

ЗАОЧНАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Харсеева Г. Г.¹, Тюкавкина С. Ю.¹, Миронов А. Ю.²

ДИФТЕРИЯ: ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА (ЛЕКЦИЯ)

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия;

²ФБун «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

*Проблема дифтерийной инфекции остается актуальной, поскольку циркуляция токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* сохраняется в организме бактерионосителей, несмотря на проводимую вакцинопрофилактику. В лекции изложены современные представления о свойствах возбудителя, факторах его патогенности (токсин, пили, поверхностные белки (67-72p (или DIP0733), DIP1281 и др.) и их роли в патогенезе заболевания. Представлена информация о клинико-эпидемиологической характеристике и современных методах лабораторной диагностики дифтерии. Описан алгоритм бактериологического исследования и методы определения токсигенных свойств возбудителя. Основы вакцинопрофилактики дифтерии как единственно эффективного средства предотвращения массовых вспышек этого заболевания рассмотрены в рамках предлагаемой лекции. Знание особенностей циркуляции штаммов *C. diphtheriae* в современных условиях, патогенетических и клинико-эпидемиологических особенностей дифтерии, современных методов лабораторной диагностики является важным и необходимым для врачей всех специальностей.*

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; дифтерийный токсин; факторы адгезии и инвазии; лабораторная диагностика.

Для цитирования: Харсеева Г. Г., Тюкавкина С. Ю., Миронов А. Ю. Дифтерия: характеристика возбудителя и лабораторная диагностика (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 699-706.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706>

Kharseeva G.G.¹, Tyukavkina S.Yu.¹, Mironov A.Yu.²

DIPHTHERIA: CHARACTERISTICS OF THE PATHOGEN AND LABORATORY DIAGNOSTICS (A LECTURE)

¹SBEI HPE «Rostov state medical university» Ministry of Health Protection of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russia;

²Federal State Institution of Science «Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology», of Federal Service of Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Department for microbiology, 125212, Moscow, Russia

*The problem of diphtheria infection remains relevant, since the circulation of toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* persists in the body of bacterial carriers, despite ongoing vaccination. The lecture presents modern ideas about the properties of the pathogen, its pathogenicity factors (toxin, pili, surface proteins (67-72P (or DIP0733), DIP1281, etc.) and their role in the pathogenesis of the disease. Information about the clinical and epidemiological characteristics and modern methods of laboratory diagnostics of diphtheria is presented. The algorithm of bacteriological research and methods for determining the toxigenic properties of the pathogen are described. The basics of diphtheria vaccination as the only effective means of preventing mass outbreaks of this disease are considered in the framework of the proposed lecture. Knowledge of the peculiarities of the circulation of strains of *Corynebacterium diphtheria* in modern conditions, pathogenetic and clinical-epidemiological features of diphtheria, as well as modern methods of laboratory diagnostics is important and necessary for students of medical schools and infectious diseases doctors, pediatricians, bacteriologists, therapists, pulmonologists, epidemiologists, etc.*

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; diphtheria toxin; adhesion and invasion factors; laboratory diagnostics.

For citation: Kharseeva G. G., Tyukavkina S. Yu., Mironov A. Yu. Diphtheria: characteristics of the pathogen and laboratory diagnostics (lecture). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (11): 699-706 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706>

For correspondence: *Kharseeva G.G.*, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;

Tyukavkina S.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-9291-2012>;

Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interest.*

Received 18.06.2020
Accepted 18.07.2020

Вакцинопрофилактика дифтерии препаратами дифтерийного анатоксина позволила за последнее столетие значительно снизить заболеваемость этой инфекцией в мире, однако не способствовала искоренению бактерионосительства и циркуляции возбудителя среди населения. В России в настоящее время случаи заболевания дифтерией почти не регистрируются. Подъём заболеваемости наблюдается в Индии, Индонезии, Нигерии, Йемене, странах Латинской Америки и, особенно, в Венесуэле. Резервуар инфекции сохраняется в странах Европейского Союза (Германия, Великобритания, Латвия и др.). Следует принимать во внимание тот факт, что антитоксический иммунитет, формирующийся в ответ на введение препаратов дифтерийного анатоксина, не препятствует адгезии и колонизации возбудителя на слизистой оболочке респираторного тракта прививаемых. У лиц с защитным уровнем антитоксина могут развиваться как бессимптомные формы заболевания (бактерионосительство), так и клинически выраженные. В сложившейся ситуации необходимым является совершенствование лабораторной диагностики дифтерии, постоянное проведение профилактических мероприятий, направленных на предотвращение и сдерживание распространения этой инфекции, а также дальнейших исследований по данной проблеме.

Этиология. Дифтерия – острое инфекционное заболевание, вызываемое токсигенными штаммами *Corynebacterium diphtheriae*, передающееся преимущественно воздушно-капельным путём, характеризующееся фибринозным воспалением в области «входных ворот», явлениями общей интоксикации и поражением сердечно-сосудистой, нервной и выделительной систем.

Род *Corynebacterium* (класс *Actinobacteria*, порядок *Actinomycetales*, семейство *Corynebacteriaceae*) включает более 120 видов коринебактерий, более 70 из которых имеют медицинское значение. *C. diphtheriae* впервые описана Klebs в 1883 г., чистая культура выделена Loeffler в 1884 г. Дифтерию вызывают токсигенные штаммы *C. diphtheriae*. Способностью продуцировать токсин, помимо *C. diphtheriae*, обладают *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, являющиеся патогенными для человека и животных (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, домашние животные). Случаи дифтерии, вызванные *C. ulcerans*, регистрируются в Великобритании и других европейских странах, в том числе, у лиц, привитых противодифтерийными препаратами. *C. pseudotuberculosis*, основным источником которого являются животные, вызывает у человека лимфаденит и считается одним из видов коринебактерий, которые могут вызвать дифтериеподобную инфекцию при лизогенизации бактериофагом, несущим *tox⁺*-ген *C. diphtheriae*.

Другие представители рода *Corynebacterium* (*Corynebacterium spp.* или недифтерийные коринебактерии), входят в состав нормальной микрофлоры организма человека и вызывают оппортунистические инфекции у иммунокомпрометированных лиц. Нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*, как и *Corynebacterium spp.*, считаются потенциальными патогенами, поскольку способны вызывать тяжёлые заболевания (инфекции респираторного тракта, кожи, эндокардит, полиневрит, остеомиелит, септический артрит и др.) и не контролируются средствами вакцинопрофилактики. Предрасполагающими факторами к развитию инфекционных поражений, вызванных этими микроорганизмами, являются алкоголизм, сахарный диабет, кариес зубов, цирроз печени, посещение стран с тропическим климатом.

C. diphtheriae неоднородна по результатам фенотипирования. На основе фенотипического биохимического исследования выделены биовары «*gravis*», «*mitis*» и промежуточный вариант – «*intermedius*». В 50-е годы описан вариант биовара «*mitis*» – *C. diphtheriae mitis var. belfanti*. Имеются указания на отсутствие филогенетической основы данной классификации, поскольку нет прямого соответствия между биоваром и аллелем *dtxR*, что связано, предположительно, с распространённостью горизонтального переноса генов. Предлагается подразделить вид *C. diphtheriae* на два подвида: *C. diphtheriae subsp. diphtheriae* и *C. diphtheriae subsp. lausannense*. Штаммы *C. diphtheriae* могут быть токсигенными, т. е. способными продуцировать дифтерийный экзотоксин, или нетоксигенными. Возбудителем дифтерии являются только токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, в геном которых интегрирован профаг, несущий *tox⁺*-ген.

Эпидемиология. Дифтерия – антропоноз. Источником инфекции являются больные и бактерионосители токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Механизм передачи – аэрогенный. Регистрируют воздушно-капельный, контактно-бытовой и алиментарный пути передачи. Возбудитель устойчив во внешней среде: сохраняется при комнатной температуре до 7 мес, в пыли – до 5 нед, в воде и молоке – до 20 сут. Характерна сезонность: подъём заболеваемости наблюдают в сентябре-ноябре, спад – в апреле-августе. Восприимчивость населения к дифтерии зависит от уровня напряжённости противодифтерийного антитоксического иммунитета (содержание антитоксина в крови менее 0,01 МЕ/мл указывает на то, что индивидуум подвержен дифтерии, 0,01-0,09 МЕ/мл – минимальный защитный уровень (базовый иммунитет), 0,1 МЕ/мл и более – защитный). В допрививочный период эпидемический процесс характеризовался выраженной цикличностью. В пределах одной и той же территории периодически повышался уровень заболеваемости за счёт накопления восприимчивых к дифтерии лиц (прежде всего, маленьких детей) в силу ослабляющего уровня напряжённости коллективного иммунитета. В результате проведения плановой вакцинопрофилактики достигнуто значительное снижение заболеваемости дифтерией. Даже лица, привитые высокоиммуногенным препаратом – дифтерийным анатоксином, имеющие защитные уровни противодифтерийных антител, подвержены заболеванию. Известны случаи повторного заболевания дифтерией.

Гетерогенность генетической структуры *C. diphtheriae* определяет высокий уровень внутривидового биологического разнообразия. В России зарегистрирован 31 риботип циркулирующих штаммов *C. diphtheriae*. В 40-70-е годы XX века в популяции циркулировали штаммы биовара *gravis* риботипа *Lyon* (84,6%), в 80-е годы – *C. diphtheriae* биовара *mitis* риботипа *Otchakov* (29,4%) и биовара *gravis* риботипов *Sankt-Peterburg/Rossiya* (23,5%). В 90-е годы во время эпидемического подъёма в России доминировали штаммы биовара *gravis* риботипов *Sankt-Peterburg/Rossiya* (75-96,1%). В период наступления эпидемического благополучия (2003-2008 гг.) наблюдали снижение удельного веса риботипов *Sankt-Peterburg/Rossiya* до 72,1% и увеличение удельного веса риботипа *Otchakov* до 17%.

Для каждого эпидемического цикла характерно распространение определённых эпидемических клонов, процесс формирования которых начинается до повышения заболеваемости дифтерией и выражается в увеличе-

нии удельного веса штаммов определённого биовара и риботипа среди циркулирующих. В период спорадической заболеваемости популяция приобретает гетерогенную структуру, в результате появляются эпидемические штаммы, способные к инфицированию большого числа людей, у которых к этим штаммам не сформирована колонизационная резистентность. Антитоксический иммунитет не препятствует колонизации. Носительство *C. diphtheriae* в коллективах охватывает 10-20% детей, в очагах дифтерии бактерионосители составляют иногда более 70% от числа обследованных.

Биологические свойства возбудителя. *C. diphtheriae* – прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные неподвижные, неспорообразующие, полиморфные палочки. Клеточная стенка бактерий рода *Corynebacterium* имеет сложное строение: содержит пептидогликан, миколовые кислоты, арабиногалактан, димиколат трегалозы (корд-фактор), липидоманнан и липоарабиноманнан (CdiLAM). Верхний наружный слой клеточной стенки включает в свой состав нефимбриальный поверхностный белок 67-72р (или DIP0733), поверхностный белок DIP1281, пили, свободные полисахариды и гликолипиды. Оболочка пронизана белками-поридами. Имеют заостренные или булавовидные концы, внутри которых расположены зёрна «воллютина», (метахроминовые гранулы полиметафосфата). Зёрна воллютина выявляют путём окраски препаратов щелочным метиленовым синим по Леффлеру. Гранулы полиметафосфата воспринимают краситель интенсивнее, чем цитоплазма клетки, обуславливая метахромию. Зёрна воллютина обнаруживают и при использовании окраски по Нейссеру, и люминесцентной микроскопии. В мазках бактерии располагаются под углом, напоминая латинские буквы L, X, V, Y или «растопыренные» пальцы рук.

C. diphtheriae и другие представители рода *Corynebacterium* – аэробы, факультативные и облигатные анаэробы, хемогетеротрофы, каталазоположительны. *C. diphtheriae* требовательны к условиям культивирования, хорошо растут при +37° С (рН 7,4-8,0) на питательных средах, обогащённых аминокислотами, пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, с добавлением лошадиной или бычьей сыворотки или гемолизированной крови. Для культивирования *C. diphtheriae* используют кровяной (5-10%) агар, сывороточный (10-15%) агар, свернутую сыворотку Леффлера или Ру, селективные среды с добавлением теллурита калия (кровяно-теллуритовый агар (КТА), среды Клауберга II и Тинсдейла-Садыковой, «Коринебакагар»). На плотных питательных средах *C. diphtheriae gravis* растёт преимущественно в R-форме, образуя через 48 час колонии диаметром 1,5-2,0 мм, с радиальной исчерченностью и неровными краями, напоминающие цветок маргаритки. Для *C. diphtheriae mitis* более характерна S-форма колоний (диаметр – 0,5-1,0 мм, с ровными краями, выпуклой гладкой поверхностью). *C. diphtheriae intermedius* образуют мелкие, слегка конусообразные, округлые колонии диаметром 0,5-1,0 мм. Культуральные свойства вида *C. diphtheriae mitis var. belfanti*, как и *C. diphtheriae intermedius*, сходны с биоваром *mitis*. При выделении *C. diphtheriae* из клинического материала для ингибирования роста сопутствующей микрофлоры используют среды, содержащие теллурид калия. Большинство штаммов *C. diphtheriae* резистентны к относительно высоким концентрациям теллурита калия, способны за счёт продукции теллуридредуктазы восста-

навливать теллурид калия до металлического теллура и накапливать его внутри клеток, что придаёт колониям серо-чёрную или чёрную окраску. На жидких питательных средах R-формы *C. diphtheriae* (биотип *gravis*) растут, образуя плёнку на поверхности или крошкообразный осадок, S-формы (биотип *mitis*) дают равномерное помутнение и мелкозернистый осадок.

Ферментативная активность невысокая. Ключевой дифференциально-диагностический признак – наличие фермента цистиназы, который выявляют на питательной среде Пизу (сывороточный агар, содержащий цистин и укусно-кислый свинец). *C. diphtheriae* не обладают уреазной активностью, окисляют глюкозу и мальтозу, не разлагают сахарозу. Способность разлагать крахмал присуща только биотипу *gravis*. Тест на редукцию нитратов положителен для всех биотипов *C. diphtheriae*, за исключением *C. diphtheriae mitis var. belfanti*. Подвид *C. diphtheriae subsp. lausannense* обладает способностью сбрасывать N-ацетилглюкозамин, в отличие *C. diphtheriae subsp. diphtheriae*.

Факторы патогенности. Основным фактором патогенности – дифтерийный токсин (ДТ), последовательность которого кодируется геном *tox*. Структурный ген *tox* переносится коринефагом при лизогенной интеграции генома β-профага в хромосому *C. diphtheriae* и других близкородственных видов, обладающих функциональным *dtxR*-геном (*Corynebacterium spp.* и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*), в результате чего они становятся токсигенными. Вирулентные штаммы могут нести в геноме две или три копии гена *tox*. Существуют разные, функционально эквивалентные сайты прикрепления (*attB*) для интеграции β-профага в хромосому *C. diphtheriae*. Каждый *attB*-сайт расположен в гене *ArgtRNA₂*, который локализуется в двух разных участках хромосом. Регуляция токсинопродукции осуществляется металлорегуляторным белком *DtxR* – продуктом хромосомного гена *dtxR* – и зависит от экспрессии гена *tox* и метаболизма Fe²⁺.

Законсервированная *dtxR*-связывающая последовательность расположена рядом с промоторами гена *tox* и генов сидерофоров. Сидерофоры солибилизируют и связывают Fe²⁺, транспортируют его в клетку бактерий через специфические мембранные рецепторы. Функциональная активность *DtxR* контролируется железом, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺. *DtxR* блокируется при низком содержании Fe²⁺ в среде, что ведёт к увеличению продукции токсина. Ответом на дефицит Fe²⁺ в среде является адгезия, колонизация, образование биоплёнок *C. diphtheriae*. *DtxR* может блокировать индуцированный Fe²⁺ эффект Фентона (генерация активных форм кислорода, токсичных для бактерий), защищая бактериальную ДНК от окислительного повреждения. Ген *dtxR* присутствует у токсигенных и нетоксигенных штаммов, и, помимо регуляции токсинопродукции, обуславливает посредством *DtxR* синтез сидерофоров, функционирование высоко аффинной транспортной системы (*ciuABCDEF*) и транскрипцию трёх локусов, вовлечённых в работу геммооксигеназы (*hmuO*).

Tox-ген *C. ulcerans* не идентичен таковому у *C. diphtheriae* вследствие большой неоднородности генетической последовательности, в отличие от высоко консервативного генома *C. diphtheriae*. Обнаружено сходство в последовательностях геномов *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* и их чёткое отличие от генома *C. diphtheriae*.

ДТ – экзотоксин, секретируемый через цитоплазматическую мембрану без лизиса клеток. Зрелый внеклеточный ДТ – полипептид массой 58 кДа, содержащий 535 аминокислотных остатков. Молекула ДТ состоит из А- и В-фрагментов (м.м. 24 и 28 кДа), соединенных двумя дисульфидными мостиками. А-фрагмент обладает ферментативной активностью. В-фрагмент обуславливает связывание молекулы ДТ с фосфолипидами мембран клеток. Основная масса ДТ фиксируется клетками, имеющими соответствующие рецепторы: клетки человека, обезьян, кроликов, морских свинок. Динамика процессов связывания ДТ с рецепторами клеток протекает в две стадии. Первая – обратимая, длительностью около 30 мин., состоит в создании непрочной связи ДТ с рецепторами клеток. При этом клетка полностью сохраняет жизнеспособность, а ДТ, фиксированный на поверхности цитоплазматической мембраны, легко нейтрализуется антитоксическими антителами. Вторая стадия – необратимая – завершается в течение последующих 30-60 мин. В этот период структура и функция клеток ещё не претерпевают каких-либо изменений, но добавление антитоксической сыворотки уже не предохраняет клетки от цитопатогенного действия ДТ и последующей их гибели. Трансмембранный транспорт ДТ в клетки происходит адсорбционным эндоцитозом. В-фрагмент взаимодействует с прогепарин-связывающим эпидермальным фактором роста, подобным фактору роста HB-EGF. В результате формируются трансмембранные каналы, по которым А-фрагмент перемещается в цитозоль. Механизм действия А-фрагмента ДТ основан на АДФ-рибозилировании фактора элонгации 2, ведущего к нарушению синтеза белка в клетке и её гибели. Антитоксические антитела, секретируемые в ответ на введение ДТ, функционально неоднородны и могут быть направлены как против А-, так и против В-фрагмента ДТ. Основным механизмом детоксикации является взаимодействие ДТ с антитоксинами, направленными против детерминант В-фрагмента, что препятствует присоединению ДТ к мембранам клеток. Антитоксические антитела нейтрализуют ДТ на поверхности клеток. В крови ДТ циркулирует в свободном состоянии или в составе циркулирующих иммунных комплексов. При тяжёлых формах дифтерии ДТ фиксируется в тканях и органах-мишенях, в кровь выходит небольшое количество ДТ. ДТ оказывает раздражающее воздействие на рецепторы слизистых оболочек и внутренних органов и цитопатогенное – на клетки миокарда, почек, надпочечников, нервной ткани, режы лёгких, печени, пищевода, желудка, кишечника, поджелудочной железы. Развитие постдифтерийных осложнений (кардиомиопатия, нейропатия) имеет аутоиммунную природу, которая обусловлена общностью антигенных детерминант В-субъединицы ДТ и экстрацеллюлярного домена рецептора HB-EGF.

C. diphtheriae обладает факторами патогенности, обеспечивающими способность к адгезии и колонизации: пили, липоарабиноманнан клеточной стенки (CdiLAM), нефимбриальный поверхностный белок 67-72p (или DIP0733), поверхностный белок DIP1281, миколовые кислоты, корд-фактор, ферменты (гиалуронидаза, нейраминидаза, амилаза, протеаза).

Пили представлены в геноме типового штамма *C. diphtheriae* NCTC13129 (эпидемический клон *Ros-sija/Sankt-Peterburg*) тремя генетическими кластерами: *spaABC*, *spaDEF*, *spaHGI*. Каждый кластер кодирует синтез фимбрий соответствующих типов, представ-

ленных основными белками SpaA, SpaD, SpaH, которые формируют ось фимбрий. Пили содержат и малые субъединицы: SpaB, SpaC, SpaE, SpaF, SpaG, SpaI. SpaB равномерно распределяется вдоль стержня пили, SpaC, SpaF, SpaG располагаются на его конце. Штаммы *C. diphtheriae* имеют различные типы пилей, между которыми существуют антигенные различия. Кластеры генов, кодирующих каждый тип фимбрий, содержат гены сортаз (англ. srt – surface protein sorting), специфически катализирующих ковалентное связывание фимбриальных протеинов между собой, а основание фимбрий – с клеточной стенкой бактерий. Это происходит с участием специфического сайта с аминокислотной последовательностью LPxTG (где «x» обозначает любую аминокислоту).

SpaA-тип пилей *C. diphtheriae* кодируется кластером генов *spaA-srtA-spaB-spaC*. Осевая часть пили SpaA-типа представлена большой SpaA-субъединицей, на боковой поверхности которой располагается малая субъединица SpaB, на кончике пили – SpaC. Подобным образом устроены SpaD- и SpaH-пилы. Большие субъединицы являются структурными компонентами пилей, малые – функциональными, играющими ключевую роль в адгезии. Каждый тип пилей вступает во взаимодействие с определёнными рецепторами на клетках хозяина: пили SpaA-типа взаимодействуют с фарингеальными эпителиальными клетками, SpaD, SpaH – эпителиоцитами гортани и бронхов. Штаммы, не имеющие пилей, могут прикрепляться к клеткам хозяина за счёт компонентов клеточной стенки (CdiLAM, белок 67-72p (или DIP0733), DIP1281).

Липоарабиноманнан клеточной стенки (CdiLAM) расположен на поверхности клеточной оболочки, способствует связыванию с эпителиальными клетками хозяина и, взаимодействуя с TLR₂, активирует дендритные клетки и Т-хелперы. CdiLAM не связывается с эритроцитами человека, но взаимодействует с клетками карциномы фарингеального эпителия Hep-2. CdiLAM рассматривается как адгезин и потенциальный фактор вирулентности *C. diphtheriae*.

Нефимбриальный поверхностный белок 67-72p (или DIP0733) распознаёт и специфически связывается с рецепторами эпителиальных клеток человека, способствует внутриклеточной инвазии *C. diphtheriae*, обуславливает цитопатическое действие и апоптоз, взаимодействует с эритроцитами человека, вызывая их агглютинацию.

Поверхностный белок DIP1281 ассоциирован с адгезией и инвазией, встречается у патогенных и непатогенных коринебактерий, в частности, *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum*, *C. jeikeium*.

При дифтерийной инфекции зарегистрированы случаи прижизненной бактериемии, выделения токсигенного возбудителя из крови и органов умерших. Нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* и *Corynebacterium spp.* способны вызывать эндокардит, остеомиелит, абсцесс селезёнки, септический артрит и др. Эти системные инфекции предполагают адгезию коринебактерий на эпителиальных клетках, инвазию в более глубокие ткани и персистенцию в них. Это является свидетельством способности коринебактерий к инвазии, которая обусловлена поверхностными структурами бактериальной клетки и, в частности, белками DIP1281 и 67-72p (или DIP0733).

Миколовые кислоты, являясь физиологическим барьером проницаемости коринебактерий, участвуют в процессах адгезии, активируют врождённый иммуните-

тет, способствуя экспрессии TLR, ингибируют функцию макрофагов.

Корд-фактор обладает способностью нарушать процессы дыхания и фосфорилирования клеток хозяина, обуславливая устойчивость к фагоцитозу.

Гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту соединительной ткани, что ведёт к повышению проницаемости кровеносных сосудов, выходу плазмы за их пределы, отёку тканей.

Нейраминидаза модифицирует клеточную поверхность, приводя к разжижению поверхностной слизи эпителия, и подготавливает рецепторы эпителиоцитов к прикреплению ДТ.

Амилаза, кодируемая *amy*-геном, утилизирует углеводы и создает дополнительный источник энергии для ускорения колонизации *C. diphtheriae* на слизистых оболочках человека и роста на питательных средах. Амилазная активность характерна только для *C. diphtheriae* биотипа *gravis*.

Протеаза инактивирует sIgA, в частности, его изотип sIgA₁.

Патогенез. Начальный этап инфекционного процесса – адгезия – обусловлен электростатической силой клеток, гидрофобностью клеточной оболочки *C. diphtheriae*, высокоспецифичным лиганд-рецепторным взаимодействием с клетками хозяина. Адгезия *C. diphtheriae* осуществляется посредством минорных пилинов SpaA-типа за счёт тесного взаимодействия концов пилей с рецепторами эпителиоцитов хозяина, затем – боковых субъединиц от верхушки до основания пилей по типу замка «молнии». Затем во взаимодействие вступают малые субъединицы, расположенные на клеточной стенке коринебактерий. Такая плотная адгезия позволяет предотвратить диссоциацию бактерий, усиливая их взаимодействие с клетками хозяина и колонизацию.

Процесс адгезии *C. diphtheriae* облегчается действием фермента нейраминидазы (сиалидазы), разрушающей сиаловые кислоты на поверхности клетки хозяина. Это позволяет освободить поверхность клеток от слизи и интенсифицировать межклеточное взаимодействие. Колонизация слизистой оболочки *C. diphtheriae* осуществляется с участием фермента каталазы, разлагающей перекиси, продуцируемые представителями нормальной микрофлоры, что создает селективные преимущества *C. diphtheriae* перед индигенной микрофлорой хозяина в месте внедрения. Корд-фактор, ДТ, протеаза, каталаза подавляют местный иммунитет, разрушая sIgA (в том числе изотип sIgA₁) и угнетая фагоцитоз. Разжижение слизи на эпителии верхних дыхательных путей, нарушение функции реснитчатого эпителия происходит под воздействием ДТ, нейраминидазы, гиалуронидазы.

ДТ, связываясь с комплементарным рецептором, проникает внутрь клетки хозяина и парализует её жизнедеятельность посредством ингибирования синтеза белка. Клетка некротизируется, формируя безопасное убежище для адгезированной *C. diphtheriae*, где она может размножаться, колонизируя другие клетки хозяина. Токсигенные и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*, попадая в фагоцитирующие клетки, индуцируют их апоптоз и некроз, что может быть обусловлено действием ДТ, поверхностных структур коринебактерий, ферментов агрессии. Колонизация сопровождается формированием биоплёнки, что наиболее интенсивно происходит в условиях развития инфекции при дефиците железа.

Дальнейшее развитие инфекционного процесса может быть различным. Развитие классической клинической картины дифтерии чаще наблюдается у лиц с отсутствием антитоксического иммунитета. В месте внедрения *C. diphtheriae* наблюдают массивное размножение, сопровождающееся увеличением продукции ДТ и развитием некроза слизистой оболочки. Токсинемия является главным фактором, формирующим клиническую картину заболевания и определяющим его характер и исход. Помимо поражения слизистой оболочки верхних дыхательных путей и токсинемии формируются и системные осложнения – миокардит, нефрозо-нефрит, пневмония, поражения нервной ткани, кишечника и др. Это указывает на то, что *C. diphtheriae* способна колонизировать эпителий, а ДТ – проникать в более глубокие ткани, взаимодействуя с различными типами клеток организма.

Формирование бактерионосительства токсигенных штаммов *C. diphtheriae* происходит, как правило, у лиц на фоне высокого уровня антитоксических антител и неполноценного антибактериального иммунитета. Бактерионосительство развивается за счёт факторов адгезии, инвазии, колонизации, имеющих у токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, а также способности к биоплёнкообразованию. ДТ, продуцируемый *C. diphtheriae*, поступает в лимфатическую систему и кровотока. При наличии антитоксинов у инфицированных лиц, как правило, не возникает ни местных, ни общих проявлений действия токсина и инфекционный процесс ограничивается бессимптомной колонизацией, т. е. носительством.

Клиника. Типичная форма дифтерии сопровождается явлениями выраженной интоксикации и фибринозным воспалением слизистой оболочки и/или кожи в области входных ворот, при генерализации – выходом процесса за пределы первичного очага, триадой специфических острых поражений органов-мишеней: сердца (дифтерийные мио- и перикардиты), нервной системы (дифтерийная полинейропатия), почек (дифтерийная нефропатия). Характерно образование плёнок – фибринозных наложений беловато-серого цвета с чёткой границей краёв наложений, возвышающихся над эпителием первичного очага, при локализации в дыхательных путях – с возможной их обструкцией.

В соответствии с МКБ 10 (с дополнениями 2019 г.) под кодом «А 36.» выделяют: дифтерию глотки (дифтерийная мембранозная ангина, тонзиллярная дифтерия) – часто встречаемая форма дифтерии (90-95% случаев), гортани (по частоте регистрации занимает второе место), носоглотки, кожи, другие формы дифтерии (конъюнктивы, носа, половых органов, комбинированная, дифтерийный миокардит, полиневрит) и неуточнённую дифтерию.

В 2016 г. предложена новая Российская классификация дифтерии. По клиническому варианту (локализация дифтерийных плёнок) выделяют дифтерию миндалин/ротоглотки – при распространении с миндалин на язычок, мягкое и твёрдое нёбо и слизистую оболочку полости носа/носоглотки; гортани/гортаноглотки; трахеи и бронхов; полости рта; дифтерию глаза, ушей, кожи; дифтерию половых органов и комбинации разных локализаций. Выделяют локализованную форму дифтерии и генерализованную (распространение возбудителя за пределы первичного очага, наличие специфического дифтерийного отёка подкожной клетчатки и окружающих тканей в области первичного очага инфицирования,

возможен волнообразный характер поражения органов-мишеней за счёт выхода депонированного ДТ из лимфоузлов). При формулировке диагноза указывается форма заболевания (по тяжести течения) и острое дифтерийное поражение внутренних органов (при наличии): сердца, нервной системы, почек и других органов.

Частыми осложнениями дифтерии, сопровождающейся острыми поражениями внутренних органов, является развитие инфекционно-токсического шока, отёка головного мозга, острой дыхательной, сердечной, почечной недостаточности, ДВС-синдрома, реже – пневмонии, поражения кишечника, печени. Они являются ранними предикторами неблагоприятного тяжёлого течения инфекции. Частота возникновения, характер, тяжесть течения осложнений коррелируют с выраженностью клинических проявлений и сроками начала введения противодифтерийной сыворотки.

Первичное бактерионосительство *C. diphtheriae* является бессимптомной формой инфекционного процесса. Оно может быть транзиторным (однократное обнаружение возбудителя), кратковременным (выделение в течение 2-х нед), средней продолжительности (до 1 мес), затяжным (1-6 мес), хроническим (более 6 мес). Продолжительное носительство часто выявляется у детей с патологией ЛОР-органов (хронический тонзиллит, аденоидит, синусит), у часто болеющих детей, при дисбиозе слизистой оболочки ротоглотки и носа.

Лечение. Лечение больных дифтерией проводится в специализированном инфекционном боксированном стационаре. Используются этиотропные, патогенетические, симптоматические средства. Основополагающим в терапии всех клинических форм является применение антитоксической противодифтерийной сыворотки (ПДС), которая должна вводиться немедленно после постановки диагноза. Использование ПДС в поздние сроки заболевания не гарантирует защиту от осложнений, при гипертоксической форме – не предупреждает летального исхода. При локализованных формах дифтерии ротоглотки введение ПДС в поздние сроки (после 4-го дня) заболевания нецелесообразно, так как существенно не влияет на клиническую симптоматику. Исключение составляют больные, у которых к моменту госпитализации сохраняются налёты на миндалинах. При тяжёлых токсических формах дифтерии ПДС вводится независимо от сроков госпитализации. Первичная и курсовая дозы ПДС определяются клинической формой дифтерии.

Антибактериальная терапия при локализованных формах дифтерии проводится с использованием макролидов (азитромицин, кларитромицин, рокситромицин и др.) и защищённых аминопенициллинов (доксциклин, юнидокс, рифампицин). При токсических формах дифтерии препаратами выбора являются цефалоспорины 3-го поколения (цефотаксим, цефтриаксон, цефиксим и др.), аминопенициллины (амоксциллин и его защищённые формы), рифампицин.

В комплекс лечения входит детоксикационная терапия, которая проводится энтерально и путём внутривенного введения глюкозо-солевых растворов. В лечении токсических форм дифтерии ротоглотки перспективно применение экстракорпоральных методов детоксикации (гемосорбция, плазмаферез) с использованием специфических иммуносорбентов. Применение кортикостероидов, антиоксидантов, кардиотропных средств патогенетически обосновано при тяжёлых формах дифтерии, развитии тяжёлых осложнений.

Санация носителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae* проводится с помощью макролидов, рифампицина, тетрациклинов (доксциклин, юнидокс). При длительном бактериовыделении рекомендуется 2-3 курса антибактериальной терапии. Используют гипосенсибилизирующие препараты (цетиризин, лоратадин и др.), поливитамины (группы В, С, А, Е, микроэлементы), адаптогены (элеутерококк, лимонник), средства, повышающие резистентность слизистой оболочки ротоглотки (лизобакт, ИРС-19, рибомунил, тонзилотрен).

Лабораторная диагностика. Лабораторная диагностика включает бактериологический, биологический, иммунохимический (РПГА, ИФА), молекулярно-биологический (ПЦР, риботипирование, энзимотипирование, секвенирование ДНК) методы. При постановке диагноза «дифтерия» помимо данных лабораторного исследования необходимо учитывать клиническую картину заболевания и данные эпидемиологического анамнеза.

Бактериологический метод является основным. Другие методы исследования имеют вспомогательное значение. Бактериологическое исследование направлено на выделение и идентификацию *C. diphtheriae* по токсигенным и биохимическим свойствам в короткие сроки (3-4 дня) с помощью минимального количества диагностических тестов.

Обследование проводят с диагностической или профилактической целью, по эпидемическим показаниям. Диагностическому обследованию на дифтерию подлежат все больные с ангинами, хроническим тонзиллитом, паратонзиллярным и заглоточными абсцессами. Обследование с профилактической целью проводят при поступлении в лечебно-профилактические учреждения, санатории, закрытые специализированные учреждения, при переводе из одного закрытого специализированного учреждения в другое. По эпидемическим показаниям обследуют всех контактных лиц в очагах дифтерии. Особое внимание следует обращать на выявление скрытых бактерионосителей, которые на фоне высокого уровня антитоксического иммунитета не имеют клинических проявлений дифтерии, но являются источником инфекции для окружающих.

Материал для исследования (слизь, отделяемое и плёнки из зева и носа) отбирают с помощью двух отдельных сухих тампонов с последующим посевом на одну чашку с плотной питательной средой (при необходимости в транспортную среду). При наличии налёта материал берут с границы поражённой и здоровой ткани. При подозрении на экстрабукальные формы дифтерии проводят забор из очагов поражения (глаз, ухо, кожа, влагалище и др.) одним сухим тампоном, также следует брать материал из носа и зева двумя сухими тампонами. От больных материал должен быть взят в течение 3-4 ч (не позднее 12 ч) с момента поступления в стационар до назначения антибактериальной терапии.

Для выделения *C. diphtheriae* проводят прямой посев материала, взятого сухим ватным тампоном или тампоном после культивирования в транспортной среде, на одну из электро-селективных сред для *C. diphtheriae*. Предпочтение отдается кровяным теллуриновым средам. Через 24 ч инкубации на кровяных теллуриновых средах формируются колонии, окрашенные в чёрный или тёмно-серый цвет. Замедленное формирование подозрительных колоний (через 48 ч) в основном выявляется при исследовании материала, взятого у бактерионосителей. Признаки, характерные для ко-

лоний биоваров *gravis*, *mitis*, *intermedius*, проявляются через 48 часов. Эти колонии исследуют на токсигенные свойства. Необходимо изучать токсигенные свойства нескольких колоний, так как из исследуемого материала могут быть выделены одновременно токсигенные и нетоксигенные клоны *C. diphtheriae*. Для определения токсигенности используют традиционный или модифицированный тест Элека, основанный на методе встречной иммунодиффузии токсина и антитоксина в специальных питательных средах (среда для определения токсина дифтерийного микроба, коринетоксагар). При постановке теста Элека делают посев по ½ каждой из двух изолированных колоний на среду для определения токсигенности и необожжённой петлей – уколом в столбик среды Пизу; другую половину колонии отсевают в пробирку со скошенным 10% сывороточным агаром, из оставшихся нескольких (5-7) колоний формируют бляшки. В случае множественного роста подозрительных колоний проводят определение уреазной активности в пробе Заксе. При обнаружении только одной колонии её засевают на среду для определения токсигенности и, не обжигая петлю, в среду Пизу для определения цистиназной активности. После учёта результатов для дальнейшей идентификации используют культуру со среды Пизу или из бляшки. У выросшей на сывороточном агаре культуры изучают морфологию (окраска по Леффлеру), определяют биохимические свойства (глюкоза, сахароза, мальтоза, крахмал, декстрин), уреазную активность. При необходимости идентифицировать *C. ulcerans* используют тесты на уреазу и восстановление нитратов в нитриты.

Критерием оценки специфичности преципитатов в тесте Элека служит время появления и расположение

линий преципитации испытуемого штамма по отношению к линиям преципитации контрольного токсигенного штамма. Специфические линии преципитации появляются через 24-48 ч, сливаются или направлены на слияние с линиями контрольного штамма. У штаммов *C. diphtheriae* с низким уровнем продукции токсина специфические линии преципитации могут формироваться позже.

Выявление цистиназной активности, способности окислять глюкозу и мальтозу, отношение к крахмалу, декстрину и отсутствие уреазы, наряду с характерными морфо-культуральными признаками (полиморфизм, метакрохроматичное окрашивание, формирование колоний чёрного или серого цвета на кровяных теллуритовых средах) позволяют отнести клинический изолят к одному из биоваров *C. diphtheriae*. Выделенный в результате бактериологического исследования штамм *C. diphtheriae* является возбудителем дифтерии, если он обладает токсигенными свойствами.

Основной метод определения ДТ – иммунодиффузия в агаре по Элеку – высокоспецифичен, но позволяет выявлять ДТ только у 84% и 80,4% штаммов, выделенных от больных и носителей соответственно. Для выявления слабо токсигенных штаммов *C. diphtheriae* возможно использование РНГА и ИФА (см. таблицу).

Эти методы не являются обязательными, но по сравнению с тестом Элека обладают преимуществами по чувствительности и времени проведения анализа. С помощью ИФА возможно выявлять ДТ в бульоне при культивировании патологического материала без этапа выделения чистой культуры. Результаты РНГА и ИФА позволяют дать только предварительный ответ о наличии ДТ.

Таблица 1

Методы определения токсина и *tox*-гена *C. diphtheriae*

	Метод	Цель	Чувствительность	Длительность	Штаммы
Иммунохимический	метод Элека	детекция ДТ	0,5-1,0 мкг/мл	24-48 ч	токсигенные
	РНГА	детекция и определение уровня продукции ДТ	0,003 И/мл	несколько часов	токсигенные и слабotoксигенные
	ИФА	детекция и количественное определение продукции ДТ	0,8-1,5 нг/мл	несколько часов	токсигенные и слабotoксигенные
	РКоА	детекция ДТ	чувствительный	несколько минут	токсигенные
	РЛА	детекция и определение уровня продукции ДТ	0,001 И/мл	несколько часов	токсигенные и слабotoксигенные
Биологический	внутрикожная проба на морских свинках и кроликах	определение ДТ по минимальной некротической дозе DNM	~ 100000 м.к.	48-72 ч	токсигенные
	внутрибрюшинная проба на морских свинках	определение ДТ по минимальной летальной дозе DLM	20-60 нг	48 ч	токсигенные
	подкожная проба на морских свинках	детекция ДТ по летальному исходу	высокочувствительный	до 5 дней	токсигенные
	цитотоксичный тест на культуре клеток Vero	детекция ДТ	0,001 мкг	5-6 дней	токсигенные и слабotoксигенные
	ПЦР	детекция <i>tox</i> -гена и <i>dtxR</i> -гена	≥10 ⁴ м.к.	несколько часов	- токсигенные - нетоксигенные - несущие <i>tox</i> -ген
Молекулярно-биологический	секвенирование ДНК	детекция мутации <i>tox</i> -гена и <i>dtxR</i> -гена	Высокочувствительный при наличии мутаций	несколько часов	- токсигенные - нетоксигенные - несущие <i>tox</i> -ген

Молекулярно-генетические методы применяют для ускоренной диагностики дифтерийной инфекции (ПЦР) и эпидемиологического мониторинга (ПЦР, риботипирование, энзимотипирование, секвенирование ДНК). ПЦР используют для детекции генов *tox* и *dtxR*, кодирующих синтез ДТ. Разработаны различные варианты генодиагностики дифтерийной инфекции (ПЦР в классическом варианте, ПЦР в реальном времени, генодиагностика на основе LAMP, ПЦР в формате мультиплекса). При использовании ПЦР гены, ответственные за продукцию ДТ, обнаруживают в минимально короткие сроки (в течение одного рабочего дня), при этом можно исследовать чистую и *mixt*-культуры. Наличие в анализе микроорганизмов контаминантов не влияет на результаты исследования. Результаты ПЦР подтверждают в тесте Элека. Некоторые штаммы, отрицательные в тесте Элека, могут быть положительны в ПЦР. Это является следствием наличия *dtxR* в геноме как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*. Учитывая, что не продуцирующие токсин, но несущие *dtxR* штаммы могут явиться причиной серьёзных заболеваний у человека, необходимо расширение подходов к их идентификации с помощью ПЦР-диагностики.

Бактериологическую диагностику дифтерии и инфекций, вызываемых условно-патогенными коринибактериями, можно проводить с использованием тест-систем (ФГУП НПО «Микроген», ООО НПО «Диагностические системы», «apiCoryne» («bioMERIUX»). Перспективным методом является MALDI-ToF масс-спектрометрия, основанная на определении уникального молекулярного состава белков и пептидов микроорганизмов.

Комплексное применение различных методов и современных технологий значительно повышает эффективность лабораторной диагностики дифтерии.

Вакцинопрофилактика. Ведущая роль в создании противодифтерийного иммунитета принадлежит анти-токсину, который вырабатывается в организме в ответ на поступление дифтерийного анатоксина. Впервые дифтерийный анатоксин получил в 1922 г. Г. Рамон. В России в соответствии с Национальным календарем прививок применяют препараты отечественного производства: АКДС, АДС, АДС-М, АД-М. Разрешены к использованию на коммерческой основе зарубежные комбинированные препараты: Тетракокк, Бубо Кок, ДТ-Вакс, ДТ-Адьюльт («AventisPasteur», Франция), АаКДС «Инфанрикс» («SmitKlein», Германия). Перспективным является использование конъюгированных полимер-субъединичных вакцин, создание векторных и субъединичных вакцин. Для профилактики дифтерийного бактерионосительства, справиться с которым существующими средствами вакцинопрофилактики невозможно, перспективной является разработка новых вакцинных препаратов на основе адгезинов *C. diphtheriae*, способных стимулировать действие факторов врождённого и адаптивного иммунитета.

Вопросы для самоконтроля:

1. Роль факторов патогенности *C. diphtheriae* в патогенезе заболевания?
2. Методы лабораторной диагностики дифтерии?
3. Методы определения токсигенности *C. diphtheriae*?

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чагина И.А., Переварова Ю.С., Переваров В.В., Чаплин А.В., Борисова О.Ю., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. Полиморфизм гена *dtxR* у современных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. *Вестник РГМУ*. 2017; (1): 34-41.
2. МУК 4.2.3065-13. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г.Онищенко 14.07.2013 г.). М.; 2013.
3. Борисова О.Ю., Пименова А.С., Чаплин А.В., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Алешкин А.В., Афанасьев М.С., Караулов А.В. Ускоренный способ генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; (5): 24-32.
4. Sharma N.C., Efstratiou A., Mokrsov I., Mutreja A., Das B., Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2019; 5(1): 81.
5. Oliveira A., Oliveira L.C., Aburjalle F., Benevides L., Tiwari S., Jamal S. B., Silva A. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. *Frontiers in Microbiology*. 2017; (8): Article 1937.
6. Ott L. Adhesion properties of toxigenic *Corynebacteria*. *AIMS Microbiol.* 2018; 4(1): 85-103.

REFERENCES

1. Chagina I.A., Perevarova Yu.S., Perevarov V.V., Chaplin A.V., Borisova O.Yu., Kafarskaya L.I., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A. DtxR gene Polymorphism in modern strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Vestnik RGMU*. 2017; (1): 34-41. (in Russian)
2. MUC 4.2.3065-13. Control method. Biological and microbiological factors. Laboratory diagnostics of diphtheria infection: guidelines (approved by the Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare, Chief state sanitary doctor of the Russian Federation G. G. Onishchenko 14.07.2013). Moscow; 2013. (in Russian)
3. Borisova O.Yu., Pimenova A.S., Chaplin A.V., Kafarskaya L.I., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A., Aleshkin A.V., Afanasiev M.S., Karaulov A.V. Accelerated method of diphtheria genodiagnosis based on isothermal amplification for detecting the pathogen's DNA. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; (5): 24-32. (in Russian)
4. Sharma N.C., Efstratiou A., Mokrsov I., Mutreja A., Das B., Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2019; 5(1): 81.
5. Oliveira A., Oliveira L.C., Aburjalle F., Benevides L., Tiwari S., Jamal S. B., Silva A. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. *Frontiers in Microbiology*. 2017; (8): Article 1937.
6. Ott L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS Microbiol.* 2018; 4(1):85-103.

Поступила 18.06.20

Принята к печати 18.07.20