

## *Corynebacterium* spp.: недооцененные патогены с высоким потенциалом вирулентности

Э. О. Мангутов<sup>1</sup>, Г. Г. Харсеева\*<sup>1</sup>, В. Н. Герасимов<sup>2</sup>, А. А. Алиева<sup>1</sup>, Н. А. Воронина<sup>1</sup>,  
Э. Л. Алутина<sup>1</sup>, П. В. Слукин<sup>2</sup>, О. Е. Хохлова<sup>2</sup>, А. Р. Гайтрафимова<sup>2</sup>, Н. К. Фурсова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Роспотребнадзора, п. Оболensk, г. о. Серпухов

### Резюме

**Актуальность.** *Corynebacterium* spp., являясь условно-патогенными микроорганизмами, играют роль в развитии воспалительных заболеваний различной локализации. Они могут вызывать инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Обладая множественной резистентностью к антимикробным препаратам и патогенными свойствами, они вызывают инфекции, не контролируемые средствами вакцинопрофилактики. **Цель исследования** – оценить частоту распространения и вирулентные свойства штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта. **Материалы и методы.** Штаммы *Corynebacterium* spp. выделены из зева и носа от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (99 штаммов) и практически здоровых лиц (33 штамма) в 2017–2021 гг. в г. Ростове-на-Дону. Исследовали ультраструктуру коринебактерий в трансмиссионном электронном микроскопе TecnaiG2 Spirit BioTWIN (FEI, Чехия); цитопатическое действие (ЦПД) на культуре клеток СНО-K1; вирулентность на модели личинок восковой моли *Galleria mellonella*. **Результаты и обсуждение.** Видовое разнообразие штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от больных, значительно шире, чем при обследовании практически здоровых лиц (16 и 6 видов коринебактерий соответственно). При электронно-микроскопическом исследовании обнаружены морфологические особенности ультраструктуры клеток различных штаммов *Corynebacterium* spp., возможно, связанные с их способностью к повреждающему воздействию. Наиболее высоким уровнем ЦПД обладали штаммы *C. striatum*, *C. aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. falsenii*, *C. argentoratense*, *C. afermentans*, *C. amycolatum*, *C. reneyi*, *C. simulans*, изолированные от больных. Штаммы *Corynebacterium* spp., выделенные от больных, имели различный уровень вирулентности в отношении личинок *G. mellonella*. Это свидетельствовало о важности установления не столько видовой, сколько штаммовой принадлежности этих микроорганизмов. **Заключение.** Обнаружено широкое видовое разнообразие штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, преимущественно детского возраста. Наиболее часто изолированными видами явились *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum* и *C. accolens*. Штаммы *Corynebacterium* spp., выделенные от больных, характеризовались в основном высоким уровнем цитотоксичности и вирулентности, что указывает на их роль в развитии инфекционного процесса.

**Ключевые слова:** *Corynebacterium* spp., вирулентность, цитотоксичность, респираторный тракт, воспалительные заболевания  
Конфликт интересов не заявлен.

**Для цитирования:** Мангутов Э. О., Харсеева Г. Г., Герасимов В. Н. и др. *Corynebacterium* spp.: недооцененные патогены с высоким потенциалом вирулентности. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2022;21(4): 80-88. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-80-88>

### *Corynebacterium* spp.: Underestimated Pathogens with High Virulence Potential

EO Mangutov<sup>1</sup>, GG Kharseeva\*\*<sup>1</sup>, VN Gerasimov<sup>2</sup>, AA Alieva<sup>1</sup>, NA Voronina<sup>1</sup>, EL Alutina<sup>1</sup>,  
VP Slukin<sup>2</sup>, OE Khokhlova<sup>2</sup>, AR Gaitrafimova<sup>2</sup>, NK Fursova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Rostov State Medical University, Ministry of Health of Russia, Russia

<sup>2</sup>State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

### Abstract

**Relevance.** *Corynebacterium* spp., being opportunistic microorganisms, play a role in the development of inflammatory diseases of various localization, including HCAI. Possessing multiple resistance to AMP and pathogenic properties, they cause infections that are not controlled by means of vaccine prophylaxis. **The aim** of the study was to evaluate the prevalence and virulent properties

\* Для переписки: Харсеева Галина Георгиевна, д. м. н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. +7 (863) 250-41-90, galinagh@bk.ru. ©Мангутов Э. О. и др.

\*\*For correspondence: Kharseeva Galina G., Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology 2 FSBEI of HE Rostov State Medical University, Ministry of Health of Russia, 29, Nakhichevan lane, Rostov-on-Don, 344022, Russia. +7 (863) 250-41-90, galinagh@bk.ru. ©Mangutov EO, et al.

of *Corynebacterium* spp. strains isolated from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract. **Materials and methods.** Strains of *Corynebacterium* spp. isolated from the pharynx and nose of patients with inflammatory diseases of the respiratory tract (99 pcs.) and practically healthy individuals (33 pcs.) at 2017–2021 in Rostov-on-Don. The ultrastructure of corynebacteria was studied using a TecnaiG2 Spirit BioTWIN transmission electron microscope (FEI, Czech Republic); cytopathic effect (CPE) on CHO-K1 cell culture; virulence in the larval model of the wax moth *Galleria mellonella*. **Results and discussion.** The species diversity of *Corynebacterium* spp. strains isolated from patients is much wider than in the examination of practically healthy individuals (16 and 6 species of *Corynebacterium*, respectively). An electron microscopic study revealed morphological features of the cell ultrastructure of various strains of *Corynebacterium* spp., possibly associated with their ability to damage. The strains of *C. striatum*, *C. aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. falsenii*, *C. argentoratense*, *C. afermentans*, *C. amycolatum*, *C. freneyi*, *C. simulans* isolated from patients had the highest level of CPE. *Corynebacterium* spp. strains isolated from patients had different levels of virulence against *G. mellonella* larvae. This testified to the importance of establishing not so much the species as the strain of these microorganisms. **Conclusion.** A wide species diversity of strains of *Corynebacterium* spp., isolated from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract, mainly of childhood, was found. The most frequently isolated species were *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum* and *C. accolens*. Strains of *Corynebacterium* spp., isolated from patients, were mainly characterized by a high level of cytotoxicity and virulence, which indicates their role in the development of the infectious process.

**Keywords:** *Corynebacterium* spp., virulence, cytotoxicity, respiratory tract, inflammatory diseases

No conflict of interest to declare.

**For citation:** Mangutov EO, Kharseeva GG, Gerasimov VN, et al. *Corynebacterium* spp.: underestimated pathogens with high virulence potential. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(4): 80-88 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-80-88>.

## Введение

*Corynebacterium* spp., являясь условно-патогенными микроорганизмами, колонизируют кожу и слизистые оболочки человека [1,2]. Однако в последние годы появляется все больше сообщений о роли этих микроорганизмов в развитии воспалительных заболеваний различной локализации (респираторного и урогенитального тракта, кожи, глаз и др.) как у иммунодефицитных, так и иммунокомпетентных пациентов [3,4]. *Corynebacterium* spp. могут вызывать инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [4–6]. Их выделяют от больных с сахарным диабетом и онкологическими заболеваниями, перенесших длительный период госпитализации, а также пациентов, подвергшихся трансплантации органов, интенсивной антибактериальной терапии, инвазивным медицинским процедурам (катетеризация, протезирование, имплантация) [4,6]. ИСМП, обусловленные *Corynebacterium* spp., связаны в основном с поражением дыхательных путей. Так, *C. pseudodiphtheriticum* может быть возбудителем бактериальной коинфекции у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), находящихся на искусственной вентиляции лёгких [7]. Штаммы *C. striatum*, вызывая вспышки ИСМП в отделениях хирургического профиля, реанимации и интенсивной терапии, поражают главным образом респираторный тракт, их выделяют из аспириата трахеи после проведения процедуры эндотрахеальной интубации и бронхоскопии [8,9]. Так как штаммы *C. striatum* обладают множественной резистентностью к антимикробным препаратам, их часто изолируют от пациентов с иммунодефицитными состояниями. [4]. Недавнее филогенетическое исследование штаммов *C. striatum*, выделенных в Китае, показало, что этот вид недифтерийных

коринебактерий распространен по всему миру и может быть охарактеризован как пандемическая линия [10]. Коринебактерии этого вида обладают вирулентностью в отношении нематод *Caenorhabditis elegans* [11,12], используемых в качестве биологической модели для изучения взаимодействия хозяин-патоген [13]. Штаммы *Corynebacterium* spp. вызывают инфекции, не контролируемые средствами вакцинопрофилактики, в связи с чем важным является мониторинг их распространения и вирулентности.

**Цель исследования** – оценить частоту распространения и вирулентные свойства штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта.

## Материалы и методы

Штаммы *Corynebacterium* spp., выделенные от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (тонзиллит, ангина, ринофарингит, бронхит, пневмония, 99 штаммов) и практически здоровых лиц (33 штамма) в 2017–2021 гг. в бактериологической лаборатории МБУЗ «Детская городская больница № 1 города Ростова-на-Дону», МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону» и ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России. Штаммы *Corynebacterium* spp. изолировали из верхних дыхательных путей (зев, нос) от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта ( $10^5$  КОЕ/мл и более) и практически здоровых лиц ( $10^4$  КОЕ/мл и менее). Идентификацию штаммов *Corynebacterium* spp. проводили масс-спектрометрическим методом (MALDI-ToF-MS) на приборе Bruker Daltonics Biotyper (Германия). Использовали программное обеспечение Flex-control для идентификации

## Original Articles

штаммов рода *Corynebacterium* с последующим сравнением со спектрами из базы данных. Штаммы *C. pseudodiphtheriticum* R7, R9, R11, Дон 2, Дон 4, Дон 5, Дон 6; *C. amycolatum* R2, R3; *C. afermentans* R12; *C. falsenii* R132 и *C. striatum* R546 задепонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболensk».

**Культивирование** штаммов *Corynebacterium* spp. осуществляли на кровяном теллуритовом агаре и 10% сывороточном агаре. Культуры коринебактерий хранили в 50% растворе глицерина при температуре  $19 \pm 1$  °C и лиофильно высушенном состоянии [14,15].

**Электронно-микроскопическое исследование** *Corynebacterium* spp. проводили методом ультратонких срезов. Из фиксированной биомассы коринебактерий с помощью стеклянного ножа на ультрамикротоме Ultracut (фирма «Reichert Jung», Австрия) получали ультратонкие срезы клеток. Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе TecnaiG2 Spirit BioTWIN (FEI, Чехия) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от 10 тыс. до 100 тыс. кратном

Съёмку электронно-микроскопических изображений производили с помощью высококонтрастной широкоугольной CCD камеры высокого разрешения Gatan Orius SC200W 120 кВ, а также CCD камеры высокого разрешения Gatan Orius SC1000W 200 кВ. Обработку фотоснимков производили с помощью программ Tecnai maging and Analysis, Gatan digital micrograph.

**Цитопатическое действие (ЦПД)** фильтратов планктонных культур штаммов *Corynebacterium* spp., полученных с использованием мембранных фильтров (фирма «Millipore», США) с размером пор 0,45 мкм, исследовали на культуре овариальных клеток китайских хомячков CHO-K1. Фильтраты титровали в 96-луночном планшете в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и вносили в лунки с клетками CHO-K1 по 0,05 мл, предварительно удалив питательную среду. Каждый образец фильтрата культур коринебактерий исследовали в 7–8 повторях. Планшет инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 72 часов при +37 °C, влажности 90% и 5% концентрации CO<sub>2</sub>. Учет производили через 24, 48 и 72 часов. ЦПД штаммов *Corynebacterium* spp. на культуре клеток CHO-K1 учитывали в инвертированном микроскопе.

**Таблица 1. Частота выделения *Corynebacterium* spp. разных видов от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта**

**Table 1. The frequency of isolation of *Corynebacterium* spp. different types from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract**

Вид Type	Дети Children		Взрослые Adults	Всего Total	
	Абс. Abs.	% ± m		Абс. Abs	Абс. Abs
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	36	42,8 ± 5,4	1	37	37,5 ± 4,9
<i>C. propinquum</i>	13	15,5 ± 4,0	4	17	17,2 ± 3,8
<i>C. accolens</i>	5	5,9 ± 2,6	5	10	10,1 ± 3,0
<i>C. afermentans</i>	7	8,3 ± 3,0	1	8	8,1 ± 2,8
<i>C. argenteratense</i>	8	9,5 ± 3,2	–	8	8,1 ± 2,8
<i>C. amycolatum</i>	4	4,8 ± 2,3	–	4	4,0 ± 2,0
<i>C. tuberculostearicum</i>	2	2,4 ± 1,7	1	3	3,0 ± 1,7
<i>C. falsenii</i>	2	2,4 ± 1,7	–	2	2,0 ± 1,4
<i>C. simulans</i>	2	2,4 ± 1,7	–	2	2,0 ± 1,4
<i>C. mucifaciens</i>	2	2,4 ± 1,7	–	2	2,0 ± 1,4
<i>C. freneyi</i>	–	–	1	1	1,0 ± 1,0
<i>C. coyleae</i>	1	1,2 ± 1,2	–	1	1,0 ± 1,0
<i>C. minutissimum</i>	1	1,2 ± 1,2	–	1	1,0 ± 1,0
<i>C. durum</i>	1	1,2 ± 1,2	–	1	1,0 ± 1,0
<i>C. aurimucosum</i>	–	–	1	1	1,0 ± 1,0
<i>C. striatum</i>	–	–	1	1	1,0 ± 1,0
Всего Total	84	100	15	99	100

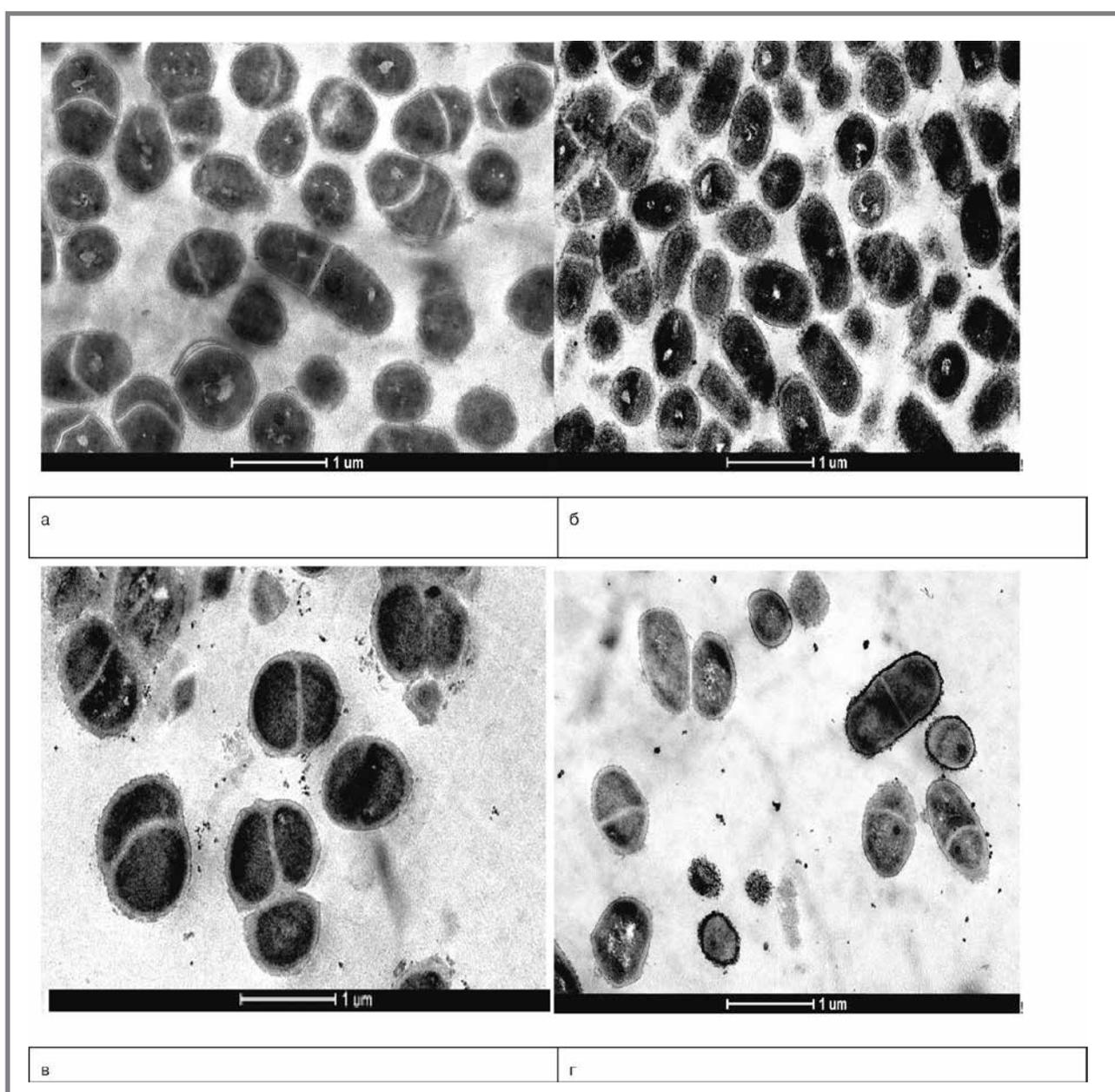
Определяли количество жизнеспособных и измененных клеток по морфологическим и деструктивным изменениям. Регистрацию результатов проводили с использованием цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа. Для этого лунки с интактной культурой клеток СНО-К1 (контроль) и лунки с клетками, подвергшимися воздействию фильтратов исследованных культур коринебактерий (опыт), фиксировали на предметном столике. Затем клетки фотографировали

через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз без дополнительного окрашивания.

**Вирулентность штаммов *Corynebacterium spp.*** определяли на модели личинок восковой моли *Galleria mellonella*, поддерживаемых в лаборатории паразитологии отдела дезинфектологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора. Готовили 10-кратные разведения культур *Corynebacterium spp.* и высевали на плотные питательные среды для подсчета

**Рисунок 1. Электронно-микроскопическое изображение ультраструктуры бактерий рода *Corynebacterium* (ультратонкие срезы) в трансмиссионном электронном микроскопе TecnaiG2 Spirit BioTWIN (FEI, Чехия) при ускоряющем напряжении 120 кВ**

**Figure 1. Electron microscopic image of the ultrastructure of bacteria of the genus *Corynebacterium* (ultrathin sections) in a transmission electron microscope TecnaiG2 Spirit BioTWIN (FEI, Czech Republic) at an accelerating voltage of 120 kV**



Примечание: а – *C. pseudodiphtheriticum* (увеличение  $\times 16000$ ); б – *C. argentoratense* (увеличение  $\times 15000$ ); в – *C. amyculatum* (увеличение  $\times 15000$ ); г – *C. Striatum* (увеличение  $\times 16000$ ).

Note: а – *C. pseudodiphtheriticum* ( $\times 16000$  magnification); б – *C. argentoratense* ( $\times 15000$  magnification); в – *C. amyculatum* ( $\times 15000$ ); г – *C. striatum* ( $\times 16000$ ).

## Original Articles

численности колониеобразующих единиц (КОЕ). Личинки *G. mellonella* заражали взвесью коринебактерий густотой  $10^7$ ,  $10^8$  и  $10^9$  КОЕ/мл и содержали при  $+37$  °C в течение 7 суток. Ежедневно подсчитывали число погибших особей. Оценку вирулентности штаммов *Corynebacterium spp.* осуществляли по характеру кривой выживаемости личинок и по величине параметра  $LD_{50}$  каждого штамма для личинок *G. mellonella* [16,17].

**Статистическую обработку** данных проводили с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoftInc, США) и MedCalc (версия 9.3.5.0) [18].

### Результаты и обсуждение

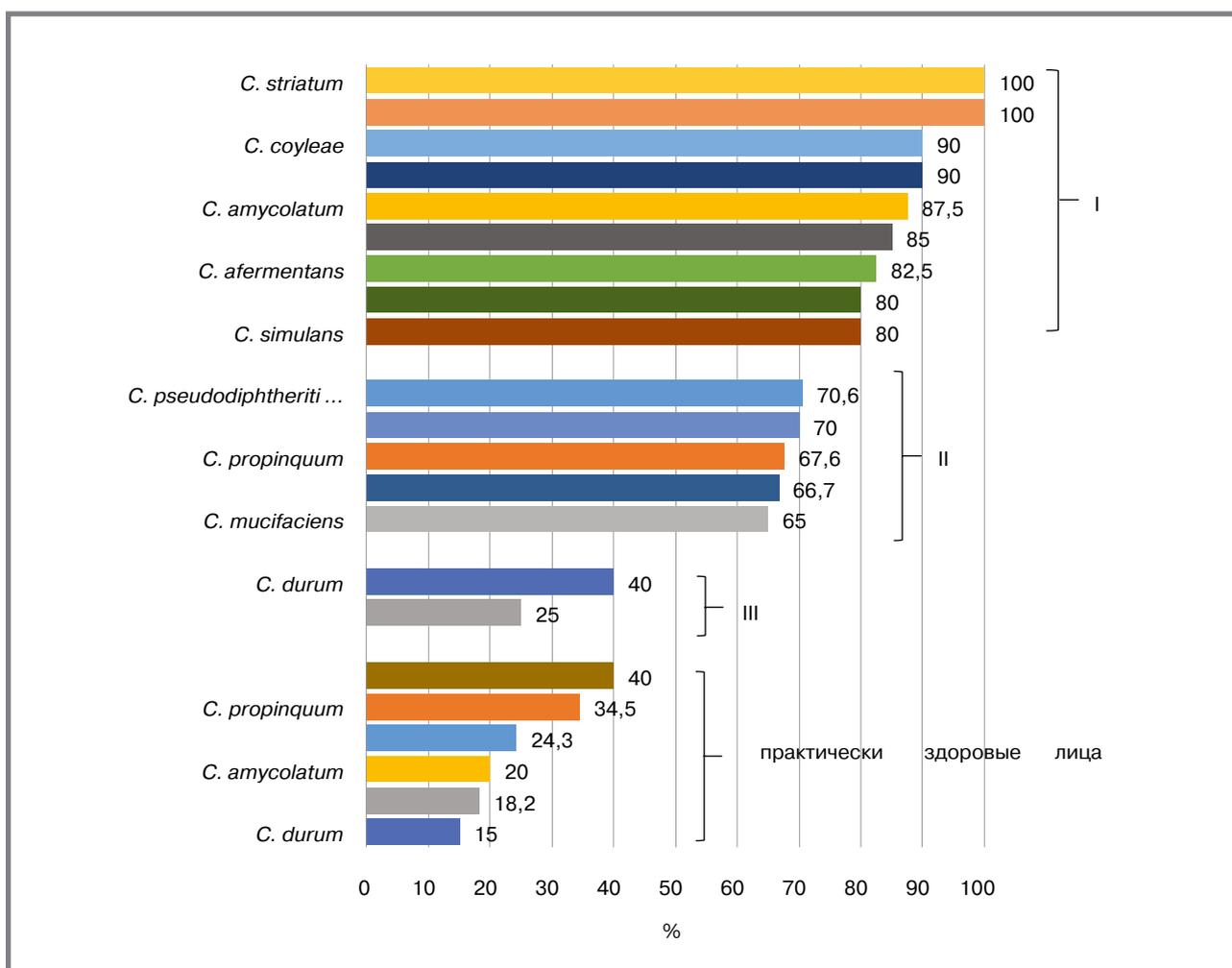
В подавляющем большинстве случаев (94,9%) *Corynebacterium spp.* выделяли от детей. При рассмотрении частоты выделения различных видов *Corynebacterium spp.* от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (табл. 1)

установлено, что наиболее часто у детей обнаруживали *C. pseudodiphtheriticum* ( $42,8 \pm 5,4\%$ ) и близкородственный ему вид *C. propinquum* ( $15,5 \pm 4,0\%$ ); значительно реже – *C. argentoratense* ( $9,5 \pm 3,2\%$ ), *C. afermentans* ( $8,3 \pm 3,0\%$ ), *C. accolens* ( $5,9 \pm 2,6\%$ ), и другие виды коринебактерий. У взрослых чаще изолировали виды *C. accolens* и *C. propinquum*.

При обследовании практически здоровых лиц установлено, что при взятии материала из зева и носа у 47 обследованных *Corynebacterium spp.* выделили только у 33 человек. Наиболее часто от здоровых высевали *C. propinquum* ( $33,3 \pm 8,3\%$ ) и *C. accolens* ( $33,3 \pm 8,3\%$ ), реже – *C. pseudodiphtheriticum* ( $21,3 \pm 7,2\%$ ) и другие виды коринебактерий (*C. durum*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*). Среди этого контингента обследованных недифтерийные коринебактерии выделяли от детей и взрослых с одинаковой частотой (51,5% и 48,5% соответственно).

**Рисунок 2. Кластерный анализ показателей ЦПД штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (I, II, III) и практически здоровых лиц по методу k-средних**

**Figure 2. Cluster analysis of CPP parameters of *Corynebacterium spp.* strains isolated from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract (I, II, III) and practically healthy individuals using the k-means method**



Примечание: По оси абсцисс - % погибших клеток CHO-K1 под воздействием штаммов *Corynebacterium spp.*; по оси ординат – виды *Corynebacterium spp.*

Note: Abscissa – % of dead CHO-K1 cells under the influence of strains of *Corynebacterium spp.*; along the y-axis, *Corynebacterium spp.*

При электронно-микроскопическом исследовании обнаружено (рис. 1), что микробная популяция штаммов *Corynebacterium spp.* характеризовалась полиморфностью и была представлена клетками палочковидной и овальной формы размером 0,3–0,5/0,9–2,5 мкм, реже – 0,3–0,5/0,7–1,3 мкм. Ультраструктура коринебактерий представлена клеточной стенкой, состоящей из двух осмиофильных слоев и одного осмиофобного толщиной 10–20 нм. Цитоплазматическая мембрана плотно примыкала своим наружным слоем к клеточной стенке, образуя выпячивания в цитоплазму – мезосомы. Цитоплазма коринебактерий имела мелкогранулярное строение и содержала комплекс структурных компонентов, включающих нуклеоид (светлые зоны с низкой электронно-оптической плотностью) и рибосомы (полисомы) – мелкозернистые темные включения высокой электронно-оптической плотности. В отдельных клетках видны небольшие вакуоли или пузырьки газа, а также плотные затемненные области с размытыми контурами, которые могут представлять собой полифосфатные комплексы зерен волютина.

Тонкое строение бактериальных клеток различных штаммов недифтерийных коринебактерий в основном заметных различий не имело. Однако иногда наблюдали некоторые отличия в ультраструктуре бактериальных клеток, связанные с толщиной клеточной стенки, количеством ее слоев, наличием или отсутствием микрофибрилярного материала на наружной поверхности. Помимо этого, штаммы *C. amycolatum* имели особенности морфологической структуры. Наряду с полиморфизмом и гетерогенностью, большое число бактериальных клеток этого вида имели выраженную склонность к образованию внутриклеточных перегородок – септ, придававших клеткам характерную исчерченность.

При исследовании штаммов *Corynebacterium spp.* на клеточной линии СНО-К1 установлено (рис. 2), что все исследованные микроорганизмы обладали цитопатической активностью разной степени выраженности. В результате классификации показателей ЦПД штаммов *Corynebacterium spp.* путем кластерного анализа по методу *k*-средних выделено три кластера, объединяющие в I кластер штаммы с высокой, II – средней и III – низкой цитопатической активностью. В отдельный кластер включены штаммы *Corynebacterium spp.*, выделенные при профилактическом обследовании от практически здоровых лиц. Установлено, что средние величины ЦПД штаммов *Corynebacterium spp.* для I кластера составили 86,4%; II – 67,3%; III – 33,7%; кластера, объединяющего штаммы коринебактерий, изолированные от практически здоровых лиц, – 25,6%. Евклидово расстояние между I кластером и кластером, включившим штаммы, выделенные от практически здоровых лиц, составило 2,38, что свидетельствовало о выраженном различии между ними. Евклидово расстояние между

кластером II и кластером, включившим штаммы коринебактерий, изолированные от практически здоровых лиц, имело значение 1,79. Между III кластером и кластером, включившим штаммы, выделенные от практически здоровых лиц, евклидово расстояние составило 0,64, что расценивали как отсутствие различий. Анализ дисперсии между кластерами и внутри них (межгрупповая и внутригрупповая дисперсия) позволил выявить, что дисперсия между кластерами составила 23,13, внутри кластеров – 668,7. По критерию Фишера (2,7) различие между кластерами было статистически значимым ( $p = 0,001$ ).

При оценке уровня вирулентности штаммов *Corynebacterium spp.* на модели личинок восковой моли *G. mellonella* установлено (рис. 3), что на основании характера кривых выживаемости личинок *G. mellonella*, инфицированных *Corynebacterium spp.*, исследованные штаммы недифтерийных коринебактерий можно подразделить на три группы: слабо-, средне- и высоковирулентные. К слабовирулентным отнесены штаммы *C. pseudodiphtheriticum* R9 и R11, которые на 4-е сутки инфицирования при дозе заражения  $10^7$  КОЕ/особь не вызывали гибели личинок *G. mellonella*; к средневирулентным – штаммы *C. amycolatum* R2 и R3, *C. pseudodiphtheriticum* R7, Дон 2, Дон 4, Дон 5, Дон 6 и *C. afermentans* R12, вызвавшие гибель 30–80% личинок; к высоковирулентным – штаммы *C. falsenii* R132 и *C. striatum* R546, приведшие к гибели 100% личинок. В контрольной группе неинфицированных личинок *G. mellonella* при культивировании в таких же условиях в течение 7 суток гибели личинок не обнаружено.

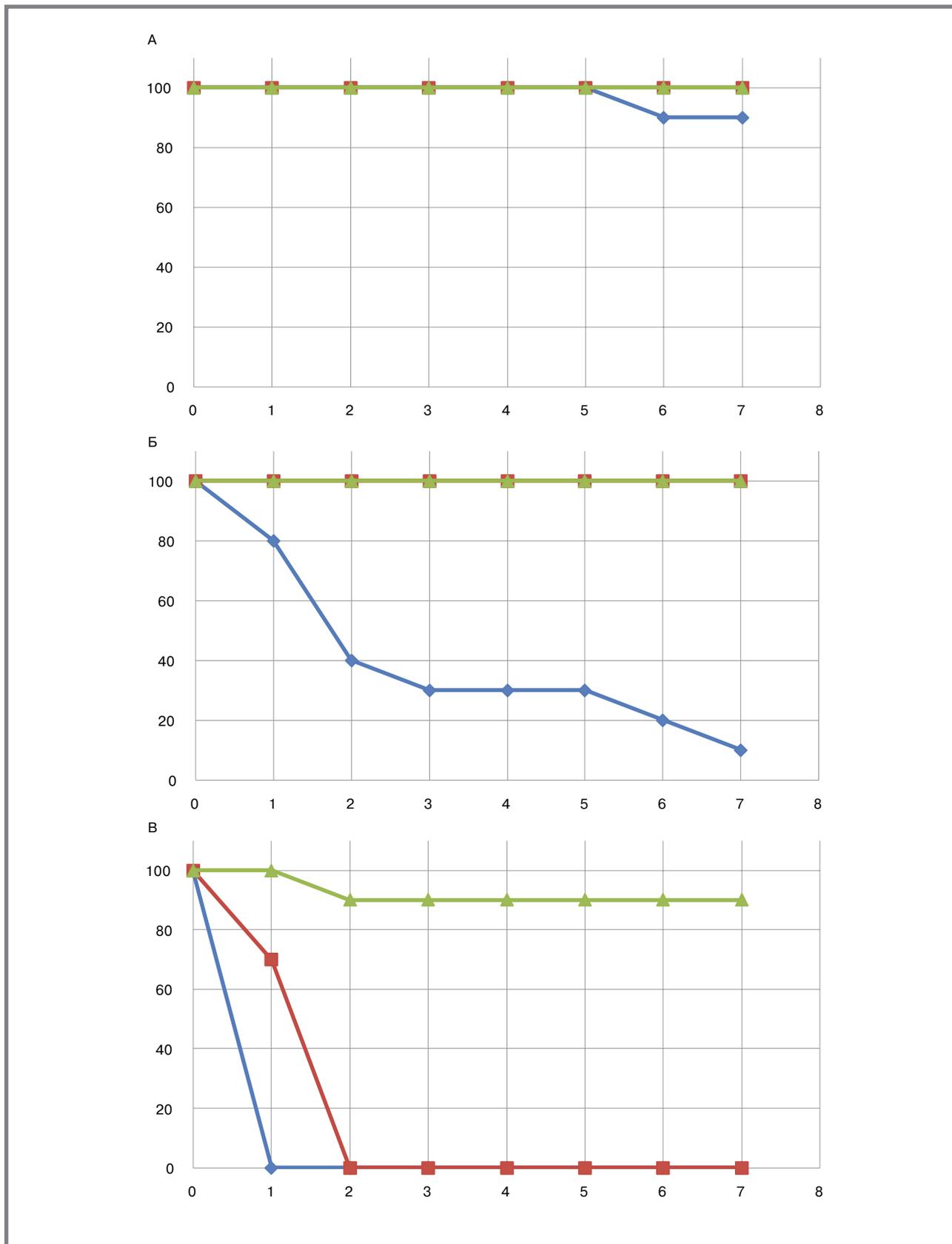
Адекватность разделения штаммов на группы подтверждена при определении показателя полулетальной дозы  $LD_{50}$  на модели личинок *G. mellonella*. Высоковирулентными оказались штаммы *C. falsenii* R132 и *C. striatum* R546, выделенные от больных с тонзиллитом и ринофарингитом. Величина  $LD_{50}$  этих штаммов была наименьшей и составила  $1,0 \times 10^6$  КОЕ/особь. К средневирулентным отнесены штаммы *C. pseudodiphtheriticum* R7, *C. amycolatum* R2 и R3, *C. afermentans* R12, выделенные от больных с ринофарингитом и бронхитом, а также *C. pseudodiphtheriticum* Дон 2, Дон 4, Дон 5, Дон 6, изолированные от практически здоровых лиц. Уровень  $LD_{50}$  этих штаммов составил в среднем  $2,5 \times 10^7$  КОЕ/особь. Слабовирулентными определены штаммы *C. pseudodiphtheriticum* R9 и R11, выделенные от больных с бронхитом, и характеризовавшиеся максимальными значениями  $LD_{50}$  ( $5,0 \times 10^7$  КОЕ/особь).

Видовое разнообразие *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, значительно шире, чем при обследовании практически здоровых лиц (16 и 6 видов коринебактерий соответственно). Однако, как от больных, так и от практически здоровых обследованных наиболее часто изолировали такие виды,

Original Articles

**Рисунок 3. Выживаемость личинок *G. mellonella* после заражения слабовирулентными (А), средневирulentными (Б) и высоковирулентными (В) штаммами *Corynebacterium* spp. в дозе 105 КОЕ/особь (зеленый цвет), 106 КОЕ/особь (красный цвет) и 107 КОЕ/особь (синий цвет)**

**Figure 3. Survival of *G. mellonella* larvae after infection with weakly virulent (A), moderately virulent (Б) and highly virulent (B) strains of *Corynebacterium* spp. at a dose of 105 CFU/individual (green), 106 CFU/individual (red) and 107 CFU/individual (blue)**



Примечание: По оси абсцисс – дни наблюдения; по оси ординат – % выживших личинок.  
 Note: The abscissa shows the days of observation; along the y-axis - % of surviving larvae.

как *C. pseudodiphtheriticum*, близкородственный ему вид *C. propinquum* и *C. accolens*. Недифтерийные коринебактерии выделяли в подавляющем большинстве случаев (94,9%) от детей, что дает основание предположить, что эти микроорганизмы могут рассматриваться как патогены преимущественно детского возраста.

При электронно-микроскопическом исследовании обнаружены незначительные отличия морфологической структуры различных штаммов недифтерийных коринебактерий, затрагивающие форму и размеры бактериальных клеток, толщину клеточной стенки и количество ее слоев, наличие или отсутствие микрофибриллярного материала на наружной поверхности. Видимые особенности ультраструктуры бактериальных клеток выявлены у *C. amycolatum*, характеризовавшихся выраженной склонностью к образованию септ, придававших клеткам характерную исчерченность. Этот феномен может быть связан с мутациями генов, участвующих в делении клетки, приводящих к неправильной сегрегации генетического материала и нарушениям, ведущим к отслоению клеточных стенок и их расхождению после завершения деления. В результате этого происходит образование новых неразделенных клеток, как имеющих нуклеоид, так и безъядерных, не несущих генетического материала. Указанные морфологические особенности могут быть использованы при морфопопуляционной и ультраструктурной характеристике клеток различных штаммов *Corynebacterium spp.*, и, возможно, связаны со способностью к адгезии и повреждающему воздействию этих микроорганизмов на клетки человеческого организма.

При рассмотрении цитотоксичности *Corynebacterium spp.* на клеточной линии СНО-К1 обнаружено, что такие виды недифтерийных коринебактерий, как *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. amycolatum*, *C. accolens*, *C. durum* изолировали как от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, так и от практически здоровых лиц. По уровню цитопатической активности эти виды недифтерийных коринебактерий, изолированные от больных, распределялись следующим образом: *C. amycolatum* характеризовались высоким уровнем ЦПД; *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum* – средним; *C. accolens*, *C. durum* – низким. Показатели ЦПД этих же видов *Corynebacterium spp.*, выделенных от практически здоровых обследованных, имели только низкие значения. Примечательно, что отдельные, относительно нечасто изолированные исключительно от больных виды (*C. striatum*, *C. aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. falsenii*, *C. argentoratense*, *C. afermentans*, *C. freneyi*, *C. simulans*) проявляли высокий уровень цитотоксичности. Сопоставимые результаты получены и при моделировании инфекции, обусловленной *Corynebacterium spp.*,

на личинках *G. mellonella*. Так, наибольшей вирулентностью среди исследованных обладали изолированные от больных штаммы *C. falsenii R132* и *C. striatum R546*, величина  $LD_{50}$  которых для личинок *G. mellonella* составила  $1,0 \times 10^6$  КОЕ/особь. В то же время, к средневирулентным отнесены штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные как от больных (*C. pseudodiphtheriticum R7*, *C. amycolatum R2* и *R3*, *C. afermentans R12*), так и практически здоровых лиц (*C. pseudodiphtheriticum* Дон 2, Дон 4, Дон 5, Дон 6). Это может свидетельствовать в пользу того, что при установлении роли *Corynebacterium spp.* в развитии инфекционного процесса безусловным приоритетом является определение вирулентных свойств этих микроорганизмов. При этом важным является установление не столько их видовой, сколько штаммовой принадлежности. Однако, учитывая данные других авторов [4,19], особое внимание следует уделять случаям выделения такого вида недифтерийных коринебактерий, как *C. striatum*, как от людей с наличием каких-либо воспалительных заболеваний, так и из больничной среды. Некоторые виды коринебактерий, в частности, *C. pseudodiphtheriticum* и *C. striatum*, обладая липофильностью и гидрофобностью, способны формировать биоплёнку на гидрофильных и гидрофобных абиотических поверхностях, особенно в присутствии фибриногена и фибронектина человека [3,8]. Это значительно осложняет борьбу с ними и указывает на их роль как возбудителей ИСМП. Учитывая наличие вирулентных свойств у штаммов *Corynebacterium spp.* и возможность их передачи воздушно-капельным и контактно-бытовым путём от человека, животных и в больничной среде [19,20], не следует недооценивать эти патогены как возможные возбудители инфекционных болезней у человека.

### Заключение

Обнаружено широкое видовое разнообразие штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, преимущественно детского возраста. Наиболее часто изолированными видами явились *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum* и *C. accolens*. Штаммы *Corynebacterium spp.*, выделенные от больных, характеризовались, в основном, высоким уровнем цитотоксичности и вирулентности, что указывает на их роль в развитии инфекционного процесса.

Исследование проводилось за счет средств Федерального бюджета в рамках государственного задания «Маркеры патогенности и антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов, связанных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта» и Отраслевой программы Роспотребнадзора.

## Литература

1. Valdeiros S.R., Neves C.S., Carvalho J.A., et al. Infection and colonization by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a 9-year observational study in a university central hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020. Vol. 39, N9. P. 1745–1752.
2. Chauvelot P., Ferry T., Tafani V. Bone and joint infection involving *Corynebacterium* spp.: from clinical features to pathophysiological pathways. *Front Med (Lausanne)*. 2021; Vol. 7:539501.
3. Burkovski A. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: putative probiotic, opportunistic infector, emerging pathogen. *Virulence*. 2015. Vol. 6, N7. P. 673–674.
4. Silva-Santana G., Silva C.M.F., Olivella J.G.B., et al. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976–2020. *Archives of Microbiology*. 2021. Vol. 203, N5. P. 1863–1880.
5. Souza C., Faria Y.V., Sant'Anna L.O., et al. Biofilm production by multi-resistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015. Vol. 110, N2. P. 242–248.
6. Carvalho R.V., Lima F.F.S., Santos C.S.D., et al. Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *Braz. J. Infect. Dis.* 2018. Vol. 22, N4. P. 347–351.
7. Yoshihiko O., Hiroyuki O., Tatsuya A., et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a pathogen in bacterial co-infection in COVID-19 patients with mechanical ventilation. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2022. Vol. 75, N2. P. 202–204.
8. Souza C., Mota H.F., Faria Y.V., et al. Resistance to Antiseptics and Disinfectants of Planktonic and Biofilm-Associated Forms of *Corynebacterium striatum*. *Microb. Drug. Resist.* 2020. Vol. 26, N 12. P. 1546–1558.
9. Superti S.V., Martins D.S., Caierão J., et al. *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2009. Vol. 51, N 2. P. 115–116.
10. Wang X., Zhou H.; Du P., et al. Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of China: an emerging national nosocomial epidemic. *J. Hosp. Infect.* 2021. Vol. 110, P. 67–75.
11. de Souza C., Simpson-Louredo L., Mota H.F., et al. Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2019. Vol. 112, N9. P. 1331–1340.
12. Alibi S., Ramos-Vivas J., Ben Selma W., et al. Virulence of clinically relevant multi-drug resistant *Corynebacterium striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces. *Microb. Pathog.* 2021. Vol. 155, 104887.
13. Kumar A., Baruah A., Tomioka M. *Caenorhabditis elegans*: a model to understand host-microbe interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020. Vol. 77, N7. P. 1229–1249.
14. 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 14.07.2013г.). – М. – 2013. – 35 с.
15. МУК 4.2.00.20-11. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*. Методические рекомендации; утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 11.05.2011 г. – М., 2011. – 55 с.
16. Tsai C.J.Y., Loh J. M. S., Proff T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016. Vol. 7, N 3. P. 214–229.
17. Слукин П. В., Асташкин Е. И., Асланян Е. М. и др. Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021. Т. 98, №6. С. 671–684.
18. Омельченко В. П., Демидова А. А. Информатика, медицинская информатика, статистика. М.: ЭОТАР-Медиа. 2021.
19. Leyton B., Ramos J.N., Baio P.V.P. et al. Treat me well or will resist: uptake of mobile genetic elements determine the resistance of *Corynebacterium striatum*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, N14. P. 7499.
20. Möller J., Busch A., Berens C. Newly isolated animal pathogen *Corynebacterium silvaticum* is cytotoxic to human epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, N7. P. 3549.

## References

1. Valdeiros S.R., Neves C.S., Carvalho J.A., et al. Infection and colonization by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a 9-year observational study in a university central hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020 Sep;39(9):1745–1752. doi: 10.1007/s10096-020-03891-y.
2. Chauvelot P, Ferry T, Tafani V. Bone and joint infection involving *Corynebacterium* spp.: from clinical features to pathophysiological pathways. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jan 21;7:539501. doi: 10.3389/fmed.2020.539501.
3. Burkovski A. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: putative probiotic, opportunistic infector, emerging pathogen. *Virulence*. 2015;6(7):673–4. doi: 10.1080/21505594.2015.1067747.
4. Silva-Santana G., Silva C.M.F., Olivella J.G.B., et al. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug resistance, 1976–2020. *Archives of Microbiology*. 2021 Jul;203(5):1863–1880. doi: 10.1007/s00203-021-02246-1.
5. Souza C., Faria Y.V., Sant'Anna L.O., et al. Biofilm production by multi-resistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015 Apr;110(2):242–8. doi: 10.1590/0074-02760140373.
6. Carvalho R.V., Lima F.F.S., Santos C.S.D., et al. Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *Braz. J. Infect. Dis.* 2018;22(4):347–351. doi: 10.1016/j.bjid.2018.07.004.
7. Yoshihiko O., Hiroyuki O., Tatsuya A., et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a pathogen in bacterial co-infection in COVID-19 patients with mechanical ventilation. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2022 Mar 24;75(2):202–204. doi: 10.7883/jyoken.JIID.2021.481.
8. Souza C., Mota H.F., Faria Y.V., et al. Resistance to Antiseptics and Disinfectants of Planktonic and Biofilm-Associated Forms of *Corynebacterium striatum*. *Microb. Drug. Resist.* 2020 Dec;26(12):1546–1558. doi: 10.1089/mdr.2019.0124.
9. Superti S.V., Martins D.S., Caierão J., et al. *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2009;51(2):115–6. doi: 10.1590/s0074-4665200900200011.
10. Wang X.; Zhou H.; Du P., et al. Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of China: an emerging national nosocomial epidemic. *J. Hosp. Infect.* 2021 Apr;110:67–75. doi: 10.1016/j.jhin.2020.10.005.
11. Cassius de Souza, Simpson-Louredo L., Mota H.F., et al. Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2019 Sep;112(9):1331–1340. doi: 10.1007/s10482-019-01265-9.
12. Alibi S., Ramos-Vivas J., Ben Selma W., et al. Virulence of clinically relevant multi-drug resistant *Corynebacterium striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces. *Microb. Pathog.* 2021 Jun;155:104887. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104887.
13. Kumar A., Baruah A., Tomioka M. *Caenorhabditis elegans*: a model to understand host-microbe interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020 Apr;77(7):1229–1249. doi: 10.1007/s00118-019-03319-7.
14. Guidelines 4.2.3065-13. Control methods. Biological and microbiological factors. Laboratory diagnosis of diphtheria infection: guidelines. M. – 2013. – 35 p. (In Russ).
15. Guidelines 4.2.00.20-11. Control methods. Biological and microbiological factors. Phenotypic identification of bacteria of the genus *Corynebacterium*. Guidelines. M., 2011. – 55 p. (In Russ).
16. Tsai C.J.Y., Loh J. M. S., Proff T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016 Apr 2;7(3):214–29. doi: 10.1080/21505594.2015.1135289.
17. Slukin P.V., Astashkin E.I., Aslanyan E.M., et al. Characterization of virulent *Escherichia coli* strains isolated from patients with urological infection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(6):671–684 (In Russ). https://doi.org/10.36233/0372-9311-134
18. Omelchenko V.P., Demidova A.A. Informatics, medical informatics, statistics. GEOTAR-Media; 2021 (in Russ).
19. Leyton B., Ramos J.N., Baio P.V.P., et al. Treat me well or will resist: uptake of mobile genetic elements determine the resistance of *Corynebacterium striatum*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jul 13;22(14):7499. doi: 10.3390/ijms22147499.
20. Möller J., Busch A., Berens C. Newly isolated animal pathogen *Corynebacterium silvaticum* is cytotoxic to human epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 Mar 29;22(7):3549. doi: 10.3390/ijms22073549.

## Об авторах

- **Эрдём Очанович Мангутов** – аспирант, кафедра микробиологии вирусологии № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. +7 (863) 250-41-09, mangutov-erdem@mail.ru. https://orcid.org/0000-0001-6959-2540.
- **Галина Георгиевна Харсеева** – д. м. н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. +7 (863) 250-41-90, galinagh@bk.ru. https://orcid.org/0000-0002-6226-2183.
- **Владимир Николаевич Герасимов** – главный научный сотрудник отдела дезинфектологии, ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. ilcvngerasimov@obolensk.org. https://orcid.org/0000-0002-0473-7785.
- **Анна Александровна Алиева** – ассистент, кафедра микробиологии вирусологии № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. +7 (863) 250-41-09, anna1976rita@mail.ru. https://orcid.org/0000-0003-0795-5312.
- **Наталья Александровна Воронина** – ассистент, кафедра микробиологии вирусологии № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. +7 (863) 250-41-09, vvv.natali@mail.ru. https://orcid.org/0000-0002-9655-6876.
- **Эльвира Львовна Алутина** – доцент, кафедра микробиологии вирусологии № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. +7 (863) 250-41-09, galinagh@bk.ru, https://orcid.org/0000-0001-6968-0583.
- **Павел Владимирович Слукин** – ведущий научный сотрудник лаборатории анти-микробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ. ORCID 0000-0002-4976-0145.
- **Ольга Евгеньевна Хохлова** – ведущий научный сотрудник лаборатории анти-микробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ. ORCID 0000-0002-2829-5117.
- **Айгуль Равиловна Гайтрафимова** – младший научный сотрудник отдела дезинфектологии ФБУН ГНЦ ПМБ. ORCID0000-0002-9113-7322.
- **Надежда Константиновна Фурсова** – ведущий научный сотрудник лаборатории анти-микробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ. n-fursova@yandex.ru. ORCID 0000-0001-6053-2621.

Поступила: 04.05.2022. Принята к печати: 04.07.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## About the Authors

- **Erdem O. Mangutov** – graduate student, Department of Microbiology and Virology No. 2 of State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Ministry of Health of Russia. +7 (863) 250-41-09, mangutov-erdem@mail.ru. https://orcid.org/0000-0001-6959-2540
- **Gal'ina G. Kharseeva** – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology No. 2, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, RostSMU of the Ministry of Health of Russia. +7 (863) 250-41-90, galinagh@bk.ru. https://orcid.org/0000-0002-6226-2183
- **Vladimir N. Gerasimov** – Chief Researcher of the Department of Disinfectology of State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology. ilcvngerasimov@obolensk.org. https://orcid.org/0000-0002-0473-7785
- **Anna A. Alieva** – assistant, Department of Microbiology of Virology No. 2 of State Medical University, Ministry of Health of Russia. +7 (863) 250-41-09, anna1976rita@mail.ru. https://orcid.org/0000-0003-0795-5312
- **Natalya A. Voronina** – assistant, Department of Microbiology of Virology No. 2 of State Medical University, Ministry of Health of Russia. +7 (863) 250-41-09, vvv.natali@mail.ru. https://orcid.org/0000-0002-9655-6876
- **Elvira L. Alutina** – associate professor, Department of Microbiology of Virology № 2 of State Medical University, Ministry of Health of Russia. +7 (863) 250-41-09, galinagh@bk.ru. https://orcid.org/0000-0001-6968-0583
- **Pavel V. Slukin** – Leading Researcher, Laboratory of Antimicrobials, Department of Molecular Microbiology of State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology. ORCID 0000-0002-4976-0145
- **Olga E. Khokhlova** – Leading Researcher, Laboratory of Antimicrobials, Department of Molecular Microbiology of State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology. ORCID 0000-0002-2829-5117
- **Aiygul R. Gaitrafimova** – Junior Researcher, Disinfectology Department State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology. ORCID0000-0002-9113-7322
- **Nadegda K. Fursova** – Leading Researcher, Laboratory of Antimicrobials, Department of Molecular Microbiology of State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology. n-fursova@yandex.ru. ORCID 0000-0001-6053-2621

Received: 04.05.2022. Accepted: 04.07.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.