keywords: *Corynebacterium*, taxonomy, nomenclature, infection.

На момент написания (май 2010 г.) раздела, посвященного бактериям рода *Corynebacterium*, во втором (последнем) издании Bergey's Manual of Systematic Bacteriology приведены сведения о 84 видах коринебактерий [1]. В настоящее время (декабрь 2020 г.) известны 124 вида с надлежащим образом опубликованными и правильными названиями; общее число подчинённых (дочерних) таксонов рода *Corynebacterium* составляет уже 176 (<https://www.bacterio.net/genus/corynebacterium>).

Такой прогресс в изучении микроорганизмов этой группы определяется убиквитарностью коринебактерий: последние обнаружены в организме человека и животных, выделены из объектов окружающей среды и искусственных экосистем. Не последнюю роль играет и медицинский аспект: по данным Катрин Бернар и Гвидо Функе (2012), 51 (!) из 84 видов являются клинически значимыми и могут вызывать антропонозные или зооантропонозные инфекции [1].

Наиболее важным патогеном рода *Corynebacterium* остается *C. diphtheriae* – возбудитель дифтерии. Данный вид генетически гетерогенный, его подразделяют на четыре культурально-биохимических варианта (биовара): Gravis, Mitis, Intermedius и Belfanti. Выделение первых двух биоваров, по-видимому, коррелирует с тяжестью заболевания [2]. Биовар Intermedius весьма условно дифференцируют от биовара Mitis только по размеру колоний и наличию липофильности; в современной литературе практически не упоминается. В 1954 году Владимир Безьяк обнаружил, что штаммы *C. diphtheriae* биовара Mitis, выделенные у носителей и больных дифтерией, отличаются от аналогичных штаммов из полости носа пациентов с озенной (форма атрофического ринита, сопровождающаяся зловонным насморком) по одному биохимическому свойству – восстановлению нитратов [3]. Впоследствии все штаммы, не восстанавливающие нитраты и, что важно, не продуцирующие экзотоксин (а, следовательно, не вызывающие дифтерию), были отнесены к вновь образованному варианту Belfanti и стали обозначать как *C. diphtheriae* Mitis var. Belfanti или *C. diphtheriae* var. Belfanti.

Использование биоваров для надежной классификации изолятов *C. diphtheriae* не находит поддержки у современных исследователей, практикующих методы геномики [4]. Штаммы *C. diphtheriae*, относящиеся к разным биоварам, могут иметь более тесное генетическое родство, чем внутри определенного биовара [5, 6]. Кроме того, отсутствует корреляция между принадлежностью культуры к определенному биовару и её патогенностью [7].

Хотя интерес к биовару *C. diphtheriae* Belfanti у клинических микробиологов не высок, именно генетическая гетерогенность данного биовара привела микробиологов-таксономистов к нескольким интересным находкам. В 2018 г. к новому виду *C. belfantii* отнесены культуры биовара Belfanti, выделенные во Франции у пациентов с патологией дыхательных путей (табл. 1). Средняя нуклеотидная идентичность геномов типовых штаммов *C. belfantii* FRC0043 и *C. diphtheriae* NCTC 11397 составила 94,78% [8].

В этом же году вышла работа, в которой предложено разделить вид *C. diphtheriae* на два подвида – *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* и *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*. К последнему подвиду отнесены только штаммы биовара Belfanti, в эту группу вошли представители 78 сиквенс-типов (из 541 известных на момент проведения исследования).

Таблица 1. Источники выделения *C. belfantii* и *C. rouxii* [8, 10]

Штамм	Вид	Биовар	Год выделения	Страна	Департамент / город (населенный пункт)	Источник / место выделения	Заболевание
FRC0043 ^T	<i>C. belfantii</i>	Belfanti	2009	Франция	Коррез / Брив	Фибринозная плёнка в гортани	Ларингит
06-4305	<i>C. belfantii</i>	Belfanti	2006	Франция	Рона / Лион	Мокрота	Бронхопатия
00-0744	<i>C. belfantii</i>	Belfanti	2000	Франция	Кальвадос / Кан	Мокрота	Муковисцидоз
FRC0074	<i>C. belfantii</i>	Belfanti	2011	Франция	Кот-д'Ор / Дижон	Мокрота	Муковисцидоз
FRC0223	<i>C. belfantii</i>	Belfanti	2014	Франция	Па-де-Кале / Кокель	Отделяемое пазухи	Синусит
05-3187	<i>C. belfantii</i>	Belfanti	2005	Франция	Приморская Сена / Руан	Мазок из носа	Ринит
FRC0250	<i>C. belfantii</i>	Belfanti	2014	Франция	Нижний Рейн / Страсбург	Промывная жидкость при бронхоальвеолярном лаваже	Затемнение лёгкого, пневмония
FRC0301	<i>C. belfantii</i>	Belfanti	2015	Франция	Кальвадос / Лизьё	Мокрота	Неизвестно
FRC0071	<i>C. rouxii</i>	Belfanti	2011	Франция	Верхняя Гаронна / Тулуза	Кожа	Язва голени при хроническом артериите и диабете
FRC0190 ^T	<i>C. rouxii</i>	Belfanti	2013	Франция	Ло / Каор	Кожа	Язва стопы, хронический артериит
FRC0284	<i>C. rouxii</i>	Belfanti	2015	Франция	Рона / Лион	Кожа	Ампутация конечности, васкулит
FRC0297	<i>C. rouxii</i>	Belfanti	2015	Франция	Эро / Безье	Асцитическая жидкость	Спонтанный перитонит
FRC0412*	<i>C. rouxii</i>	Belfanti	2016	Франция	Ло / Каор	Кожа	Орбитальный целлюлит (гнойная флегмона глазницы) у собаки
FRC0527	<i>C. rouxii</i>	Belfanti	2017	Франция	Савойя / Шамбери	Кожа	Язва стопы, хронический артериит

Примечание. FRC – коллекция Французского национального референтного центра по коринебактериям комплекса *C. diphtheriae*. * Штамм выделен у собаки.

Из 76 изолятов *C. diphtheriae* subsp. *lausannense* 69 выделены в Европе, 3 – в Алжире, 2 – на острове Майотта (архипелаг Коморские острова, Индийский океан), по одному – в России и Бангладеш. Из 27 штаммов с задокументированным источником выделения подавляющее большинство культур изолировано из верхних (10) и нижних (7) дыхательных путей; третьим распространенным местом их выделения являются кожа и раны (4 культуры) [9].

Шесть клинических изолятов, идентифицированные прежде как *C. diphtheriae* биовар *Belfanti*, отнесены к новому виду *C. rouxii*: пять штаммов выделены при инфекциях кожных покровов и перитоните у пациентов во Франции, одна культура – из гнойного содержимого флегмоны у собаки (табл. 1) [10]. К этому виду также относятся атипичные, не ферментирующие мальтозу штаммы, выделенные у домашних кошек с отитом [11].

Два вида коринебактерий выделены группой французских ученых под руководством профессора Дидье Рауля, предложившего новый подход для ревизии биологического разнообразия микрофлоры человека («культуромика»). Типовой штамм *C. fournieri*, Marseille-P2948 (= CSUR P2948 = DSM 103271), выделен из влагалища 30-летней пациентки с бактериальным вагинозом в Марселе (Франция) [12]. Типовой штамм *C. jeddahense* JCB (= CSUR P778 = DSM 45997) выделили в июле 2013 г. из образца фекалий 24-летнего мужчины с тяжелым ожирением (индекс массы тела 52), проживающего в Джидде (Саудовская Аравия). На момент исследования пациент не принимал никакие антибиотики; кроме того, из этого образца было выделено несколько других новых видов бактерий [13].

Типовой штамм *C. aquatimens* IMMIB L-2475 (= DSM 45632 = CCUG 61574) выделили из крови 30-летнего мужчины в Перте (Западная Австралия) с помощью автоматизированной системы гемокультивирования BD Vacutec Plus, хотя его клиническое значение неизвестно. Липофильные негемолитические коринеформные бактерии этого штамма устойчивы к большинству протестированных антибиотиков; минимальная подавляющая концентрация составила (по данным E-теста): 0,25 мкг/мл (пенициллин); 0,064 мкг/мл (ампициллин); 0,032 мкг/мл (ципрофлоксацин); 0,125 мкг/мл (доксикалин); 0,064 мкг/мл (гентамицин); 0,016 мкг/мл (имипенем); 0,125 мкг/мл (линезолид); 0,032 мкг/мл (рифампицин); 0,25 мкг/мл (ванкомицин). Однако изолят устойчив к фосфомицину (>1024 мкг/мл) и оксациллину (12 мкг/мл) [14]. В целом, профиль его антибиотикоустойчивости схож с показателями боль-

шинства липофильных видов коринебактерий [15].

В 2008 г. в Японии у пациентов с конъюнктивитом или после хирургических операций на глазе были выделены штаммы коринебактерий (идентифицированы как *C. macginleyi*) с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам. В этом исследовании у пациентов данной группы четыре штамма идентифицированы как *C. mastitidis*; однако они имеют сходство (по результатам анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК) только 98,2% с типовым штаммом *C. mastitidis* и менее 98% со всеми другими видами рода *Corynebacterium* (табл. 2) [16]. Полученные данные свидетельствуют, что эти четыре изолята могут относиться к *species novum* или *species nova*, имеющим близкое родство с *C. mastitidis* – микроорганизмом, выделенным ранее из молока овец при мастите [17] и гнойного отделяемого при воспалении препуциальных желез у мышей [18]. Схожие с указанными выше изоляты позже были обнаружены у пациентов с глазными инфекциями и являются представителями новых видов – *C. lowii* (два штамма, оба выделены в Японии) и *C. oculi* (семь штаммов из Японии, по одному из Цюриха (Швейцария) и Кортрейка (Западная Фландрия, Бельгия)) [19].

Таблица 2. Штаммы, схожие с *C. mastitidis*, выделенные у пациентов с патологией глаз в Японии [16]

Штамм	Пол, возраст пациентов (лет)	Клинический диагноз
TBS-06	М, 54	Катаракта
TBS-07	М, 55	Диабетическая ретинопатия
TBS-10	Ж, 67	Синдром сухого глаза
TBS-19	Ж, 74	Катаракта

По данным К. Бернар с соавторами [20], семь штаммов из клинического материала (табл. 3), поступившие в Национальную микробиологическую лабораторию Канады на протяжении 26-летнего периода, относятся к одному неизвестному ранее таксону, наиболее близким родственником которого является *C. imitans*.

Группой К. Бернар были проанализированы не только канадские штаммы – внимание авторского коллектива привлекли три работы, опубликованные в течение 7-месячного периода и описывающие три новых вида коринебактерий.

Таблица 3. Источники выделения штаммов, схожих с *C. imitans*, у пациентов из Канады [20]

Штамм	Провинция Канады	Источник выделения
NML 92–0415	Онтарио	Моча
NML 93–0607	Альберта	Кровь
NML 99–0020	Онтарио	Кровь
NML 00–0156	Манитоба	Кровь
NML 120412	Британская Колумбия	Кровь
NML 150383	Остров Принца Эдуарда	Биоптат
NML 180780	Онтарио	Спинномозговая жидкость

В ноябре 2017 г. был охарактеризован единичный изолят (22991/2016^T = DSM 103494^T = JCM 31931^T) из крови пациента с бактериемией неизвестного происхождения в Институте медицинской микробиологии, Гёттингенский университет (Нижняя Саксония, Германия); в честь города вид получил название *C. gottingense* [21]. В январе 2018 г. описан вид *C. godavarianum*; штамм PRD07^T выделили из воды реки Годавари рядом с городом Нашик (Махараштра, Индия) во время религиозного фестиваля Кумбха Мела в 2015 г. [22] (Кумбха Мела – «праздник кувшина» – паломничество миллионов индусов к святыням индуизма с массовым омовением в водах рек). В мае 2018 г. описан вид *C. hadale*; штамм NBT06-6^T выделен из образца морской воды, взятого 31 января 2017 г. с глубины 8900 м (гадопелагическая зона) в Новобританском глубоководном жёлобе (6,36° ю. ш., 153,83° в. д.) рядом с архипелагом Бисмарка (Папуа-Новая Гвинея) [23]. Полногеномное секвенирование типовых штаммов, анализ сходства последовательностей генов 16S рНК и *rpoB* показали, что эти 10 геномов формируют один вид – *C. gottingense* Atasayar et al. 2017, а названия *C. godavarianum* Jani et al. 2018 и *C. hadale* Wei et al. 2018 являются более поздними гетеротипическими синонимами [20].

В 2008 г. Гвидо Функе и Рейнхард Фродль обнаружили новый геновид коринебактерий (неопубликованные данные; цит. по [24]): все девять штаммов предполагаемого нового вида были изолированы из крови человека и окружающей среды в лаборатории клинической микробиологии в Германии и получили предварительное название “*Corynebacterium sanguinis*”. Эти штаммы оказались генетически схожими с культурами коринебактерий, вы-

деленными на протяжении 20 лет (1999-2018 гг.) в различных регионах Швеции из разных источников; из 17 штаммов, депонированных в Коллекции культур Университета Гётеборга (CCUG, www.ccug.se), восемь получены из клинического материала (кровь – 4, венозный катетер – 1, донорский орган – 1, кость – 1, рана – 1), оставшиеся девять штаммов – из окружающей среды и промышленных образцов [24]. Хотя видовой эпитет *C. sanguinis* используется в микробиологической литературе с 1999 г. [25], «узаконен» он был только в 2020 г. [24].

Приведенные выше данные свидетельствуют, что «коринебактериом» человека исследован не достаточно полно; сведения о роли бактерий рода *Corynebacterium* в поддержании гомеостаза организма хозяина и развитии патологических процессов фрагментарны. Практически не изучен патогенный потенциал новых таксонов (особенно, описанных на основе единичных изолятов). Эти обстоятельства служат побудительным мотивом для дальнейших исследований бактерий этого рода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bernard K.A., Funke G. Genus I. *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, 350AL emend. Bernard, Wiebe, Burdz, Reimer, Ng, Singh, Schindle and Pacheco 2010, 877. In: Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K.I., Parte A. (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed., vol. 5, the Actinobacteria. Springer, New York, 2012. pp. 245-289.
2. Anderson J.S., Cooper K.E., Happold F.C., McLeod J.W. Incidence and correlation with clinical severity of gravis, mitis, and intermediate types of diphtheria bacillus in a series of 500 cases at Leeds. J. Pathol. Bacteriol. 1933. 36(1): 169-182. doi: 10.1002/path.1700360116.
3. Bezjak V. Differentiation of *Corynebacterium diphtheriae* of the Mitis type found in diphtheria and ozaena. I. Biochemical properties. Antonie Van Leeuwenhoek. 1954. 20(1): 269-272. doi: 10.1007/BF02543729.
4. Sangal V., Hoskisson P.A. Evolution, epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: New perspectives on an old foe. Infect. Genet. Evol. 2016. 43: 364-370. doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.024.
5. Trost E., Blom J., Soares Sde C. et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. J. Bacteriol. 2012. 194(12): 3199-3215. doi: 10.1128/JB.00183-12.
6. Sangal V., Burkovski A., Hunt A.C. et al. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing. Infect. Genet. Evol. 2014. 21: 54-57. doi: 10.1016/j.meegid.2013.10.019.
7. Bolt F., Cassidy P., Tondella M.L. et al. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Clin. Microbiol. 2010. 48(11): 4177-4185. doi: 10.1128/JCM.00274-10.
8. Dazas M., Badell E., Carmi-Leroy A. et al. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Mi-

- crobiol. 2018. 68(12): 3826-3831. doi: 10.1099/ijsem.0.003069.
9. Tagini F., Pillonel T., Croxatto A. et al. Distinct genomic features characterize two clades of *Corynebacterium diphtheriae*: Proposal of *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *diphtheriae* subsp. nov. and *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *lausannense* subsp. nov. *Front. Microbiol.* 2018. 9: 1743. doi: 10.3389/fmicb.2018.01743.
 10. Badell E., Hennart M., Rodrigues C. et al. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the *diphtheriae* species complex. *Res. Microbiol.* 2020. 171(3-4): 122-127. doi: 10.1016/j.resmic.2020.02.003.
 11. Hall A.J., Cassidy P.K., Bernard K.A. et al. Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. *Emerg. Infect. Dis.* 2010. 16(4): 688-691. doi: 10.3201/eid1604.091107.
 12. Diop K., Nguyen T.T., Delerce J. et al. *Corynebacterium fournierii* sp. nov., isolated from the female genital tract of a patient with bacterial vaginosis. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2018. 111(7): 1165-1174. doi: 10.1007/s10482-018-1022-z.
 13. Edouard S., Bibi F., Dhamodharan R. et al. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Corynebacterium jeddahense* sp. nov. *Stand. Genomic Sci.* 2014. 9(3): 987-1002. doi: 10.4056/sigs.5561028.
 14. Aravena-Román M., Spröer C., Siering C. et al. *Corynebacterium aquatimens* sp. nov., a lipophilic *Corynebacterium* isolated from blood cultures of a patient with bacteremia. *Syst. Appl. Microbiol.* 2012. 35(6): 380-384. doi: 10.1016/j.syapm.2012.06.008.
 15. Soriano F., Zapardiel J., Nieto E. Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995. 39(1): 208-214. doi: 10.1128/aac.39.1.208.
 16. Eguchi H., Kuwahara T., Miyamoto T. et al. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* 2008. 46(2): 527-532. doi: 10.1128/JCM.01741-07.
 17. Fernandez-Garayzabal J.F., Collins M.D., Hutson R.A. et al. *Corynebacterium mastitidis* sp. nov., isolated from milk of sheep with subclinical mastitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997. 47(4): 1082-1085. doi: 10.1099/00207713-47-4-1082.
 18. Radaelli E., Manarolla G., Pisoni G. et al. Suppurative adenitis of preputial glands associated with *Corynebacterium mastitidis* infection in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2010. 49(1): 69-74.
 19. Bernard K.A., Pacheco A.L., Loomer C. et al. *Corynebacterium lowii* sp. nov. and *Corynebacterium oculi* sp. nov., derived from human clinical disease and an emended description of *Corynebacterium mastitidis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. 66(8): 2803-2812. doi: 10.1099/ijsem.0.001059.
 20. Bernard K.A., Pacheco A.L., Burdz T. et al. *Corynebacterium godavarianum* Jani et al. 2018 and *Corynebacterium hadale* Wei et al. 2018 are both later heterotypic synonyms of *Corynebacterium gottingense* Atasayar et al. 2017, proposal of an emended description of *Corynebacterium gottingense* Atasayar et al. 2017. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. 70(5): 3534-3540. doi: 10.1099/ijsem.0.004153.
 21. Atasayar E., Zimmermann O., Spröer C. et al. *Corynebacterium gottingense* sp. nov., isolated from a clinical patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. 67(11): 4494-4499. doi: 10.1099/ijsem.0.002322.
 22. Jani K., Khare K., Senik S. et al. *Corynebacterium godavarianum* sp. nov., isolated from the Godavari river, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. 68(1): 241-247. doi: 10.1099/ijsem.0.002491.
 23. Wei Y., Fang J., Xu Y. et al. *Corynebacterium hadale* sp. nov. isolated from hadopelagic water of the New Britain Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. 68(5): 1474-1478. doi: 10.1099/ijsem.0.002695.
 24. Jaén-Luchoro D., Gonzales-Siles L., Karlsson R. et al. *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and environmental associated corynebacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 2020. 43(1): 126039. doi: 10.1016/j.syapm.2019.126039.

25. Bruckner D.A., Colonna P., Bearson B.L. Nomenclature for aerobic and facultative bacteria. Clin. Infect. Dis. 1999. 29(4): 713-723. doi: 10.1086/520421.

Поступила 25.09.2020

Повторно – 25.12.2020

(Контактная информация: Валышев Александр Владимирович – кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории микробной экологии и дисбиозов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. (3532) 775417; e-mail: valyshev@esoo.ru)

Образец ссылки на статью:

Валышев А.В., Чертков К.Л., Валышева Н.А. Новые виды коринебактерий и их клиническое значение. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2020. 3: 9с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2020-3/Articles/VAV-2020-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2020-13001