

*На правах рукописи*

ВОРОНИНА НАТАЛЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**НЕДИФТЕРИЙНЫЕ КОРИНЕБАКТЕРИИ:  
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РОЛЬ В РАЗВИТИИ  
ИНФЕКЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ У ЧЕЛОВЕКА**

03.02.03 – «микробиология»

**Автореферат**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону

2016

Работа выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии №2 Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ростовский Государственный Медицинский Университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

**Харсеева Галина Георгиевна**, доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

**Краева Людмила Александровна**, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», заведующая лабораторией бактериальных капельных инфекций.

**Афанасьев Станислав Степанович**, заслуженный деятель науки России, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, заместитель директора по биотехнологии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения России

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека России по адресу:

142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, кор. № 1, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года.

**Учёный секретарь**

диссертационного совета

кандидат биологических наук

**Фурсова Надежда Константиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Недифтерийные коринебактерии или *Corynebacteria non diphtheriae* (англ.) (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium riegelii*, *Corynebacterium striatum* и др.), являющиеся условно-патогенными микроорганизмами, колонизируют кожу и слизистые оболочки человека; некоторые их виды встречаются во внешней среде и выделяются от животных (Coyle M.B., 1990; Funke G., 1997; Cazanave C., 2012; Oliveira M., 2014; Kawasaki Y., 2014; Aleman M., 2015; Heggelund L., 2015). Ранее их называли общим словом «дифтероиды» и считалось, что недифтерийные коринебактерии, за исключением *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*, не патогенны для человека. Обнаружение коринебактерий в клиническом материале объяснялось контаминацией, причем учет частоты их выделения в бактериологических лабораториях до сих пор не предусмотрен. Однако недифтерийные коринебактерии выделяют от пациентов с острыми заболеваниями верхних дыхательных путей (10-15%), гнойно-септическими процессами, патологией урогенитального тракта (61,1-70,0%), кожи и др. (Анохин В.А., 2012; Bernard K.A. 2012; Reddy B.S., 2012; Oliveira M., 2014). Инфекции, обусловленные недифтерийными коринебактериями, обычно регистрируют на фоне вторичных иммунодефицитных состояний, формирующихся у онкологических, гематологических больных, наркоманов, ВИЧ-инфицированных, пациентов с мультиорганной патологией, особенно пожилых (Костюкова Н.Н., 2002; Belmares J., 2007; Bernard K.A., 2012; Matsunami M., 2012; Aygun G., 2013, Meinel D.M., 2015).

В настоящее время описано 88 видов коринебактерий, 53 из которых имеют медицинское значение (Bernard K.A., 2012; Burkovski A., 2013). Факторы патогенности недифтерийных коринебактерий (пили, корд-фактор, ферменты патогенности, токсины) позволяют им взаимодействовать с эпителием входных ворот организма, размножаться *in vivo*, преодолевать клеточные и гуморальные механизмы защиты, снижая фагоцитарную активность и активизируя процессы апоптоза в клетках хозяина (Кнох К., 2002; Belmares J., 2007; Dos Santos C.S., 2010; Abebe D., 2015; Heggelund L., 2015). Недостаточность естественного иммунитета, формирование вторичных иммунодефицитных состояний, социальные и другие условия способствуют активации синтеза факторов патогенности недифтерийных коринебактерий, вследствие чего развивается заболевание. Формирование антибиотикоустойчивости недифтерийных коринебактерий, и, особенно, множественной, способствует распространению их как агентов госпитальной инфекции (Костюкова Н.Н., 2001; Ценева Г.Я., 2007; Краева Л.А., 2011). Так, резистентность к пенициллинам, аминогликозидам и хинолонам сделала *Corynebacterium jeikeium* причиной развития внутрибольничных инфекций, немаловажную роль в развитии которых играют и такие виды коринебактерий, как *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium amycolatum* и *C. striatum* (Ценева Г.Я., 2007; Funke G., 1997).

Учитывая видовое разнообразие недифтерийных коринебактерий и широкий спектр заболеваний, при которых они выделяются, особое значение имеет правильная их идентификация, традиционной основой которой является бактериологическое исследование. «Золотым стандартом» идентификации признан метод гено-инженерного анализа – секвенирование генов 16S рПНК (Case R.J., 2007; Venezia J., 2012), в последние годы внедряется масс-спектрометрический анализ (MALDI-ToF-MS) (Alatoom A.A., 2012). Однако очевидно, что необходим комплексный подход к идентификации недифтерийных коринебактерий, включающий в себя фено- и генотипическую информацию об основных биологических свойствах и, в частности, факторах патогенности коринебактерий.

В связи с этим, актуальным для борьбы с заболеваниями, обусловленными недифтерийными коринебактериями, является высококачественная лабораторная диагностика с учетом определения факторов патогенности и оптимальный подбор антибактериальных препаратов.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время работы зарубежных и отечественных исследователей, посвященные изучению биологических свойств недифтерийных коринебактерий и роли их факторов патогенности в генезе патологических процессов, крайне малочисленны и посвящены лишь отдельным клиническим случаям (Bernier R., 1997; Belmares J., 2007; Bonmarin I., 2009; Aygun G., 2013). Роль поверхностных белков, липидов, корд-фактора, нейраминидазы, гиалуронидазы, сфингомиелиназы в реализации патогенных и иммуногенных свойств *C. non diphtheriae* изучена недостаточно. Механизмы персистенции недифтерийных коринебактерий в организме хозяина, устойчивость к антибактериальным препаратам, характер воздействия на клетки иммунной системы человека, как за рубежом, так и в нашей стране по-прежнему остаются малоисследованными. Рассмотрение всех этих аспектов позволит расширить представления о роли недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных заболеваний различной локализации и поможет разработать более эффективные подходы к их лечению.

**Цель исследования** – характеристика патогенных свойств недифтерийных коринебактерий и их роль в развитии инфекционных процессов в организме человека.

#### **Задачи исследования:**

1. Провести сравнительный анализ эффективности трех методов идентификации недифтерийных коринебактерий: бактериологического, молекулярно-генетического (секвенирование генов 16S рПНК), масс-спектрометрического MALDI-ToF-MS.
2. Охарактеризовать факторы патогенности недифтерийных коринебактерий.
3. Разработать биоинформационный алгоритм для определения этиологической значимости недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных процессов в организме человека.
4. Определить способность недифтерийных коринебактерий к индукции фагоцитоза и апоптоза макрофагов, а также оценить регуляторное влияние нейтрофилокинов,

индуцированных *C. non diphtheriae*, на данные процессы.

5. Установить спектр чувствительности недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам.

#### **Научная новизна результатов исследования**

1. Показано преимущество бактериологического метода исследования по сравнению с масс-спектрометрическим (MALDI-ToF-MS) при сравнительном анализе эффективности методов идентификации различных видов недифтерийных коринебактерий с использованием «золотого стандарта» (секвенирование генов 16S рРНК).
2. Определена значимость некоторых факторов патогенности недифтерийных коринебактерий (уреазная, гемолитическая, ДНК-азная активность, АIg-а по отношению к IгG) в развитии инфекционных процессов различной локализации и впервые разработан биоинформационный алгоритм для определения этиологической значимости *C. non diphtheriae* в развитии инфекционных процессов в организме человека.
3. Впервые выявлена чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов *C. non diphtheriae*, выделенных при инфекционных процессах среди различных контингентов населения в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области.
4. Депонирован штамм *Corynebacterium riegelii* «Дон» в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболенск» (свидетельство № 207 от 23.12.13г.).
5. Впервые определена способность недифтерийных коринебактерий к индукции фагоцитоза и апоптоза макрофагов, а также рассмотрен механизм регуляторного влияния нейтрофилокинов, индуцированных *C. non diphtheriae*, на данные процессы.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Определена роль факторов патогенности недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных процессов. Впервые разработан биоинформационный алгоритм для определения этиологической значимости недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных процессов в организме человека. Впервые исследована способность недифтерийных коринебактерий к индукции фагоцитоза и апоптоза макрофагов, а также механизм регуляторного влияния нейтрофилокинов, индуцированных *C. non diphtheriae*, на эти процессы. Разработаны подходы к рациональной антибиотикотерапии воспалительных заболеваний, вызванных недифтерийными коринебактериями, с учетом их симбиотических взаимоотношений с представителями условно-патогенной микрофлоры организма человека.

#### **Методология и методы исследования.**

Методология диссертационной работы спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования. Предметом исследования являлась характеристика основных биологических свойств недифтерийных коринебактерий и

создание биоинформационного алгоритма для определения их этиологической значимости в развитии инфекционных процессов в организме человека. Объектом исследования послужили штаммы недифтерийных коринебактерий (217 шт.): *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. riegelii*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium propinquum*, *Corynebacterium cystitidis*, *C. ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium pilosum*, *Corynebacterium paurometabolum*, выделенные от больных и практически здоровых лиц.

Исследованы основные биологические свойства недифтерийных коринебактерий, влияние их на макрофаги (МФ) беспородных белых мышей, чувствительность к антибактериальным препаратам, создан биоинформационный алгоритм для определения их этиологической значимости в развитии инфекционных процессов в организме человека. Проанализированы современные методы идентификации недифтерийных коринебактерий. Выделен, охарактеризован и депонирован штамм *C. riegelii* «Дон» в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболensk» (свидетельство № 207 от 23.12.13г.).

Научная литература, посвящённая исследованиям в области патогенных свойств недифтерийных коринебактерий и их влиянию на организм человека, проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы бактериологические, молекулярно-генетические, иммунологические и статистические методы исследования.

**Материалы и методы исследования.** При проведении исследований использовали штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. riegelii*, *C. minutissimum*, *C. propinquum*, *C. cystitidis*, *C. ulcerans*, *C. glutamicum*, *C. pilosum*, *C. paurometabolum*), *Corynebacterium diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, *BH*, *cepomun 2*; *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, *S. aureus ATCC 29213*, *Echerichia coli ATCC 25922* и *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*, *E. coli*, *Morganella morganii*, *Citrobacter spp.*, грибы рода *Candida*: *C. kefyri*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*.

**Бактериологические методы.** Идентификацию и основные биологические свойства недифтерийных коринебактерий проводили согласно Методическим рекомендациям «Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*», 2011 и с использованием MALDI-ToF-MS.

**Молекулярно-генетические методы.** Идентификацию штаммов недифтерийных коринебактерий проводили секвенированием генов 16S рРНК (ЗАО «Синтол», г. Москва); наличие гена токсигенности определяли с помощью ПЦР (НПО «Литех» (г. Москва).

**Иммунологические методы.** Апоптогенную активность штаммов *C. non diphtheriae* и их способность индуцировать процессы фагоцитоза перитонеальных

макрофагов мышей изучали до и после добавления нейтрофилокинов (НФК) *in vitro* в соответствии с указаниями (Кондратьева И.А., 2001; Харсеева Г.Г., 2014).

**Статистическая обработка данных.** Построение биоинформационного алгоритма для определения этиологической значимости *C. non diphtheriae* в развитии инфекционных процессов в организме человека проводили с помощью метода логистической регрессии. Для проведения ROC-анализа был использован модуль программы MedCalc 9.3.5.0. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью персонального компьютера *IBM PC/XT* и статистического пакета «STATISTICA 7.0» (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0) для *WindowsXP* с использованием параметрических и непараметрических методов статистики.

**Личное участие автора в получении результатов.** Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведено моделирование процессов, мониторинг основных параметров, аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: постановка задач, способы их решения, обсуждение результатов в научных публикациях и докладах и их внедрение в практику.

#### **Результаты исследования внедрены в работу:**

- лаборатории бактериологических методов исследования ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» (имеется акт внедрения);
- использованы при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами, интернами, ординаторами, курсантами факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов на кафедре микробиологии и вирусологии № 2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (имеется акт внедрения).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Для идентификации видов недифтерийных коринебактерий с постоянными биохимическими свойствами эффективно использовать бактериологический, с переменными – молекулярно-генетический метод исследования (секвенирование генов 16S рРНК). Масс-спектрометрический (MALDI-ToF-MS) метод требует дальнейшего совершенствования для определения представителей рода *Corynebacterium*.
2. Штаммы видов недифтерийных коринебактерий обладают факторами патогенности (гемолитическая, уреазная, ДНК-азная, антииммуноглобулиновая активность по отношению к IgG), играющими роль в развитии инфекционных процессов у человека.
3. Разработанный биоинформационный алгоритм позволяет определить этиологическую значимость различных видов недифтерийных коринебактерий в

развитии инфекционных процессов в организме человека.

4. Штаммы видов недифтерийных коринебактерий ингибируют функциональную активность макрофагов и индуцируют процессы их апоптоза; препараты нейтрофилокинов оказывают регуляторное влияние на апоптоз и фагоцитарную активность макрофагов.
5. Наиболее эффективными антимикробными препаратами в отношении циркулирующих штаммов видов недифтерийных коринебактерий являются цефотаксим, цефазолин и ванкомицин, наименее - бензилпенициллин, линкомицин и рифампицин.

**Степень достоверности и апробация результатов исследования.** О достоверности полученных результатов работы свидетельствует достаточный объём проведённых исследований по изучению основных биологических свойств, факторов патогенности, сравнительного анализа методов идентификации, исследованию антибиотикочувствительности недифтерийных коринебактерий, проведённый с использованием бактериологических, молекулярно-генетических, иммунологических, статистических методов исследования, характеризующихся высокой специфичностью и чувствительностью. Комплексное исследование различных видов недифтерийных коринебактерий позволило получить результаты, сопоставимые с данными литературы, что свидетельствует об их достоверности.

Диссертация апробирована на совместном заседании кафедры микробиологии и вирусологии №2 и координационного совета ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 4 от 23.03.2016 г.).

**Материалы и результаты исследований доложены на:**

1. «65-й Итоговой научной конференции молодых ученых РостГМУ с международным участием», 22 апреля 2011 г., г. Ростов-на-Дону;
2. «X межвузовской конференции с международным участием. Обмен веществ при адаптации и повреждении», 20-21 мая 2011 г., г. Ростов-на-Дону;
3. Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные аспекты природной очаговости болезней», 1-2 ноября 2011г., г. Омск;
4. XI Региональной конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» 11-12 мая 2012 г., г. Ростов-на-Дону;
5. XII Региональной научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении (Дни лабораторной диагностики Южного федерального округа)», 17-18 мая 2013 г., г. Ростов-на-Дону;
6. Региональной научно-практической конференции с международным участием «Проблемы антибиотикорезистентности возбудителей внутрибольничных инфекций», 9 июля 2013 г., г. Ростов-на-Дону;
7. «Всероссийской научно-практической конференции с международным участием по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVI Кашкинские



чтения)», 19-21 июня 2013г., г. Санкт-Петербург;

8. Всероссийской научно-практической конференции «Воздушно-капельные инфекции: микробиология, биотехнология, иммунология, эпидемиология» 26 мая 2014г., г. Ростов-на-Дону;
9. Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология)» 13-15 мая 2015 г., г. Ростов-на-Дону.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано всего 29 научных работ, из них – 6 статей и 6 тезисов в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. В публикациях содержится полный объём информации, касающейся темы диссертации. Получено Свидетельство № 207 от 23.12.13г. о депонировании штамма *Corynebacterium riegeli* «Дон» в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболенск».

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы. Работа включает 154 страницы текста, 32 таблицы, 3 рисунка. Список литературы содержит 168 источника, из них - 46 отечественных и 122 зарубежных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

При проведении исследований использовали штаммы:

– недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. amycolatam*, *C. striatum*, *C. riegeli*, *C. minutissimum*, *C. propinquum*, *C. cystitidis*, *C. ulcerans*, *C. glutamicum*, *C. pilosum*, *C. paurometabolum*), выделенные от больных с острыми и хроническими тонзиллитами, фарингитами, ларингитами, бронхитами, скарлатиной, пиелонефритами, туберкулезом мочевыводящей системы, кольпитами, дерматитами, гнойно-воспалительными заболеваниями (105 шт.) и практически здоровых лиц (112 шт.); полученные за период с 2009 по 2015г.г. из лабораторий бактериологических методов исследования МБУЗ ЦГБ «Горбольница №1» г. Гуково Ростовской области, ГБУЗ «Областная детская больница» г.Ростова-на-Дону, МЛПУЗ ЦГБ №1 им. Н.А.Семашко г.Ростова-на-Дону, МБУЗ «Консультативно-диагностический центр г.Ростова-на-Дону»;

– *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, *BH*, *cepomun 2*, *S. aureus ATCC 25923*, *S. aureus ATCC 29213*, *E. coli ATCC 25922* и *P. aeruginosa ATCC 27853*, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-медицинский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

– *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, выделенные от больных с острыми и хроническими тонзиллитами, фарингитами, полученные из лаборатории

бактериологических методов исследования МЛПУЗ ЦГБ №1 им. Н.А.Семашко г.Ростова-на-Дону; *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *M. luteus*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*, *E. coli*, *M. morgani*, *Citrobacter spp.*, грибы рода *Candida*: *C. kefyr*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, выделенные от больных с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей (ВДП) и урогенитального тракта (УГТ), беременных и лиц, проходивших профилактическое обследование, предоставленные Клинико-диагностической лабораторией ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава РФ.

Идентификацию штаммов недифтерийных коринебактерий проводили с помощью бактериологического метода, секвенирования генов 16S рРНК и методом масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS). Бактериологический метод исследования осуществляли в соответствии с МР «Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*», 2011. Секвенирование генов 16S рРНК штаммов *C. non diphtheriae* проводили с помощью праймеров для коринебактерий (ЗАО «Синтол», г.Москва). Определение степени высеваемости коринебактерий из дыхательных путей, УГТ и поверхности кожи проводили по методу Голда (Приказ № 535, 1985). Основные биологические свойства недифтерийных коринебактерий исследовали в соответствии с МР «Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*», 2011. Дезоксирибонуклеазную (ДНК-азную) активность бактериальных клеток определяли на агаре с толуидиновым синим для теста на ДНКазу (фирма «HiMedia Laboratories Pvt.Ltd», Индия). Определение токсинообразования проводили с помощью теста Элека (МУ «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции», 2013); гена токсигенности – с использованием ПЦР (НПО «Литех», г.Москва). Адгезивную активность исследовали по методике (Костюкова Н.Н., 1985); гемолитическую – по методу Грейга (Лабинская А.С., 2012); антииммуноглобулиновую (AIg-a) – в соответствии с указаниями (Бухарин О.В., 2004); антагонистические свойства штаммов *C. non diphtheriae* и представителей условно-патогенной микрофлоры определяли по методу (Биргер М.О., 1973). Определение чувствительности штаммов *C. non diphtheriae* к антибиотикам проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде (МУК 4.2.1890-04, Москва, 2004). Апоптогенную активность штаммов *C. non diphtheriae* и способность их индуцировать процессы фагоцитоза перитонеальных Мф мышей изучали до и после добавления НфК *in vitro* по характерным морфологическим изменениям в клетках при окрашивании по Май-Грюнвальду и докрасчиванием по Романовскому-Гимзе (Кондратьева И.А., 2001; Харсеева Г.Г., 2014).

При построении биоинформационного алгоритма для определения этиологической значимости *C. non diphtheriae* в развитии инфекционных процессов в организме человека использовали метод логистической регрессии. Модель была разработана совместно с доцентом кафедры медицинской и биологической физики ГБОУ ВПО РостГМУ, к.м.н. Демидовой АА. Для проведения ROC-анализа был использован модуль программы MedCalc 9.3.5.0. На основе табличного процессора *Microsoft Excel* была разработана программа автоматического расчета показателя К в

соответствии с ведущими факторами патогенности *C. non diphtheriae* по их совокупности.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью персонального компьютера *IBM PC/XT* и статистического пакета «STATISTICA 7.0» (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0) для *WindowsXP* с использованием параметрических и непараметрических методов статистики.

### Результаты исследования

При анализе эффективности трех методов идентификации *C. non diphtheriae* (бактериологического, молекулярно-генетического (секвенирование генов 16S рПНК) и масс-спектрометрического MALDI-ToF-MS) установили, что полное совпадение результатов обнаружено у 26 (51,0%) штаммов *C. non diphtheriae*.

При сравнении результатов бактериологического метода исследования с данными секвенирования генов 16S рПНК («золотым стандартом») обнаружено совпадение результатов у 43 (84,3%) штаммов недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. diphtheriae*). Несовпадающие результаты (табл.1) обнаружены у 8 штаммов, относящихся к видам *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. propinquum*, *C. falsenii* (15,7% случаев).

Причины ложных результатов бактериологического исследования могут заключаться, с одной стороны, в том, что некоторые из неправильно идентифицированных бактериологически видов (*C. pseudotuberculosis*, *C. amycolatum*, *C. falsenii*) имеют переменные биохимические признаки (нитратредуктазная, уреазная, пиразинамидазная активность, способность разлагать мальтозу и сахарозу). С другой стороны, метаболическая инертность некоторых видов (*C. amycolatum*), липофильность (почти 85% коринебактерий, входящих в состав нормальной микрофлоры организма человека, в разной степени липофильны) и гидрофобность *C. non diphtheriae* способствуют схожести их фенотипических проявлений.

Таблица 1. Несовпадающие результаты при идентификации недифтерийных коринебактерий бактериологическим методом и секвенированием генов 16S-рПНК

Бактериологический метод	Секвенирование генов 16S-рПНК	Кол-во штаммов (n=8)
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	<i>C.aurimucosum</i>	1
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	<i>C.propinquum</i>	2
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	<b><i>C.falsenii</i></b>	1
<b><i>C.pseudotuberculosis</i></b>	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	2
<i>C.paurometabolum</i>	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1
<b><i>C.amycolatum</i></b>	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1

При сравнении результатов масс-спектрометрического метода исследования и секвенирования генов 16S рРНК совпадение результатов обнаружено только у 29 (57,0%) штаммов *C. non diphtheriae* (*C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*). Данные масс-спектрометрического исследования 22 штаммов *C. non diphtheriae* таких видов, как *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. minutissimum*, не подтверждены секвенированием генов 16S рРНК (табл.2). Несовпадение результатов обнаружили в 43,1% случаев, причем наиболее часто (у 17-ти из 22 штаммов) – среди генетически близкородственных видов *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*. Два штамма *C. diphtheriae gravis* (нетоксигенный и с «молчащим» геном токсигенности) по результатам MALDI-ToF-MS были идентифицированы как *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*, что свидетельствовало о недостаточной эффективности масс-спектрометрического исследования для идентификации близкородственных видов *C. non diphtheriae* и штаммов *C. diphtheriae*.

Таблица 2. Несовпадающие результаты при идентификации недифтерийных коринебактерий методом MALDI-ToF-MS и секвенированием генов 16S-рРНК

MALDI-ToF-MS		Секвенирование генов 16S-рРНК	Кол-во штаммов (n=22)
Вид	ScoreValue		
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	> 2	<i>C.aurimucosum</i>	1
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	> 2	<i>C.propinquum</i>	2
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	>2	<i>C.diphtheriae</i>	1
<i>C.propinquum</i>	>2	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	10
<i>C.propinquum</i>	> 2	<i>C.diphtheriae</i>	1
<i>C.minutissimum</i>	1,900-1,999	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1
<i>C.propinquum</i>	1,900-1,999	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	4
<i>C.propinquum</i>	1,7-1,799	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1
<i>C.propinquum/C.falsenii</i>	> 2/1,800-1,899	<i>C.falsenii</i>	1

Реализация патогенного потенциала недифтерийных коринебактерий осуществляется за счет факторов патогенности, обуславливающих последовательное взаимодействие коринебактерий с рецепторами органов и тканей человеческого организма.

Среди всех исследованных видов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных, положительной гемолитической активностью обладали большинство (79,2±5,9%) штаммов. Чаще способность формировать гемолиз проявляли штаммы *C. pseudotuberculosis* (100%), *C. xerosis* (100%), реже *C. pseudodiphtheriticum* (66,7±9,6%). Среди *C. non diphtheriae*, выделенных от практически здоровых лиц,

гемолитическую активность проявили  $52,6 \pm 11,5\%$  штаммов, причем, преимущественно в низкой степени (у 9 из 10 штаммов с положительной гемолитической активностью).

Положительная ДНК-азная активность с одинаковым уровнем продукции фермента ДНК-азы обнаружена у  $14,4 \pm 3,1\%$ , штаммов, выделенных от больных и у  $16,7 \pm 4,2\%$  штаммов, выделенных от практически здоровых лиц. Высокая и средняя степень ДНК-азной активности обнаружена у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis* и *C. amycolatum*. При сопоставительном исследовании гемолитической и ДНК-азной активности штаммов *C. non diphtheriae* (рис.1) штаммы с положительной гемолитической активностью (38 шт.), выделенные от больных, обладали высокой (9 шт.) и средней (3 шт.) ДНК-азной активностью. При этом среди штаммов коринебактерий с положительной гемолитической активностью (10 шт.), выделенных от практически здоровых лиц, только четыре имели ДНК-азную активность средней степени, а остальные шесть были отрицательны в этом тесте.

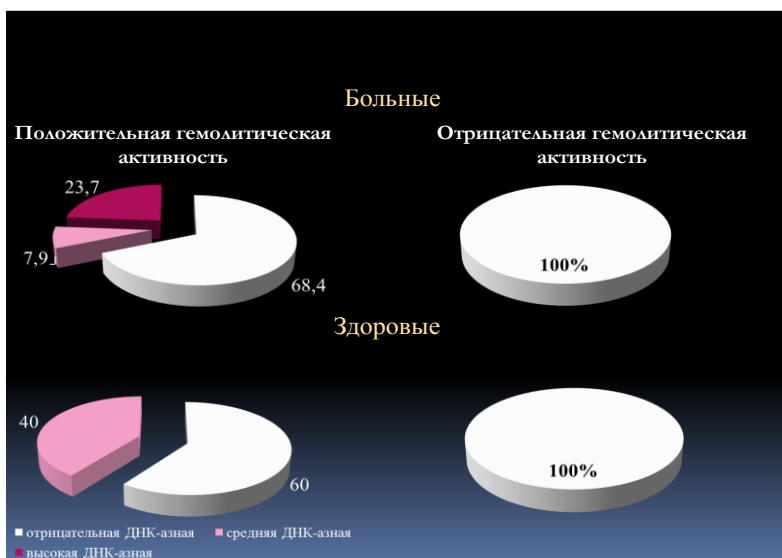


Рисунок 1. Сопоставление гемолитической и ДНК-азной активности штаммов недифтерийных коринебактерий

Уровень АIg-a *C. non diphtheriae*, выделенных как от больных с различной патологией, так и от практически здоровых лиц был одинаково высоким (100%) по отношению к IgA. При этом уровень АIg-a по отношению к IgM и IgG был ниже и составлял у штаммов коринебактерий, выделенных от больных  $95,6 \pm 1,3\%$  и  $59,0 \pm 3,4\%$

соответственно, у штаммов, выделенных от практически здоровых лиц –  $97,8 \pm 1,0\%$  и  $57,7 \pm 3,8\%$  соответственно. Примечательно, что при исследовании различных видов *C. non diphtheriae*, выделенных от больных, AIg-a к IgG для *C. pseudotuberculosis* ( $68,1 \pm 2,7\%$ ) была выше ( $P \geq 95\%$ ), чем таковая у *C. pseudodiphtheriticum* ( $53,0 \pm 5,6\%$ ).

При исследовании токсигенных свойств штаммов недифтерийных коринебактерий все они были отрицательны как в иммунопреципитационном тесте Элека, так и в ПЦР.

При определении уреазной активности штаммов *C. non diphtheriae*, установлено, что от больных с различной патологией выделено значительно большее количество уреазоположительных штаммов ( $65,7\%$ ), чем от практически здоровых ( $35,7\%$ ). Наличие высокой уреазной активности у коринебактерий (особенно таких видов как *C. riegliei* и *C. urealyticum*) расценивают как фактор патогенности (Funke G. 1998).

Учитывая вышеизложенное, для оценки патогенных свойств недифтерийных коринебактерий целесообразно определять гемолитическую, ДНК-азную, уреазную и антииммуноглобулиновую активность.

Недифтерийные коринебактерии обнаруживали в ассоциации с такими микроорганизмами, как *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus hominis*, *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus haemolyticus*, *Pseudomonas spp.*, *Aspergillus spp.*, *P. mirabilis*, *Enterobacter spp.*, *Haemophilus spp.*, *Serratia spp.*, *C. albicans*, *C. krusei*.

При исследовании межмикробных взаимодействий установлено, что штаммы *C. non diphtheriae*, выделенные как от практически здоровых лиц, так и от больных, не обладали антагонистическим действием в отношении *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *M. luteus*, *E. coli*, *Serratia spp*, *Enterobacter spp.*, *M. morgani*, *Citrobacter spp*. Наличие антагонистической активности у всех исследованных штаммов *C. non diphtheriae*, причем в наибольшей степени у *C. pseudotuberculosis*, обнаружено в отношении *S. epidermidis*. При этом штаммы *C. pseudotuberculosis*, выделенные от больных, более устойчивы к антагонистической активности микроорганизмов (*C. albicans*, *M. morganii*, *P. aeruginosa*), чем выделенные от практически здоровых лиц.

Недифтерийные коринебактерии обладали способностью снижать фагоцитарную активность и активизировать процессы апоптоза в клетках хозяина, что могло быть обусловлено наличием поверхностных антигенов, корд-фактора, нейраминидазы, высокой уреазной активности.

Поглотительная активность Мф, оцениваемая по показателю ФИ (фагоцитарный индекс), была одинакова для всех видов недифтерийных коринебактерий, вне зависимости от места их выделения. В то же время значения ФЧ (фагоцитарное число) были минимальны относительно коринебактерий, выделенных из УГТ. При этом показатель ФЧ для *C. pseudotuberculosis*, выделенных их ВДП и УГТ, был ниже, чем для других видов коринебактерий из этих же биотопов. Переваривающая активность

Мф также была наименее выражена в отношении коринебактерий, выделенных из УГТ. Однако, в отличие от ФЧ, ИЗФ (индекс завершенности фагоцитоза) относительно *C. pseudotuberculosis* имел значения, превышающие таковые для других видов *C. non diphtheriae*. Никаких отличий в показателях ФИ, ИЗФ и апоптогенной активности, индуцированной штаммами *C. non diphtheriae*, выделенными от больных и практически здоровых лиц не обнаружено. Все исследованные виды коринебактерий индуцировали апоптоз Мф, причем наиболее выраженное апоптогенное действие было выявлено у *C. pseudotuberculosis*, выделенных из УГТ. По-видимому, высокая апоптогенная активность *C. pseudotuberculosis*, обусловленная интерференцией действия его факторов патогенности, обладающих как токсической, так и антифагоцитарной функцией, является одним из способов защиты данного вида коринебактерий от фагоцитоза. Известно, что гибель клеток организма путем апоптоза благоприятна для бактерий, так как при этом не происходит запуска воспалительных реакций (Dorella F.A., 2006) и создаются условия для длительной персистенции возбудителя.

Закономерно встает вопрос о способах регуляции функциональной активности клеток иммунной системы, позволяющих повышать фагоцитарную активность Мф и их устойчивость к апоптогенному воздействию недифтерийных коринебактерий. Известно, что Нф, наряду с Мф и лимфоцитами, способны осуществлять регуляторную функцию, опосредованную продуцируемыми ими низкомолекулярными пептидами – нейтрофилокинами (НфК) (Тюкавкина С.Ю., 2013). Учитывая данные о широком спектре иммунорегуляторной активности НфК, изучили возможность их использования для иммунокоррекции процессов фагоцитоза и апоптоза Мф, индуцированных *C. non diphtheriae*. НфК повышали поглотительную активность Мф, оцениваемую по ФЧ, в отношении коринебактерий, выделенных из всех исследованных биотопов. Увеличение переваривающей активности Мф наблюдали только при изучении коринебактерий, выделенных с кожных покровов. Примечательно, что наименьшие средние показатели фагоцитарной активности Мф, как исходные, так и при добавлении НфК, были зарегистрированы относительно *C. non diphtheriae*, изолированных из УГТ. Известно, что одними из доминирующих микроорганизмов, выделяемых при патологии УГТ, являются коринебактерии (60-70%), причем доказана роль некоторых из них (*C. riegelii*, *C. urealyticum*) в генезе воспалительных заболеваний нижних мочевых путей и уросепсиса (Aygun G., 2013). При острых воспалительных заболеваниях ВДП недифтерийные коринебактерии выделяются реже – в 10-15% случаев (Funke G., 1997; Izurieta H.S., 1997; Stackebrandt E., 2006). Несмотря на то, что фагоцитарная активность Мф была ниже относительно коринебактерий, выделенных из УГТ, устойчивость Мф к апоптогенному действию *C. non diphtheriae* одинакова вне зависимости от места их выделения. При этом воздействие НфК приводило к снижению апоптогенного эффекта почти всех видов, взятых в исследование *C. non diphtheriae*, также вне зависимости от биотопа, из которого они были выделены.

На основании полученных данных об основных биологических свойствах и, в частности, факторах патогенности штаммов *C. non diphtheriae*, разработали модель расчета коэффициента этиологической значимости *C. non diphtheriae* (К) в развитии инфекционного процесса, объединяющую в себе ведущие признаки (степень высеваемости, факторы патогенности) с указанием коэффициента детерминации ( $R^2$ ) для каждого из них. Этиологическая значимость (по величине  $R^2$ ) для коринебактерий (табл.3) была наиболее высокой для степени высеваемости ( $R^2=0,55$ ), уреазной ( $R^2=0,54$ ) и гемолитической ( $R^2=0,46$ ) активности. Наименее значимыми, но достоверными ( $p<0,05$ ) оказались показатели АIg-а по отношению к IgG ( $R^2=0,31$ ) и ДНК-азная активность ( $R^2=0,28$ ).

В результате ROC-анализа было установлено, что дифференциальной точкой разделения является 0,72. Если  $K>0,72$ , то этиологическая значимость *C. non diphtheriae* в развитии инфекционного процесса высокая, если  $K\leq 0,72$  – низкая. Ценность полученной модели для установления этиологической значимости *C. non diphtheriae* в развитии инфекционного процесса высокая, о чем свидетельствовал критерий Пирсона  $\chi^2$  (Chi квадрат) 6,89 при  $p<0,01$ .

Таблица 3. Значимость ведущих признаков недифтерийных коринебактерий, способствующих развитию инфекционных процессов

Ведущие признаки	$R^2$ (коэффициент детерминации)	p
Десятичный логарифм степени высеваемости коринебактерий	0,55	<0,001
Уреазная активность	0,54	<0,001
Гемолитическая активность	0,46	0,001
АIg-а по отношению к IgG	0,31	0,044
ДНК-азная активность	0,28	0,046

На основе табличного процессора *Microsoft Excel* была разработана программа автоматического расчета показателя К в соответствии с ведущими факторами патогенности *C. non diphtheriae* по их совокупности. Дифференциальная чувствительность метода составила 86,1% ( $ДЧ=(31/36)*100\%$ ), диагностическая специфичность – 77,8% ( $ДС=(14/18)*100\%$ ), диагностическая точность или эффективность – 80,4%. Среди всех исследованных штаммов *C. non diphtheriae*, у 39 (72,2%) штаммов коэффициент  $K>0,72$ , что свидетельствовало об их этиологической значимости в развитии инфекционного процесса.

Представлено клиническое наблюдение пациентки с диагнозом «туберкулез мочеполовой системы», зарегистрированный в 2013 году в г.Ростове-на-Дону. От больной П. при бактериологическом исследовании был выделен штамм *C. riegelii* в



диагностически значимом количестве ( $10^6$ ). Масс-спектрометрический анализ (MALDI-ToF-MS), проведенный с помощью прибора Bruker Daltonik MALDI Biotyper, подтвердил (индекс Score-1,844) результаты идентификации данного вида бактериологическим методом. Патогенный потенциал *C. riegelii* был определен с помощью разработанного биоинформационного алгоритма (рис.2). После введения данных автоматический расчет показал, что значение К составило 0,88. Поскольку  $K > 0,72$ , этиологическая значимость *C. riegelii* в развитии данного инфекционного процесса оказалась высока. Выделенный штамм *C. riegelii* «Дон» депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболенск» (свидетельство № 207 от 23.12.13г.).

При исследовании чувствительности различных видов *C. non diphtheriae* к антибактериальным препаратам (табл.4) путем определения МПК<sub>50</sub>, МПК<sub>90</sub> установлено, что эти показатели при исследовании *C. pseudodiphtheriticum* были

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
1												
2												
3												
4				Const.B0	X1	X2	X3	X4	X5			
5				Estimate	-1,02	0,79	0,15	0,46	0,17	0,75		
6				Значения	-1,02	1	0	2	3	1		
7					-1,02	0,79	0,00	0,92	0,51	0,75	1,95	
8				7,029	0,88							
9												
10												
11												
12					$z = -1,02 + 0,79 * X1 + 0,15 * X2 + 0,46 * X3 + 0,17 * X4 + 0,75 * X5$							
13												
14												

Рисунок 2. Окно для установления этиологической значимости *C. riegelii* в развитии инфекционного процесса в организме человека.

минимальны для ванкомицина, цефазолина, цефотаксима и гентамицина; *C. pseudotuberculosis* – ванкомицина, цефазолина, цефотаксима и гентамицина; *C. xerosis* – цефотаксима; *C. amycolatum* –бензилпенициллина; *C. striatum* – цефазолина. При определении чувствительности *C. non diphtheriae* к антибактериальным препаратам на основании расчета показателей МПК<sub>50</sub>, МПК<sub>90</sub> наиболее эффективными оказались ванкомицин, цефазолин и цефотаксим.

Таблица 4. Чувствительность штаммов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам (МПК мг/л)

Антибактериальные препараты	МПК мг/л	
	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>
ванкомицин	≤ 0,019	2,5
линкомицин	0,312	≥ 5,0
цефазолин	≤ 0,019	2,5
цефотаксим	≤ 0,019	0,625
бензилпенициллин	0,157	2,5
гентамицин	0,039	≥ 5,0
эритромицин	0,157	≥ 5,0
рифампицин	0,078	2,5

Согласно величине МПК все исследованные виды недифтерийных коринебактерий подразделили на чувствительные и резистентные (NCCLS, 2015; EUCAST, 2015).

В результате сравнения количества чувствительных к указанным антибактериальным препаратам всех исследованных видов *C. non diphtheriae* установлено, что наибольшее количество штаммов (60,0% – 100%) были чувствительны к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму и гентамицину, наименьшее – к бензилпенициллину и рифампицину (28,0% – 66,7%).

По результатам определения количества резистентных к указанным антибактериальным препаратам всех исследованных видов *C. non diphtheriae* установлено (рис.3), что к бензилпенициллину и линкомицину проявляли резистентность 33,3% – 72,0% исследованных штаммов, тогда как к цефотаксиму, цефазолину и ванкомицину количество резистентных штаммов коринебактерий (8,3% – 28,0% штаммов) было наименьшим.

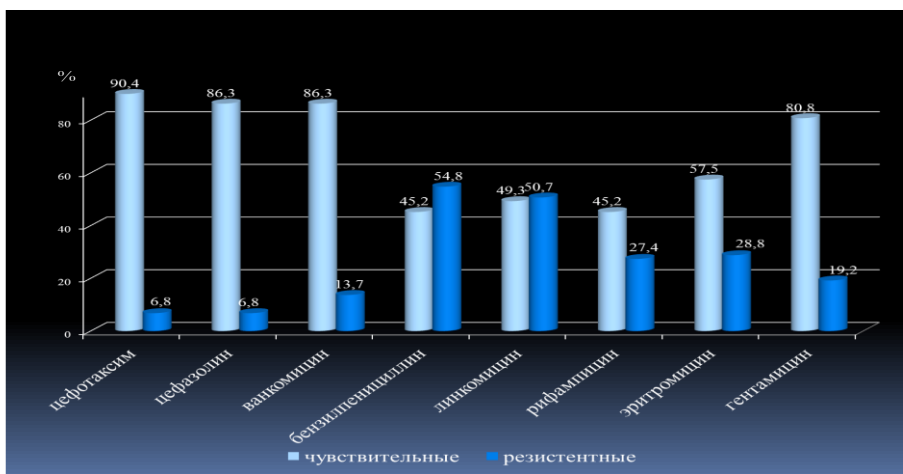


Рисунок 3. Количество штаммов недифтерийных коринебактерий, чувствительных и резистентных к антибактериальным препаратам

Количество резистентных штаммов среди недифтерийных коринебактерий к нескольким антибактериальным препаратам велико и неодинаково у разных видов. Наиболее часто резистентность к антибиотикам проявляли штаммы *C. pseudotuberculosis*, реже *C. xerosis*, *C. amycolatum* и *C. striatum*, причем все они были выделены из урогенитального тракта. Из всех исследованных видов коринебактерий наиболее полиантибиотикорезистентными оказались *C. xerosis* и *C. amycolatum*, у которых наблюдали резистентность к пяти и шести антибиотикам. Чаще резистентность формировалась к бензилпенициллину, линкомицину и рифампицину; реже – к эритромицину и гентамицину.

### Выводы

1. Для установления видовой принадлежности недифтерийных коринебактерий возможно использование бактериологического метода исследования, но для идентификации коринебактерий с переменными биохимическими свойствами необходим молекулярно-генетический метод (секвенирование генов 16S рРНК). Масс-спектрометрический (MALDI-ToF-MS) метод требует дальнейшего совершенствования и пополнения баз данных для идентификации представителей рода *Corynebacterium*.
2. Штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные от лиц с различной патологией, обладали наиболее выраженной по сравнению с практически здоровыми гемолитической, гемолитической в сочетании ДНК-азной, уреазной и антииммуноглобулиновой активностью.

3. Разработанный биоинформационный алгоритм на основе ведущих признаков недифтерийных коринебактерий (степень высеваемости, факторы патогенности (гемолитическая, уреазная, ДНК-азная, антииммуноглобулиновая активность по отношению к IgG)), позволяет рассчитать коэффициент (K) для установления этиологической значимости в развитии инфекционных процессов у человека.
4. Замедление процессов фагоцитоза, индуцированного *C. non diphtheriae*, их апоптогенное действие обуславливают патогенные свойства коринебактерий. Воздействие нейтрофилокинов приводит к снижению апоптогенного эффекта всех исследованных видов недифтерийных коринебактерий.
5. Штаммы *C. non diphtheriae* чувствительны к цефотаксиму, цефазолину и ванкомицину, резистентны к бензилпенициллину, линкомицину и рифампицину. Количество антибиотикорезистентных штаммов коринебактерий значительно (до 89,0%) и чаще встречается среди видов *C. pseudotuberculosis*, а также *C. xerosis*, *C. amycolatum* и *C. striatum*.

### Практические рекомендации

1. Для идентификации штаммов недифтерийных коринебактерий и, особенно, с переменной биохимической активностью, в лабораторной практике рекомендуется осуществлять комплексный подход, включающий бактериологический и молекулярно-генетический методы исследования.
2. Для установления этиологической значимости недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных процессов рекомендуется использовать биоинформационный алгоритм, основанный на расчете коэффициента (K), объединяющего в себе ведущие признаки коринебактерий (степень высеваемости и факторы патогенности (гемолитическая, уреазная, ДНК-азная, антииммуноглобулиновая активность по отношению к IgG)).
3. Для корректного назначения антибактериальных препаратов при инфекционных процессах у человека, обусловленных недифтерийными коринебактериями, необходимо определение антибиотикочувствительности клинических изолятов недифтерийных коринебактерий.
4. Для коррекции иммунодефицитных состояний, развивающихся на фоне воспалительных процессов, вызываемых недифтерийными коринебактериями, следует рассмотреть возможность использования препаратов цитокинового ряда.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в реферируемых научных журналах ВАК РФ:

1. Харсеева Г.Г. Персистентные свойства *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области / Г.Г. Харсеева, **Н.А. Воронина**, Т.Д. Гасретова, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова // **Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии**. – 2012. – №3. – С. 13-17. (Импакт фактор по РИНЦ 0,405; цит. - 1)
2. Харсеева Г.Г. Антибиотикочувствительность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области / Г.Г. Харсеева, **Н.А. Воронина**, А.Ю. Миронов, А.Р. Харисова // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2012. – №10. – С. 62-64. (Импакт фактор по РИНЦ 0,383)
3. Харсеева Г.Г. Роль *Corynebacterium non diphtheriae* в индукции апоптоза макрофагов мышей / Г.Г. Харсеева, **Н.А. Воронина**, Э.Л. Алутина, А.Ю. Миронов, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова // **Имунопатология, аллергология, инфектология**. – Витебск Беларусь. – 2012. – №2. – С.56-59. (Импакт фактор по РИНЦ 0,388; цит. - 3)
4. Харсеева Г.Г. Влияние *Corynebacterium non diphtheriae* на функциональную активность и апоптоз макрофагов / Г.Г. Харсеева, **Н.А. Воронина**, С.Ю. Тюкавкина // **Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии**. – 2014. – №6. – С. 96-100. (Импакт фактор по РИНЦ 0,427)
5. Харсеева Г.Г. Сравнительный анализ методов идентификации *Corynebacterium non diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, **Н.А. Воронина**, А.Ю. Миронов, Э.Л. Алутина // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2015. – №12. – С. 43-46. (Импакт фактор по РИНЦ 0,362)
6. Харсеева Г.Г. Методы идентификации *Corynebacterium non diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, **Н.А. Воронина**, А.Ю. Миронов // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2016. – №4. – С.245-249. (Импакт фактор по РИНЦ 0,297)

Патенты на изобретения:

1. Национальное патентное депонирование. Свидетельство № 207 от 23.12.13г. о депонировании авторского штамма *Corynebacterium riegellii* «Дон» / Харсеева Г.Г., **Воронина Н.А.**, Лабушкина А.В., Кудря Е.В. Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»

Другие публикации:

7. **Воронина Н.А.** Персистентные свойства *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных из урогенитального тракта / Н.А. Воронина, Т.А. Галаган // Материалы 64 Итоговой научной конференции молодых ученых. – Ростов-на-Дону, 2010. – С.76-77.
8. **Воронина Н.А.** Персистентные свойства *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области / Н.А. Воронина, А.Р. Харисова, Н.И. Мамычева // Материалы 65 Итоговой научной конференции молодых ученых РостГМУ с международным участием. – Ростов-на-Дону, 2011. – С.67.
9. **Воронина Н.А.** Мониторинг антибиотикочувствительности штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области / Н.А.Воронина, Г.Г. Харсеева, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова // Обмен веществ при

- адаптации и повреждении (дни медицинской лабораторной диагностики) Материалы X межвузовской конференции с международным участием. – Ростов-на-Дону, 2011. – С.36-37.
10. Харсеева Г.Г. Роль апоптоза, индуцированного *Corynebacterium non diphtheriae*, в альтерации макрофагов мышей / Г.Г. Харсеева, **Н.А. Воронина**, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова // Современные аспекты природной очаговости болезней. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Омск, 2011. – С.200-201.
  11. **Воронина Н.А.** Биологические свойства штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных из урогенитального тракта / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, Т.Д. Гасретова // Обмен веществ при адаптации и повреждении. XI Межвузовская биохимическая научно-практическая конференция с международным участием. – Ростов-на-Дону, 2012. – С.15-16.
  12. Харсеева Г.Г. Апоптогенные свойства штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, Н.А. Воронина, А.Р. Харисова, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова // Журнал «**Инфекционные болезни**». Материалы IV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2012. – С.408.
  13. Харсеева Г.Г. Патогенные свойства *Corynebacterium non diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, Н.А. Воронина, А.Р. Харисова, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова // Журнал «**Клиническая лабораторная диагностика**». XVI Форум «Национальные дни лабораторной медицины России-2012». Материалы конференции. – Москва, 2012. – № 9. – С. 86-87.
  14. **Воронина Н.А.** Циркуляция и роль в патологии штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* в Ростовском регионе / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова, С.З. Валиева // Региональные проблемы окружающей среды, здоровья населения и санитарно-эпидемиологического благополучия. III Научно-практическая конференция с международным участием. Выпуск 3. – Ростов-на-Дону, 2013г. – С.119-121.
  15. Воронина Н.А. Влияние нейтрофилокинов на апоптогенную активность *Corynebacterium non diphtheriae* / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, С.Ю. Тюкавкина, О.М. Бут, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова, С.З. Валиева, Н.Г. Золотилина, Э.А. Рыжкова, Н.И. Кигим // Журнал «**Инфекционные болезни**». Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2013. – Т. 11. – Прил. №1 – С.93.
  16. Воронина Н.А. Характеристика антибиотикочувствительности возбудителя дифтерии и *Corynebacterium non diphtheriae* / Н.А. Воронина, Я.Н. Фролова, А.Ю. Миронов, Т.Д. Гасретова, Г.Г. Харсеева, О.В. Карнаухова // Журнал «**Клиническая лабораторная диагностика**». XVII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России-2013». Материалы конференции. – Москва, 2013. – № 9. – С.73-74.
  17. Воронина Н.А. Микробиологическая характеристика штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, А.Р. Харисова, О.М. Бут, О.В. Карнаухова // Журнал «**Проблемы медицинской микологии**». Материалы Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической

микологии (XVI Кашкинские чтения). – Санкт-Петербург, 2013. – Т. 15. – № 2. – С. 64.

18. **Воронина Н.А.** Апоптоз иммунокомпетентных клеток, индуцированный штаммами *Corynebacterium non diphtheriae* / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, Т.Д. Гасретова, С.Ю. Тюкавкина, О.И. Сылка, Э.Л. Алутина, А.В. Лабушкина // Обмен веществ при адаптации и повреждении (дни лабораторной диагностики южного федерального округа). Материалы XII Региональной научно-практической конференции с международным участием. – Ростов-на-Дону, 2013, 17-18мая., С.74-76.
19. Фролова Я.Н. Действие нейтрофилокинов на апоптогенную активность, обусловленную коринебактериями / Я.Н. Фролова, **Н.А. Воронина**, Г.Г. Харсеева, С.Ю. Тюкавкина // Проблемы антибиотикорезистентности возбудителей внутрибольничных инфекций. Сб. научн-практ. работ / под общ. ред. Г.Г. Харсеевой. – Ростов-на-Дону: Изд-во РостГМУ, 2013. – С.59-61.
20. Воронина Н.А. *Corynebacterium riegelii* – потенциальный патоген урогенитального тракта / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, Е.В. Кудря, Ю.А. Доля, Т.Д. Гасретова, О.И. Сылка // Журнал «**Инфекционные болезни**». Материалы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, Москва. – 2014. – С. 65.
21. Воронина Н.А. Влияние нейтрофилокинов на апоптогенную активность возбудителя дифтерии и недифтерийных коринебактерий / Н.А. Воронина, Я.Н. Фролова, Г.Г. Харсеева, Т.Д. Гасретова // Журнал «**Проблемы медицинской микологии**». Материалы Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVII Кашкинские чтения). – Санкт-Петербург, 2014. – Т. 16. – № 2. – С. 53.
22. Воронина Н.А. *Corynebacterium non diphtheriae*: идентификация, свойства, роль в патологии / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева // Журнал «**Проблемы медицинской микологии**». Материалы Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVII Кашкинские чтения). – Санкт-Петербург, 2014. – Т.16. – № 2. – С. 142-143.
23. Воронина Н.А. Сравнительная характеристика методов идентификации представителей рода *Corynebacterium* / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, О.М. Бут, О.В. Карнаухова, Т.Д. Гасретова, А.В. Лабушкина // Журнал «**Клиническая лабораторная диагностика**». Форум «Национальные дни лабораторной медицины России-2014». Материалы конференции. – Москва, 2014. – № 9. – Т.59. – С.79-80.
24. **Воронина Н.А.** Регуляторное влияние нейтрофилокинов на апоптоз, индуцированный *Corynebacterium non diphtheriae* / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, С.Ю. Тюкавкина // Сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» / под ред. В.И.Покровского. – Москва, 2014. – Т.1. – С.256-257.
25. Рудова Т.С. Антибиотикочувствительность штаммов недифтерийных коринебактерий / Т.С. Рудова, А.Ю. Рязанова, Е.В. Пуха, **Н.А. Воронина** // Материалы 68-й Итоговой научной конференции студентов РостГМУ. – Ростов-на-Дону, 2014. – С. 4-5.
26. **Воронина Н.А.** Чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов

- Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области / Н.А. Воронина, Л.А. Бурлакова, Е.Л. Владимирова, Г.Г. Харсеева, Э.Л. Алутина, Я.Н. Фролова, О.И. Сылка // Сб. науч.-практ. работ Всероссийской научно-практической конференции «Воздушно-капельные инфекции микробиология, иммунология, эпидемиология». – Ростов-на-Дону, 2014. – С.14-15.
27. Воронина Н.А. Основные биологические свойства *Corynebacterium non diphtheriae* / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, О.И. Сылка, Я.Н. Фролова, А.В. Лабушкина // Журнал «**Инфекционные болезни**». Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – Москва, 2015. – Т.13.- С. 80-81.
28. **Воронина Н.А.** Гемолитическая активность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, О.И. Сылка, А.В. Лабушкина, А.А. Алиева, Э.Л. Алутина // Сб. науч.-практ. работ межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология эпидемиология, паразитология)». – Ростов-на-Дону, 2015. – С.27-29.
29. Лабушкина А.В. *Corynebacterium pseudodiphtheriae*: антагонистические и адгезивные свойства / А.В. Лабушкина, Г.Г. Харсеева, С.Ю. Тюкавкина, Т.Д. Гасретова, **Н.А. Воронина**, Я.Н. Фролова // Сб. науч.-практ. работ Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология)». – Ростов-на-Дону, 2015г. – С.77-79.

#### **Перечень сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов**

- AIg-a — антииммуноглобулиновая активность;
- ВДП — верхние дыхательные пути;
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИЗФ — индекс завершённости фагоцитоза;
- МПК — минимальная подавляющая концентрация;
- МУК, МУ — методические указания;
- Мф — макрофаги;
- Нф — нейтрофилы;
- НфК — нейтрофилокины;
- ПЦР — полимеразная цепная реакция;
- УГТ — урогенитальный тракт;
- ФИ — фагоцитарный индекс;
- ФЧ — фагоцитарное число;
- 16S рРНК — 16S рибосомальная рибонуклеиновая кислота;
- Ig — иммуноглобулин