

## Адгезивные и инвазивные свойства токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*

Г. Г. Харсеева\*, А. А. Алиева, А. В. Чепусова, Э. Л. Алутина, О. И. Сылка

ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России

### Резюме

**Актуальность.** В настоящее время известно, что токсигенные штаммы *Corynebacterium diphtheriae* способны не только к адгезии, но и инвазии в эпителиальные клетки верхних дыхательных путей. Помимо этого, коринебактерии обладают способностью к формированию биопленок, в составе которых они могут изменять в определенной мере свои свойства (размеры бактериальных клеток, антибиотикочувствительность), что может оказывать влияние на их адгезивные и инвазивные свойства.

**Цель.** Выявление и сравнительный анализ адгезивной и инвазивной активности типовых и биопленочных культур различных токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. **Материалы и методы.** Исследованы адгезивные и инвазивные свойства типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* gravis tox+ № 665, № 6765, *C. diphtheriae* mitis tox+ № 269, полученных из ГИСК им. Л. А. Тарасевича; штамма *C. diphtheriae* gravis tox+, выделенного от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии» бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» Минобороны России г. Ростова-на-Дону, штамма *C. diphtheriae* gravis с «молчащим» tox-геном, предоставленным МБУЗ «ГБ № 1 им. Н. А. Семашко Ростова-на-Дону» на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2. **Результаты.** Проведены определение и сравнительный анализ адгезивной и инвазивной активности типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер 2. Способность к адгезии и инвазии типовых культур всех токсигенных штаммов коринебактерий увеличивалась к 8 и 18-му часу культивирования. При исследовании 120-часовых биопленочных культур коринебактерий обнаружены аналогичные результаты. У 720-часовых биопленочных культур адгезивность не изменялась, а инвазивность резко снижалась. Динамика их инвазивности характеризовалась незначительным увеличением к 8-му часу культивирования и снижением к 18-му часу. Наиболее выраженный адгезивно-инвазивный потенциал обнаружили у циркулирующего штамма *C. diphtheriae* gravis tox+. **Заключение.** Адгезия и инвазия возбудителя дифтерии играют существенную роль на ранних стадиях инфекционного процесса, тогда как в последующем, при формировании биопленки, адгезивность коринебактерий увеличивается, а инвазивность резко снижается.

**Ключевые слова:** *Corynebacterium diphtheriae*, адгезия, инвазия, биопленочные культуры.

**Конфликт интересов не заявлен.**

**Для цитирования:** Харсеева Г. Г., Алиева А. А., Чепусова А. В. и др. Адгезивные и инвазивные свойства токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2019; 18 (3): 22–27. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-3-22-27>.

### *Corynebacterium diphtheria*, Adhesion, Type and Biofilm Cultures

G. G. Kharseeva\*\*, A. A. Alieva, A. V. Chepusova, E. L. Alutina, O. I. Sylka  
State Medical University, Ministry of Healthcare of Russian Federation

### Abstract

**Relevance.** It is now known that toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* are capable not only of adhesion, but also of invasion into epithelial cells of the upper respiratory tract. In addition, *Corynebacteria* have the ability to form biofilms, as a part of which they can change to some extent their properties (sizes of bacterial cells, antibiotic sensitivity), which can affect their adhesion and invasive properties.

**Aims.** Identification and comparative analysis of adhesive and invasive activity of typical and biofilm cultures of various toxigenic strains of *C. diphtheriae*.

**Materials & Methods.** Abstract adhesive and invasive properties of standard and bioplēnochnykh (120- and 720-hour) cultures of toxigenic strains of *C. diphtheriae* gravis tox + № 665, № 6765, *C. diphtheriae* mitis tox + № 269, derived from NISC L.A. Tarasevich, strain *C. diphtheriae* gravis tox +, isolated from patients with a diagnosis of "localized form of diphtheria" bacteriological laboratory FSI «1002 CSSE SNCMD» Ministry of defence of the Russian Federation, *C. diphtheriae* gravis strain with a "silent" tox-gene provided

\* Для переписки: Харсеева Галина Георгиевна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 Ростовского государственного медицинского университета, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. 8-863-250-41-90, galinagh@bk.ru. ©Харсеева Г. Г. и др.

\*\* For correspondence: Kharseeva Galina G., Dr. Sci. (Med.), professor, head of the Department of Microbiology and Virology 2 of Rostov State Medical University, Nakhichevan lane, Rostov-on-Don, Russia, 2934402. +7 863-250-41-90, galinagh@bk.ru. ©Kharseeva G. G. et al.

by the MBUZ "GB № 1 them. ON. Semashko Rostov-on-Don" on culture pharyngeal epithelial carcinoma cells Hep-2.

**Results.** The identification and comparative analysis of the adhesive and invasive activity of typical and biofilm cultures of various toxigenic strains of *C. diphtheriae* was carried out. The adhesive and invasive properties of typical and biofilm (120- and 720-hour) cultures of toxigenic *C.*

*diphtheriae* strains were studied on the culture of Hep-2 carcinoma cells of the pharyngeal epithelium. The ability to adhere type cultures of all toxigenic strains of corynebacteria increased by the 8th and 18th hours of cultivation, and the dynamics of their invasive properties correlated with adhesion. The most pronounced adhesive-invasive potential was found in the circulating strain of *C. diphtheriae gravis tox +*. Adhesion processes prevailed over invasion in the *C.*

*diphtheriae gravis tox +* strains № 6765, *C. diphtheriae gravis* with the "silent" *tox*-gene and *C. diphtheriae mitis tox +* № 269. When biofilm was formed, adhesion of corynebacterium increased, and invasiveness decreased dramatically. Conclusion All studied toxigenic strains of *C. diphtheriae* had adhesive and invasive activity. These properties were most pronounced in the circulating strain of *C. diphtheriae gravis tox +*.

**Conclusions.** Adhesion and invasion of the causative agent of diphtheria play a significant role in the early stages of the infectious process, whereas subsequently, during the formation of a biofilm, the adhesion of corynebacteria increases and the invasiveness decreases sharply.

**Key words:** *Corynebacterium diphtheria*, adhesion, type and biofilm cultures

**No conflict of interest to declare.**

**For citation:** Kharseeva GG, Alieva AA, Chepusova AV *Corynebacterium diphtheria*, Adhesion, Type and Biofilm Cultures. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019; 18 (3): 22–27 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-3-22-27>.

## Введение

В настоящее время возбудитель дифтерийной инфекции достаточно хорошо изучен, однако работы по его исследованию связаны в основном с главным фактором патогенности – дифтерийным экзотоксином. Значительно меньше данных имеется о его субстанциях, обуславливающих процессы адгезии и колонизации слизистых оболочек хозяина. При дифтерии, помимо поражения слизистой верхних дыхательных путей и токсемии, могут формироваться и системные осложнения – миокардит, нефрозо-нефрит, пневмония, поражения нервной ткани и кишечника. Это указывает на то, что возбудитель дифтерии способен колонизировать не только эпителий, но и более глубокие ткани, взаимодействуя с различными типами клеток организма [1]. Установлено, что токсигенные штаммы *Corynebacterium diphtheriae* могут не только прикрепляться, но и проникать и выживать в клетках фарингеального эпителия Нер-2 [2], нечувствительных к действию токсина. Способность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* к адгезии и инвазии обусловлена поверхностными структурами бактериальной клетки и, в частности, белками DIP1281 и DIP0733 (или 67-72p). Белок DIP0733 вызывает агрегацию эритроцитов и апоптозфагоцитирующих клеток, с этим его качеством связывают в значительной степени способность коринебактерий к выживанию внутри клеток [3–5] и, как следствие, персистенцию в организме. Коринебактерии обладают способностью к формированию биопленок, в составе которых они могут изменять в определенной мере свои свойства (размеры бактериальных клеток, антибиотикочувствительность) [6,7], что может оказывать влияние на их адгезивные и инвазивные свойства.

В связи с этим, **цель исследования** – выявление и сравнительный анализ адгезивной и инвазивной активности типовых и биопленочных культур различных токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

## Материалы и методы

Исследованы типовые и биопленочные (120- и 720-часовые) культуры штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* № 665, *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox+* № 269, полученных из ГИСК им. Л. А. Тарасевича; штамма *C. diphtheriae gravis tox+*, выделенного от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии» бактериологической лабораторией ФГКУ «1002 ЦГСЭН» Минобороны России г. Ростова-на-Дону; штамма *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном (отрицательный в тесте Элека и положительный при определении гена дифтерийного токсина в ПЦР), предоставленным МБУЗ «ГБ № 1 им. Н. А. Семашко Ростова-на-Дону».

Тестирование штаммов на способность формировать биопленку проводили по методике P. L. Watnick [8].

Способность к адгезии и инвазии штаммов коринебактерий исследовали по методике L. Ott [3] на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при различных временных экспозициях (2, 8, 18 часов) в полистироловых планшетах. Количество коринебактерий, адгезированных на клетках Нер-2, определяли путем посева смыва на 20% сывороточный агар с последующим подсчетом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. Для определения числа инвазировавшихся коринебактерий в лунки планшета добавляли гентамицин в концентрации  $1,2 \pm 0,4$  мг/мл с целью уничтожения *C. diphtheriae*, адгезированных на поверхности клеток Нер-2. Затем клетки

Нер-2 разрушали в течение 5 минут с помощью 0,025% раствора Твин-20, после чего содержимое лунок высевали на 20% сывороточный агар и подсчитывали количество КОЕ в 1 мл.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoftInc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0) по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой статистической значимости показателей и различий по критерию Стьюдента. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при уровне значимости 95% ( $p \leq 0,05$ ). В тексте и таблицах результаты экспериментов представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – среднеквадратичная ошибка среднего арифметического.

### Результаты и обсуждение

Все типовые и биопленочные культуры исследованных токсигенных штаммов коринебактерий обладали адгезивной активностью разной степени выраженности (табл. 1), причем наиболее

высокие показатели адгезии ( $(КОЕ \pm m) \times 10^2$ ) как среди типовых, так и биопленочных культур обнаружены у циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox+*. Так, при двухчасовой экспозиции культивирования типовой культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox+* этот показатель составил  $0,26 \pm 0,01$ , что отличалось ( $p \leq 0,05$ ) от результатов определения адгезии других исследованных штаммов (от  $0,03 \pm 0,003$  до  $0,20 \pm 0,01$ ). Аналогичные результаты получены и при 8- и 18-часовых экспозициях культивирования как типовых, так и биопленочных (120- и 720-часовых) культур коринебактерий. Наименьшей адгезивной активностью при двухчасовой экспозиции культивирования обладали как типовая, так и биопленочные культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765, при 8- и 18-часовой – штаммы *C. diphtheriae gravis tox+* (с «молчащим» *tox*-геном) и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269.

При исследовании адгезивных свойств типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур внутри каждой временной экспозиции (2, 8, 18 часов)

Таблица 1.

Адгезивные свойства типовых и биопленочных культур (120- и 720-часовых) штаммов *C. diphtheriae* при различных экспозициях

Table 1. Adhesive properties of typical and biofilm cultures (120 and 720 hours) of *C. diphtheriae* strains at different exposures

Штаммы Strains	Типовые культуры Type cultures			120-часовые биопленочные культуры 120-hour biofilm cultures			720-часовые биопленочные культуры 720-hour biofilm cultures		
	2 часа 2 hours	8 часов 8 hours	18 часов 18 hours	2 часа 2 hours	8 часов 8 hours	18 часов 18 hours	2 часа 2 hours	8 часов 8 hours	18 часов 18 hours
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующий) <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (circulating)	$0,26 \pm 0,01$	$33,3 \pm 3,3^{**}$	$193,3 \pm 3,3^{**}$	$0,24 \pm 0,01$	$32,3 \pm 3,3^{**}$	$203,3 \pm 3,3^{***}$	$0,26 \pm 0,01$	$34,12 \pm 0,14^{**}$	$201,41 \pm 0,35^{***}$
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> № 665 <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> No. 665	$0,13 \pm 0,01$	$26,8 \pm 0,36^{**}$	$113,3 \pm 3,3^{**}$	$0,14 \pm 0,01$	$27,8 \pm 0,36^{**}$	$120,0 \pm 0,01^{***}$	$0,17 \pm 0,02$	$20,72 \pm 0,24^{***}$	$112,0 \pm 0,1^{**}$
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> 6765 <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> No. 6765	$0,03 \pm 0,003$	$20,2 \pm 2,86^{**}$	$60,0 \pm 5,8^{**}$	$0,096 \pm 0,01$	$20,2 \pm 2,87^{**}$	$61,0 \pm 0,6^{**}$	$0,05 \pm 0,05$	$19,87 \pm 0,17^{**}$	$60,6 \pm 0,57^{**}$
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (с «молчащим» геном) <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (with «silent» gene)	$0,20 \pm 0,01$	$14,5 \pm 0,1^{**}$	$27,7 \pm 0,34^{**}$	$0,21 \pm 0,01$	$13,7 \pm 0,1^{**}$	$26,7 \pm 0,31^{**}$	$0,19 \pm 0,01$	$15,96 \pm 0,08^{**}$	$18,0 \pm 0,01^{***}$
<i>C. diphtheriae mitis tox+</i> 269 <i>C. diphtheriae mitis tox+</i> No. 269	$0,17 \pm 0,01$	$18,02 \pm 0,04^{**}$	$18,9 \pm 0,27^{**}$	$0,22 \pm 0,09$	$17,8 \pm 0,04^{**}$	$19,6 \pm 0,22^{**}$	$0,23 \pm 0,01$	$13,03 \pm 0,14^{**}$	$25,0 \pm 0,01^{*}$ **

Примечание: Адгезивные свойства штаммов *C. diphtheriae* выражали в  $(КОЕ \pm m) \times 10^2$

\* Достоверность отличий ( $P \leq 0,05$ ) между типовыми и биопленочными культурами внутри каждой временной экспозиции.

\*\* Достоверность отличий ( $P \leq 0,05$ ) между экспозициями 2 часа и 8 часов, 2 часа и 18 часов для каждой культуры (типовой и биопленочной).

Note: adhesive properties of *C. diphtheriae* strains were expressed in  $(CFU \pm m) \times 10^2$ .

\* Consistency of the differences ( $P \leq 0.05$ ) between type and biofilm cultures within each exposure duration.

\*\* Consistency of the differences ( $P \leq 0.05$ ) between 2-hour and 8-hour, 2-hour and 18-hour exposures for every culture (both type and biofilm).

при культивировании в течение 2 часов достоверных отличий обнаружено не было. При 8-часовой экспозиции культивирования адгезивные свойства биопленочных культур исследованных штаммов коринебактерий не изменялись по сравнению с типовыми, за исключением 720-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269, у которых адгезивность снижалась ( $p \leq 0,05$ ). К 18-му часу культивирования адгезивная активность увеличивалась ( $p \leq 0,05$ ) у 120- и 720-часовых биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий), 120-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 и 720-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae mitis tox+* № 269. Снижение адгезивных свойств отмечено у 720-часовой биопленочной культуры *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном).

Типовые культуры всех исследованных штаммов коринебактерий, за исключением штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765, обладали незначительной инвазивной активностью при двухчасовой экспозиции культивирования (табл. 2). При увеличении сроков культивирования (к 18 часу)

инвазивность увеличивалась ( $p \leq 0,05$ ) у всех типовых культур штаммов *C. diphtheriae* за исключением *C. diphtheriae gravis tox+* (с «молчащим» геном). При этом наиболее высокие показатели инвазии наблюдали у циркулирующего в популяции штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (216,7  $\pm$  6,7), наименьшие – у *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 (1,37  $\pm$  0,01). Подобные закономерности прослеживались и при исследовании 120-часовых биопленочных культур коринебактерий. Совершенно иные результаты обнаружены при изучении инвазивности 720-часовых биопленочных культур коринебактерий. Так, если при двухчасовой экспозиции показатели инвазии биопленочных культур не отличались от таковых у типовых культур, то при увеличении сроков культивирования до 8 и, особенно, 18 часов, они регистрировались на значительно более низком уровне ( $p \leq 0,05$ ). У 720-часовых биопленочных культур всех штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* инвазивность к 18-му часу культивирования была ниже, чем у типовых, *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 – в 4,4 раза, а у штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (с «молчащим» геном) вообще не обнаруживалась.

При сравнительном исследовании адгезивных и инвазивных свойств исследованных штаммов

Таблица 2.

**Инвазивные свойства типовых и биопленочных культур (120- и 720-часовых) штаммов *C. diphtheriae* при различных экспозициях**

**Table 2. Invasive properties of typical and biofilm cultures (120 and 720 hours) of *C. diphtheriae* strains at various exposures**

Штаммы Strains	Типовые культуры Type cultures			120-часовые биопленочные культуры 120-hour biofilm cultures			720-часовые биопленочные культуры 720-hour biofilm cultures		
	2 часа 2 hours	8 часов 8 hours	18 часов 18 hours	2 часа 2 hours	8 часов 8 hours	18 часов 18 hours	2 часа 2 hours	8 часов 8 hours	18 часов 18 hours
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующий) <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (circulating)	0,19 $\pm$ 0,67	23,3 $\pm$ 3,3**	216,7 $\pm$ 6,7***	0,19 $\pm$ 0,69	24,3 $\pm$ 3,3	206,6 $\pm$ 6,6*	0,17 $\pm$ 0,01	5,62 $\pm$ 0,47*	3,54 $\pm$ 0,07*
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> №665 <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> No. 665	0,06 $\pm$ 0,014	14,7 $\pm$ 0,33***	140,0 $\pm$ 9,98**	0,06 $\pm$ 0,01	13,6 $\pm$ 0,34*	133,3 $\pm$ 3,3	0,053 $\pm$ 0,02	3,23 $\pm$ 0,09*	1,53 $\pm$ 0,01*
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> 6765 <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> No. 6765	0	1,2 $\pm$ 0,5**	40,0 $\pm$ 5,77**	0	1,2 $\pm$ 0,5	40,0 $\pm$ 5,6	0,01 $\pm$ 0,01	1,41 $\pm$ 2,6	0,44 $\pm$ 0,02*
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (с «молчащим» геном) <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (with «silent» gene)	0,37 $\pm$ 0,006	0,4 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01*	0,4 $\pm$ 0,01	0,72 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,002	0,35 $\pm$ 0,01	0
<i>C. diphtheriae mitis tox+</i> 269 <i>C. diphtheriae mitis tox+</i> No. 269	0,31 $\pm$ 0,003	0,8 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,01**	0,33 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,002	0,50 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,001

Примечание: Адгезивные свойства штаммов *C. diphtheriae* выражали в (КОЕ  $\pm$  m)  $\times$  10<sup>2</sup>

\* Достоверность отличий ( $P \leq 0,05$ ) между типовыми и биопленочными культурами внутри каждой временной экспозиции.

\*\* Достоверность отличий ( $P \leq 0,05$ ) между экспозициями 2 часа и 8 часов, 2 часа и 18 часов для каждой культуры (типовой и биопленочной).

Note: Adhesive properties of *C. diphtheriae* strains were expressed in (CFU  $\pm$  m)  $\times$  10<sup>2</sup>.

\* Consistency of the differences ( $P \leq 0.05$ ) between type and biofilm cultures within each exposure duration.

\*\* Consistency of the differences ( $P \leq 0.05$ ) between 2-hour and 8-hour, 2-hour and 18-hour exposures for every culture (both type and biofilm).



коринебактерий установлено, что способность к адгезии всех типовых культур токсигенных штаммов коринебактерий в динамике увеличивалась к 8 и 18 часу культивирования. Наиболее интенсивно этот процесс происходил у циркулирующего штамма возбудителя дифтерии (от  $0,26 \pm 0,01$  до  $193,3 \pm 3,3$  КОЕ/мл) и штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 (от  $0,13 \pm 0,01$  до  $113,3 \pm 3,3$  КОЕ/мл), наименее – у штаммов *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном (от  $0,20 \pm 0,01$  до  $27,7 \pm 0,34$  КОЕ/мл) и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 (от  $0,03 \pm 0,003$  до  $60,0 \pm 5,8$  КОЕ/мл). Динамика инвазивных свойств исследованных штаммов коринебактерий коррелировала с их адгезией. Так, количество проникших внутрь клеток Нер-2 коринебактерий резко (в 40–200 раз) увеличивалось при исследовании штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий), *C. diphtheriae gravis tox+* № 665, *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765 и не претерпевало изменений у штаммов *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269. При этом количество коринебактерий, инвазировавшихся к 18-часу культивирования в клетки Нер-2, превышало ( $p \leq 0,05$ ) число адгезированных на их поверхности у штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) и *C. diphtheriae gravis tox+* № 665. У штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765, *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 напротив, процессы адгезии превалировали ( $p \leq 0,05$ ) над инвазией.

Изучая 120-часовые биопленочные культуры токсигенных штаммов коринебактерий, обнаружили аналогичные результаты, характеризующие динамику их адгезивных и инвазивных свойств. Однако в отличие от типовых культур коринебактерий, процесс инвазии превалировал над адгезией только у биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665.

При рассмотрении адгезивных свойств 720-часовых биопленочных культур штаммов коринебактерий никаких отличий от типовых и 120-часовых биопленочных культур обнаружено не было, но их инвазивность была иной. Так, инвазивные свойства 720-часовых биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий были существенно ниже адгезивных (в 50–120 раз,  $p \leq 0,05$ ). При этом динамика их инвазивности характеризовалась низкими значениями при 2-часовой экспозиции культивирования (от  $0,01 \pm 0,01$  до  $0,25 \pm 0,002$  КОЕ/мл), незначительным увеличением к 8-му часу культивирования (от  $0,35 \pm 0,01$  до  $5,62 \pm 0,47$  КОЕ/мл) и снижением к 18-му часу (от 0 до  $3,54 \pm 0,07$  КОЕ/мл).

В настоящее время известно, что такие поверхностные структуры возбудителя дифтерии, как пили, белки DIP0733 (67-72p), DIP1281, имеют важнейшее значение в адгезии коринебактерий, но, в то же время, белки DIP0733 (67-72p), DIP1281

обуславливают и процессы их инвазии внутрь клеток [9,10]. Вызывает интерес, в какие периоды и при каких условиях развития инфекционного процесса поверхностные белки коринебактерий выступают в роли адгезинов и/или инвазинов. При дифтерийном бактерионосительстве длительную персистенцию возбудителя в организме связывают, с одной стороны, со свойствами коринебактерий (адгезивностью, способностью к расположению внутри макрофагов с последующей индукцией их апоптоза, гидрофобностью и агрегацией, приводящих к биопленкообразованию), с другой – с особенностями состояния иммунной системы бактерионосителей.

По результатам исследования адгезивных и инвазивных свойств типовых культур коринебактерий, процессы инвазии к 18-часу культивирования в культуре клеток Нер-2 доминировали над адгезией у штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) и *C. diphtheriae gravis tox+* № 665. Причем наиболее выраженный адгезивно-инвазивный потенциал был характерен для циркулирующего среди населения штамма коринебактерий. Это дает основание предположить, что на ранних стадиях инфекционного процесса возбудитель, придерживаясь стратегии выживания, проникает внутрь клеток, избегая, таким образом воздействия иммунной системы хозяина и антибиотиков. В дальнейшем, при формировании биопленки, способность к адгезии коринебактерий сохраняется на высоком уровне, а инвазивность постепенно снижается. Причем самое выраженное снижение инвазивных свойств (более чем в 50 раз) наблюдается у свежeweделенного циркулирующего штамма коринебактерий, как наиболее приспособленного к условиям существования в организме. Это позволяет предположить, что на более поздних стадиях инфекционного процесса возбудитель, адаптировавшись, выходит из эпителиальных клеток и формирует биопленку. Межмикробный матрикс биопленки коринебактерий имеет преимущественно белковую природу [7], что может быть обусловлено участием в его формировании адгезинов. Следует отметить, что способность к адгезии и инвазии у штаммов *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 значительно ниже, чем у других исследованных штаммов *C. diphtheriae* биовара *gravis*, что указывает, по видимому, на их небольшие адаптационные возможности в организме.

### Заключение

Адгезия и инвазия возбудителя дифтерии играют существенную роль на ранних стадиях инфекционного процесса, тогда как в последующем, при формировании биопленки, адгезивность коринебактерий увеличивается, а инвазивность резко снижается.

## Литература

1. Sabbadini P.S., Assis M.C., Trost E., et al. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in Hep-2 cells // *Microbial Pathogenesis*. 2012. Vol. 52, N 3. P. 165–176.
2. Hirata R.Jr., Napoleao F., Monteiro-Leal L.H., et al. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. N 215. P. 115–119.
3. Ott L., Höller M., Gerlach R.G., et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells // *BMC Microbiology*. 2010. N 10. P. 2.
4. Oliveira A., Oliveira L.C., Aburjaile F., et al. *Insight of Genus Corynebacterium: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species* // *Frontiers in Microbiology*. 2017. N 8. P. 1937–1938.
5. Verlaine J.T., Nguyen T., Crighton T., et al. Genome-wide comparison of *Corynebacterium diphtheriae* isolates from Australia identifies differences in the Pan-genomes between respiratory and cutaneous strains // *BMC Genomics*. 2018. N 19. P. 869.
6. Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Гасретова Т.Д. и др. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты. М.: Практическая медицина; 2014.
7. Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю., Фролова Я.Н. и др. Способность к формированию биопленки возбудителем дифтерии // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013. № 2. С. 36–38.
8. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes // *J. of Bacteriol.* 2000. Vol. 182, N 10. P. 2675–2679.
9. Burkovski A. Cell envelope of *Corynebacteria*: Structure and influence on pathogenicity // *ISRN Microbiology*. Vol. 2013, Article ID 935736, P. 11.
10. Харсеева Г.Г., Алиева А.А., Сылка О.И. и др. Способность к адгезии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* // *Альманах клинической медицины*. 2017. Т. 45, № 2. С. 154–158.

## References

1. Sabbadini PS, Assis MC, Trost E, et al. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in Hep-2 cells. *Microbial Pathogenesis*. 2012;52(3):165–176. doi: 10.1016/j.micpath.2011.12.003
2. Hirata R Jr, Napoleao F, Monteiro-Leal LH, et al. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;215:115–119. doi: 10.1016/S0378-1097(02)00930-8
3. Ott L, Höller M, Gerlach RG, et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiology*. 2010;10:2. doi: 10.1186/1471-2180-10-2
4. Oliveira A, Oliveira LC, Aburjaile F, et al. *Insight of Genus Corynebacterium: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species*. *Frontiers in Microbiology*. 2017:1937–1938. doi: 10.3389/fmicb.2017.01937
5. Verlaine JT, Nguyen T, Crighton T, et al. Genome-wide comparison of *Corynebacterium diphtheriae* isolates from Australia identifies differences in the Pan-genomes between respiratory and cutaneous strains. *BMC Genomics*. 2018; 19:869. doi: 10.1101/143800
6. Kharseeva GG, Alutina EL, Gasretova TD, et al. *Diphtheria: microbiological and immunological aspects*. Moscow: Practical Medicine Publishing House; 2014. (In Russ.)
7. Kharseeva GG, Mironov AJ, Frolova JaN, et al. The ability to form a biofilm causative agent of diphtheria. *Clinical laboratory diagnosis*. 2013;2:36–38. (In Russ.)
8. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Of Bacteriol*. 2000; 182(10):2675–2679. doi: 10.1128/jb.182.10.2675-2679.2000
9. Burkovski A. Cell envelope of *Corynebacteria*: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiology*. Vol. 2013, Article ID 935736:11. doi: 10.1155/2013/935736
10. Kharseeva GG, Alieva AA, Sylka OI, et al. Adhesion ability of typical and biofilm cultures of toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Almanac of Clinical Medicine*. 2017;45(2):154–158. (In Russ.) doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-154-158

## Об авторах

- **Галина Георгиевна Харсеева** – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 Ростовского государственного медицинского университета, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. +7 (863) 250-41-90, galinagh@bk.ru. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>.
- **Анна Александровна Алиева** – аспирант кафедры микробиологии вирусологии № 2 Ростовского государственного медицинского университета, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. +7 (863) 250-41-09, e-mail: anna1976rita@mail.ru. ORCID <https://orcid.org/0000-0003-0795-5312>.
- **Эльвира Львовна Алутина** – доцент кафедры микробиологии вирусологии № 2 Ростовского государственного медицинского университета, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. +7(863) 250-41-09, galinagh@bk.ru. ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6968-0583>.
- **Анна Владимировна Чепусова** – доцент кафедры микробиологии вирусологии № 2 Ростовского государственного медицинского университета, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. +7(863) 250-41-09, anutka\_drum@mail.ru. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4490-7013>.
- **Ольга Ивановна Сылка** – доцент кафедры микробиологии вирусологии № 2 Ростовского государственного медицинского университета, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. (863) 250-41-09, <https://orcid.org/0000-0001-6351-8630>

Поступила: 28.12.2018. Принята к печати: 24.04.2019.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## About the Authors

- **Galina G. Kharseeva** – Dr. Sci. (Med.), professor, head of the Department of Microbiology and Virology 2 of Rostov State Medical University, Nakhichevan lane 29, Rostov-on-Don, Russia, 2934402. +7 (863) 250-41-90, galinagh@bk.ru. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>.
- **Anna A. Alieva ORCID** – graduate student of Department of Microbiology of Virology No. 2 of Russia Rostov of Rostov State Medical University, Nakhichevan lane 29, Rostov-on-Don, Russia, 2934402. +7 (863) 250-41-09, anna1976rita@mail.ru, ORCID <https://orcid.org/0000-0003-0795-5312>
- **Elvira L. Alutina** – associate professor of Department of Microbiology of Virology № 2 of Rostov State Medical University, Nakhichevan lane 29, Rostov-on-Don, Russia, 2934402. +7 (863) 250-41-09, galinagh@bk.ru. ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6968-0583>.
- **Anna V. Chepusova** – associate professor of Department of Microbiology of Virology No. 2 of Russia Rostov of Rostov State Medical University, Nakhichevan lane 29, Rostov-on-Don, Russia, 2934402., +7(863) 250-41-09, anutka\_drum@mail.ru. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4490-7013>
- **Olga I Sylka** Department of Microbiology of Virology No. 2 FSBEI of HE Rostov State Medical University Ministry of Health of Russia, Associate Professor, (863) 250-41-09, <https://orcid.org/0000-0001-6351-8630>

Received: 28.12.2018. Accepted: 24.04.2019.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

## ИНФОРМАЦИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

## Полиомиелит и другие энтеровирусные инфекции

11 июня 2019 г. на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН») состоялось заседание Проблемной комиссии Роспотребнадзора «Полиомиелит и другие энтеровирусные инфекции». Заседание было посвящено совершенствованию надзора за энтеровирусной (неполио) инфекцией в Российской Федерации. В работе проблемной комиссии приняли участие представители Центрального аппарата Роспотребнадзора, ведущие ученые и специалисты учреждений Роспотребнадзора, работающие по этой проблеме – представители ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций», ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И. Н. Блохиной», ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии», ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», ФБУЗ «Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии», ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова

РАН», руководители и представители референс-центров по надзору за энтеровирусной инфекцией.

На заседании была представлена информация об итогах надзора за энтеровирусной (неполио) инфекцией и результатах молекулярно-генетического мониторинга непوليوмиелитных энтеровирусов в Российской Федерации в 2018 г.

Значительное внимание было уделено вопросам дальнейшего совершенствования надзора за энтеровирусной (неполио) инфекцией в Российской Федерации, в том числе в части регистрации и лабораторного исследования, внесению изменений в нормативные и методические документы.

Активное обсуждение вызвали вопросы, поставленные в блоке докладов, посвященных надзору за циркулирующей полио- и непوليوмиелитных энтеровирусов. По итогам заседания Проблемной комиссии будут определены дальнейшие направления работы и задачи.

Источник: <http://rospotrebнадзор.ru>