

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Ростовский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Воронина Наталья Александровна

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: д. м. н., проф. Харсеева Г. Г.

Ростов-на-Дону – 2016

Содержание

	Стр
ВВЕДЕНИЕ	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
Недифтерийные коринебактерии: основные биологические свойства и роль в патологии	
1.1. Таксономия.....	16
1.2. Морфологические свойства.....	18
1.3. Культуральные свойства.....	26
1.4. Факторы патогенности.....	27
1.5. Методы идентификации	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Микробные штаммы.....	42
2.2. Методы определения основных биологических свойств штаммов недифтерийных коринебактерий.....	43
2.2.1. Морфологические, культуральные и ферментативные свойства	43
2.2.2. Методы идентификации.....	44
2.2.3. Токсигенные свойства	45
2.2.4. Адгезивная активность.....	45
2.2.5. Гемолитическая активность.....	46
2.2.6. Антииммуноглобулиновая активность	47
2.2.7. Антагонистические свойства.....	47
2.2.8. Чувствительность к антибактериальным препаратам.....	48
2.3. Методы исследования влияния недифтерийных коринебактерий на клетки иммунной системы	48
2.3.1. Выделение нейтрофилокинов, индуцированных недифтерийными коринебактериями.....	48
2.3.2. Фагоцитарная активность.....	49

	2.3.3. Апоптогенная активность.....	50
	2.3.4. Влияние нейтрофилокинов, индуцированных недифтерийными коринебактериями, на апоптогенную активность	51
	2.4. Методы статистической обработки результатов исследования.....	51
	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	57
ГЛАВА 3.	Недифтерийные коринебактерии и сравнительный анализ методов их идентификации	
	3.1. Морфологические, культуральные и ферментативные свойства	57
	3.2. Идентификация недифтерийных коринебактерий.....	61
ГЛАВА 4.	Патогенный потенциал недифтерийных коринебактерий	
	4.1. Гемолитическая, ДНК-азная и гемагглютинирующая активность.....	65
	4.2. Антииммуноглобулиновая активность.....	71
	4.3. Токсигенные свойства	73
	4.4. Антагонистические свойства	73
	4.5. Влияние недифтерийных коринебактерий на клетки иммунной системы	85
	4.6. Разработка биоинформационного алгоритма для установления этиологической значимости недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных процессов в организме человека	94
	4.7. <i>Corynebacterium riegelii</i> - необычный вид, выделенный от пациентки с туберкулезом мочевыводящих путей	98
ГЛАВА 5.	Антибиотикочувствительность штаммов недифтерийных коринебактерий, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области	101

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	114
ВЫВОДЫ	126
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	127
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Недифтерийные коринебактерии или *Corynebacteria non diphtheriae* (англ.) (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium riegellii*, *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 [51, 75, 84, 96, 104, 110, 139]. 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. [2, 65, 139, 148]. 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 [18, 55, 61, 65, 124, 129].

В настоящее время описано 88 видов коринебактерий, 53 из которых имеют медицинское значение [65, 72]. 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 [47, 61, 90, 104, 112]. 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 [17, 21, 44]. 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* [44, 96].

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 генно-инженерного анализа – секвенирование генов 16S рРНК [74, 163], в последние годы внедряется масс-спектрометрический анализ (MALDI-ToF-MS) [49]. 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 [55, 61, 66, 69]. 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 рРНК), 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, A1g-а по отношению к IgG) 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 riegelsii* «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 явилась 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-Оболенск» (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⁺*, ВН, 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. kefyr*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*.

Бактериологические методы

Идентификацию и основные биологические свойства недифтерийных коринебактерий проводили согласно Методическим рекомендациям [28] 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 Мф мышей изучали до и после добавления нейтрофилокинов (НфК) *in vitro* в соответствии с указаниями [14, 42].

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, исследования 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 2014 г., 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 объем информации, касающейся темы диссертации. Получено Свидетельство № 207 от 23.12.13г. о депонировании штамма *Corynebacterium riegelii* «Дон» в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболенск».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Недифтерийные коринебактерии: основные биологические свойства и роль в патологии

Недифтерийные коринебактерии – *Corynebacteria non diphtheriae* (англ.) (*Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium riegelii*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium jeikeium* и др.), являющиеся условно-патогенными микроорганизмами, колонизируют кожу и слизистые оболочки человека; некоторые виды встречаются во внешней среде и выделяются от животных.

Большинство видов коринебактерий, существующих в природе, не патогенны для человека, за исключением *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, вызывающих не только дифтериеподобные заболевания, но и псевдоперепончатый фарингит, умеренный фарингит, отит, лимфаденит, кожные язвы [23, 47, 54, 69, 80, 146]. Эта группа коринебактерий циркулирует среди животных (крупный рогатый скот, овцы, козы, кошки, собаки [10, 51, 70, 88, 165, 168] и является патогенной для человека и животных [10, 47, 51, 65, 68, 70, 88, 96, 104, 129, 146, 168]. Другие виды коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeium*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. matruchtotii*, *C. minutissimum*, *C. auriscanis*, *C. seminale* и др.) способны при определенных условиях вызывать менингиты, абсцессы мозга, перитониты, эндокардиты, инфекции верхних и нижних дыхательных путей, поражения кожи, сепсис и др. [1, 2, 3, 65, 66, 68, 69, 70, 75, 87, 96, 108, 148, 151]. Коринебактерии чаще вызывают гнойно-септические заболевания у лиц с вторичными иммунодефицитными состояниями, формирующимися у онкологических, гематологических больных, наркоманов, ВИЧ-инфицированных, пациентов с мультиорганной патологией, особенно

пожилых, и др. [1, 2, 17, 18, 21, 37, 44, 65, 84, 96, 112, 148]. Недифтерийные коринебактерии находят как преобладающие в этиологической структуре у больных с острыми заболеваниями верхних дыхательных путей в 10-15% случаев [96, 108], при инфекциях нижних мочевых путей - в 61,1% случаев [9, 34, 95].

1.1. Таксономия

По современной классификации [28] коринеформные бактерии, объединенные по 16S рРНК, входят в семейство *Corynebacteriaceae*, порядок *Actinomycetales*, класс *Actinobacteria*, тип *Actinobacteria*, домен Бактерии [63].

Термин «коринеформные» связан с плеоморфной палочковидной формой этих бактерий; термин «дифтероиды» в последнее время не употребляется, так как большинство видов не имеют сходства с *Corynebacterium diphtheriae*. Коринеформные бактерии делят на роды на основе хемотаксономических признаков, в частности, особенностей строения клеточной стенки и содержания G+C пар в ДНК [28].

Согласно *Funke G.* с соавт. (1997), гетерогенная группа коринеформных бактерий включает следующие роды: *Corynebacterium*, *Turicella*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Propionibacterium*, *Rothia*, *Exiguobacterium*, *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Sanguibacter*, *Microbacterium*, *Aureobacterium*, "*Corynebacterium Aquaticum*," *Arcanobacterium* и *Actinomyces* [96]. Среди представителей коринеформных бактерий выделяют клинически значимые роды или виды отдельных родов (*Corynebacterium*, *Turicella*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Rothia*, *Exiguobacterium*, *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Leifsonia*, *Arcanobacterium*, *Gardnerella*) [28, 96].

Род *Corynebacterium* включает 88 видов [63, 65, 72], из которых 53 вида имеют медицинское значение, являясь причиной инфекций человека или человека и животных [17, 22, 28, 51, 55, 75, 96, 104, 124, 129]. Остальные 35 видов коринебактерий выделены только от животных, птиц и из окружающей среды (вода, пищевые продукты, синтетические материалы) [65, 72]. Наиболее часто

встречаемыми медицински значимыми видами коринебактерий являются *C. pseudodiphtheriticum* (*C. hoffmanni*), *C. pseudotuberculosis* (*C. ovis*), *C. ulcerans*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. propinquum*, *C. riegliei*, *C. jeikeium*, CDC Group F-1 G Bacteria, *C. minutissimum*, *C. striatum*, *C. auris*, *C. glucuronolyticum*. Каждый из новых или редких видов коринебактерий, имеющих медицинское значение, исследован на наличие пропионовой кислоты в качестве продукта ферментации, что обеспечивает дополнительные хемотаксономические данные при дифференциации фенотипически близких видов [62].

Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC) (The United States and Canada) опубликовал схемы и методы для идентификации коринеформных бактерий на основе фенотипических особенностей штаммов из коллекции культур и дал предварительные "имена групп" таксонов *Corynebacterium* [65]. К предварительным "именам групп", имеющим отношение к роду *Corynebacterium*, относят следующие: группа CDC 6 (*C. accolens*), группа CDC ANF-1 (*C. afermentans*), группа CDC ANF-3 (*C. propinquum*), группа CDC D-1 (*C. pseudodiphtheriticum*), группа CDC D-2 (*C. urealyticum*), группа CDC F-2 (*C. amycolatum*), CDC группа G-1 (*C. macginleyi*), группа CDC G-2 (присвоено *C. tuberculostearicum*), CDC группа I-1 (*C. striatum*), CDC группа I-2 (*C. amycolatum*) и CDC группа J-K (*C. jeikeium*). Некоторые штаммы группы CDC F-1 от известных коллекций культур до сих пор не имеют определенного вида. Предварительные "имена групп", имеющие отношение к каталазо-положительным коринеформным бактериям, включают следующее: группа CDC A-1, A-2 (*Oerskovia* или *Cellulosimicrobium* spp.), CDC группы A-3, A-4 (*Cellulomonas* spp.), CDC группы A-4, A-5 (*Microbacterium* spp.), группа CDC B-1 и B-3 (в первую очередь *Brevibacterium casei*) и CDC группы 3 и 5 (*Dermabacter hominis*) [63, 65, 71, 86, 96].

1.2. Морфологические свойства

Недифтерийные коринебактерии - мелкие овоиды, коккоподобные или короткие прямые палочки, грамположительные, способные образовывать рудиментарные «ветви», но не мицелий. Располагаются в микропрепаратах в виде «частокола» из нескольких параллельно лежащих клеток. Коринебактерии кислотонеустойчивы, спор и капсул не образуют, обычно неподвижны [3, 24, 28, 29,33].

В структуре бактериальной клетки (рисунок 1.1) выделяют верхний слой, сложноорганизованную клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, цитоплазму и ядерную субстанцию - нуклеоид. По данным электронной микроскопии, клеточная оболочка тонких срезов после замораживания имеет слоистую организацию и содержит цитоплазматическую мембрану, толстый электронно-плотный (пептидогликан), электронно-прозрачный (корд-фактор) и тонкий внешний слой [72, 77, 122, 145]. Структура клеточной оболочки коринебактерий напоминает типичный вид таковой у микобактерий [72, 79, 91, 137].

Верхний слой содержит пили (фимбрии), микрокапсулу, поверхностные белки (PS-2, DIP1281, белок 67-72p (гемагглютинин), порины, сиалидазу (нейраминидазу).

Пили (фимбрии) - белковые нити, ковалентно связанные с пептидогликаном, расположены на поверхности коринебактерий [125, 131, 136, 161], среди представителей семейства *Corynebacteriaceae* впервые обнаружены у *C. renale* [41, 115, 120, 150, 161].

Строение пилей коринебактерий изучено на модели *C. diphtheriae*. Геном типового штамма *C. diphtheriae* NCTC13129, относящегося к эпидемическому клону *Rossija/Sankt-Peterburg*, представлен тремя различными кластерами: spaABC, spaDEF, spaHGI. Каждый кластер кодирует синтез фимбрий соответствующих типов SpaA, SpaD и SpaH, представленных основными белками SpaA, SpaD и SpaH, формирующими ось фимбрий [91, 160]. Помимо основных

белков в состав пилей входят и другие (малые) субъединицы: SpaB, SpaC, SpaF, SpaG и SpaI. SpaB равномерно распределяется вдоль стержня пили, а SpaC, SpaF и SpaG - на его конце [26, 41, 72, 143].

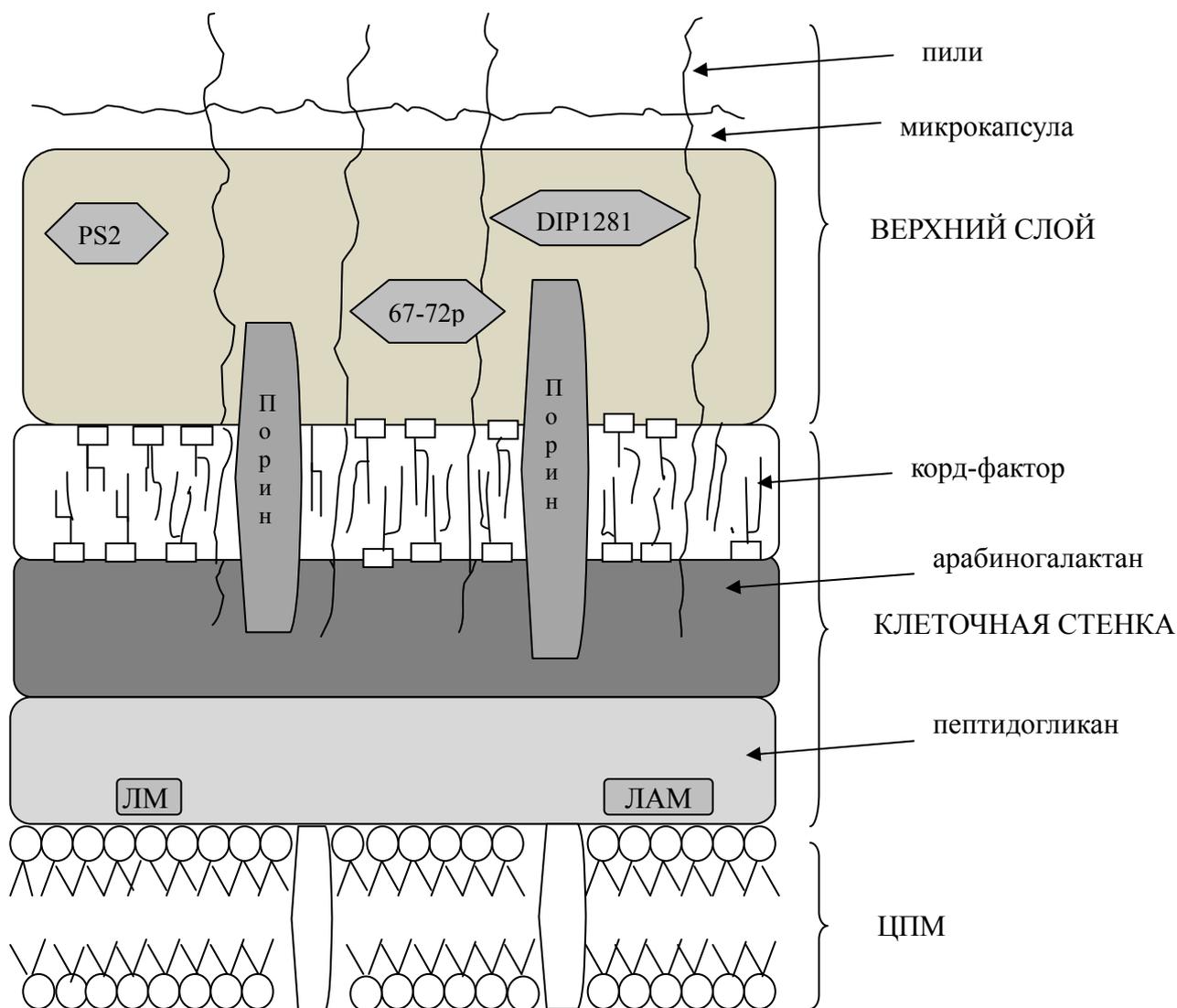


Рисунок 1.1 Схематическое изображение структуры клеточной оболочки коринебактерий.

Кластеры генов, кодирующих каждый тип фимбий, содержат гены сортаз (srt-surface protein sorting). Эти транспептидазы специфически катализируют ковалентное связывание фимбриальных протеинов между собой, а основание фимбрий - с клеточной стенкой бактерий. Для такого связывания в С-концевом участке молекулы белка имеется специфический сайт с аминокислотной

последовательностью LPxTG (где «x» обозначает любую аминокислоту). Сортаза расщепляет данную последовательность и связывает белок с определенной аминокислотой другого мономера, образуя, таким образом, полимерную основу фимбрии. Для катализируемого сортазами «заякоривания» белка в клеточной стенке важную роль играет располагающийся следом за LPxTG-участком гидрофобный мембранный домен, а также концевая часть молекулы с положительным зарядом. Фиксация белка в клеточной стенке наступает в результате сортазозависимого расщепления LPxTG-последовательности между треонином (T) и глицином (G) с последующим связыванием остатка треонина с аминокислотной группой пептидогликана [72, 91, 92, 100].

SpaA-тип фимбрий кодируется кластером генов *spaA-srtA-spaB-spaC*. Структурная основа пилия SpaA-типа состоит из большой SpaA-субъединицы, на боковой поверхности которой располагается малая субъединица SpaB, а на кончике пилия находится другая малая субъединица SpaC. Подобным образом устроены SpaD- и SpaH - пили. Большие субъединицы являются структурными компонентами пилей, а малые - функциональными [72], которые играют ключевую роль в адгезии [41, 72, 120] и инициируют взаимодействие возбудителя с клетками хозяина, обуславливая последующую колонизацию [41, 59].

Микрокапсула – слизистое образование, выявляемое только при электронной микроскопии; имеет липидную природу, прочно связана с остальными слоями клеточной стенки, выявляется как у неповреждённых, так и частично лизированных клеток [10].

Поверхностные белки коринебактерий разнообразны и многофункциональны.

PS-2 белок – образует поверхностный слой наружной мембраны некоторых коринебактерий. У *C. glutamicum* PS-2 белок имеет молекулярную массу около 63 кДа. При электронной микроскопии выявлена его упорядоченная кристаллическая гексагональная структура и определенная степень изменчивости у различных штаммов *C. glutamicum* [72].

Белок DIP1281 - представитель NlpC/P60 группы - большого надсемейства,

объединяющего несколько различных групп белков [52, 162]. Обуславливает адгезию, встречается у бактерий, бактериофагов, РНК-вирусов, эукариот, а также различных представителей коринебактерий (*C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum* и *C. jeikeium*) [142]. Мутации DIP1281 вызывают изменение белковых структур клеточной поверхности и формирование цепей бактерий. DIP1281 не является ключевым фактором при отделении пептидогликанового слоя делящихся бактерий: разрушение цепей не снижает жизнеспособность бактерий.

Белок 67-72p (гемагглютинин) – нефимбриальный поверхностный белок, кодирующийся геном DIP0733, обнаружен у штаммов *C. diphtheriae*, лишенных фимбрий, *C. pseudodiphtheriae*, *C. xerosis* [79]. Белок 67-72p способен распознавать и специфически связываться с эритроцитами человека, обуславливая их гемагглютинацию и давая тем самым возбудителю возможность распространяться по всему организму через кровь [156]. Белок 67-72p способен связываться и с клетками Нер-2 [134], что может блокироваться анти-67-72p-IgG-антителами. Установлена отрицательная корреляция между способностью *C. diphtheriae* к адгезии на клетках линии Нер-2 и эритроцитах: штамм с низкой гемагглютинирующей активностью показал высокие темпы адгезии к Нер-2-клеткам, и наоборот. Белок 67-72p способствует также инвазии *C. diphtheriae* в клетки Нер-2 и индуцирует их апоптоз [134].

Порины – каналобразующие белки, способствующие транспорту питательных веществ в клетку. Коринебактериальные порины функционально эквивалентны таковым грамотрицательных бактерий, но имеют совершенно иную структуру, представляя собой мультимерные α -спиральные субъединицы. Порины *C. glutamicum* представлены несколькими каналобразующими белками: PorA, PorB, PorC и PorH [72, 81, 82, 106, 117]. Их гомологи были найдены у *C. callunae*, *C. diphtheriae*, *C. efficiens* и *C. amycolatum* [72, 89].

Сиалидаза (нейраминидаза) - белковый фермент, представляющий собой гликозилгидролазу. Внеклеточная сиалидаза (экзосиалидаза) обнаружена у *C. diphtheriae*. Установлена взаимосвязь синтеза дифтерийного токсина, продукции сиалидазы и углеводного состава поверхности клетки *C. diphtheriae* с

концентрацией железа в среде [72].

Клеточная стенка почти всех видов коринебактерий имеет сложное строение и включает в свой состав корд-фактор, арабиногалактан, пептидогликан, липоманнан (ЛМ), липоарабиноманнан (ЛАМ) (рисунок 1.1).

Корд-фактор (фактор жгутообразования) представлен миколовыми кислотами (коринемиколатами), основой его является токсичный гликолипид - 6,6-димиколат трегалозы [72, 99, 107, 167]. Формирует второй барьер проницаемости, эквивалентный наружной мембране грамотрицательных бактерий, что является главной особенностью коринебактерий, нокардий и микобактерий. Эффективность этого барьера обусловлена содержащейся в нем миколовой кислотой [101, 107]. Внутренняя часть слоя миколовой кислоты коринебактерий сформирована, главным образом, миколовыми кислотами, связанными с арабиногалактаном; во внешнем слое преобладают трегалоза и глицерин-эстерифицированные миколовые кислоты и незначительное количество свободных миколовых кислот [99, 167].

Арабиногалактан - гетерополисахарид, состоящий из D-арабинозы и D-галактозы. Арабиногалактан у *C. glutamicum* состоит только из арабинозы и галактозы, у *C. amycolatum* и *C. xerosis* дополнительно содержит глюкозу [71, 144]. У *C. glutamicum* чередующиеся сшитые остатки D-галактозы образуют линейную цепочку примерно из 30 сахарных долей, сшитых с пептидогликаном. Арабиногалактан обеспечивает ковалентную связь не только с пептидогликаном, но и с наружной мембраной [50, 72].

Пептидогликан. Как и у других бактерий, гликановую часть макромолекулы пептидогликана составляют чередующиеся β -1,4-связанные N-ацетилглюкозаминовые и N-ацетиловые единицы мурамовой кислоты. Образование поперечных связей между различными полимерами гликана происходит через пептидные связи. Пептидогликан у *C. bovis*, *C. pseudodiphthericum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. striatum*, *C. ulcerans* и *C. xerosis* сшит напрямую; межпептидные мостики, которые можно обнаружить у других грамположительных бактерий, отсутствуют. Сложная архитектура

пептидогликана коринебактерий обеспечивает ригидность их клеточной оболочки и форму клеток [72, 102].

Липоманнан (ЛМ) и липоарабиноманнан (ЛАМ). У коринебактерий, как и у других прокариот, липидный бислой клеточной оболочки не симметричен. Причиной асимметрии является введение гликоконъюгатов в ее внешний слой [85]. Производные ЛМ и ЛАМ обнаружены у различных видов коринебактерий [145], причем распределение ЛМ- и ЛАМ-подобных веществ видоспецифично. Так, у *C. glutamicum* доминируют ЛМ-подобные молекулы, у *C. xerosis* и *C. amycolatum* - преимущественно ЛАМ-подобные вещества, тогда как у *C. diphtheriae* обнаружено практически равное распределение ЛМ и ЛАМ - производных [72, 130, 145].

Цитоплазматическая (или плазматическая) мембрана (ЦПМ) - основной диффузный барьер клеток, отделяющий цитоплазму от окружающей среды. ЦПМ коринебактерий состоит из фосфолипидов, собранных в липидный бислой, который дополнительно содержит другие полярные липиды, жирные кислоты (насыщенная пальмитиновая и ненасыщенная деценовая кислоты) и большое разнообразие белков. Такая структура ЦПМ необходима для реализации процессов переноса и биоэнергетики клетки [72]. Основными фосфолипидами ЦПМ являются фосфатидилглицерол, дифосфатидилглицерол и фосфатидилинозитол. Состав жирных кислот может существенно изменяться в зависимости от условий окружающей среды (низкая температура или наличие остатка углерода).

Жирные кислоты синтезируются путем последовательных циклов многоступенчатой реакции [147, 152]. Описано два различных типа синтеза жирных кислот (*fatty acid synthesis*) (FAS), которые основаны на их общем составе. При реализации типа FAS-I задействован крупный многофункциональный белковый комплекс, типа FAS-II - минимум семь функциональных областей, необходимых для синтеза жирных кислот.

Протеины FAS-I обнаружены у представителей семейства *Corynebacteriaceae*, в том числе, и *C. diphtheriae*. *C. glutamicum* и *C. efficiens*

содержат гены, кодирующие два комплекса протеинов типа FAS-I: FAS-IA и FAS-IB. У *C. glutamicum* FAS-IA играет ключевую роль, а FAS-IB - менее важен. Однако для мутантных штаммов, не имеющих FAS-IB, характерна измененная структура жирных кислот, включая и миколовые кислоты, что свидетельствует о необходимости наличия FAS-IB у штаммов коринебактерий дикого типа [147]. *C. glutamicum* содержит гены, кодирующие не только FAS-I, но и FAS-II [147], которые принимают участие в удлинении цепочек миколовой кислоты и у микобактерий. Тип FAS-II, обычно обнаруживаемый у бактерий, отсутствует у других коринебактерий, в частности, у *C. diphtheriae* [72].

Цитоплазма клеток коринебактерий представлена мелко-гранулярным компонентом с зонами повышенной плотности размером 20-40 нм (рибосомы, полисомы). В различных частях клеток обнаруживают значительное количество внутрицитоплазматических мембранных структур, расположенных в непосредственной близости от плазмолеммы и сохраняющих с ней анатомическую связь [10]. Цитоплазма коринебактерий содержит липиды, крахмал [33]. На электронограммах коринебактерий видны достаточно крупные и многочисленные включения - полиметафосфаты (гранулы волютинина или Бабеша-Эрнста диаметром 0,18-0,20 мкм), имеющие разрыхленную центральную часть и плотную осмиофильную периферию. Такие гранулы расположены вблизи нуклеоида или на концах клеток и являются резервуаром клеточной энергии [3, 10, 23, 33].

Геном (нуклеоид). В ультратонких срезах коринебактерий нуклеоид представлен небольшой, достаточно дифференцированной осмиофобной зоной, в которой располагаются тяжи, образованные слипшимися нитями ДНК [10].

Последовательность генома коринебактерий штамма *NCTC 13129 C. diphtheriae* биотипа *gravis* не отличается от таковой у *C. glutamicum* и *C. efficiens*. Геном представлен кольцевой двуцепочечной молекулой ДНК и содержит 2389 генов, из которых 2272 кодируют белки [76]. Помимо ДНК, в клетке коринебактерий имеется вторая нуклеиновая кислота - рибонуклеиновая (РНК), которая, в отличие от ДНК, состоит из одной цепи, имеет сахар рибозу

вместо дезоксирибозы и урацил вместо тимина. Основная масса РНК связана с белком в форме маленьких частиц или рибосом, которые являются центрами синтеза белка. Помимо рибосомальной РНК (рРНК), в цитоплазме бактерии находится еще информационная РНК (иРНК, или мРНК), осуществляющая функцию переноса генетической информации от ДНК к полисомам.

Рибосомные РНК (рРНК) - консервативные элементы бактерий. 16S рРНК входит в состав малой, а 23S рРНК - в состав большой субъединицы рибосом. Определение последовательности генов 16S рРНК является основой геносистематики, что используется в качестве эталона для идентификации и установления степени родства коринебактерий [63].

При идентификации и дифференциации близкородственных видов коринебактерий в настоящее время применяют различные молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование генов 16S рРНК и groB). В составе ДНК гомология генов фосфолипазы D (PLD) штаммов *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans* составляет 80%, гомология по аминокислотному и антигенному соотношению - 87% [96].

Ген groB – универсальный ген для филогенетического анализа и отличия близкородственных видов, а также идентификации неизвестных штаммов и семейств микроорганизмов в случаях, когда выявление последовательности генов 16S рРНК дает неоднозначные ответы. Частичное или полное определение последовательности генов groB наиболее широко используется для определения видов коринебактерий [65]. Определение полной последовательности groB-гена и области гена с высокой степенью полиморфизма (гипервариабельная область) позволяет более точно идентифицировать большинство видов коринебактерий [49, 65, 111].

1.3. Культуральные свойства

По типу дыхания одни из коринебактерий – облигатные аэробы, другие – факультативные анаэробы либо строгие анаэробы с различной каталазной активностью, в отдельных случаях обладающие подвижностью. Хемогетеротрофы. Углеводный метаболизм смешанный – дыхательный и бродильный [28, 29].

Многие виды недифтерийных коринебактерий культивируются при стандартных условиях роста (+35-37⁰С, рН 7,4-8,0), некоторые – при +20-22⁰С (*C. xerosis*, *C. freneyi*), +42⁰С (*C. jeikeium*) [28, 29, 65]. Для культивирования используют простые питательные среды (мясо-пептонный агар – МПА) [22, 44]; питательные среды, обогащенные аминокислотами, пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, кровяной агар (КА) с добавлением гемолизированной крови (5-10%), кровяная среда на основе питательного агара Колумбия, сывороточный агар с добавлением лошадиной или бычьей сыворотки (10-20%); среды с добавлением теллурита калия (кровяно-теллуритовый агар (КТА), среда Клауберга II, Тинсдейла-Садыковой, хинозольная среда Бучина, «Коринебакагар»); среды с добавлением липидов (среда Твин-80, триптон-соевый агар (TSA)) [28, 54].

Липофильные виды рода *Corynebacterium* растут в бульоне плохо, на МПА - в виде крошечных точечных колоний в течение 24 часов. При добавлении в агар или бульон экзогенных липидов (Твин 80) рост интенсифицируется [28, 65].

При выделении *C. non diphtheriae* из клинического материала для ингибирования роста сопутствующей микрофлоры используют среды, содержащие теллурит калия. Коринебактерии резистентны к относительно высоким концентрациям 2% раствора теллурита калия (до 20 мл/л) способны за счет продукции теллуритредуктазы восстанавливать теллурит калия до металлического теллура и накапливать его внутри клеток, что придает колониям серо-черную или черную окраску. На теллуритовых средах коринебактерии

образуют колонии округлые, суховатые (некоторые виды – влажные), мелкие (диаметром около 1 мм), гладкие или шероховатые, черные или матовые с серым ободком или серые колонии с коричневым центром, иногда радиально исчерченные. На среде Бучина (с хинозолом) – голубоватые колонии; на кровяном агаре - желтоватые, серые или белые с кремовым оттенком S-колонии, реже – R-колонии (*C. pseudotuberculosis*) с неровным краем, иногда гемолизирующие, диаметром 1-2 мм.

Особенностью рода *Corynebacterium* (*C. pseudodiphtheriticum*, *R. equi*, *C. kutscheri* и др.) является способность колоний окрашиваться от ярко-белых, кремовых до бледно-желтых, оранжево-красных и коралловых цветов [3]. Некоторые штаммы продуцируют зеленовато-желтый пигмент, розовый или темно-серый, диффундирующий в среду; в бульоне дают зернистый осадок или нежную, ломкую, полупрозрачную серо-белую пленку [33].

1.4. Факторы патогенности

Недифтерийные коринебактерии обладают факторами патогенности (пили, микрокапсула, компоненты клеточной стенки, ферменты патогенности, токсины), позволяющими последовательно взаимодействовать с эпителием входных ворот организма, преодолевать клеточные и гуморальные механизмы защиты, размножаться *in vivo* и оказывать патогенное воздействие.

Пили (фимбрии) - фактор адгезии, инициирующий взаимодействие возбудителя с клетками хозяина, необходимое для последующей колонизации [41, 59, 120, 129, 136, 161]. Кластеры генов фимбрий найдены как у патогенных, так и непатогенных коринебактерий, включая *C. accolens*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. glucuronolyticum*, *C. jeikeium*, *C. pseudogenitalium*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum* и *C. urealyticum* [153, 161]. Каждый тип пилей (SpaA, SpaD и SpaH) реагирует с соответствующими структурами (рецепторами) эпителиальных клеток [119], что позволяет коринебактериям колонизировать различные виды слизистых оболочек. Наличие пилей различных типов у одного микроорганизма

обуславливает их избирательную функциональную активность, тропность к определенным клеткам и тканям. При отсутствии SpaA-субъединицы и, соответственно, нитевидных выростов SpaA-типа, коринебактерии остаются способными адсорбироваться на фарингеальных клетках, а в отсутствии малых субъединиц SpaB- и SpaC-типа – нет. Это объясняется тем, что большие субъединицы являются структурными компонентами пилей, а малые – функциональными компонентами, играющими ключевую роль в адгезии [41, 72, 120]. Малые субъединицы фимбриальных протеинов (SpaB, -C, -E, -F, -G, -I) могут быть связаны не только с большими фимбриальными субъединицами (SpaA, -D, -H), но и непосредственно с клеточной стенкой [120, 121], которая также обладает способностью к адгезии [119]. Формирование пилей и скорость адгезии - не связанные процессы. Штаммы, их не имеющие, также могут прикрепляться к клеткам хозяина [142], что указывает на наличие иных, помимо пилей, факторов адгезии. Попадая в кровяное русло, коринебактерии связываются с фибриногеном и трансформируют его в фибрин, который, формируя слой на поверхности бактериальной клетки, защищает их от фагоцитоза [72]. Как токсигенные, так и нетоксигенные штаммы видов коринебактерий способны адгезироваться на поверхности макрофагов и вызывать их гибель. У патогенных коринебактерий (*C. diphtheriae* и *C. jeikeium*), имеющих совершенную систему поглощения ионов калия, устойчивость к фагоцитозу более выражена, чем у непатогенных (*C. glutamicum*) [72, 138, 150].

Кроме пилей существуют и другие неполимерные адгезины, которые распознают различные структурные элементы поверхности клеток хозяина, в том числе, компоненты внеклеточного матрикса – коллаген, эластин, протеогликианы, гиалуроновую кислоту.

Нейраминидаза (сиалидаза) и N-ацетилнейраминидаза обеспечивают разрушение сиаловых/нейраминовых кислот и других моносахаридов, входящих в состав гликопротеидов на поверхности клетки хозяина, и, как следствие, нарушают структуру и функции ЦПМ, повышая ее проницаемость. Освобождают клеточную поверхность и интенсифицируют межклеточное взаимодействие [41,

72] с токсинопродуцирующими штаммами, подготавливая рецепторы эпителия для прикрепления токсина.

Гиалуронидаза разрушает гиалуроновую кислоту, входящую в состав основного межклеточным веществом соединительной ткани. Способствует проникновению микробов вглубь тканей организма, является фактором инвазивности.

Уреаза расщепляет мочевины с образованием аммиака и углекислоты. Аммиак, вызывая защелачивание среды, подавляет клеточное дыхание и обеспечивает прямой токсический эффект на органы центральной нервной системы. Уреаза отсутствует у *C. diphtheriae*, однако обнаружена у *C. riegelii*, *C. urealyticum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. ulcerans* и, реже, *C. amycolatum*. Наиболее высокой ее активностью обладают *C. riegelii* и *C. urealyticum*, у которых данный фермент рассматривается как фактор патогенности [97].

Микрокапсула защищает коринебактерии от фагоцитоза, действия факторов внешней среды, обеспечивает способность к колонизации.

Поверхностные белки, входящие в состав верхнего слоя коринебактерий, обнаружены у *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum*, *C. jeikeium* и *C. pseudotuberculosis*. Одни из них имеют функции поглощения питательных веществ и роста, другие - принимают участие в процессах адгезии [72, 158]. Поверхностно-связанный белок DIP1281, он же и адгезин, выявленный у *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum* и *C. jeikeium* [146], рассматривается как фактор инвазивности [52, 162]. Поверхностные липиды считают одним из главных факторов патогенности у *C. pseudotuberculosis* [73, 88], индуцирующим геморрагический некроз после внутрикожной инъекции морской свинке [88] и развитие хронического абсцесса у мышей [88]. Липиды внешней оболочки *C. pseudotuberculosis* (*C. ovis*) оказывают цитопатическое воздействие на макрофаги коз и мышей, повреждая целостность их оболочки. При заражении макрофагов факультативным внутриклеточным паразитом *C. pseudotuberculosis* происходит поглощение бактерий и образование фаголизосомы, причем макрофаги погибают, а бактерии выживают, ускользая от иммунного ответа

хозяина [88, 128].

Коринебактериальные порины образуют каналы во внешней бактериальной мембране, способствуя транспорту питательных веществ в клетку. Обнаружены у *C. glutamicum*, *C. amycolatum*, *C. efficiens*, *C. callunae* и *C. diphtheriae* [41]. Известно несколько различных каналообразующих белков – PorA, PorB, PorC и PorH, основными из которых являются PorA и PorH. У штаммов *C. glutamicum* выявлена чрезвычайно высокая изменчивость PorA и PorH. Сравнительные исследования двух штаммов *C. glutamicum* – дикого и мутантного, лишённого PorA, показали значительное снижение чувствительности последнего к ампициллину, канамицину, стрептомицину, тетрациклину и гентамицину. Мутации в генах поринов могут приводить к появлению устойчивости бактерий к антибиотикам, кроме того, порины увеличивают вирулентность коринебактерий посредством подавления фагоцитоза.

Клеточная стенка ограничивает микробную клетку снаружи, обеспечивая стабильность размеров и формы коринебактерий, ее механическую, осмотическую и химическую защиту. Корд-фактор выполняет роль барьера проницаемости; вызывает разрушение митохондрий, угнетение дыхания и ингибирует процессы фосфорилирования клеток мышечной ткани; обуславливает незавершенность процессов фагоцитоза, препятствуя образованию фаголизосомы и приводя к гибели клеток [72, 103]. Составные элементы слоя миколовых кислот, входящих в состав корд-фактора, могут активировать систему врожденного иммунитета, способствуя экспрессии TLR, и ингибировать функцию макрофагов [102]. ЛМ и ЛАМ клеточной стенки способствуют связыванию коринебактерий с эпителиальными клетками хозяина. У *C. glutamicum* липоарабиноманнан и его производные способны инициировать иммунный ответ, взаимодействуя с TLR2, активируя дендритные клетки и Т-хелперы [72, 145].

Некоторые виды недифтерийных коринебактерий, помимо указанных факторов патогенности, обладают способностью продуцировать токсины. Так, *pld*-ген, кодирующий выработку PLD-экзотоксина (фосфолипаза D, гемолитический токсин или "*ovis toxin*") с м.м. 31,4 кДа, обнаружен у *C. pseudotuberculosis* и

C. ulcerans [58, 73, 127, 129, 139]. PLD-экзотоксин катализирует диссоциацию сфингомиелина, увеличивает проницаемость сосудов и обладает гемолитической активностью [139], обуславливая распространение *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans* в организме (проникновение в фагоциты, транспорт в регионарные лимфатические узлы, выживание внутри клеток) [56]. PLD-экзотоксин вызывает поражения кожи и в более высоких дозах является смертельным для лабораторных и домашних животных [88]. Регуляция активности PLD-экзотоксина – сложный процесс, играющий важную роль в адаптации *C. pseudotuberculosis* к изменяющимся условиям среды обитания в организме хозяина на разных этапах инфекционного процесса. Установлено, что температурное воздействие (+43⁰С) в течение 20 мин. приводит к снижению экспрессии PLD вследствие уменьшения содержания м-РНК, кодирующей синтез PLD. Однако многие детерминанты вирулентности бактерий регулируются более чем одним фактором окружающей среды (температура, фазы роста, наличие питательных веществ, рН, осмотическое давление). Для *C. pseudotuberculosis* установлена прямая зависимость экспрессии PLD от густоты микробной взвеси в среде и обратная – от воздействия температуры. При этом действие температуры +43⁰С снижает уровень экспрессии PLD независимо от базального уровня густоты микробной взвеси. Механизмы контроля и регуляции гена-промотора PLD остаются пока невыясненными. Процессы регуляции PLD обусловлены многофакторным воздействием (колебание температур, истощение питательной среды, изменение скорости роста микробной популяции) и могут включать в себя такие механизмы, как связывание репрессоров или активаторов, изменение структуры ДНК *C. pseudotuberculosis* под действием температуры. Высокий уровень экспрессии PLD выявлен у *C. pseudotuberculosis* внутри макрофагов при их экспериментальном заражении. Рассматривается несколько механизмов снижения жизнеспособности макрофагов, пораженных *C. pseudotuberculosis*. Во-первых, этот эффект может быть связан с нарушением целостности плазматической мембраны макрофагов под действием сфингомиелиназной активности PLD. Во-вторых, после гибели макрофагов клеточное содержимое с

PLD выходит в среду, в результате чего происходит повреждение сфингомиелина наружной мембраны еще жизнеспособных макрофагов. Снижение жизнеспособности макрофагов под действием PLD может быть обусловлено и нарушением целостности зон цитоплазматических мембранных внутриклеточных структур макрофагов, внутри которых расположены *C. pseudotuberculosis*, что приводит к выходу бактерий из этой ограниченной области. Третий механизм действия PLD внутри макрофагов может быть связан с нарушением главной каскадной системы регуляции (сигнальных путей) у млекопитающих. PLD в естественных условиях (*in vivo*) приводит к увеличению проницаемости сосудов, в результате чего бактерии распространяются от места внедрения инфекции к лимфатическим узлам, где образуются абсцессы. Экспрессируемый внутриклеточными бактериями PLD имеет прямое влияние на жизнеспособность макрофагов и формирование абсцесса. При экспериментальном заражении овец *C. pseudotuberculosis* наблюдали кратковременное повышение температуры тела животных в первый день после инфицирования. Вероятно, на ранних стадиях инфекционного процесса *C. pseudotuberculosis* размножается внеклеточно. При этом экспрессии PLD не происходит из-за подавляющего воздействия высокой температуры (теплового шока) животного и небольшого количества внеклеточно расположенных бактерий. Затем, по всей видимости, происходит повторное заражение клеток [58, 127].

Процесс инфицирования организма хозяина *C. pseudotuberculosis* состоит из нескольких этапов [127]. Вначале бактерии должны преодолеть кожный барьер, как правило, через раневую поверхность или любые повреждения кожных покровов, а затем попасть в лимфатические узлы. Это происходит как до, так и после интернализации бактерий внутрь фагоцитирующих клеток. В лимфатических узлах бактерии должны пройти циклы размножения и повторного заражения новых фагоцитов. Затем происходит выход бактерий из лимфатического узла с последующим повторением всего цикла. Внешняя среда, кровь, лимфатические узлы и внутриклеточная среда макрофагов обуславливают адаптацию коринебактерий для их дальнейшего выживания и потребления

питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности и репликации. Экспрессия PLD *C. pseudotuberculosis* осуществляется в ответ на воздействие факторов внешней среды, что приводит к развитию инфекционного процесса в макроорганизме [127].

Наиболее выраженными токсигенными свойствами обладают S-формы *C. pseudotuberculosis*, R-формы менее токсигенны. Установлено, что понижение температуры культивирования на МПА до +2-4⁰С приводит к повышению токсинообразования всех форм культур. Заражение белых мышей фильтратом культур вызывало в 65% случаев гибель на 3-8 сутки. При патолого-анатомическом вскрытии у мышей обнаруживали отеки, кровоизлияния в брюшной и грудной полостях [10].

Другими важными факторами вирулентности *C. pseudotuberculosis* являются интегральный мембранный белок (FagA), энтеробактин (FagB), АТФ-связывающий цитоплазматический мембранный белок (FagC), железосвязывающий белок сидерофора (FagD). Их синтез связан с опероном, отвечающим за поглощение железа, что обеспечивает выживание *C. pseudotuberculosis* в организме животных. Этот оперон локализован рядом с геном PLD. Нахождение семи предполагаемых островков патогенности у *C. pseudotuberculosis*, содержащих классические элементы вирулентности, в том числе, генов поглощения железа, фимбриальных субъединиц, инсерционных элементов и секретируемых токсинов, вероятно, приобретены, главным образом, в результате горизонтального переноса [155].

Способность к токсинообразованию среди *C. non diphtheriae*, помимо *C. pseudotuberculosis*, имеют и *C. ulcerans*, имеющие тесные филогенетические связи с *C. diphtheriae*, обладая дифтерийным tox-геном. У некоторых штаммов *C. ulcerans* обнаружен токсин, идентичный дифтерийному, который вырабатывается в результате спонтанной лизогенизации умеренным фагом, несущим tox⁺-ген [58, 73, 157]. Помимо этого, у штаммов *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* имеется PLD-токсин, обладающий фосфолипазной и сфингомиелиназной активностью. Токсигенность коринебактерий связана с

лизогенностью (наличием у токсигенных штаммов умеренных фагов/профагов, несущих tox-ген) [58, 97]. Горизонтальный перенос генов является одним из основных механизмов приобретения бактериями новых свойств. Показано, что перенесенные по горизонтали гены токсигенности часто отключаются и становятся псевдогенами, не производящими токсинов [69, 165]. Токс-псевдогены *C. diphtheriae* схожи с tox-генами *C. ulcerans*, что является подтверждением горизонтального переноса генов между штаммами коринебактерий. Однако tox-ген *C. ulcerans* не идентичен таковому у *C. diphtheriae* вследствие большой неоднородности генетической последовательности в отличие от высококонсервативного генома *C. diphtheriae*. В то же время обнаружено сходство в последовательностях геномов *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* и их четкое отличие от генома *C. diphtheriae* [157].

Одной из причин проявления патогенных свойств недифтерийных коринебактерий является липофильность и гидрофобность некоторых видов, среди которых лидируют *C. jeikeium*, вызывающие сепсис и другие инфекции у хирургических больных. *C. jeikeium* относится к CDC группе G2 – второй по частоте встречаемости среди коринебактерий, вызывающих тяжелые инфекции. У этиологически значимых штаммов обнаружена мультирезистентность к антибиотикам. Среди коринеформных бактерий поверхности кожи человека почти 85% из них являются липофильными. Гидрофобность играет важную роль в бактериальной адгезии, обеспечивает формирование биопленки и облегчает распространение в организме внутри фагоцитов. Усиление гидрофобности способствует более интенсивному образованию биопленки, особенно в условиях развития инфекции при дефиците железа [57, 133, 140]. Причина гидрофобности заключена в особом строении различных видов длинноцепочечных коринемиколовых кислот, длина цепей от 22 до 35 атомов углерода (специфично для всего рода *Corynebacterium*). Липиды, ответственные за барьерную функцию, могут быть прекрасной базой для присоединения гидрофобных бактерий. Липидный слой – это ключ к колонизации кожи этими бактериями, которым необходимы липиды для роста. Наиболее гидрофобными и активными в

образовании биопленки бактериями являются *C. jeikeium* (CDC группа G2). Липофильные коринебактерии остаются в динамическом равновесии с коагулазо-негативными стафилококками. Смешанная популяция коринебактерий и стафилококков способствует формированию взаимно поддерживающегося симбиоза, который может эффективно противостоять иммунной системе и действию антибиотиков [116].

Таким образом, реализация патогенных свойств недифтерийных коринебактерий осуществляется за счет их способности к адгезии, инвазии и продукции факторов патогенности. Адгезия является необходимым условием для размножения коринебактерий и колонизации слизистых оболочек организма. Коринебактерии посредством поверхностных белков (DIP1281, PS2, 67-72p), пилей или фимбрий распознают рецепторы клеток хозяина и связываются с их мембранами. Процесс адгезии облегчается действием ферментов нейраминидазы, гиалуронидазы, а также корд-фактора. Нейраминидаза, повышая проницаемость ЦПМ, приводит к нарушению ее структуры и функции; гиалуронидаза способствует проникновению коринебактерий вглубь тканей организма, корд-фактор нарушает процессы тканевого дыхания и фосфорилирования человеческих клеток, способствуя формированию устойчивости коринебактерий к фагоцитозу. Белки 67-72p и DIP1281 обуславливают помимо адгезивных и инвазивные свойства, способствуя проникновению коринебактерий внутрь клеток с последующей персистенцией в них, что ведет к нарушению их жизнедеятельности. Способность некоторых видов недифтерийных коринебактерий (*C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*) продуцировать токсины (дифтериеподобный и PLD-токсин), обладающие фосфолипазной и сфингомиелиназной активностью, оказывает токсическое воздействие на организм. За счет сфингомиелиназной активности происходит повреждение ЦПМ клетки хозяина путем ферментативного гидролиза, что обеспечивает быстрое проникновение и распространение бактерий в макроорганизме.

Недостаточность естественного иммунитета, формирование вторичных иммунодефицитных состояний, социальные и другие условия способствуют

активации синтеза факторов патогенности недифтерийных коринебактерий, вследствие чего развивается инфекционное заболевание.

1.5. Методы идентификации

Традиционно основой идентификации недифтерийных коринебактерий является метаболический профиль. Выявление фенотипических особенностей коринебактерий проводится культуральным методом на основе определения их ферментативной и окислительной активности, наличие или отсутствие которой определяется на питательных средах или с использованием тест-систем для идентификации [29, 30, 42, 65]. Использование дифференциально-диагностических сред – "пробирочных" тестов для определения гидролиза сахаров, крахмала, наличия нитратредуктазы, фосфатазы, цистиназы, пиразинамидазы, уреазы, тирозиназы эффективно для видов *C. non diphtheriae*, медленно разлагающих сахара или требующих липидной добавки [64, 65]. Многие из этих тестов характеризуются достаточно высокой воспроизводимостью, точностью, быстротой выполнения, приемлемой стоимостью и доступны для практических лабораторий. Эти тесты незаменимы, когда идет проверка диагностической эффективности новых тест-систем.

Бактериологический метод исследования с применением "пробирочных" тестов, особенно для медленно растущих видов коринебактерий, может занимать от 7 до 14 дней и давать неоднозначные результаты, что является главным и существенным недостатком. Липофильные виды коринебактерий могут плохо расти на питательных средах и давать ложные результаты при фенотипической идентификации, что затрудняет установление их видовой принадлежности.

Биохимическое тестирование может выполняться и с использованием идентификационных тест-систем для *Corynebacterium spp.* и некоторых коринеформных бактерий. Идентификацию осуществляют визуально или с помощью автоматизированных систем, основанных на базе данных для характеристики этих бактерий [65, 94, 149]. Данный метод требует много времени

(не менее 16 часов для обработки результатов после выделения подозрительных колоний) и не всегда даёт надёжную информацию на видовом уровне [164].

Существуют определенные ограничения по использованию фенотипического тестирования в качестве единственного метода идентификации. Ограниченное количество субстратов в панелях тест-систем не обеспечивает определение достаточного набора биохимических признаков, отличающих соответствующие виды. Это усугубляется для тех видов бактерий, которые являются метаболически неактивными, имеют замедленный рост, являются близкородственными (например, *C. amycolatum* и *C. xerosis*) [65]. Необходимо учитывать, что фенотипические признаки коринебактерий могут изменяться под воздействием антибактериальных препаратов [163]. Стоимость тест-систем для идентификации возрастает с увеличением числа субстратов, присутствующих в панели. Лежащие в основе тест-систем базы данных обновляются редко, что затрудняет идентификацию.

Фенотипическое тестирование в качестве единственного подхода к идентификации может быть удовлетворительным для обычных видов рода *Corynebacterium*, которые хорошо растут в течение 24-48 часов и являются биохимически активными по отношению к субстратам, находящимся в обычно используемых тест-системах. Для окончательной идентификации трудно определяемых видов недифтерийных коринебактерий рекомендуется проводить молекулярно-биологическое исследование [65].

«Золотым стандартом» идентификации признан метод генно-инженерного анализа – секвенирование генов 16S рРНК (ДНК), генов groV и PLD [74, 163]. При этом 16S рРНК (ДНК), groV- и PLD-гены используются в качестве молекулярных маркёров (мишеней) бактерий [74].

Секвенирование генов 16S рРНК позволяет выявить различия в последовательностях генов у большинства видов рода *Corynebacterium*, отличающихся на 1,3% или с большей дисперсией (при сравнении последовательности всего гена), а также величину критерия идентичности >98,7% для представителей одного вида [159]. Исключение составляют следующие виды

рода *Corynebacterium* с уровнем дисперсии $\leq 2\%$ друг к другу: *C. afermentans*, *C. coyleae*, *C. mucifaciens* ($< 2\%$); *C. aurimucosum*, *C. minutissimum*, *C. singulare* ($< 2\%$); *C. sundsvallense*, *C. thomsseni* ($< 1,5\%$); *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* ($< 1\%$ друг к другу и $< 2\%$ к *C. diphtheriae*); *C. propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum* ($< 2\%$); *C. xerosis*, *C. freneyi*, *C. hansenii* ($< 2\%$), *C. macginleyi*, *C. accolens* ($< 2\%$) [65].

Установлено, что у микроорганизмов часто встречаются множественные копии гена 16S рРНК. Последовательности этих внутригеномных копий могут отличаться между собой для одного микроорганизма [74]. Обусловленный этим высокий внутривидовой полиморфизм генов 16S рРНК затрудняет идентификацию. При сравнительном анализе последовательности генов 16S рРНК процент гомологии между штаммами *C. coyleae*, *C. afermentans*, *C. musifaciens* составляет 97,7-98,5% [62], штаммами *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* - 98,5%, *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* - 98,5%, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* - 99,7%. [163].

Окончательная и более точная идентификация может быть получена путем секвенирования второстепенного гена groВ, когда секвенирование генов 16S рРНК даёт неоднозначные ответы. Частичное или полное секвенирование гена groВ как универсального для филогенетического анализа и отличия близкородственных видов является наиболее широко используемым подходом для межвидовой характеристики коринебактерий [65, 111]. Выявление последовательности гипервариабельной области гена groВ позволяет идентифицировать неизвестные микроорганизмы в исследуемом материале, что является несомненным преимуществом данного подхода [163]. Степень идентичности генетической последовательности при секвенировании гипервариабельной области groВ заметно ниже и составляет между штаммами *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* – 93,6%, а между *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* – 86,0%. [62, 163].

Большим преимуществом молекулярно-генетических методов исследования является обнаружение уникальных отличий в последовательностях геномов у различных видов коринебактерий: наличие генов вирулентности, ответственных за синтез нейраминидазы и PLD у *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans*; отсутствие

кластера генов, ответственных за продукцию некоторых сахаролитических ферментов; наличие генов, кодирующих синтез чёрного пигмента у *C. aurimicosum*, защищающего от высоких концентраций перекиси водорода в организме; наличие локуса уреазы у *C. urealyticum* и *C. riegelii* [65].

Совместное использование мультиплексной ПЦР, осуществляющей секвенирование генов 16S рРНК, groB- и PLD-генам, позволяет дифференцировать такие виды как *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans* [62, 163]. Несмотря на то, что секвенирование генов 16S рРНК и groB дают схожие результаты, для обнаружения groB не требуется секвенирование всего генома, что более трудоёмко и может занимать до нескольких дней.

Сведения о геномных последовательностях 16S рРНК коринеформных бактерий занесены и хранятся в известных базах данных, таких как GenBank. На сегодняшний день доступны многочисленные последовательности генома не только для *C. diphtheriae*, но и недифтерийных бактерий, в том числе *C. aurimicosum*, *C. bovis*, *C. jeikeium*, *C. kroppenstedtii*, нескольких штаммов *C. pseudotuberculosis*, *C. resistens*, двух штаммов *C. ulcerans*, *C. urealyticum*, *C. variabile* [62, 65].

Использование сложных, дорогостоящих, требующих специально подготовленного персонала молекулярно-генетических методов исследований доступно малому числу лабораторий, что создаёт сложности при идентификации коринебактерий [163].

В последние годы для быстрой идентификации микроорганизмов, в том числе и недифтерийных коринебактерий, в лабораторной практике внедряется масс-спектрометрический анализ (MALDI-ToF-MS), позволяющий определить специфический для каждого вида микроорганизмов масс-спектр рибосомальных белков [27, 65, 164, 166].

Масс-спектрометрический метод (MALDI-ToF-MS) позволяет идентифицировать род *Corynebacterium* на уровне видов и может широко применяться как быстрый скрининговый метод, в том числе, для обнаружения токсигенных штаммов коринебактерий [27, 114]. В ходе данного метода белки,

высвобождаемые из бактерий, ионизируются и детектируются масс-спектрометром (MS), в котором анализируется спектр белков [32]. Процесс автоматизирован (после калибровки прибора), масс-спектры изолята генерируются и сравниваются с базой данных референтного спектра. Программа сопоставляет спектр исследуемого изолята с известными спектрами в библиотеке данных, фиксируя перечень возможных микроорганизмов (ранжированных по шкале или в процентах) и оценивая уровень достоверности идентификации. Далее определяется коэффициент совпадения (Score Value). Результаты идентификации со значением коэффициента $Score \geq 2,0$ считаются достоверными на уровне вида, от 1,999 до 1,700 - на уровне рода; $< 1,700$ – свидетельствует о ненадёжной идентификации. Метод MALDI-ToF-MS полезен для применения в клинической микробиологии за счёт сочетания мощных аналитических возможностей и хорошо составленной базы данных о спектрах микроорганизмов. Доступны две коммерческие системы (включающие коммерческие базы данных) – Bruker Biotyper (Bruker Daltonics) с использованием программного обеспечения Flex-control для идентификации штаммов рода *Corynebacterium* и VITEK[®] MS (bioMerieux) [32, 49, 65, 164]. Одиночные и множественные изоляты могут быть исследованы одновременно. Сроки идентификации сокращаются при этом на 24-72 часа, а аналитическое время оборота теста составляет ≤ 3 мин на изолят. Технология, за редкими исключениями, не применяется непосредственно к клиническим образцам – микроорганизмы должны предварительно быть культивированы и пока ещё сохраняется необходимость подготовительной обработки. Для проведения исследования требуется мало расходных материалов и реагентов, не требуется серьёзной и длительной подготовки методики. Данная технология обладает низкой стоимостью расходных материалов без учёта стоимости прибора MALDI-ToF-MS [32, 65, 98, 114].

При сравнении результатов видовой идентификации недифтерийных коринебактерий масс-спектрометрическим методом с «золотым стандартом» (секвенированием генов 16S рРНК) 57-87% изолятов определялись точно. Исключение составили *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, которые MALDI-

ToF-MS определил как генетически близкородственные виды *C. minutissimum* и *C. propinquum* соответственно [164]. Большинство из указанных штаммов (около 70%) имели при MALDI-TOF-MS индекс Score $\geq 2,0$ [27, 32, 35].

В применении данного подхода к идентификации недифтерийных коринебактерий существуют некоторые ограничения. Во-первых, метод позволяет определять только известные виды коринебактерий, что является существенным недостатком в случае обнаружения новых видов. Во-вторых, необходимо учитывать существование близкородственных видов коринебактерий, таких как *C. propinquum* и *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum* и *C. minutissimum*, различия между которыми позволяют выявить только молекулярно-генетические методы исследования [65]. В-третьих, результаты масс-спектрометрического анализа для достоверности необходимо подтверждать основными фенотипическими и биохимическими характеристиками исследуемых видов (морфология колоний, тест на оксидазу, гемолитические свойства, темпы роста, другие дополнительные тесты) [110]. В-четвёртых, причиной ошибки при идентификации методом MALDI-ToF-MS может служить то, что точечные или слизистые колонии содержат недостаточное количество белка для получения идеального спектра [49]. Метод MALDI-ToF-MS может дополнять традиционные фенотипические методы идентификации коринебактерий, введенные в базу данных [35], но требует дальнейшего совершенствования для определения более широкого спектра представителей рода *Corynebacterium*.

В настоящее время необходим комплексный подход к идентификации недифтерийных коринебактерий, который включает в себя хемотаксономическую, фенотипическую, генотипическую информацию, необходимую для достоверного описания новых клинически значимых видов коринебактерий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Микробные штаммы

При проведении исследований использовали штаммы:

– Недифтерийные коринебактерии (217 шт.): *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*, выделенные от больных (105 шт.): из ВДП (75 шт.) с острыми и хроническими тонзиллитами, фарингитами, ларингитами, бронхитами, скарлатиной и др., а также УГТ (17 шт.) с пиелолнефритами, туберкулезом мочевыводящей системы, кольпитом и др., с поверхности кожи (13шт.) от больных с аллергическими заболеваниями, дерматитами, гнойно-воспалительными заболеваниями и практически здоровых лиц (112 шт.) из ВДП (72 шт.) и УГТ (40 шт.). Штаммы получены 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⁺*, ВН, *seromun 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. aeruginosae*, выделенные из ВДП от больных 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 из ВДП (зев, нос) и УГТ (моча) от больных с лейкозом, заболеваниями мочевыводящих путей (пиелонефриты, мочекаменная болезнь), беременных и лиц, проходивших профилактическое обследование. Штаммы получены из Клинико-диагностической лаборатории ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава РФ.

2.2 Методы определения основных биологических свойств штаммов недифтерийных коринебактерий

Основные биологические свойства штаммов недифтерийных коринебактерий определяли в соответствии с рекомендациями, изложенными в инструктивных документах [28, 29].

2.2.1. Морфологические, культуральные и ферментативные свойства

Морфологические свойства и чистоту культуры проверяли в мазках, окрашенных синькой Леффлера, по методу Нейссера и Грама [28, 29].

Культуральные свойства коринебактерий исследовали при посеве культур на КТА, коринебакагар, КА, сывороточный агар и МПА в течение 24–48 часов при +37°C [28, 29].

Определение степени высеваемости коринебактерий из дыхательных путей, урогенитального тракта и поверхности кожи проводили по методу Голда на кровяном, кровяно-теллуриновом и коринебакагаре [31].

Ферментативную активность изучали путем определения ферментов цистиназы (на среде Пизу), уреазы (мясо-пептонный бульон с мочевиной), а также способности расщеплять глюкозу, сахарозу, мальтозу, ксилозу, маннитол, крахмал и вызывать редукцию нитратов [28]. Дезоксирибонуклеазную (ДНК-азную) активность микроорганизмов определяли в соответствии с инструкцией с

помощью специальной среды – агара для теста на ДНК-азу с толуидиновым синим (производство фирмы «Himedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия). Посев микроорганизмов на пластинку агара осуществляли в виде бляшки диаметром 5-7 мм, инкубировали 24-72 часа при + 37⁰С. Наличие и активность ДНК-азы определяли по изменению цвета среды (с синего на розовый) вокруг сформированной бляшки: более 6 мм - высокая, от 2 до 6 мм - средняя, до 2 мм - низкая.

2.2.2. Методы идентификации

Идентификацию штаммов недифтерийных коринебактерий проводили с помощью бактериологического метода, секвенирования по 16S рРНК и методом масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS).

Бактериологический метод исследования осуществляли в соответствии с Методическими рекомендациями [28, 29], а также использовали тест-системы Api Coryne (производства фирмы «bioMerieux, Inc», Франция).

Секвенирование штаммов недифтерийных коринебактерий по 16S рРНК проводили с помощью праймеров для коринебактерий (ЗАО «Синтол», г.Москва). Полученные результаты сравнивали с базами данных геномных последовательностей (рибосомная дифференциация микроорганизмов, GenBank).

Для проведения MALDI-ToF-MS из подозрительных на коринебактерии колоний, выращенных на кровяно-теллуритовом и кровяном агаре, получали чистые культуры, которые наносили на мишень масс-спектрометра (MSP-чип). Полученные культуры смешивали в чашке Петри в объеме 2 мкл матрицы, представляющей собой α -циано-гидроксикоричную кислоту (HGGA, Bruker Daltonics) в 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. Смесь готовили путем добавления 1 мкл органического растворителя к 10 мг HGGA, затем смешивали на вортексе в течение 30 минут до полного растворения кристаллов гидроксикоричной кислоты. Далее раствор использовали в качестве матрицы для кристаллизации белков. В качестве стандарта калибровки использовали

коммерческий препарат DH5-alpha E.coli (Bruker bacteria test standart). Определяли коэффициент совпадения (Score Value). Результаты идентификации со значением коэффициента Score >2,0 считали достоверными. Учет результатов проводили с помощью прибора Bruker Daltonics Biotyper (Германия) с использованием программного обеспечения Flex-control для идентификации штаммов рода *Corynebacterium* и сравнением со спектрами из базы данных.

2.2.3. Токсигенные свойства

Токсинообразование штаммов недифтерийных коринебактерий определяли с помощью теста Элека [29]. Учёт результатов теста на среде ОТДМ с 15±5% сывороткой крупного рогатого скота проводили через 24-48 часов по образованию линий преципитации, сливающихся с линиями преципитации контрольных токсигенных штаммов.

Для тестирования гена дифтерийного токсина использовали ПЦР со специфическими праймерами, комплементарными двум участкам гена дифтерийного токсина с помощью программы Vector NTI: прямой TCATTGAGGAGTAGGTCCCGATTGG – *for Dt* и обратный GCCACGTTTTCCACGGGTTTC – *rev Dt*. Праймеры были синтезированы в НПО «Литех» (г. Москва). Для этого был амплифицирован участок ДНК длиной 755 пар нуклеотидов гена дифтерийного токсина (от 143 пары до 897 включительно). Температурный режим ПЦР был следующим: (93°C – 30 сек) – 1 цикл; (93°C-20 сек, 60°C-20 сек., 73°C-30 сек.) – 35 циклов; (73°C – 60 сек.) – 1 цикл.

2.2.4. Адгезивная активность

Адгезивную активность микроорганизмов исследовали с помощью метода полуколичественного титрования гемагглютинирующей активности культур коринебактерий, в котором результаты учитывали по 4-х (+) системе [15, 16].

2.2.5. Гемолитическая активность

Гемолитическую активность штаммов недифтерийных коринебактерий исследовали по методу Грейга по наличию гемолиза (лаковая кровь) в пробирке с суточной бульонной культурой коринебактерий и 1%-ной взвесью эритроцитов I (0) группы крови человека. Для этого к 1 мл 18-24-часовой культуры недифтерийных коринебактерий, выращенной в 4-5 мл мясопептонного бульона добавляли 1 мл 1%-ной взвеси эритроцитов, трижды отмытых в физиологическом растворе (опыт). В качестве контроля использовали смесь 1 мл бульона и 1 мл 1%-ной взвеси эритроцитов. Содержимое контрольных и опытных пробирок осторожно перемешивали встряхиванием и помещали в термостат на 2 часа при температуре $+37,0 (\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$, затем в холодильник на 16-18 часов. Предварительный учет результатов осуществляли через 2 часа, а окончательный – на следующий день.

Учет результатов проводили визуально и с помощью мультискана «Labsystems Multiskan MS» (Финляндия). При визуальном учете при положительной реакции наступает полный (+) или частичный (+/-) лизис эритроцитов («лаковая кровь»). При отрицательной реакции и в пробирке с отрицательным контролем гемолиз эритроцитов отсутствует (-), они в виде пуговки оседают на дно пробирки [24]. Для проведения инструментального учета реакции по 100 мкл содержимого из контрольных и опытных пробирок вносили в полистироловые планшеты с плоским дном (ОАО «Фирма Медполимер», Санкт-Петербург, Россия) и учитывали на мультискане «Labsystems Multiskan MS» при длине волны 450 нм. Положительным считали результат определения оптической плотности в лунке, превышающий соответствующие значения содержимого лунки с отрицательным контролем на 0,1 оптическую единицу: 0,120-0,190 – отрицательная; 0,191-0,290 – низкая; 0,291-0,390 – средняя; 0,391 и выше – высокая гемолитическая активность.

2.2.6. Антииммуноглобулиновая активность

Антииммуноглобулиновую активность (AIg-a) недифтерийных коринебактерий определяли в соответствии с указаниями [6]. Учет результатов проводили с помощью мультискана «Labsystems Multiskan MS» (Финляндия) при длине волны 450 нм. Величину AIg-a определяли по шкале: 10,0-30,0 – низкая; 31,0-60,0 – средняя; 61,0-90,0 – высокая. Расчет уровня AIg-a каждого класса иммуноглобулинов производили по формуле:

$$\text{AIg-a} = \frac{C_k - C_0}{C_0} \times 100\%$$

, где

C_k - концентрация остаточного иммуноглобулина в контроле, мкг/мл;

C_0 - концентрация остаточного иммуноглобулина в опыте, мкг/мл.

2.2.7. Антагонистические свойства

Антагонистические свойства штаммов недифтерийных коринебактерий и представителей условно-патогенной микрофлоры исследовали на плотной питательной среде (МПА). Для этого на пластинку агара (2% агар, приготовленный на мясо-пептонном бульоне, толщиной 15-20 мл) засеивали радиальными штрихами штаммы (не более 6), помещали в термостат при +37⁰С на 24 часа. По истечении срока между выросшими полосками штамма-антагониста засеивали прерывистым кругом культуры микробов (тест-микроб) так, чтобы полукруглые полоски нигде не соединялись с радиальными и были на расстоянии 1-2 мм, затем чашки помещали в термостат при +37⁰С на 24 часа. Антагонистом считали тот штамм, от полоски роста которого на расстоянии 10-20 мм отсутствовал рост тест-микроба [5].

2.2.8. Чувствительность к антибактериальным препаратам

Определение чувствительности штаммов недифтерийных коринебактерий к 8 антибактериальным препаратам (АБП), применяемым в клинической практике (бензилпенициллину, цефотаксиму, цефазолину, эритромицину, гентамицину, рифампицину, линкомицину, ванкомицину) проводили методом серийных разведений (микрометодом) в жидкой питательной среде [30]. Результаты метода дисков оценивали по величине зоны задержки роста, метода серийных разведений – по значениям МПК (минимальной подавляющей концентрации) в мг/л, при которой наблюдали полную задержку роста исследуемого микроорганизма. Для контроля метода использовали чувствительные к антибиотикам эталонные штаммы *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853. Для характеристики степени чувствительности коринебактерий к антибактериальным препаратам вычисляли МПК для 50% и 90% исследованных штаммов и определяли диапазоны колебаний МПК [8].

2.3. Методы исследования влияния недифтерийных коринебактерий на клетки иммунной системы

2.3.1. Выделение нейтрофилокинов, индуцированных недифтерийными коринебактериями

Для получения нейтрофилокинов (НфК) мышам вводили внутривенно 2 мл 0,1% раствора гликогена на стерильном забуференном изотоническом растворе натрия хлорида (рН 7,2). Умерщвление животных осуществляли методом цервикальной дислокации после предварительной наркотизации с помощью тиопентала натрия в дозе 5мг/кг через 4 часа после введения препарата. Перитонеальный экссудат, содержащий до 90% нейтрофилов (Нф), получали путем вымывания из брюшной полости мышей средой 199 (10 мл), содержащей

20% инактивированной (+56⁰С, 30 мин.) сыворотки крупного рогатого скота, 5 ед/мл гепарина и пенициллин (100 мг/л). В качестве индуктора синтеза НфК использовали клетки недифтерийных коринебактерий густотой 0,5 КОЕ (500 млн.клеток/мл). Контролем служил 0,15 М раствор натрия хлорида. Длительность примирования клеток указанными препаратами составила 4 часа при +37⁰С в атмосфере 5% СО₂. После окончания срока инкубации супернатанты получали центрифугированием культуральных жидкостей при 1000 об/мин в течение 10 мин. и изучали регуляторное влияние полученных НфК на фагоцитарную активность макрофагов (Мф) и их устойчивость к апоптогенному действию исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий.

2.3.2. Фагоцитарная активность

Фагоцитарную активность макрофагов (Мф) определяли по следующим показателям: фагоцитарное число (ФЧ) – среднее количество поглощенных частиц на 1 клетку; фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток; индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) – отношение количества колоний в контроле к количеству колоний в опыте. Для постановки реакции фагоцитоза [14] перитонеальный экссудат (0,8 мл) смешивали с микробной взвесью исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий густотой 0,5 КОЕ (0,04 мл) и НфК (опыт) или изотоническим раствором натрия хлорида (контроль) в объеме по 0,04 мл. Для определения ФЧ и ФИ через 15 минут инкубации готовили мазки и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Для определения ИЗФ проводили высевы из полученных смесей в объеме 0,02 мл на чашки с 20% сывороточным агаром через 1,5 часа. Чашки инкубировали при +37⁰С 24 часа, после чего проводили подсчет количества выросших колоний и определяли ИЗФ.

2.3.3. Апоптогенная активность

Апоптогенную активность штаммов недифтерийных коринебактерий определяли на белых беспородных мышах (19-21г) из вивария Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону государственный научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора». Умерщвление животных осуществляли методом цервикальной дислокации после предварительной наркотизации с помощью тиопентала натрия в дозе 5 мг/кг. Объектом исследования послужили перитонеальные Мф мышей. Клетки получали после асептического воспаления, вызванного внутрибрюшинным введением 1% пептонной воды рН 7,2 (2 мл). Взятие клеток проводили промыванием брюшной полости животных средой 199 (10 мл), содержащей 5 ед/мл гепарина, 20% инактивированной (56⁰С, 30 мин.) сыворотки крови человека и пенициллин – 100ед/мл. Для исследования использовали 24-х часовые агаровые культуры недифтерийных коринебактерий. Из агаровых культур готовили микробные взвеси густотой 5 КОЕ (500 млн. клеток/мл) их разведения 1:10. Из пробирки с бульонной культурой отбирали надосадочную жидкость и разводили ее в 10 раз. В опыте использовали микробные взвеси в разведении 1:10 (50 мкл), которые соединяли с экссудатом из брюшной полости мышей (500 мкл) и подслаивали под покровное стекло, вложенное в стерильный пенициллиновый флакон. Время инкубации микроорганизмов с Мф для недифтерийных коринебактерий – 3 часа. Флаконы инкубировали при +37⁰С. Контролем являлась культура Мф, к которой добавляли раствор Хенкса без микробной взвеси. При 3-х часовой экспозиции стекла через 1 час промывали в 6 порциях стерильного раствора Хенкса, переносили в стерильные пенициллиновые флаконы с 2 мл среды 199 с 20% инактивированной сыворотки и пенициллина – 100 ед/мл и вновь инкубировали при +37⁰С в течение 2 часов. После инкубации стекла подсушивали, фиксировали 20 минут и окрашивали по Май-Грюнвальду с докрасиванием по Романовскому-Гимзе [42]. Мазки высушивали и

просматривали в микроскопе при увеличении 90x7. В мазках подсчитывали процент клеток с апоптозом. При условии обнаружения в контрольных мазках 94±1% жизнеспособных Мф подсчитывали процент клеток с апоптозом в опытных образцах. Средний показатель вычисляли по трем экспериментам.

2.3.4. Влияние нейтрофилокинов, индуцированных недифтерийными коринебактериями, на апоптогенную активность

Апоптогенную активность штаммов недифтерийных коринебактерий в отношении перитонеальных Мф мышей изучали до и после добавления НфК *in vitro* по характерным морфологическим изменениям в клетках при окрашивании по Май-Грюнвальду и докрасиванием по Романовскому-Гимзе [42]. Для исследования использовали взвеси культур коринебактерий густотой 0,5 КОЕ (500 млн.клеток/мл) в разведении 1/10, которые соединяли с перитонеальным экссудатом и НфК или изотоническим раствором в равных объемах.

2.4. Методы статистической обработки результатов исследования

На начальном этапе формировали выборки штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных и практически здоровых лиц, а также в зависимости от биотопа. Далее было проверено распределение изучаемых показателей в группах на соответствие нормальному распределению. При этом использовали модуль «частотный анализ» в программе STATISTICA 7.0, который позволяет вычислить сразу три статистических критерия проверки распределения: Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса (Lilliefors) и Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's). В последнее время критерий Шапиро-Уилка W признается наиболее эффективным, так как обладает большей мощностью по сравнению с альтернативными критериями проверки нормальности [43]. В связи с этим, при одновременном расчете трех критериев, окончательное решение о распределении формировалось при анализе критерия Шапиро-Уилка. Если доверительная

вероятность критерия значима ($p \leq 0,05$), то гипотеза о том, что соответствующее распределение нормально, отвергалось.

Информация о проверке на нормальность распределения показателей в изучаемых группах использовалась в дальнейшем при основании выбора статистического критерия.

В работе исследованные величины были представлены в виде выборочного среднего значения и стандартной ошибки средней величины.

Достоверность различий средних величин независимых выборок (то есть между группами) оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента при нормальном законе распределения и непараметрического критерия Манна-Уитни при отличии распределения показателей от нормального. Критерии Стьюдента и Манна-Уитни предназначены для оценки различий между двумя выборками по уровню какого-либо признака, количественно измеренного. Данные методы оценки достоверности различия средних чаще всего используются в научных исследованиях и при соблюдении условий не имеют противопоказаний к применению [11].

Проверка статистических гипотез относительно различия средних с использованием критерия Стьюдента для независимых выборок осуществлялась при выполнении следующих условий: две выборки независимые; распределение показателей в выборках соответствует нормальному закону распределения; дисперсии двух выборок равны между собой [39].

Если одна или две выборки при сравнении их выборочных средних соответствовали совокупностям, не подчиняющихся нормальному распределению, то для проверки статистических гипотез относительно различия средних использовали непараметрический U критерий Манна-Уитни. Таким образом, критерий Манна-Уитни представляет непараметрическую альтернативу t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Преимущество его состоит в том, что мы отказываемся от предположения нормальности распределения и одинаковых дисперсий. Если объем выборки больше 20, то распределение выборки для U статистики быстро сходится к нормальному распределению [36]. Поэтому вместе

с U статистикой рассчитываются z значение (для нормального распределения и соответствующее p -значение). U критерий – наиболее мощная (чувствительная) непараметрическая альтернатива t -критерия Стьюдента для независимых выборок.

Интерпретация t -критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни была по существу одинаковой. Каждому наблюдаемому значению критерия рассчитывался достигаемый уровень значимости p . Критическим считали уровень значимости $p=0,05$. Если достигаемый уровень значимости был больше критического $p>0,05$, то принимали нулевую гипотезу об отсутствии статистически значимого различия средних. Если достигаемый уровень значимости был равен или меньше критического $p\leq 0,05$, то нулевая гипотеза отвергалась в пользу конкурирующей гипотезы и делалось заключение о статистически значимом различии выборочных средних. Данная методика заменяет метод сравнения эмпирического и теоретического значений критериев при принятии той или иной из статистических гипотез.

При сравнении дискретных переменных (качественных показателей) использовался критерий χ^2 Пирсона с поправкой Мантеля-Хэнзеля на правдоподобие (M-L Chi-square), а также критерий Фишера.

Факторы, влияющие на исход, принято называть факторами риска, независимыми переменными. А сам исход – зависимой переменной или эффектом. Важным моментом, обуславливающим необходимость многомерного анализа, является именно многообразие потенциальных факторов риска, возможно связанных с исходом.

В клинических исследованиях при изучении факторов риска, влияющих на исход, чаще всего используется три метода: множественная линейная регрессия (multiple linear regression), множественная логистическая регрессия (multiple logistic regression) и модель пропорциональных интенсивностей Кокса (Cox proportional hazards model).

В таблице 2.1 представлены наиболее существенные характеристики этих методов.

Таблица 2.1 – Основные модели многомерного анализа

Вид анализа	Тип данных	Особенности
Множественная линейная регрессия	Диапазон значений исхода	Коэффициенты при переменной линейно связаны с (вливают на) результатом
Множественная логистическая регрессия	Дихотомические результаты (Да/Нет)	Модель ограничивает вероятность исхода от 0 до 1
Модель пропорциональных интенсивностей Кокса	Период времени до события (время до выздоровления/рецидива/смерти)	Применяется для продолжительных исследований, в которых объекты могут быть потеряны во время наблюдения

Для построения биоинформационного алгоритма для прогнозирования развития патологических процессов в организме человека, обусловленных недифтерийными коринебактериями, использовали метод логистической регрессии. Модель была разработана совместно с доцентом кафедры медицинской и биологической физики ГБОУ ВПО РостГМУ, к.м.н. Демидовой АА. Логистическая регрессия используется, когда значение переменной результата являлось бинарным (да/нет или 1/0) и включало одну или более независимых переменных. Логистическая регрессия – это разновидность множественной регрессии, назначение которой состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными (называемыми также предикторами) и зависимой переменной. С помощью бинарной логистической регрессии можно оценивать вероятность того, что событие наступит для конкретного испытуемого (например, больной/здоровый).

Важной характеристикой регрессионной модели является коэффициент детерминации R^2 , показывающий, какая доля совокупной вариации в зависимой переменной описывается выбранным набором независимых переменных. Величина R^2 изменяется от 0 до 1. Как правило, данный показатель должен превышать 0,5 (чем он выше, тем показательнее построенная регрессионная

модель). Если $R^2 = 0,43$ — это значит, что регрессионной моделью описано только 43 % случаев. Таким образом, при интерпретации результатов регрессионного анализа следует постоянно иметь в виду существенное ограничение: построенная модель справедлива только для 43% случаев. Коэффициент детерминации рассчитывали как для модели в целом, так и для отдельных факторов модели.

Исходя из значений чувствительности и специфичности, нами было использовано построение характеристической кривой (ROC-кривая или Receiver Operator Characteristic curve) с помощью ROC-анализа (использован модуль программы MedCalc 9.3.5.0). ROC-кривая показывает зависимость количества верно диагностированных положительных случаев от количества неверно диагностированных положительных случаев. В терминологии ROC-анализа первые называются истинно положительным, вторые – ложноотрицательным множеством [38].

ROC-кривая получается следующим образом. Для каждого значения порога отсечения, которое меняется от 0 до 1 с шагом 0,01, рассчитываются значения чувствительности Se и специфичности Sp . Строится график зависимости: по оси Y откладывается чувствительность Se , по оси X – $100\% - Sp$ (доля ложноположительных случаев). Для идеального классификатора график ROC-кривой проходит через верхний левый угол, где доля истинно положительных случаев составляет 100% или 1.0 (идеальная чувствительность), а доля ложноположительных примеров равна нулю. Поэтому чем ближе кривая к верхнему левому углу, тем выше предсказательная способность фактора или теста. Наоборот, чем меньше изгиб кривой и чем ближе она расположена к диагональной прямой, тем менее эффективен тест или исследование. Диагональная линия соответствует "бесполезному" классификатору, т.е. полной неразличимости двух классов [7].

Ключевым моментом ROC-анализа является нахождение дифференциальной точки разделения или порога отсечения, или точки *cut-off*. Порог отсечения нужен для того, чтобы применять тест на практике: относить новые примеры к одному из двух классов в зависимости от соотношения величины показателя с точкой *cut-off*.

Порог отсечения соответствует максимальной диагностической чувствительности и специфичности метода [20].

Порог отсечения использовали в модели как величину разделения риска на высокий и низкий.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы *STATISTICA 7.0* (*StatSoft Inc.*, США) и *MedCalc* (версия 9.3.5.0).

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 3. Недифтерийные коринебактерии и сравнительный анализ методов их идентификации

Учитывая видовое разнообразие недифтерийных коринебактерий и широкий спектр заболеваний, при которых они выделяются, особое значение имеет правильная их идентификация, которая позволит оценить клиническую значимость и выбрать адекватные средства антибактериальной терапии. Традиционно основой идентификации недифтерийных коринебактерий является метаболический профиль. Выявление фенотипических особенностей коринебактерий проводится культуральным методом на основе определения наличия или отсутствия сахаролитических энзимов и других ферментных систем [42] с использованием отечественных и зарубежных тест-систем для идентификации. «Золотым стандартом» идентификации признан метод генно-инженерного анализа - секвенирование по 16S рРНК, который является дорогостоящим и требует наличия специально подготовленного персонала [163]. В последние годы для быстрой идентификации микроорганизмов, в том числе и недифтерийных коринебактерий, в лабораторной практике внедряется масс-спектрометрический анализ (MALDI-ToF-MS), позволяющий определить специфический для каждого вида микроорганизмов масс-спектр рибосомальных белков [49].

3.1. Морфологические, культуральные и ферментативные свойства

Исследованы штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные от практически здоровых обследованных и больных с различной патологией.

При световом микроскопическом исследовании недифтерийные коринебактерии имели вид прямых или слегка изогнутых грамположительных

полиморфных коротких палочек, некоторые имели бочкообразную и кокковидную формы. В мазках располагались чаще одиночно, реже парами или стопками из нескольких параллельно лежащих клеток («палисадом»). Окрашивались неравномерно, часто имели метахроматические гранулы. При окраске по методу Нейссера на концах или в середине палочек выявлены зерна волютина. Никаких отличий по морфологическим и тинкториальным свойствам между различными видами недифтерийных коринебактерий установлено не было.

При исследовании культуральных свойств различных видов коринебактерий (таблица 3.1) наблюдали отличия по таким признакам, как цвет колоний, характер поверхности, размеры и консистенция. Размеры колоний, выросших на средах КТА и КА, находились в пределах от 0,5-1,0 мм (*C. xerosis*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, *C. paurometabolum*), 1,0-2,0 мм (*C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. glutamicum*, *C. cystitidis*, *C. pilosum*, *C. propinquum*, *C. riegelii*, *C. minutissimum*) и 1,0 - 3,0 мм в диаметре (*C. pseudodiphtheriticum*). Сроки культивирования составляли от 24 до 72 часов при первичном посеве.

Выращенные колонии имели выпуклую, глянцевою, блестящую, гладкую, матовую или шероховатую поверхность. Цвет колоний на КА – чаще белый, кремовый, у некоторых видов серый (*C. amycolatum*) или с желто-зеленым пигментом (*C. striatum*); на КТА колонии однородно черные или серого цвета. На КА некоторые коринебактерии образовывали слабую зону гемолиза (*C. pseudotuberculosis*). Характер края колоний коринебактерий был, в основном, ровный, для некоторых видов - волнистый (*C. amycolatum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*); консистенция колоний - чаще сухая, реже - влажная, маслянистая (*C. xerosis*).

При изучении ферментативных свойств недифтерийных коринебактерий выявлено, что все исследованные виды были каталазоположительны и не обладали цистиной активностью (кроме *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans*). Некоторые виды были инертны ко многим углеводам (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. paurometabolum*, *C. propinquum*, *C. riegelii*) или обладали замедленной ферментативной реакцией (*C. riegelii*). Уреазная активность, являющаяся

Таблица 3.1 – Культуральные и ферментативные свойства штаммов недифтерийных коринебактерий

Вид	Характер колоний (на КТА и КА)	Ферментативные свойства									
		кага лаза	глюко за	саха роза	маль тоза	крах мал	редук ция нит ратов	уреаз а	цис ти наза		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	КА – белые, кремовые S-колонии; КТА – сухие, мелкие, с гладкой поверхностью, серые с коричневым центром и ровными краями, 1,0-3,0 мм в диаметре.	+	-	-	-	-	+	+	-		
<i>C. xerosis</i>	КА – мелкие, круглые гладкие или шероховатые колонии; КТА- выпуклые, влажные, серого цвета после 24 ч инкубации, 0,5-1,0 мм в диаметре.	+	+	+	+	-	+/	-	-		
<i>C. amycolatum</i>	КА – серые плотные колонии с неровным краем; КТА – выпуклые, влажные, серого цвета, 1,0-2,0 мм диаметром	+	+	+/	+/	-	+/	+/	-		
<i>C. striatum</i>	КА через 48 ч – мелкие, блестящие, круглые колонии со слабой зоной гемолиза; некоторые образуют желто-зеленый пигмент; КТА – темно-серые, влажные, 1,0-2,0 мм диаметром	+	+	+	-	+	+/	-	-		
<i>C. pseudotuberculosis</i>	КА – колонии мелкие, желтоватые, с неровным краем, узкая зона гемолиза; КТА – колонии однородно черные, суховатые, 0,5-1,0 мм в диаметре.	+	+	+/	+	-	+/	+	+		
<i>C. ulcerans</i>	КА – колонии светлые, блестящие; КТА – через 24 ч образуют черные матовые сухие колонии с неровным краем и серым ободком, до 1,0 мм в диаметре.	+	+	-	+	+	-	+	+		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>C. paurometabolum</i>	КА – колонии светлые в S-форме; КТА - мелкие суховатые колонии, 0,5-1,0 мм в диаметре.	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glutamicum</i>	КА колонии светлые, блестящие, S-формы, диаметром 1,0-2,0 мм после 24 ч инкубации; КТА – темно-серые, блестящие, суховатые.	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>C. cystitidis</i>	КА – колонии светлые, блестящие, суховатые, S-формы; КТА – через 48-72 ч образуют колонии однородно черные, 1,0-2,0 мм в диаметре.	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>C. pilosum</i>	КА колонии кремовые, гладкие, блестящие, диаметром 1,0-2,0 мм после 24 ч инкубации; КТА – колонии серые, блестящие, суховатые, в S-форме.	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>C. propinquum</i>	КА – колонии светлые, блестящие, S-формы, реже сухие, диаметром 1,0-2,0 мм после 24 ч инкубации; КТА – колонии черные, блестящие, в S-форме.	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. riegelii</i>	КА - колонии белые или с кремовым оттенком, влажные; КТА светло-серые, гладкие, блестящие, S-формы, диаметром 1,0-2,0 мм после 24 ч инкубации.	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>C. minutissimum</i>	КА - колонии кремовые, гладкие, блестящие, диаметром до 2,0 мм после 24 ч инкубации; КТА – колонии черные, сухие, гладкие после 24 ч инкубации.	+	+	+/-	+	-	-	-	-

постоянным видовым признаком у *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, *C. glutamicum*, *C. cystitidis*, *C. pilosum*, *C. riegelii* и вариабельным у *C. amycolatum*, обнаружена у 109 из 217 исследованных штаммов коринебактерий. При этом от больных с различной патологией выделено значительно большее количество уреазоположительных штаммов (65,7%), чем от практически здоровых (35,7%).

3.2. Идентификация недифтерийных коринебактерий

Для анализа эффективности трех методов идентификации недифтерийных коринебактерий (бактериологического, молекулярно-генетического (секвенирование генов 16S рРНК), масс-спектрометрического (MALDI-ToF-MS)) исследовано 49 штаммов недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. propinquum*, *C. falsenii*) и 2 штамма *C. diphtheriae* (*C. diphtheriae gravis tox⁻* и *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» геном токсигенности (отрицательный в тесте Элека и положительный в ПЦР)), выделенные из верхних дыхательных путей от больных с острым и хроническим тонзиллитом, острым ринитом, с поверхности кожи от больных с дерматитами различной этиологии, из урогенитального тракта от пациентов с острым и хроническим пиелонефритом, острым кольпитом, а также практически здоровых лиц, проходивших профилактическое обследование.

Идентификацию штаммов недифтерийных коринебактерий проводили с помощью бактериологического метода, секвенирования генов 16S рРНК, методом масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS).

При видовой идентификации полное совпадение результатов трех методов исследования (бактериологического, молекулярно-биологического, масс-спектрометрического) обнаружено у 26 (51,0%) штаммов недифтерийных коринебактерий. По результатам MALDI-ToF-MS индекс Score находился в пределах >2 у 24 штаммов (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*), что расценивалось как безусловный положительный результат. У 2-х штаммов

C. pseudodiphtheriticum Score колебался в пределах 1,878-1,991, что свидетельствовало о ненадежной идентификации.

При сравнении результатов бактериологического метода исследования с данными секвенирования генов 16S рНК («золотым стандартом») обнаружено совпадение результатов у 43 (84,3%) штаммов коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. diphtheriae*). Несовпадающие результаты (таблица 3.2) обнаружены у 8 (15,7%) штаммов, относящихся к видам *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. propinquum*, *C. falsenii*. При этом следует отметить, что 4 штамма коринебактерий, идентифицированных бактериологическим методом как *C. pseudodiphtheriticum*, по результатам секвенирования определены как *C. aurimucosum* (1 шт.), *C. propinquum* (2 шт.) и *C. falsenii* (1 шт.). В то же время 4 штамма *C. pseudodiphtheriticum*, идентифицированные молекулярно-биологическим методом, при бактериологическом исследовании отнесены к видам *C. pseudotuberculosis* (2 шт.), *C. parametabolum* (1 шт.) и *C. amycolatum* (1 шт.).

При сравнении результатов масс-спектрометрического метода исследования и секвенирования генов 16S рНК совпадение результатов обнаружено только у 29 (57,0%) штаммов *C. non diphtheriae*, относящихся к видам *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*. Данные масс-спектрометрического исследования 22 штаммов *C. non diphtheriae* (*C. pseudodiphtheriticum* – 4 шт., *C. propinquum* – 17 шт., *C. minutissimum* – 1 шт.) не подтверждены секвенированием генов 16S рНК (таблица 3.3). Большинство из них (*C. pseudodiphtheriticum* – 4 шт. и *C. propinquum* – 11 шт.) имели при MALDI-ToF-MS индекс Score >2. У 7 штаммов *C. non diphtheriae* (*C. propinquum* – 6 шт., *C. minutissimum* – 1 шт.) значения индекса Score были недостаточно достоверными и колебались в пределах 1,7-1,999. У одного штамма, идентифицированного с помощью MALDI-ToF-MS как *C. propinquum*, индекс Score для данного вида составил >2, а для вида *C. falsenii* – 1,890 – 1,899, причем данный микроорганизм был определен секвенированием как *C. falsenii*.

По результатам масс-спектрометрического и молекулярно-генетического методов идентификации *C. non diphtheriae* несовпадение выявили в 43,7%

Таблица 3.2 – Несовпадающие результаты при идентификации недифтерийных коринебактерий бактериологическим методом и секвенированием генов 16S-рРНК

Бактериологический метод	Секвенирование генов 16S-рРНК	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>	<i>C.falsenii</i>	1
<i>C.pseudotuberculosis</i>	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	2
<i>C.paurometabolum</i>	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1
<i>C.amycolatum</i>	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1

Таблица 3.3 – 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

случаев. Наиболее часто (у 17-ти из 22 штаммов) несовпадения выявлены 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 недифтерийных коринебактерий и штаммов *C. diphtheriae*.

Следовательно, для идентификации недифтерийных коринебактерий бактериологический метод исследования является достаточно эффективным. Для точного установления видовой принадлежности коринебактерий с переменными биохимическими свойствами необходимо использовать молекулярно-генетический метод исследования. Масс-спектрометрический (MALDI-ToF-MS) метод требует дальнейшего совершенствования и пополнения баз данных для определения более широкого спектра представителей рода *Corynebacterium*.

ГЛАВА 4. Патогенный потенциал недифтерийных коринебактерий

В настоящее время не вызывает сомнения, что недифтерийные коринебактерии могут играть роль в патологии человека. Учитывая чрезвычайно большое видовое разнообразие коринебактерий, широкий спектр и вариабельность их биохимической активности, особую важность для установления клинической значимости имеет тщательное исследование их основных биологических свойств и, в частности, наличия факторов патогенности.

4.1. Гемолитическая, ДНК-азная и гемагглютинирующая активность

Определение гемолитической активности штаммов видов недифтерийных коринебактерий проводили по методу Грейга [24]. Гемолитическая активность исследована у 67 штаммов *C. non diphtheriae*, из которых 48 выделены от больных с различной патологией, 19 - от практически здоровых лиц (таблица 4.1).

Количество штаммов недифтерийных коринебактерий с положительной гемолитической активностью, выделенных от больных с различной патологией ($79,2 \pm 5,9\%$), было выше ($P \geq 95\%$), чем таковых, выделенных от практически здоровых лиц ($52,6 \pm 11,5\%$). Среди коринебактерий, выделенных от больных, $12,5 \pm 4,8\%$ штаммов обладали высокой гемолитической активностью, средней - $29,2 \pm 6,6\%$, низкой - $37,5 \pm 7,0\%$. В то же время штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные от практически здоровых лиц, не обладали высокой гемолитической активностью, а только низкой ($47,4 \pm 11,5\%$) и средней ($5,3\%$).

При исследовании различных видов *C. non diphtheriae* (таблица 4.2), выделенных от больных, положительная гемолитическая активность была выявлена у большинства ($79,2 \pm 5,9\%$) штаммов. При этом 41,7% штаммов проявляли гемолитическую активность средней и высокой степени. Способностью вызывать гемолиз обладали штаммы *C. pseudodiphtheriticum* ($66,7 \pm 9,6\%$), *C. pseudotuberculosis* (100%), *C. xerosis* (100%) и др.

Таблица 4.1 - Гемолитическая активность штаммов недифтерийных коринебактерий

Штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные от:	Количество штаммов недифтерийных коринебактерий			
	положительная (всего)	низкая	средняя	высокая
- больных с различной патологией (n=48)	38 79,2±5,9%*	18 37,5±7,0%	14 29,2±6,6%	6 12,5±4,8%
-практически здоровых (n=19)	10 52,6±11,5%*	9 47,4±11,5%	1 5,3	-

Условные обозначения:

* - достоверность различий ($P \geq 95\%$) между гемолитической активностью штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с различной патологией и практически здоровых

Таблица 4.2 - Гемолитическая активность штаммов видов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с различной патологией

Вид	Количество штаммов недифтерийных коринебактерий			
	положительная (всего)	низкая	средняя	высокая
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=24)	16	6	8	2
<i>C. pseudotuberculosis</i> (n=8)	8	3	3	2
<i>C. xerosis</i> (n=6)	6	3	2	1
<i>C. amycolatum</i> (n=2)	1	1	-	-
<i>C. striatum</i> (n=2)	2	2	-	-
<i>C. glutamicum</i> (n=2)	2	1	-	1
<i>C. pilosum</i> (n=1)	1	1	-	-
<i>C. cystitidis</i> (n=1)	0	-	-	-
<i>C. minutissimum</i> (n=1)	1	1	-	-
<i>C. riegelii</i> (n=1)	1	-	1	-
Всего (n=48)	38 79,2±5,9%	18 37,5±7,0%	14 29,2±6,6%	6 12,5±4,8%

Среди коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц (таблица 4.3), положительной гемолитической активностью обладали 10 ($52,6 \pm 11,5\%$) штаммов, причем почти все из них (9 штаммов) проявляли ее в низкой степени.

Положительная ДНК-азная активность (таблица 4.4) была обнаружена у $17,1 \pm 3,7\%$ штаммов, выделенных от больных, что не отличалось от аналогичного показателя у практически здоровых лиц ($16,7 \pm 4,2\%$). При этом никаких отличий в уровне продукции фермента ДНК-азы у больных и практически здоровых обследованных обнаружено не было.

Среди коринебактерий, выделенных от больных с различной патологией (таблица 4.5), положительная ДНК-азная активность выявлена у 18 ($17,1 \pm 3,7\%$) штаммов. При этом 14 ($13,3 \pm 3,3\%$) штаммов проявляли высокую ДНК-азную активность и 4 ($3,8 \pm 1,9\%$) штамма - среднюю. Высокая и средняя ДНК-азная активность выявлена у штаммов *C. pseudodiphtheriticum* и *C. pseudotuberculosis*, высокая - *C. xerosis* и *C. amycolatum*.

Среди *C. non diphtheriae*, выделенных от практически здоровых лиц (таблица 4.6), положительной ДНК-азной активностью обладали 13 ($16,7 \pm 4,2\%$) штаммов, причем 8 ($10,3 \pm 3,4\%$) штаммов проявляли ее в высокой и 5 ($6,4 \pm 2,8\%$) штаммов – в средней степени.

При сопоставительном исследовании гемолитической и ДНК-азной активности штаммов *C. non diphtheriae* (таблица 4.7) установлено, что среди штаммов, выделенных от больных, с положительной гемолитической активностью (38 шт.) выявлено 9 ($23,7 \pm 6,9\%$) штаммов (*C. pseudotuberculosis* – 4 шт., *C. pseudodiphtheriticum* – 3 шт., *C. xerosis* – 1 шт., *C. amycolatum* – 1 шт.) с высокой и 3 ($7,9 \pm 4,4\%$) штамма (*C. pseudotuberculosis* – 2 шт., *C. pseudodiphtheriticum* – 1 шт.) со средней ДНК-азной активностью. Среди штаммов коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц, имеющих положительную гемолитическую активность (10 шт.), выявлено только 4 ($40,0 \pm 15,5\%$) штамма (*C. pseudodiphtheriticum* – 3 шт., *C. xerosis* – 1 шт.) с ДНК-азной активностью средней степени. Эти данные указывают на то, что обнаружение сочетанной гемолитической и ДНК-азной активности играет важную

Таблица 4.3 – Гемолитическая активность штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц

Вид	Количество штаммов недифтерийных коринебактерий			
	положительная (всего)	низкая	средняя	высокая
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=16)	9	9	-	-
<i>C. amycolatum</i> (n=2)	1	-	1	-
<i>C. propinquum</i> (n=1)	1	-	-	-
Всего (n=19)	10 52,6%±11,5%	9 47,4±11,5%	1 5,2%	-

Таблица 4.4 – ДНК-азная активность штаммов недифтерийных коринебактерий

Штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные от:	Количество штаммов недифтерийных коринебактерий		
	положительная (всего)	средняя	высокая
- больных с различной патологией (n=105)	18 17,1±3,7%	4 3,8±1,9%	14 13,3±3,3%
-практически здоровых лиц (n=78)	13 16,7±4,2%	5 6,4±2,8%	8 10,3±3,4%

Таблица 4.5 – ДНК-азная активность штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с различной патологией

Вид	Количество штаммов недифтерийных коринебактерий		
	положительная (всего)	средняя	высокая
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> (n=57)	10 21,3±6,0%	2 4,3±3,0%	8 17,0±5,5%
<i>C.pseudotuberculosis</i> (n=18)	6	2	4
<i>C.xerosis</i> (n=13)	1	-	1
<i>C.amycolatum</i> (n=4)	1	-	1
<i>C. striatum</i> (n=2)	-	-	-
<i>C. riegelii</i> (n=1)	-	-	-
<i>C. minutissimum</i> (n=1)	-	-	-
<i>C. propinquum</i> (n=1)	-	-	-
<i>C. cystitidis</i> (n=1)	-	-	-
<i>C. ulcerans</i> (n=3)	-	-	-
<i>C. glutamicum</i> (n=2)	-	-	-
<i>C. pilosum</i> (n=1)	-	-	-
<i>C. paurometabolum</i> (n=1)	-	-	-
Всего (n=105)	18 17,1±3,7%	4 3,8±1,9%	14 13,3±3,3%

Таблица 4.6 – ДНК-азная активность штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц

Вид	Количество штаммов недифтерийных коринебактерий		
	положительная (всего)	средняя	высокая
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=46)	9 19,6±5,6%	4 8,7±4,2%	5 10,9±4,6%
<i>C. xerosis</i> (n=25)	3	1	2
<i>C. amycolatum</i> (n=7)	1	-	1
Всего (n=78)	13 16,7±4,2%	5 6,4±2,8%	8 10,3±3,4%

Таблица 4.7 – Сопоставление гемолитической и ДНК-азной активности штаммов недифтерийных коринебактерий

Контингент обследован ных	Гемолитическая активность	ДНК-азная активность		
		отрицательная	средняя	высокая
1. Больные (n= 48)	положительная: (n=38)	26 68,4±7,5%	3 7,9±4,4%	9 23,7±6,9%
	отрицательная: (n=10)	10	-	-
2. Здоровые (n= 19)	положительная: (n=10)	6 60,0±15,5%	4 40,0±15,5%	0
	отрицательная: (n=9)	9	-	-

роль в реализации патогенного потенциала недифтерийных коринебактерий.

Все исследованные штаммы недифтерийных коринебактерий не обладали гемагглютинирующей активностью, определяемой в реакции гемагглютинации эритроцитами человека I (0) группы крови.

4.2. Антииммуноглобулиновая активность

Уровень антииммуноглобулиновой активности (AIg-a) штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с различной патологией (таблица 4.8), по отношению к IgM составил $95,6 \pm 1,3\%$, IgG - $59,0 \pm 3,4\%$, тогда как к IgA - 100% для всех исследованных штаммов. Среди коринебактерий, выделенных от практически здоровых людей, уровень AIg-a статистически не отличался от такового у больных и составил по отношению к IgM $97,8 \pm 1,0\%$, IgG - $57,7 \pm 3,8\%$, IgA - 100% для всех исследованных штаммов коринебактерий.

При исследовании различных видов недифтерийных коринебактерий (таблица 4.9), выделенных от больных, установили, что AIg-a к IgG для *C. pseudotuberculosis* ($68,1 \pm 2,7\%$) была выше ($P \geq 95\%$), чем таковая у *C. pseudodiphtheriticum* ($53,0 \pm 5,6\%$). Причем, уровень AIg-a по отношению к IgG как у отдельных видов (*C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. pseudodiphtheriticum*), так у всех исследованных штаммов коринебактерий в целом был ниже ($P \geq 95\%$), чем к IgA.

При сравнении AIg-a различных видов недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц (таблица 4.10), в отличие от аналогичного показателя у больных, никаких статистически значимых отличий не обнаружено. При этом уровень AIg-a по отношению к IgG у коринебактерий в целом был ниже ($P \geq 95\%$), чем к IgM и IgA.

Таблица 4.8 – Антииммуноглобулиновая активность штаммов недифтерийных коринебактерий

Штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные от:	IgM	IgG	IgA
- больных с различной патологией (n=27)	95,6±1,3%	59,0±3,4%	100%
-практически здоровых (n=26)	97,8±1,0%	57,7±3,8%	100%

Таблица 4.9 – Антииммуноглобулиновая активность различных видов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с различной патологией

Вид	IgM	IgG	IgA
<i>C. pseudotuberculosis</i> (n=9)	96,9±2,1%	68,1±2,7%* **	100%
<i>C. xerosis</i> (n=9)	98,6±1,4%	55,0±8,1%*	100%
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=8)	90,2±2,8%	53,0±5,6%* **	100%
<i>C. amycolatum</i> (n=1)	100%	59,2%	100%

Условные обозначения

* - достоверность различий ($P \geq 95\%$) между уровнем AИг-а к IgG и AИг-а к IgM;

** - достоверность различий ($P \geq 95\%$) между уровнем AИг-а к IgG *C. pseudotuberculosis* и *C. pseudodiphtheriticum*.

Таблица 4.10 – Антииммуноглобулиновая активность различных видов недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц

Вид	IgM	IgG	IgA
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> (n=11)	96,1±2,0%	59,0±4,4%*	100%
<i>C.xerosis</i> (n=8)	100%	56,2±9,4%*	100%
<i>C.amycolatum</i> (n=4)	98,4±1,6%	56,7±12,0%*	100%
<i>C.pseudotuberculosis</i> (n=2)	96,9±3,2%	49,3±3,6%*	100%
<i>C.striatum</i> (n=1)	100%	75,0%	100%

Условные обозначения:

* - достоверность различий ($P \geq 95\%$) между уровнем AИг-а к IgG и AИг-а к IgG и IgM

4.3. Токсигенные свойства

Исследование токсигенных свойств штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных и при профилактических осмотрах населения в период с 2009 по 2014г.г. в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области, было направлено на детекцию дифтерийного экзотоксина в иммунопреципитационном тесте Элека и обнаружение *tox*⁺-гена в ПЦР. Все штаммы недифтерийных коринебактерий были отрицательны как в иммунопреципитационном тесте Элека, так и в ПЦР, что свидетельствовало о полном совпадении результатов иммунопреципитационного теста Элека и ПЦР при исследовании штаммов *C. non diphtheriae* (таблица 4.11).

4.4. Антагонистические свойства

При исследовании микроорганизмов, выделенных в ассоциации с коринебактериями от больных с различной патологией (таблица 4.12), чаще обнаруживали такие виды микроорганизмов, как *S. epidermidis* и *S. aureus* (13,3±5,1%), *S. viridans* и *S. pyogenes* (11,1±4,7%), реже – *S. hominis*, *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. saprophyticus*, *S. pneumoniae*, *S. haemolyticus*, *Pseudomonas spp.*, *Aspergillus spp.*. Причем, в диагностически значимом количестве микробы-ассоцианты выделяли в большинстве (74,4±6,7%) случаев ($P \geq 95\%$).

Среди микробов, изолированных в ассоциации с коринебактериями от практически здоровых лиц (таблица 4.13), чаще выделяли *Enterococcus faecalis* (25,0±6,8%), *Staphylococcus saprophyticus* (17,5±6,0%) и *Enterococcus spp.* (17,5±6,0%), реже – *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Haemophilus spp.*, *S. viridans*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *Serratia spp.*, *C. albicans*, *C. krusei*. В целом, при исследовании количества микробов-ассоциантов, выделенных в диагностически значимом и не значимом количестве, никаких отличий выявить

Таблица 4.11 – Токсигенные свойства штаммов недифтерийных коринебактерий

Вид	Штаммы	Количество	Диагноз	Результаты теста Элека		ПЦР	
				Отр.	Полож.	Отр.	Полож.
<i>C. non diphtheriae</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	72	Профилактические осмотры, воспалительные заболевания ВДП	72	-	72	-
				2	-	2	-
				1	-	1	-
				1	-	1	-
				2	-	2	-
				2	-	2	-
				1	-	1	-
				6	-	6	-
				1	-	1	-
<i>C. diphtheriae</i> (контроль)	<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (музейный)	1	-	-	1	-	1
				1	-	1	-
<i>S. aureus</i> (контроль)	<i>S. aureus ATCC 25923</i> (музейный)	1	-	-	-	-	-

Таблица 4.12 – Микроорганизмы, выделенные в ассоциации с недифтерийными коринебактериями от больных с различной патологией

Вид микроба-ассоцианта	Частота встречаемости	Из них выделено	
		диагностически незначимое КОЛ-ВО	диагностически значимое КОЛ-ВО
<i>S.epidermidis</i>	6 13,3±5,1%	2	4
<i>S.aureus</i>	6 13,3±5,1%	-	6
<i>S.viridans</i>	5 11,1±4,7%	1	4
<i>S.pyogenes</i>	5 11,1±4,7%	1	4
<i>S.hominis</i>	4 8,9±4,2%	-	4
<i>E.coli</i>	4 8,9±4,2%	3	1
<i>Enterococcus spp.</i>	2 4,4±3,1%	1	1
<i>K.pneumoniae</i>	2 4,4±3,1%	1	1
<i>E.faecalis</i>	2 4,4±3,1%	1	1
<i>S.saprophyticus</i>	2 4,4±3,1%	1	1
<i>S.pneumoniae</i>	2 4,4±3,1%	-	2
<i>S.haemolyticus</i>	1 2,2%	-	1
<i>Pseudomonas spp.</i>	1 2,2%	-	1
<i>Aspergillus spp.</i>	1 2,2%	-	1
Всего	43 100%	11 25,6±6,7 %*	32 74,4±6,7 %*

Условные обозначения:

* - достоверность различий ($P \geq 95\%$) между количеством микробов-ассоциантов, выделенных в диагностически значимом и незначимом количестве.

Таблица 4.13 – Микроорганизмы, выделенные в ассоциации с недифтерийными коринебактериями от практически здоровых лиц

Вид микроба-ассоцианта	Частота встречаемости	Из них выделено	
		диагностически незначимое КОЛ-ВО	диагностически значимое КОЛ-ВО
<i>E.faecalis</i>	10 25,0±6,8%	9	1
<i>S.saprophyticus</i>	7 17,5±6,0%	5	2
<i>Enterococcus spp.</i>	7 17,5±6,0%	4	3
<i>S.epidermidis</i>	6 15,0±5,6%	4	2
<i>E.coli</i>	5 12,5±5,2%	4	1
<i>S.aureus</i>	3 7,5±4,2%	-	3
<i>S.haemolyticus</i>	2 5,0±3,4%	1	1
<i>P.mirabilis</i>	2 5,0±3,4%	1	1
<i>Pseudomonas spp.</i>	2 5,0±3,4%	-	2
<i>Enterobacter spp.</i>	2 5,0±3,4%	1	1
<i>Haemophilus spp.</i>	2 5,0±3,4%	-	2
<i>S.viridans</i>	1 2,5%	-	1
<i>S.pyogenes</i>	1 2,5%	-	1
<i>K.pneumoniae</i>	1 2,5%	1	-
<i>Serracia spp.</i>	1 2,5%	-	1
<i>C.albicans</i>	1 2,5%	1	-
<i>C.krusei</i>	1 2,5%	1	-
Всего:	54 100%	32 59,3±6,7 %	22 40,7±6,7 %

не удалось.

При исследовании межмикробных взаимодействий (таблица 4.14) установлено, что штаммы *C. non diphtheriae*, выделенные от больных с различной патологией, не обладали антагонистическим действием по отношению к *C. diphtheriae gravis tox⁺*, *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* обнаружено в отношении *S. epidermidis*, причем в наибольшей степени – у *C. pseudotuberculosis* (ЗЗР - 25 мм).

Штаммы *C. pseudotuberculosis* подавляли рост грибов *Candida*: *C. glabrata* – полностью, а в отношении *C. albicans*, *C. krusei*, *C. kefyr* наблюдали зоны задержки роста в пределах 10-25 мм. *C. striatum* обладали антагонистической активностью только в отношении штамма *C. glabrata*, рост которого подавляли полностью.

Штаммы *C. non diphtheriae*, выделенные от практически здоровых лиц, также, как и штаммы, выделенные от больных, не обладали антагонистическим действием в отношении *C. diphtheriae gravis tox⁺*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *M. luteus*, *E. coli*, *Serratia spp*, *Enterobacter spp.*, *M. morgani*, *Citrobacter spp*. Однако антагонистическая активность штаммов *C. pseudotuberculosis*, выделенных от практически здоровых, обследованных в отношении *S. epidermidis* (зона задержки роста 7-18 мм), была ниже таковой, чем штаммов, выделенных от больных (зона задержки роста 25 мм). Антагонистические свойства штаммов *C. pseudotuberculosis* и *C. striatum*, выделенных от больных и практически здоровых лиц в отношении *C. glabrata*, были одинаковы.

С другой стороны, при исследовании антагонистической активности различных микроорганизмов в отношении штаммов *C. non diphtheriae* (таблица 4.15), выделенных от больных с различной патологией, установлено, что *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *M. luteus*, *E. coli*, *Serratia spp*, *C. diphtheriae gravis tox⁺*, *S. epidermidis*, *C. glabrata* не оказывали никакого воздействия на рост

Таблица 4.14 – Антагонистическая активность различных видов недифтерийных коринебактерий по отношению к другим микроорганизмам

Вид <i>C. non diphtheriae</i>	Штаммы <i>C. non diphtheriae</i> , выделенные от больных		Штаммы <i>C. non diphtheriae</i> , выделенные от практически здоровых лиц	
	отсутствует	обнаружена	отсутствует	обнаружена
1	2	3	4	5
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	<p><i>S.aureus</i>, грибы рода <i>Candida</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i>, <i>M.luteus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>M.morganii</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>C.diphtheriae gravis tox</i>⁺</p>	<i>S.epidermidis</i> (10-15мм)	<p><i>S.aureus</i>, грибы рода <i>Candida</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i>, <i>M.luteus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>M.morganii</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>C.diphtheriae gravis tox</i>⁺</p>	<i>S.epidermidis</i> –(15 мм)
<i>C.pseudotuberculosis</i>	<p><i>S.aureus</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i>, <i>M.luteus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>M.morganii</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>C.diphtheriae gravis tox</i>⁺</p>	<p><i>C.glabrata</i> - роста нет <i>C.albicans</i> (10-25 мм) <i>C.krusei</i> (10-25 мм) <i>C.kefyr</i> (10-25 мм) <i>S.epidermidis</i> (25 мм)</p>	<p><i>S.aureus</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i>, <i>M.luteus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>M.morganii</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>C.diphtheriae gravis tox</i>⁺</p>	<p><i>C.glabrata</i>- роста нет <i>C.albicans</i> (10-25 мм) <i>C.krusei</i> (10-25 мм) <i>C.kefyr</i> (10-25 мм) <i>S.epidermidis</i> (7-18 мм)</p>

1 <i>C.amycolatum</i>	2 <i>S.aureus</i> , грибы рода <i>Candida</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>M.morganii</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox⁺</i> <i>C.albicans</i> <i>C.krusei</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.glabrata</i>	3 <i>S.epidermidis</i> (16-18мм)	4 <i>S.aureus</i> , грибы рода <i>Candida</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>M.morganii</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox⁺</i> <i>C.albicans</i> <i>C.krusei</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.glabrata</i>	5 <i>S.epidermidis</i> (10 мм)
<i>C.xerosis</i>	2 <i>S.aureus</i> , грибы рода <i>Candida</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>M.morganii</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox⁺</i> <i>C.albicans</i> <i>C.krusei</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.glabrata</i>	<i>S.epidermidis</i> (20 мм)	<i>S.aureus</i> , грибы рода <i>Candida</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>M.morganii</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox⁺</i> <i>C.albicans</i> <i>C.krusei</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.glabrata</i>	<i>S.epidermidis</i> (15-17 мм)

1	2	3	4	5
<i>C.striatum</i>	<p><i>S.aureus</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i>, <i>M.luteus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>M.morganii</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>C.diphtheriae gravis tox</i>⁺ <i>C.albicans</i> <i>C.krusei</i> <i>C.kefyr</i></p>	<p><i>C.glabrata</i> - роста нет <i>S.epidermidis</i> (14мм)</p>	<p><i>S.aureus</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i>, <i>M.luteus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>M.morganii</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>C.diphtheriae gravis tox</i>⁺ <i>C.albicans</i> <i>C.krusei</i> <i>C.kefyr</i></p>	<p><i>C.glabrata</i> - роста нет <i>S.epidermidis</i> (10-12 мм)</p>
<i>C.paurometabolum</i>	<p><i>S.aureus</i>, грибы рода <i>Candida</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i>, <i>M.luteus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>M.morganii</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>C.diphtheriae gravis tox</i>⁺ <i>C.albicans</i> <i>C.krusei</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.glabrata</i></p>	<p><i>S.epidermidis</i> (20мм)</p>	<p><i>S.aureus</i>, грибы рода <i>Candida</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i>, <i>M.luteus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>M.morganii</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>C.diphtheriae gravis tox</i>⁺ <i>C.albicans</i> <i>C.krusei</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.glabrata</i></p>	<p><i>S.epidermidis</i> (15-18 мм)</p>

Таблица 4.15 – Антагонистическая активность различных микроорганизмов по отношению к недифтерийным коринебактериям

Вид <i>C. non diphtheriae</i>	Штаммы <i>C. non diphtheriae</i> , выделенные от больных		Штаммы <i>C. non diphtheriae</i> , выделенные от практически здоровых лиц	
	отсутствует	обнаружена	отсутствует	обнаружена
1	2	3	4	5
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	<p><i>S. aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>M. luteus</i>, <i>E. coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>C. diphtheriae gravis tox</i>⁺ <i>S. epidermidis</i> <i>C. glabrata</i></p>	<p>роста нет <i>Acinetobacter spp.</i> <i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>Citrobacter spp.</i></p> <p>ЗЗР <i>P. aeruginosa</i> –15-20мм <i>C. kefyur</i> –5-8 мм <i>M. morganii</i>– 5-10 мм</p>	<p><i>S. aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>M. luteus</i>, <i>E. coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>C. diphtheriae gravis tox</i>⁺ <i>S. epidermidis</i></p>	<p>роста нет <i>Acinetobacter spp.</i> <i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>M. morganii</i> <i>Citrobacter spp.</i></p> <p>ЗЗР <i>P. aeruginosa</i> –18-28мм <i>C. kefyur</i> –5-8 мм</p>
<i>C. pseudotuberculosis</i>	<p><i>S. aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>M. luteus</i>, <i>E. coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>C. diphtheriae gravis tox</i>⁺ <i>S. epidermidis</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. kefyur</i> – <i>C. dubliniensis</i></p>	<p>роста нет <i>C. albicans</i></p> <p>ЗЗР <i>P. aeruginosa</i> –10-15 мм <i>M. morganii</i>– 5-8 мм</p>	<p><i>S. aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>M. luteus</i>, <i>E. coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>C. diphtheriae gravis tox</i>⁺ <i>S. epidermidis</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. kefyur</i> – <i>C. dubliniensis</i></p>	<p>роста нет <i>C. albicans</i> <i>M. morganii</i></p> <p>ЗЗР <i>P. aeruginosa</i> - 17-24мм</p>

1	2	3	4	5
<i>C.amycolatum</i>	<i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox</i> ⁺ <i>S.epidermidis</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>C.glabrata</i>	роста нет <i>Acinetobacterspp.</i> <i>C.albicans</i> <i>C.dubliniensis</i> <i>Citrobacterspp.</i> 33P <i>C.kefyr</i> – 10 мм <i>M.morganii</i> – 10 мм	<i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox</i> ⁺ <i>S.epidermidis</i> . <i>P.aeruginosa</i> <i>C.glabrata</i>	роста нет <i>Acinetobacter spp.</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.albicans</i> <i>C.dubliniensis</i> <i>Citrobacter spp.</i> 33P <i>M.morganii</i> – 10 мм
<i>C.xerosis</i>	<i>S.aureus</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox</i> ⁺ <i>S.epidermidis</i> <i>C.kefyr</i> –	роста нет <i>Acinetobacter spp.</i> <i>C.glabrata</i> <i>C.dubliniensis</i> <i>C.albicans</i> <i>Citrobacter spp.</i> 33P <i>P.aeruginosa</i> – 10-18 мм <i>M.morganii</i> – 5-8 мм	<i>S.aureus</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox</i> ⁺ <i>S.epidermidis</i>	роста нет <i>Acinetobacter spp.</i> <i>C.glabrata</i> <i>C.dubliniensis</i> <i>C.kefyr</i> <i>Citrobacter spp.</i> 33P <i>P.aeruginosa</i> - 15-27 мм <i>C.albicans</i> – 20 мм <i>M.morganii</i> – 7-8 мм
<i>C.striatum</i>	<i>S.aureus</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>C.diphtheria gravis tox</i> ⁺ , <i>S.epidermidis</i> <i>C.glabrata</i> <i>Acinetobacter spp.</i>	роста нет <i>C.albicans</i> <i>C.dubliniensis</i> <i>Citrobacter spp.</i> 33P <i>P.aeruginosa</i> – 5-18 мм <i>C.kefyr</i> – 10 мм <i>M.morganii</i> – 7 мм	<i>S.aureus</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>C.diphtheriae gravis tox</i> ⁺ <i>S.epidermidis</i> <i>Acinetobacter spp.</i>	роста нет <i>C.albicans</i> <i>C.dubliniensis</i> <i>C.glabrata</i> <i>C.kefyr</i> <i>Citrobacter spp.</i> 33P <i>P.aeruginosa</i> – 10-18 мм <i>M.morganii</i> – 7 мм

1		3	4	5
<i>C. raugometabolium</i>	<p><i>S. aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>M. luteus</i>, <i>E. coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>C. diptheriae gravis tox⁺</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>M. organii</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. dubliniensis</i></p>	<p><i>C. albicans</i></p> <p>33P</p> <p><i>P. aeruginosa</i> – 15-20 мм <i>C. кэфур</i> – 5мм</p>	<p><i>S. aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>M. luteus</i>, <i>E. coli</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>C. diptheriae gravis tox⁺</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>M. organii</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. dubliniensis</i></p>	<p><i>C. albicans</i></p> <p>33P</p> <p><i>P. aeruginosa</i> – 15-26 мм <i>C. кэфур</i> – 10 мм</p>

коринебактерий. В то же время, наличие антагонистической активности по отношению к большинству исследованных штаммов *C. non diphtheriae* обнаружено у *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.* (подавление роста коринебактерий полностью), *P. aeruginosa* (ЗЗР 5-20 мм), *M. morgani* (зона задержки роста 5-10 мм) и *C. kefir* (зона задержки роста 5-10 мм). Наиболее устойчивыми к антагонистической активности различных микроорганизмов оказались *C. pseudotuberculosis*, рост которых подавлялся только *C. albicans* (полностью), *P. aeruginosa* (ЗЗР 10-15 мм) и *M. morgani* (зона задержки роста 5-8 мм).

Антагонистическое действие различных микроорганизмов по отношению к штаммам недифтерийных коринебактерий, выделенным от практически здоровых лиц, как и выделенным от больных, не выявлено у *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *M. luteus*, *E. coli*, *Serratia spp.*, *C. diphtheriae gravis tox⁺*, *S. epidermidis*.

Подавляющее рост воздействие *P. aeruginosa* на штаммы *C. non diphtheriae*, выделенные от практически здоровых лиц, более выражено (диапазон зоны задержки роста 10-28 мм), чем в отношении коринебактерий, выделенных от больных (диапазон зоны задержки роста 5-20 мм). Антагонистические свойства штаммов *M. morgani*, *C. kefir* в отношении коринебактерий, выделенных от больных и практически здоровых лиц, одинаковы. Следует отметить, что штаммы *C. pseudotuberculosis*, выделенные от больных, более устойчивы к антагонистической активности микроорганизмов (*C. albicans*, *M. morgani*, *P. aeruginosa*), чем выделенные от практически здоровых.

Различные виды микроорганизмов проявляли более выраженную антагонистическую активность в отношении штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц, чем выделенных от больных. В свою очередь, штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные от больных, проявляли наиболее высокое антагонистическое воздействие на другие виды микроорганизмов, чем выделенные от практически здоровых лиц.

4.5. Влияние недифтерийных коринебактерий на клетки иммунной системы

Недифтерийные коринебактерии, как и токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, обладают способностью снижать фагоцитарную активность и активизировать процессы апоптоза в клетках хозяина [40, 42, 90, 113], что может быть обусловлено наличием поверхностных антигенов, *corD*-фактора, нейраминидазы, высокой уреазной активности. Повреждающее воздействие недифтерийных коринебактерий на организм в целом и на клетки иммунной системы в частности является важнейшим механизмом реализации их патогенного действия и способом выживания и распространения в организме [40, 42]. В связи с этим 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 нейтрофилы, наряду с макрофагами и лимфоцитами, способны осуществлять регуляторную функцию, опосредованную продуцируемыми ими низкомолекулярными пептидами – НфК [40, 46]. С этих позиций представляет интерес оценить характер воздействия НфК на процессы фагоцитоза и апоптоза Мф, индуцированных недифтерийными коринебактериями.

Способность индуцировать процессы фагоцитоза и апоптоза Мф белых беспородных мышей исследовали у штаммов *C. non diphtheriae*, выделенных из верхних дыхательных путей (ВДП) от больных острым и хроническим тонзиллитом, острым ринитом (*C. pseudotuberculosis*, *C. pseudodiphtheriticum*); с поверхности кожи от больных с дерматитами различной этиологии (*C. pseudotuberculosis*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. xerosis*); из урогенитального тракта (УГТ) от пациентов с острым и хроническим пиелонефритом, острым кольпитом и практически здоровых лиц, проходивших профилактическое обследование (*C. pseudotuberculosis*, *C. amycolatum*, *C. xerosis*).

При сравнении поглотительной активности Мф мышей, индуцированной исследованными видами *C. non diphtheriae* (таблица 4.16), выделенными из различных биотопов больных, никаких отличий при определении фагоцитарного

Таблица 4.16 – Показатели поглотительной активности Мф, индуцированной недифтерийными коринебактериями, выделенными от больных

Биотоп	Вид	Исходные		При добавлении НфК	
		ФИ	ФЧ	ФИ	ФЧ
ВДП (зев, нос)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	43,0±6,9	1,4±0,02	57,0±7,1	2,6±0,03*
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	60,0±7,0	3,4±0,03 ***	65,0±6,8	3,9±0,04* ***
	Средний показатель	51,5±7,0	2,4±0,03 **	61,0±7,0	3,3±0,04* **
кожа	<i>C.pseudotuberculosis</i>	52,0±7,1	2,0±0,02	51,0±7,1	1,9±0,02
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	42,0±7,0	1,8±0,02***	51,0±7,1	3,1±0,03* ***
	<i>C.xerosis</i>	40,0±7,0	1,4±0,02***	52,0±7,1	2,0±0,02*
	Средний показатель	44,7±7,0	1,7±0,02 **	51,3±7,1	2,3±0,02* **
УГТ (влагалище, цервикаль- ный канал, моча)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	41,0±7,0	0,1±0,001	43,0±7,1	1,9±0,02*
	<i>C.amycolatum</i>	38,0±6,9	0,9±0,01 ***	34,0±6,8	1,4±0,01* ***
	<i>C.xerosis</i>	40,0±7,0	1,6±0,02 ***	55,0±7,1	2,9±0,03* ***
	Средний показатель	39,7±7,0	0,9±0,01**	44,0±7,0	2,1±0,02* **

Условные обозначения:

* – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между аналогичными показателями фагоцитоза исходными и при добавлении НфК;

** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между аналогичными средними показателями фагоцитоза, индуцированного коринебактериями, выделенными из разных биотопов;

*** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между аналогичными показателями фагоцитоза, индуцированного *C.pseudotuberculosis* и другими видами коринебактерий, выделенных из одного биотопа.

индекса (ФИ) установлено не было. Средний показатель фагоцитарного числа (ФЧ) был выше ($P \geq 95\%$) при использовании коринебактерий, выделенных из ВДП ($2,4 \pm 0,03$), по сравнению с таковым для коринебактерий из других биотопов: кожные покровы ($1,7 \pm 0,02$) и УГТ ($0,9 \pm 0,01$). Максимальные значения ФЧ были выявлены при оценке поглотительной активности Мф в отношении вида *C. pseudodiphtheriticum* ($3,4 \pm 0,03$), выделенного из ВДП, и *C. pseudotuberculosis* ($2,0 \pm 0,02$), выделенного с поверхности кожи. В то же время наименьшее ($P \geq 95\%$) среднее значение ФЧ выявили при исследовании *C. non diphtheriae*, выделенных из УГТ ($0,9 \pm 0,01$).

Обработка макрофагов НфК не оказывала влияния на поглотительную активность Мф в отношении *C. non diphtheriae*, оцениваемую по показателю ФИ. При определении ФЧ, напротив, наблюдали достоверное ($P \geq 95\%$) его увеличение при использовании *C. non diphtheriae*, выделенных из различных биотопов.

Примечательно, что максимальное значение ФЧ было зарегистрировано при исследовании коринебактерий, выделенных из ВДП ($3,3 \pm 0,04$), а минимальное – из УГТ ($2,1 \pm 0,02$).

Изучение поглотительной активности Мф, индуцированной *C. non diphtheriae*, выделенными от практически здоровых лиц (таблица 4.17), показало аналогичные результаты по показателю ФИ, однако значения ФЧ были выше ($P \geq 95\%$) таковых, чем у обследованных с различной патологией.

При исследовании переваривающей активности Мф, индуцированной *C. non diphtheriae*, выделенными от больных (таблица 4.18), максимальные ($P \geq 95\%$) значения ИЗФ ($2,8 \pm 0,3$) были определены для *C. pseudotuberculosis*, выделенных с кожных покровов. При этом средний показатель ИЗФ относительно *C. non diphtheriae* из данного биотопа ($2,0 \pm 0,2$) был выше ($P \geq 95\%$) по сравнению с аналогичным для коринебактерий, выделенных из УГТ ($1,5 \pm 0,1$).

Изменения средних показателей переваривающей активности Мф под влиянием НфК наблюдали только для изолятов коринебактерий, выделенных с кожных покровов: ИЗФ достоверно ($P \geq 95\%$) увеличился и составил $2,9 \pm 0,4$. При этом киллинг макрофагами *C. non diphtheriae*, выделенных из УГТ, был

Таблица 4.17 – Показатели поглотительной активности Мф, индуцированной недифтерийными коринебактериями, выделенными от практически здоровых лиц

Биотоп	Вид	исходные		при добавлении НфК	
		ФИ	ФЧ	ФИ	ФЧ
ВДП (зев, нос)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	44,0±7,1	1,8±0,02	60,0±7,0	2,7±0,03*
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	64,0±6,9	3,6±0,03 ***	68,0±6,6	3,9±0,04***
	Средний показатель	54,0±7,0	2,7± 0,03 **	64,0±6,8	3,3±0,04* **
УГТ (влагалище, цервикаль- ный канал, моча)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	47,0±7,1	0,6±0,01	53,0±7,1	2,0±0,01*
	<i>C.amycolatum</i>	42,0±7,0	2,3±0,03 ***	44,0±7,1	3,0±0,03***
	<i>C.xerosis</i>	43,0±6,9	1,9±0,02 ***	56,0±7,1	3,3±0,03***
	Средний показатель	44,0±7,0	1,6±0,02**	51,0±7,1	2,8±0,02* **

Условные обозначения:

* – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между аналогичными показателями фагоцитоза исходными и при добавлении НфК;

** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между аналогичными средними показателями фагоцитоза, индуцированного коринебактериями, выделенными из разных биотопов;

*** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между аналогичными показателями фагоцитоза, индуцированного *C. pseudotuberculosis* и другими видами коринебактерий, выделенных из одного биотопа.

Таблица 4.18 – Показатели переваривающей активности Мф, индуцированной недифтерийными коринебактериями, выделенными от больных

Биотоп	Вид	исходные	придобавлении НфК
		ИЗФ	ИЗФ
ВДП (зев, нос)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	1,9±0,6	2,4±0,2
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1,5±0,1	1,8±0,1* ***
	Средний показатель	1,7±0,4	2,1±0,2
кожа	<i>C.pseudotuberculosis</i>	2,8±0,3	3,4±0,5
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1,7±0,1 ***	2,4±0,4
	<i>C.xerosis</i>	1,6±0,2 ***	2,9±0,3*
	Средний показатель	2,0±0,2 **	2,9±0,4* **
УГТ (влагалище, цервикальный канал, моча)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	1,8±0,1	2,1±0,1*
	<i>C.amycolatum</i>	1,3±0,1 ***	1,5±0,04 ***
	<i>C.xerosis</i>	1,4±0,2***	1,6±0,1***
	Средний показатель	1,5±0,1 **	1,7±0,1 **

Условные обозначения:

* – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между аналогичными показателями фагоцитоза исходными и при добавлении НфК;

** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между средними показателями ИЗФ, индуцированными коринебактериями, выделенными из различных биотопов;

*** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между показателями ИЗФ, индуцированными *C. pseudotuberculosis* и другими видами коринебактерий, выделенных из одного биотопа.

минимальным ($1,7 \pm 0,1$) по сравнению с таковым коринебактерий из ВДП ($2,1 \pm 0,2$) и кожных покровов ($2,9 \pm 0,4$).

Показатели переваривающей активности Мф мышей, индуцированной различными видами *C. non diphtheriae*, выделенными от практически здоровых лиц (таблица 4.19), имели фактически те же значения, что и при исследовании коринебактерий, выделенных от больных.

Все исследованные виды *C. non diphtheriae* обладали способностью индуцировать апоптоз Мф (таблица 4.20): количество клеток с апоптозом находилось в пределах от $42,8 \pm 6,7\%$ до $70,0 \pm 6,4\%$. Никаких отличий при сравнении апоптогенной активности коринебактерий, выделенных из различных биотопов, обнаружено не было. При сравнении способности различных видов коринебактерий внутри биотопа индуцировать апоптоз Мф отличия были зарегистрированы только для *C. non diphtheriae*, выделенных из УГТ.

Так, процент Мф с признаками апоптоза, индуцированного *C. pseudotuberculosis* ($70,0 \pm 6,4\%$), был достоверно ($P \geq 95\%$) выше, чем вызываемый *C. amycolatum* ($42,8 \pm 6,7\%$) и *C. xerosis* ($45,3 \pm 6,8\%$), изолированными из этого же биотопа.

Добавление в реакционную смесь НфК приводило к повышению устойчивости Мф к апоптогенному воздействию *C. non diphtheriae*. Об этом свидетельствовало достоверное ($P \geq 95\%$) снижение средних показателей апоптоза Мф, индуцированного коринебактериями, выделенными из всех исследованных биотопов. При этом апоптогенная активность *C. pseudotuberculosis*, выделенных с кожных покровов ($58,8 \pm 6,9\%$) и УГТ ($48,4,0 \pm 6,6\%$), достоверно ($P \geq 95\%$) превышала таковую других коринебактерий, выделенных из этих же биотопов.

Апоптогенная активность недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц (таблица 4.21), не отличалась от таковой при исследовании различных видов коринебактерий, выделенных от больных.

Одним из возможных способов реализации патогенного действия недифтерийными коринебактериями является их угнетающее влияние на клетки иммунной системы, обусловленное, прежде всего, выраженным апоптогенным

Таблица 4.19 – Показатели переваривающей активности Мф, индуцированной недифтерийными коринебактериями, выделенными от практически здоровых лиц

Биотоп	Вид	исходные	При добавлении НфК
		ИЗФ	ИЗФ
ВДП (зев, нос)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	2,2±0,1	2,6±0,3*
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	1,8±0,1 ***	2,0±0,2* ***
	Средний показатель	2,0±0,1	2,3±0,3
УГТ (влагалище, цервикальный канал, моча)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	2,0±0,1	2,4±0,4
	<i>C.amycolatum</i>	1,4±0,1 ***	1,8±0,1* ***
	<i>C.xerosis</i>	1,4±0,1 ***	1,9±0,1* ***
	Средний показатель	1,6±0,1 **	2,0±0,2

Условные обозначения:

* – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между аналогичными показателями фагоцитоза исходными и при добавлении НфК;

** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между средними показателями ИЗФ, индуцированными коринебактериями, выделенными из различных биотопов;

*** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между показателями ИЗФ, индуцированными *C. pseudotuberculosis* и другими видами коринебактерий, выделенных из одного биотопа.

Таблица 4.20 – Апоптогенная активность недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных

Биотоп	Вид	Процент Мф с признаками апоптоза (%±m)	
		исходный	при добавлении НфК
ВДП (зев, нос)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	65,3±6,4	45,0±7,0*
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	62,3±6,0	30,2±5,9*
	Средний показатель	60,6±6,9	35,3±6,8*
кожа	<i>C.pseudotuberculosis</i>	69,9±6,5	58,8±6,9
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	55,4±6,8	33,7±6,7* **
	<i>C.xerosis</i>	60,1±6,4	31,0±6,6* **
	Средний показатель	61,8±6,9	41,2±7,0*
УГТ (влагалище, цервикальный канал, моча)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	70,0±6,4	48,4±6,6*
	<i>C.amycolatum</i>	42,8±6,7 **	26,0±6,3 **
	<i>C.xerosis</i>	45,3±6,8 **	24,3±6,1* **
	Средний показатель	52,7± 7,1	32,9±6,7*

Условные обозначения:

* – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между количеством клеток с апоптозом исходным и при добавлении НфК;

** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) внутри биотопа между количеством клеток с апоптозом, индуцированным *C. pseudotuberculosis* и другими видами коринебактерий.

Таблица 4.21 – Апоптогенная активность недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых лиц

Биотоп	Вид	Процент Мф с признаками апоптоза (%±m)	
		исходный	при добавлении НфК
ВДП (зев, нос)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	56,5±7,0	30,1±6,5*
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	60,1±6,9	28,7±6,4*
	Средний показатель	58,3±7,0	29,4±6,5*
УГТ (влагалище, цервикальный канал, моча)	<i>C.pseudotuberculosis</i>	62,2±6,9	34,5±6,7*
	<i>C.amycolatum</i>	40,0±7,0 **	21,4±5,8
	<i>C.xerosis</i>	45,0±7,0	20,4±5,7*
	Средний показатель	49,1± 7,0	25,4±6,1*

Условные обозначения:

* – достоверность различий ($P \geq 95\%$) между количеством клеток с апоптозом исходным и при добавлении НфК;

** – достоверность различий ($P \geq 95\%$) внутри биотопа между количеством клеток с апоптозом, индуцированным *C. pseudotuberculosis* и другими видами коринебактерий.

действием, а также замедлением процессов индуцированного коринебактериями фагоцитоза. Это, по всей видимости, способствует длительной персистенции коринебактерий в организме, и, как следствие, развитию воспалительных заболеваний различной локализации. Результаты наших исследований указывают на возможность использования НфК для иммунокоррекции иммунодефицитных состояний, развивающихся на фоне заболеваний, обусловленных недифтерийными коринебактериями, и связанных, вероятно, с их апоптогенным действием на клетки иммунной системы.

4.6. Разработка биоинформационного алгоритма для установления этиологической значимости недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных процессов в организме человека

Для установления этиологической значимости недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных процессов необходимым является определение спектра ведущих факторов патогенности и степени их значимости. Наиболее точное решение данной задачи возможно получить с использованием многомерных статистических способов анализа информации.

Для построения биоинформационного алгоритма создана модель расчета коэффициента этиологической значимости недифтерийных коринебактерий (К) в развитии инфекционного процесса, объединяющая в себе перечень ведущих признаков *C. non diphtheriae* (степень высеваемости, факторы патогенности) с указанием коэффициента детерминации (R^2) для каждого из них.

Использовали 54 штамма различных видов недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. riegelii*). С помощью метода логистической регрессии определили перечень ведущих признаков различных видов *C. non diphtheriae*, обуславливающих их этиологическую роль в развитии инфекционных процессов (степень высеваемости и факторы патогенности (уреазная, гемолитическая, ДНК-азная активность, A_{Ig}-а по отношению к IgG)), установили их статистическую

значимость и рассчитали классификационные коэффициенты в уравнении расчета коэффициента K этиологической значимости *C. non diphtheriae*. Значимость каждого показателя оценивали по коэффициенту детерминации (R^2). Этиологическая значимость (по величине R^2) для коринебактерий была наиболее высокой для степени высеваемости ($R^2=0,55$), уреазной ($R^2=0,54$) и гемолитической ($R^2=0,46$) активности (таблица 4.22). Наименее значимыми, но достоверными ($p<0,05$) оказались показатели A Ig-a по отношению к IgG ($R^2=0,31$) и ДНК-азная активность ($R^2=0,28$).

Таблица 4.22 – 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
A Ig-a по отношению к IgG	0,31	0,044
ДНК-азная активность	0,28	0,046

На основании многомерного нелинейного анализа совокупности ведущих признаков *C. non diphtheriae* (степень высеваемости, факторы патогенности (уреазная, гемолитическая, ДНК-азная активность, A Ig-a по отношению к IgG) была разработана модель для расчета коэффициента (K) этиологической значимости *C. non diphtheriae* в развитии инфекционного процесса по формуле:

$$K = \frac{\exp(z)}{1 + \exp(z)}, \text{ где}$$

z – коэффициент регрессии

$$z = -1,02 + 0,79 \cdot X_1 + 0,15 \cdot X_2 + 0,46 \cdot X_3 + 0,17 \cdot X_4 + 0,75 \cdot X_5,$$

X_1 – показатель высеваемости *C. non diphtheriae* ($0 - \leq 10^4$; $1 - \geq 10^5$);

X_2 – показатель дезоксирибонуклеазной активности (0 – отсутствие, 1 – низкая

(до 2 мм), 2 – средняя (2-6 мм), 3 – высокая (более 6 мм));

X3 – показатель гемолитической активности (0 – отсутствие, 1- низкая (0,190–0,290), 2 - средняя (0,291 – 0,390), 3 – высокая (0,391 и выше);

X4 – показатель антииммуноглобулиновой активности по отношению к IgG, где 1 – низкая (10% – 30,0%), 2 – средняя (31% – 60%), 3 – высокая (61% и выше).

X5 – показатель уреазной активности, где 0 – отсутствие, 1 – наличие;

Для определения дифференциального порога разделения значений K (точка *cut-off*) в отношении риска развития инфекционного процесса был использован ROC-анализ. Порог отсечения нужен для того, чтобы применять тест на практике: относить новые примеры к одному из двух классов в зависимости от соотношения величины показателя K с точкой *cut-off*. Порог отсечения соответствовал максимальной диагностической чувствительности и специфичности метода [20].

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

На основе табличного процессора *Microsoft Excel* была разработана программа автоматического расчета показателя K в соответствии с ведущими факторами патогенности *C. non diphtheriae* по их совокупности.

Например, для штамма *C. pseudodiphtheriticum* 3474, выделенного из носа больного А. характеристика ведущих признаков развития инфекционного процесса, обусловленного *C. non diphtheriae*, была следующей: степень высеваемости (X1) – 1, активность ДНК-азы (X2) – 2, гемолитическая активность (X3) – 2, A Ig-a по отношению к IgG (X4) – 2, уреазная активность (X5) – 1.

После введения данных автоматический расчет (рисунок 4.1) показал, что значение K составило 0,89. Поскольку $K > 0,72$, этиологическая значимость *C. non diphtheriae* в развитии инфекционного процесса высокая.

	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	2	2	2	1		
7					-1,02	0,79	0,30	0,92	0,34	0,75	2,08	
8			8,004	0,89								
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 4.1 Окно для установления этиологической значимости недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционных процессов в организме человека.

Клиническое обследование больного А. выявило наличие лакунарной ангины, следовательно, роль штамма *C. pseudodiphtheriticum* 3474 в развитии инфекционного процесса подтверждена.

При исследовании 54 штаммов *C. non diphtheriae* у 39 (72,2%) из них коэффициент К оказался $>0,72$, что свидетельствовало о высокой этиологической значимости недифтерийных коринебактерий в развитии инфекционного процесса.

У 28 пациентов имели место объективные клинические признаки острого или обострения хронического инфекционного процесса. Дифференциальная чувствительность метода составила 86,1% ($ДЧ = (31/36) * 100\%$). У 15 пациентов с низким риском развития инфекционного процесса при клиническом обследовании признаки острого или обострения хронического инфекционного процесса выявлены у 4 больных. Следовательно, диагностическая специфичность составила 77,8% ($ДС = (14/18) * 100\%$), диагностическая точность или эффективность метода - 80,4%.

4.7. *Corynebacterium riegelii* – необычный вид, выделенный от пациентки с туберкулезом мочевыводящих путей

Corynebacterium riegelii впервые был описан и идентифицирован G.Funke в 1998 году как микроорганизм, связанный с инфекциями мочевыводящих путей у женщин [55, 95, 97]. *C. riegelii* (rie.gel'ii, в дальнейшем *riegelii* от *Riegelii*), назван так в честь современного французского микробиолога Филиппа Ригеля, внесшего большой вклад в систематику рода *Corynebacterium*. В 2012 году в Японии был зафиксирован редкий случай уросепсиса у 94-летнего мужчины с почечно-каменной болезнью, обусловленный *C. riegelii* [124]. В 2013 году в Бразилии выявлен фатальный случай уросепсиса у 79-летней женщины, причиной которого послужил штамм *C. riegelii* [55]. У пациентки не было обнаружено иных сопутствующих заболеваний, способных вызвать прогрессирующее ухудшение клинического состояния, и других возбудителей инфекций. На основании этого констатировали, что смерть наступила вследствие уросепсиса, вызванного *C. riegelii*.

В настоящее время тяжело протекающие и летальные случаи заболеваний мочевыводящих путей, обусловленных *C. riegelii*, описаны лишь за рубежом (Япония, Бразилия, Испания, Швейцария) [55, 95, 97, 124]. Отличительной особенностью *C. riegelii* является высокая уреазная активность, проявляющаяся через 5 минут после инокуляции в среду культуры при комнатной температуре. Повышенная уреазная активность расценивается у этого микроорганизма как фактор патогенности [97].

В настоящем исследовании представлено клиническое наблюдение пациентки с диагнозом «туберкулез мочеполовой системы», зарегистрированный в 2013 году в г. Ростове-на-Дону. Особенностью случая является выделение редко встречающегося вида *C. riegelii*, выделенного из мочи в диагностически значимом количестве.

Больная П., 73 года, поступила в урогенитальное отделение противотуберкулезного клинического диспансера 20.05.2013г. с жалобами на боли в правом бедре, хромоту, дизурию, свищ правого бедра с гнойно-серозным отделяемым.

В анамнезе: болела длительно, лечилась в поликлинике без существенного эффекта по поводу кисты правого бедра. Была госпитализирована в урогенитальное отделение противотуберкулезного диспансера, где после комплексного обследования был поставлен диагноз: «Туберкулез мочевыделительной системы: поликавернозный туберкулез правой почки, стриктура нижней трети левого мочеточника, гидронефроз слева».

При бактериологическом исследовании мочи 22.05.2013г. *Mycobacterium tuberculosis* не выявлены, но обнаружены *Staphylococcus cohnii* – 10^6 и *Corynebacterium spp.* – 10^7 . После назначения антибактериальных препаратов (рифампицин, изониазид, стрептомицин, канамицин, пипразинамид) при повторном бактериологическом исследовании мочи 17.10.2013г. *M. tuberculosis* не выявлены, но обнаружены *C. riegelii* – 10^6 .

Анализ представленных данных показал, что 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. При микроскопическом исследовании *C. riegelii* представляли собой грамположительные палочки средних размеров, расположенные в мазках хаотично. Их рост был обнаружен на средах МПА, КТА, коринебакагаре с теллуридом калия при $+37^0$ С. На коринебакагаре (производства ФГУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) *C. riegelii* образовывали колонии черного цвета, блестящие, гладкие, диаметром 1,0-1,5 мм после инкубации в течение 24 часов. Каталазоположительны, неподвижны. В тесте ферментации/окисления глюкозы *C. riegelii* только ферментировали глюкозу, медленно окисляли мальтозу, обладали высокой уреазной активностью (разложение уреазы в течение 5 минут),

что является характерными отличительными признаками данного вида. Не редуцировали нитраты в нитриты. *C. riegelii* обладали средней гемолитической (ОП-0,325) и отрицательной ДНК-азной активностью.

Выделенный штамм *C. riegelii* по показателям МПК в соответствии с [92, 134] был чувствителен к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму и резистентен к бензилпенициллину, линкомицину, рифампицину и гентамицину.

Патогенный потенциал *C. riegelii* был определен с помощью разработанного биоинформационного алгоритма (рисунок 4.2). Для этого были использованы следующие значения показателей: степень высеваемости (X1) – 1, активность ДНК-азы (X2) – 0, гемолитическая активность (X3) – 2, AIG-a по отношению к IgG (X4) – 3, уреазная активность (X5) – 1.

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

После введения данных автоматический расчет показал, что значение К составило 0,88. Поскольку $K > 0,72$, этиологическая значимость *C. riegelii* в развитии инфекционного процесса высока. Таким образом, представленные исследования подчеркивают важность выявления коринебактерий, и, в частности, *C. riegelii* из клинических образцов для назначения адекватного лечения.

ГЛАВА 5. Антибиотикочувствительность штаммов недифтерийных коринебактерий, циркулирующих в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области

Формирование устойчивости многих видов коринебактерий к одному или нескольким антибактериальным препаратам способствует их распространению в популяции, в том числе, и как возбудителей внутрибольничных инфекций [17, 21, 30, 140]. Полиантибиотикорезистентность недифтерийных коринебактерий, особенно ассоциированных с другими микроорганизмами, обуславливает более тяжелое и длительное течение болезни [19, 21, 44, 45]. В связи с этим актуальным для борьбы с инфекцией, вызванной недифтерийными коринебактериями, является оптимальный подбор антибактериальных препаратов на основе определения их чувствительности к антибиотикам.

Результаты определения чувствительности штаммов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам, наиболее часто применяемым в клинической практике (ванкомицин, линкомицин, цефазолин, цефотаксим, бензилпенициллин, эритромицин, гентамицин, рифампицин) показали, что к большинству из них в настоящее время коринебактерии сохраняют чувствительность (таблица 5.1). Диапазоны колебаний средних значений МПК всех указанных антибактериальных препаратов колебались в пределах от 0,02 до 2,5 мг/л.

Сравнительное исследование антибиотикочувствительности различных видов коринебактерий показало, что у *C. pseudodiphtheriticum* наименьшие значения МПК обнаружены при использовании гентамицина, цефотаксима, ванкомицина и цефазолина ($0,05 \pm 0,02$ мг/л, $0,05 \pm 0,03$ мг/л, $0,09 \pm 0,04$ мг/л и $0,3 \pm 0,16$ мг/л соответственно). Это могло свидетельствовать о чувствительности *C. pseudodiphtheriticum* к данным препаратам. Высокие показатели МПК выявлены у линкомицина ($1,54 \pm 0,47$ мг/л) и эритромицина ($1,04 \pm 0,46$ мг/л), что, напротив, могло указывать на низкую чувствительность к ним данного вида коринебактерий.

Таблица 5.1 – Чувствительность штаммов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам (МПК мг/л)

Вид	Кол-во штаммов	Антибактериальные препараты, МПК (M±m)									
		Ванкоми-цин	Линкоми-цин	Цефазолин	Цефотаксим	Бензилпенициллин	Гентамицин	Эритромицин	Рифампицин		
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	21	0,09±0,04	1,54±0,47	0,3±0,16	0,05±0,03	0,52±0,3	0,05±0,02	1,04±0,46	0,64±0,4		
<i>C. pseudotuberculosis</i>	12	0,26±0,21	2,26±0,9	0,36±0,3	0,27±0,2	0,74±0,6	0,37±0,13	1,74±1,4	0,75±0,4		
<i>C. xerosis</i>	25	0,56±0,4	1,02±0,4	0,41±0,2	0,57±0,3	0,55±0,4	0,89±0,5	1,11±0,5	0,57±0,4		
<i>C. amycolatum</i>	5	0,65	0,2	1,88	0,94	0,1	2,0	1,01	0,66		
<i>C. striatum</i>	8	0,38	2,16	0,1	0,6	1,2	1,39	2,02	0,13		
<i>C. ulcerans</i>	2	0,02	0,78	0,02	0,02	0,17	0,2	2,5	0,31		

При исследовании *C. pseudotuberculosis* наименьшие значения МПК обнаружены при использовании ванкомицина ($0,26 \pm 0,21$ мг/л) и цефотаксима ($0,27 \pm 0,2$ мг/л), наиболее высокие, также как и для *C. pseudodiphtheriticum*, – линкомицина ($2,26 \pm 0,9$ мг/л) и эритромицина ($1,74 \pm 1,4$ мг/л).

C. xerosis имели примерно одинаковую чувствительность к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму, бензилпенициллину, гентамицину и рифампицину (диапазон МПК составил от $0,41 \pm 0,2$ мг/л до $0,89 \pm 0,5$ мг/л). При этом, как и у вышеназванных видов коринебактерий, наибольшие значения МПК выявлены у линкомицина и эритромицина ($1,02 \pm 0,4$ мг/л и $1,11 \pm 0,5$ мг/л соответственно).

Для *C. amycolatum* наименьшие значения МПК обнаружены при использовании бензилпенициллина ($0,1 \pm 0,06$ мг/л) и линкомицина ($0,2 \pm 0,01$ мг/л), наибольшие – цефазолина ($1,88 \pm 1,2$ мг/л) и гентамицина ($2,0 \pm 0,9$ мг/л).

Для *C. striatum* значения МПК были минимальны при исследовании цефазолина и рифампицина ($0,1 \pm 0,1$ мг/л и $0,13 \pm 0,1$ мг/л соответственно). Высокие показатели МПК выявлены при использовании линкомицина ($2,16 \pm 0,8$ мг/л), эритромицина ($2,02 \pm 0,8$ мг/л) и бензилпенициллина ($1,2 \pm 0,63$ мг/л).

При исследовании *C. ulcerans* выявлены одинаково низкие показатели МПК ванкомицина, цефазолина и цефотаксима ($0,02 \pm 0,01$ мг/л) и высокие ($2,5 \pm 1,1$ мг/л) – эритромицина.

В результате сравнения средних значений МПК исследованных антибактериальных препаратов в отношении указанных видов *C. non diphtheriae* установлено, что наименьшие величины данного показателя обнаружены у ванкомицина и цефотаксима, наибольшие – у эритромицина и линкомицина.

При исследовании чувствительности различных видов *C. non diphtheriae* к антибактериальным препаратам путем определения МПК₅₀, МПК₉₀ (таблица 5.2) установлено, что эти показатели при исследовании *C. pseudodiphtheriticum* были минимальны для ванкомицина, цефазолина, цефотаксима и гентамицина; *C. pseudotuberculosis* – ванкомицина, цефазолина, цефотаксима и гентамицина; *C. xerosis* – цефотаксима; *C. amycolatum* – бензилпенициллина; *C. striatum* –

Таблица 5.2 – Чувствительность различных видов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам (МПК₅₀, МПК₉₀)

АБП МПК (мг/л)	Вид						Недифтерийные коринебактерии
	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>C. xerosis</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>		
Ванкомицин МПК ₅₀ МПК ₉₀	≤ 0,019 0,312	≤ 0,019 0,625	≤ 0,019 ≥ 5,0	≥ 5,0 ≥ 5,0	2,5 2,5		≤ 0,019 2,5
Линкомицин МПК ₅₀ МПК ₉₀	0,312 ≥ 5,0	2,5 ≥ 5,0	0,312 ≥ 5,0	0,625 0,625	≥ 5,0 ≥ 5,0		0,312 ≥ 5,0
Цефазолин МПК ₅₀ МПК ₉₀	≤ 0,019 2,5	≤ 0,019 0,157	≤ 0,019 ≥ 5,0	≥ 5,0 ≥ 5,0	0,157 0,312		≤ 0,019 2,5
Цефотаксим МПК ₅₀ МПК ₉₀	≤ 0,019 2,5	≤ 0,019 1,25	≤ 0,019 0,625	≥ 5,0 ≥ 5,0	2,5 2,5		≤ 0,019 0,625
Бензилпенициллин МПК ₅₀ МПК ₉₀	0,039 2,5	0,039 2,5	0,312 2,5	0,157 0,312	≥ 5,0 ≥ 5,0		0,157 2,5
Гентамицин МПК ₅₀ МПК ₉₀	≤ 0,019 0,078	0,078 0,625	0,625 ≥ 5,0	≥ 5,0 ≥ 5,0	≥ 5,0 ≥ 5,0		0,039 ≥ 5,0
Эритромицин МПК ₅₀ МПК ₉₀	0,312 2,5	0,078 ≥ 5,0	0,078 ≥ 5,0	≥ 5,0 ≥ 5,0	≥ 5,0 ≥ 5,0		0,157 ≥ 5,0
Рифампицин МПК ₅₀ МПК ₉₀	0,078 2,5	0,157 ≥ 5,0	≤ 0,019 ≥ 5,0	≥ 5,0 ≥ 5,0	0,625 0,625		0,078 2,5

цефазолина. При определении чувствительности недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам в целом установили, что на основании расчета показателей МПК₅₀, МПК₉₀ наиболее эффективными оказались ванкомицин, цефазолин и цефотаксим.

На основании полученных величин МПК все исследованные виды *C. non diphtheriae* подразделили на чувствительные и резистентные. Для разграничения этих категорий чувствительности (или резистентности) между собой использовали пограничные концентрации МПК антибиотика, которые сравнивали с показателями NCCLS (Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США), а также показателями EUCAST (Европейский комитет по тестированию антимикробной восприимчивости) для коринебактерий [93, 135].

При определении количества чувствительных (таблица 5.3) к антибактериальным препаратам коринебактерий установлено, что все исследованные штаммы *C. pseudodiphtheriticum* (100%) были чувствительны к ванкомицину, цефотаксиму и гентамицину, 85,7% из них – к цефазолину. Наименьшее количество штаммов *C. pseudodiphtheriticum* проявляло чувствительность к линкомицину ($47,6 \pm 10,9\%$) и рифампицину ($42,9 \pm 10,8\%$). При исследовании *C. pseudotuberculosis* наибольшее количество штаммов ($91,7 \pm 8,0\%$) были чувствительны к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму и гентамицину, наименьшее ($33,3 \pm 13,6\%$) – к линкомицину и рифампицину. Количество чувствительных к указанным антибактериальным препаратам штаммов *C. xerosis* находилось в пределах от 28,0% до 88,0%, причем наибольшее количество штаммов были чувствительны к цефотаксиму и цефазолину ($88,0 \pm 6,5\%$ и $84,0 \pm 7,3\%$ соответственно). Наименьшее количество штаммов проявляли чувствительность к бензилпенициллину ($28,0 \pm 9,0\%$). 4 из 5 исследованных штаммов *C. amycolatum* были чувствительны к ванкомицину, линкомицину, цефотаксиму и гентамицину. При этом только 2 штамма проявляли чувствительность к бензилпенициллину. Все 8 исследованных штаммов *C. striatum* оказались чувствительными к цефазолину, 7 из них – к ванкомицину.

Таблица 5.3 – Количество штаммов недифтерийных коринебактерий, чувствительных к антибактериальным препаратам

Вид	Кол-во штаммов	Антибактериальные препараты (M±m)									
		Ванкомицин	Линкомицин	Цефазолин	Цефотаксим	Бензилпенициллин	Гентамицин	Эритромицин	Рифампицин		
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	21	21 100%	10 47,6±10,9%	18 85,7±7,6%	21 100%	14 66,7±10,3%	21 100%	15 71,4±9,9%	9 42,9±10,8%		
<i>C. pseudotuberculosis</i>	12	11 91,7±8,0%	4 33,3±13,6%	11 91,7±8,0%	11 91,7±8,0%	7 58,3±14,2%	11 91,7±8,0%	5 41,6±14,2%	4 33,3±13,6%		
<i>C. xerosis</i>	25	18 72,0±8,9%	14 56,0±9,9%	21 84,0±7,3%	22 88,0±6,5%	7 28,0±9,0%	15 60,0±9,8%	13 52,0±10,0%	12 48,0±10,0%		
<i>C. amycolatum</i>	5	4	4	3	4	2	4	3	3		
<i>C. striatum</i>	8	7	3	8	6	2	6	4	5		
<i>C. ulcerans</i>	2	2	1	2	2	1	2	2	0		

Наименьшее количество из 8 исследованных штаммов *C. striatum* проявляли чувствительность к линкомицину и бензилпенициллину (3 и 2 штамма соответственно). При исследовании двух штаммов *C. ulcerans* оба они оказались чувствительными к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму, гентамицину и эритромицину, в то время как к линкомицину и бензилпенициллину проявил чувствительность только один из штаммов, а к рифампицину у них чувствительность отсутствовала.

В результате сравнения количества чувствительных к указанным антибактериальным препаратам всех исследованных видов *C. non diphtheriae* установлено, что наибольшее количество штаммов коринебактерий были чувствительны к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму и гентамицину, наименьшее – к бензилпенициллину, рифампицину и линкомицину.

При определении количества резистентных (таблица 5.4.) к антибактериальным препаратам коринебактерий установлено, что среди всех исследованных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* не обнаружены резистентные штаммы к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму и гентамицину. Количество резистентных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* к эритромицину, рифампицину, бензилпенициллину и линкомицину находилось в пределах от 4,8% до 52,4%, причем наибольшее количество штаммов были резистентны к линкомицину ($52,4 \pm 10,9\%$), а наименьшее – к эритромицину ($4,8 \pm 4,7\%$). При исследовании *C. pseudotuberculosis* резистентных штаммов к цефазолину не обнаружено, к ванкомицину, цефотаксиму и гентамицину и их количество минимально ($8,3 \pm 8,0\%$), а к линкомицину – максимально ($66,7 \pm 13,6\%$ штаммов). Количество резистентных ко всем указанным антибактериальным препаратам штаммов *C. xerosis* находилось в пределах от 12,0% до 72,0%, причем наибольшее количество штаммов были резистентны к бензилпенициллину ($72,0 \pm 9,0\%$), наименьшее – к цефазолину и цефотаксиму ($12,0 \pm 6,5\%$). Три из 5 исследованных штаммов *C. amycolatum* были резистентны к бензилпенициллину. При этом

Таблица 5.4 – Количество штаммов недифтерийных коринебактерий, резистентных к различным антибактериальным препаратам

Вид	Кол-во штаммов	Антибактериальные препараты (M±m)									
		Ванкомицин	Линкомицин	Цефазолин	Цефотаксим	Бензилпенициллин	Гентамицин	Эритромицин	Рифампицин		
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	21	0	11 52,4±10,9%	0	0	7 33,3±10,3%	0	1 4,8±4,7%	4 19,0±8,6%		
<i>C. pseudotuberculosis</i>	12	1 8,3±8,0%	8 66,7±13,6%	0	1 8,3±8,0%	5 41,7±14,2%	1 8,3±8,0%	5 41,7±14,2%	5 41,7±14,2%		
<i>C. xerosis</i>	25	7 28,0±9,0%	11 44,0±9,9%	3 12,0±6,5%	3 12,0±6,5%	18 72,0±9,0%	10 40,0±9,8%	10 40,0±9,8%	9 36,0±9,6%		
<i>C. amycolatum</i>	5	1	1	2	1	3	1	2	1		
<i>C. striatum</i>	8	1	5	0	0	6	2	3	1		
<i>C. ulcerans</i>	2	0	1	0	0	1	0	0	0		

только у 1 штамма была выявлена резистентность к ванкомицину, линкомицину, цефотаксиму, гентамицину и рифампицину. При исследовании *C. striatum* ни у одного из штаммов не была обнаружена резистентность к цефазолину и цефотаксиму. Наибольшее число штаммов (6 из 8 исследованных) проявляли резистентность к бензилпенициллину, наименьшее (1 штамм) – к ванкомицину и рифампицину. При исследовании двух штаммов *C. ulcerans* к линкомицину и бензилпенициллину проявил резистентность один из них, тогда как к большинству других антибактериальных препаратов – ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму, гентамицину, эритромицину и рифампицину резистентных штаммов не обнаружено.

По результатам определения количества резистентных к указанным антибактериальным препаратам штаммов *C. non diphtheriae* выявили, что наиболее резистентны они были к бензилпенициллину и линкомицину, а наименее – к цефотаксиму, цефазолину и ванкомицину.

При исследовании расширенного спектра резистентности к антибактериальным препаратам различных видов *C. non diphtheriae* (табл. 5.5) установили, что наибольшее количество резистентных штаммов обнаружено среди представителей вида *C. pseudotuberculosis* (100%), причем среди них чаще штаммы *C. pseudotuberculosis* проявляли резистентность к двум ($33,3 \pm 13,6\%$) антибиотикам. В то же время среди штаммов *C. pseudotuberculosis* наблюдали резистентность к одному, трем ($25,0 \pm 12,5\%$), реже – к четырем ($16,7 \pm 10,8\%$) антибактериальным препаратам.

Среди других видов коринебактерий большое количество резистентных штаммов обнаружено у *C. xerosis* ($96,0 \pm 3,9\%$), причем среди них была выявлена полиантибиотикорезистентность к трем ($12,0 \pm 6,5\%$), четырем ($28,0 \pm 9,0\%$) и пяти ($12,0 \pm 6,5\%$) антибактериальным препаратам. Несколько меньшее количество резистентных штаммов было определено у *C. pseudodiphtheriticum* ($81,0 \pm 8,6\%$), среди которых антибиотикорезистентность встречалась чаще к одному ($38,1 \pm 10,6\%$), реже - к двум ($24,0 \pm 9,3\%$) и трем ($19,0 \pm 8,6\%$) антибактериальным

Таблица 5.5 – Количество штаммов недифтерийных коринебактерий, резистентных к одному и более антибактериальным препаратам

Вид	Количество антибактериальных препаратов						Всего
	1	2	3	4	5	6	
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=21 шт.)	8 38,1±10,6%	5 24,0±9,3%	4 19,0±8,6%	-	-	-	17 81,0±8,6%
<i>C. pseudotuberculosis</i> (n=12 шт.)	3 25,0±12,5%	4 33,3±13,6%	3 25,0±12,5%	2 16,7±10,8%	-	-	12 100%
<i>C. xerosis</i> (n=25 шт.)	4 16,0±7,3%	7 28,0±9,0%	3 12,0±6,5%	7 28,0±9,0%	3 12,0±6,5%	-	24 96,0±3,9%
<i>C. amycolatum</i> (n=5 шт.)	3	-	1	-	-	1	5
<i>C. striatum</i> (n=8 шт.)	0	2	4	1	-	-	7
<i>C. ulcerans</i> (n=2 шт.)	0	0	0	0	0	0	0

препаратам. При исследовании 5 штаммов *C. amycolatum* была выявлена множественная антибиотикорезистентность к трем (1 штамм) и шести антибактериальным препаратам (1 штамм). Из 8 исследованных штаммов *C. striatum* полиантибиотикорезистентность к трем и четырем препаратам обнаружили у 4 и 1 штамма соответственно.

Наиболее часто штаммы недифтерийных коринебактерий проявляли резистентность к одному и двум антибактериальным препаратам, реже – к трем, четырем, пяти и шести препаратам. Подавляющее количество штаммов *C. non diphtheriae* (*C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. amycolatum* и *C. striatum*), у которых обнаружена полиантибиотикорезистентность, были выделены из урогенитального тракта.

Рассматривая, к каким антибактериальным препаратам выявлена полиантибиотикорезистентность (таблица 5.6), установили, что наиболее часто она формировалась к бензилпенициллину, линкомицину и рифампицину (у 28, 22 и 21 штаммов соответственно); реже – к эритромицину и гентамицину (у 12 штаммов); наиболее редко – к ванкомицину, цефотаксиму и цефазолину (у 7, 5 и 3 штаммов соответственно). Следует отметить, что из 47 штаммов *C. non diphtheriae*, проявивших резистентность к двум и более антибактериальным препаратам, 25 (53,2%) штаммов выделены в ассоциации с другими микроорганизмами (*E. faecalis*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. viridans*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *C. krusei*, *Pseudomonas spp.*), а 29 (61,7%) – от практически здоровых лиц.

Интересным является тот факт, что при рассмотрении характера множественной резистентности штаммов *C. non diphtheriae* (к четырем, пяти и шести антибиотикам), обнаруживаемой в большинстве случаев к указанным антибактериальным препаратам, в единичных случаях встречали штаммы, резистентные не только к гентамицину и эритромицину, но и к цефотаксиму, ванкомицину и цефазолину. Следует отметить, что из всех штаммов *C. non diphtheriae* наибольшее количество полиантибиотикорезистентных штаммов определяли среди видов *C. xerosis*, *C. amycolatum* и *C. striatum*.

Таблица 5.6 – Антибактериальные препараты, к которым обнаружена полирезистентность штаммов недифтерийных коринебактерий

Вид	Антибактериальные препараты	Кол-во резистентных штаммов
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=21 шт.)	бензилпенициллин+рифампицин	1
	линкомицин+рифампицин	4
	линкомицин+ бензилпенициллин+ рифампицин	4
<i>C. pseudotuberculosis</i> (n=12 шт.)	линкомицин+рифампицин	2
	гентамицин+рифампицин	1
	бензилпенициллин+линкомицин	1
	бензилпенициллин+линкомицин+рифампицин	2
	линкомицин+рифампицин+эритромицин	1
	бензилпенициллин+цефотаксим+линкомицин+эритромицин	1
	бензилпенициллин+линкомицин+рифампицин+эритромицин	1
<i>C. xerosis</i> (n=25 шт.)	бензилпенициллин+рифампицин	2
	бензилпенициллин+гентамицин	1
	линкомицин+эритромицин	2
	линкомицин+рифампицин	1
	бензилпенициллин+линкомицин	1
	бензилпенициллин+рифампицин+цефотаксим	1
	бензилпенициллин+гентамицин+эритромицин	1
	бензилпенициллин+гентамицин+ванкомицин	1
	бензилпенициллин+цефазолин+гентамицин+рифампицин	1
	бензилпенициллин+гентамицин+рифампицин+ванкомицин	2
	бензилпенициллин+линкомицин+рифампицин+ванкомицин	2
	бензилпенициллин+гентамицин+линкомицин+ванкомицин	1
	бензилпенициллин+гентамицин+линкомицин+эритромицин	1
	бензилпенициллин+цефазолин+линкомицин+ванкомицин+цефотаксим	1
	бензилпенициллин+цефазолин+гентамицин+рифампицин+цефотаксим	1
бензилпенициллин+гентамицин+линкомицин+рифампицин+эритромицин	1	
<i>C. amycolatum</i> (n=5 шт.)	бензилпенициллин+рифампицин+эритромицин	1
	бензилпенициллин+линкомицин+рифампицин+ванкомицин+цефотаксим+эритромицин	1
<i>C. striatum</i> (n=8 шт.)	бензилпенициллин+линкомицин	1
	линкомицин+рифампицин	1
	бензилпенициллин+гентамицин+рифампицин	1
	бензилпенициллин+гентамицин+эритромицин	1
	бензилпенициллин+линкомицин+эритромицин	1
	бензилпенициллин+линкомицин+рифампицин	1
	бензилпенициллин+линкомицин+ванкомицин+эритромицин	1
<i>C. non diphtheriae</i> (n=71 шт.)		47 шт.

Таким образом, на основании полученных данных (МПК (мг/л), МПК₅₀, МПК₉₀, количество чувствительных, резистентных и полирезистентных штаммов) установили, что наиболее эффективными антибактериальными препаратами в отношении штаммов *C. non diphtheriae*, в целом, явились ванкомицин, цефазолин и цефотаксим, а для отдельных видов: *C. pseudodiphtheriticum* - цефазолин, цефотаксим, гентамицин; *C. pseudotuberculosis* – ванкомицин, цефазолин, цефотаксим, гентамицин; *C. xerosis* – цефотаксим; *C. striatum* – цефазолин и рифампицин. Наименьшую эффективность, в свою очередь, проявили в отношении штаммов *C. non diphtheriae*, в целом, бензилпенициллин и линкомицин, а отдельных видов - *C. pseudodiphtheriticum* и *C. pseudotuberculosis* - линкомицин и эритромицин; *C. xerosis* и *C. striatum* – бензилпенициллин, линкомицин и эритромицин. В качестве препаратов выбора в отношении различных видов *C. non diphtheriae* можно рекомендовать цефалоспорины (цефотаксим и цефазолин), резервных препаратов – гентамицин и ванкомицин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Роль патогенного потенциала недифтерийных коринебактерий длительное время была недооценена. Ранее считалось, что недифтерийные коринебактерии, за исключением *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, не патогенны для человека, а обнаружение коринебактерий в клиническом материале объяснялось его контаминацией. Однако в настоящее время известно, что многие виды недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. xerosis*, *C. riegelii*, *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. jeikeium* и др.) выделяют от пациентов с острыми заболеваниями ВДП, гнойно-септическими процессами, патологией УГТ, кожи и др. [68, 78, 87, 144]. Реализация патогенных свойств *C. non diphtheriae* осуществляется за счет таких факторов патогенности как пили, микрокапсула, адгезины, компоненты клеточной стенки, ферменты патогенности, токсины, позволяющих коринебактериям последовательно взаимодействовать с эпителием входных ворот организма, размножаться *in vivo*, преодолевать клеточные и гуморальные механизмы защиты [41]. Формирование устойчивости многих видов коринебактерий к одному или нескольким антибактериальным препаратам способствует их распространению в популяции, в том числе, и как возбудителей внутрибольничных инфекций [31, 44, 148]. Антибиотикоустойчивость недифтерийных коринебактерий, особенно ассоциированных с другими микроорганизмами, к двум и более антибактериальным препаратам обуславливает более тяжелое и длительное течение заболевания [20, 45]. В связи с этим в настоящее время актуальным для борьбы с заболеваниями, вызванными недифтерийными коринебактериями, является высоко качественная лабораторная диагностика на основе определения факторов патогенности, мониторинг антибиотикочувствительности и выявление штаммов *C. non diphtheriae*, обладающих множественной резистентностью к антибактериальным препаратам.

При проведении настоящих исследований использованы штаммы *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*, выделенные из ВДП и УГТ больных и практически здоровых лиц.

Учитывая видовое разнообразие *C. non diphtheriae* и широкий спектр заболеваний, при которых они выделяются, особое значение имеет правильная их идентификация, которая позволит оценить клиническую значимость и выбрать адекватные средства антибактериальной терапии. При анализе эффективности трех методов идентификации *C. non diphtheriae* (бактериологического, молекулярно-генетического (секвенирование генов 16S рРНК) 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 рРНК («золотым стандартом») обнаружено совпадение результатов у 43 (84,3%) штаммов недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. diphtheriae*). Несовпадающие результаты 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 в следующем. С одной стороны, 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. Все это ведет к искажению результатов бактериологического исследования.

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*). При

этом данные масс-спектрометрического исследования 22 штаммов *C. non diphtheriae* таких видов, как *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. minutissimum*, не подтверждены секвенированием генов 16S рНК. 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*.

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

При определении гемолитической активности установили, что среди всех исследованных видов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных, положительной гемолитической активностью обладали большинство ($79,2 \pm 5,9\%$) штаммов. При этом 41,7% штаммов проявляли гемолитическую активность средней и высокой степени. Чаще способность формировать гемолиз проявляли штаммы *C. pseudotuberculosis* (100%), *C. xerosis* (100%), реже *C. pseudodiphtheriticum* ($66,7 \pm 9,6\%$). Среди *C. non diphtheriae*, выделенных от практически здоровых лиц, гемолитическую активность проявили $52,6 \pm 11,5\%$ штаммов. Следует отметить, что у *C. non diphtheriae*, выделенных от практически здоровых лиц, гемолитическая активность была обнаружена 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*. Интересным является тот факт, что при сопоставительном исследовании гемолитической и ДНК-азной активности штаммов *C. non diphtheriae* 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.

Все исследованные штаммы недифтерийных коринебактерий не обладали гемагглютинирующей активностью, определяемой в реакции гемагглютинации эритроцитами человека I (0) группы крови.

Уровень AIg-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 AIg-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%). Следует отметить, что наличие высокой уреазной активности у коринебактерий (особенно таких видов как *C. riegelii* и *C. urealyticum*)

расценивают как фактор патогенности [97].

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*, *S. viridans*, *S. pyogenes*, *S. hominis*, *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. saprophyticus*, *S. pneumoniae*, *S. 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⁺*, *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. morgani*, *P. aeruginosa*), чем выделенные от практически здоровых лиц. Возможно, это является одним из механизмов формирования устойчивости *C. pseudotuberculosis* к колонизационной резистентности организма, что обуславливает их патогенные свойства.

Недифтерийные коринебактерии, как и токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, 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, была одинакова для всех видов недифтерийных коринебактерий, вне зависимости от места их выделения. В то же время значения ФЧ 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 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. *C. pseudotuberculosis*, помимо *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*, является единственным известным на сегодняшний день видом коринебактерий, способным продуцировать токсин, имеющий активность фосфолипазы D, сфингомиелиназы и проникающего фактора [88]. Однако способность к длительной персистенции в организме и антифагоцитарные свойства коринебактерий связаны не только с действием токсина, но и наличием у них *coqD*-фактора, миколовых кислот, способности продуцировать каталазу и супероксиддисмутазу. По результатам наших исследований, *C. pseudotuberculosis*, по сравнению с другими видами коринебактерий, обладал наиболее выраженной способностью индуцировать процессы завершеного фагоцитоза, однако максимальной была и его способность вызывать программированную гибель Мф. 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 [88] и создаются условия для длительной персистенции возбудителя.

Повреждающее воздействие *C. non diphtheriae* на организм в целом и на клетки иммунной системы в частности является важнейшим механизмом

реализации их патогенного действия и способом выживания и распространения в организме. В связи с этим 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) [40, 42, 46]. Учитывая данные о широком спектре иммунорегуляторной активности НфК [46], 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. riegliei*, *C. urealyticum*) в генезе воспалительных заболеваний нижних мочевых путей и уросепсиса [55]. При острых воспалительных заболеваниях ВДП недифтерийные коринебактерии выделяются реже – в 10-15% случаев [96, 108, 159]. По нашим данным, 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.

Угнетающее влияние недифтерийных коринебактерий на клетки иммунной системы способствует их длительной персистенции в организме, и, как следствие,

развитию воспалительных заболеваний различной локализации. Результаты наших исследований указывают на возможность использования НфК для иммунокоррекции иммунодефицитных состояний, развивающихся на фоне заболеваний, обусловленных *C. non diphtheriae*, и связанных, вероятно, с их апоптогенным действием на клетки иммунной системы.

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 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 χ^2 (Chi квадрат) 6,89 при $p<0,01$. 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 метода – 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.

В настоящем исследовании 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-FMS), проведенный с помощью прибора Bruker Daltonik MALDI Biotyper, подтвердил (индекс Score-1,844) результаты идентификации данного вида бактериологическим методом. При микроскопическом исследовании *C. riegelii* представляли собой грамположительные палочки средних размеров, расположенные в мазках хаотично. Их рост был обнаружен на мясо-пептонном агаре, кровяно-теллуритовом агаре, коринебакагаге при $+37^{\circ}\text{C}$. На коринебакагаге (производства ФГУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) *C. riegelii* образовывали колонии черного цвета, блестящие, гладкие, диаметром 1,0-1,5 мм после инкубации в течение 24 часов, каталазоположительные, неподвижные. В тесте ферментации/окисления глюкозы штамм *C. riegelii* только ферментировал глюкозу, медленно окислял мальтозу, обладал высокой уреазной активностью (разложение уреазы в течение 5 минут), что является характерными отличительными признаками данного вида. *C. riegelii* обладали средней гемолитической (ОП-0,325) и отрицательной ДНК-азной активностью. Патогенный потенциал *C. riegelii* был определен с помощью разработанного биоинформационного алгоритма. 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.).

Сравнительное исследование антибиотикочувствительности штаммов *C. non diphtheriae* к антибактериальным препаратам (бензилпенициллину, цефотаксиму, цефазолину, эритромицину, гентамицину, рифампицину, линкомицину,

ванкомицину) показало, что наименьшие величины МПК обнаружены у ванкомицина и цефотаксима, наибольшие – у эритромицина и линкомицина.

При исследовании чувствительности различных видов *C. non diphtheriae* к антибактериальным препаратам путем определения МПК₅₀, МПК₉₀ установлено, что эти показатели при исследовании *C. pseudodiphtheriticum* были 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 в целом, установили, что на основании расчета показателей МПК₅₀, МПК₉₀ наиболее эффективными оказались ванкомицин, цефазолин и цефотаксим.

Согласно величине МПК все исследованные виды недифтерийных коринебактерий подразделили на чувствительные и резистентные [93, 135].

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

Чувствительность к таким антибактериальным препаратам, как цефотаксим и цефазолин, у большинства штаммов коринебактерий можно объяснить, по-видимому, их повреждающим воздействием на клеточную мембрану и подавлением синтеза пептидогликанового слоя, сопровождающихся высвобождением аутолитических ферментов. Клеточная оболочка коринебактерий, имея сложное строение, включает в свой состав такие поверхностные белки, как PS-2, DIP1281, белок 67-72p (гемагглютинин), арабиногалактан, пептидогликан, корд-фактор, липоманнан и липоарабиноманнан, являющиеся факторами патогенности и обуславливающие процессы жизнедеятельности клетки. Повреждающее воздействие цефотаксима и цефазолина на эти структуры влечет за собой их разрушение и лизис

коринебактерий.

По результатам определения количества резистентных к указанным антибактериальным препаратам всех исследованных видов *C. non diphtheriae* установлено, 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.

Наличие большого количества антибиотикорезистентных штаммов *C. non diphtheriae* к таким препаратам, как бензилпенициллин, рифампицин и линкомицин, вероятно, может быть обусловлено давностью и частотой их применения в медицинской практике, а также проведенной ранее антибиотикотерапией обследованных с различными заболеваниями, от которых эти штаммы выделяли. Поскольку антибактериальные препараты в проведенном исследовании были взяты из разных фармакологических групп, возможно наличие различной природы и механизмов резистентности к ним коринебактерий. По-видимому, к таким механизмам могут быть отнесены инактивация антибиотика за счет продукции бета-лактамаз и аминогликозид-модифицирующих ферментов; структурные изменения в молекулах, являющихся мишенями для антибиотика; активное выведение антибиотиков из микробной клетки («efflux pump» – эффлюкс-эффект). При этом снижение проницаемости внешних структур бактериальной клетки является наименее специфичным механизмом устойчивости и обычно приводит к формированию устойчивости одновременно к нескольким разным группам антибиотиков.

Полученные результаты по изучению антибиотикорезистентности у штаммов *C. non diphtheriae* показали, что количество резистентных штаммов 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 уrogenитального тракта. В то же время множественная резистентность штаммов разных видов также отличалась между собой. Так, из

всех исследуемых видов коринебактерий наиболее полиантибиотикорезистентными оказались *C. xerosis* и *C. amycolatum*, у которых наблюдалась резистентность к пяти и шести антибиотикам. При этом чаще резистентность формировалась к бензилпенициллину, линкомицину и рифампицину; реже – к эритромицину и гентамицину.

На основании полученных данных (МПК₅₀, МПК₉₀, количество чувствительных, резистентных и полирезистентных штаммов) установлено, что наиболее эффективными антибактериальными препаратами в отношении штаммов *C. non diphtheriae* явились цефотаксим, цефазолин и ванкомицин, наименее – бензилпенициллин и линкомицин. В качестве препаратов выбора в отношении различных видов *C. non diphtheriae* можно рекомендовать цефалоспорины (цефотаксим и цефазолин), из резервных препаратов – гентамицин и ванкомицин.

Таким образом, штаммы недифтерийных коринебактерий, обладая факторами патогенности, оказывают ингибирующее воздействие на факторы врожденного иммунитета. При этом большинство штаммов коринебактерий были резистентны к одному и нескольким антибактериальным препаратам.

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 вариабельной 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 (К), 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.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ,
ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ**

АБП	— антибактериальные препараты;
AIg-a	— антииммуноглобулиновая активность;
ВДП	— верхние дыхательные пути;
ЗЗР	— зона задержки роста;
ИЗФ	— индекс завершённости фагоцитоза;
КА	— кровяной агар;
КОЕ	— колониеобразующая единица;
КТА	— кровяно-теллуритовый агар;
М.м.	— молекулярная масса;
МПА	— мясо-пептонный агар;
МПК	— минимальная подавляющая концентрация;
мРНК	— матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота;
МУК, МУ	— методические указания;
Мф	— макрофаги;
Нф	— нейтрофилы;
НфК	— нейтрофилокины;
ОП	— оптическая плотность;
ОТДМ	— определение токсигенности дифтерийного микроба;
ПЦР	— полимеразная цепная реакция;
УГТ	— урогенитальный тракт;
ФИ	— фагоцитарный индекс;
ФЧ	— фагоцитарное число;
16S рНК	— 16S рибосомальная рибонуклеиновая кислота;
Ig	— иммуноглобулин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азнабаева, Л.М. Модификация биологических свойств микроорганизмов в паре «доминант-ассоциант» / Л.М. Азнабаева // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 12. – С. 11-15.
2. Анохин, В.А. Случай раннего неонатального сепсиса, обусловленного *S.amycolatum* / В.А. Анохин, С.В. Халиуллина, О.А. Назарова, Х.С. Хаертынов // *Практическая медицина*. – 2012. – № 7. – С. 178-180.
3. Батуро, А.П. Микрофлора верхних дыхательных путей больных аллергией (методы выделения и идентификации) / А.П. Батуро, Э.Е. Романенко, И.Н. Улиско, М.А. Мокроносова, Г.Д. Тарасова, А.В. Сергеев // ГЦ «НИИ вакцин и сывороток» им. И.И.Мечникова РАМН, ФГУ «Научно-клинический центр оториноларингологии» Росздрава. – Москва. – 2006. – С. 27.
4. Бережанский, Б.В. Инфекции диализатных катетеров / Б.В. Бережанский // *Клин. Микробиология и антимикроб. химиотер.* – 2012. – Т. 14 – № 2. – С. 107-117.
5. Биргер, М.О. Справочник по микробиологическим и микробиологическим методам исследования / под ред. М. О. Биргера. – М.: «Медицина». – 1973. – 455 с.
6. Бухарин, О.В. Способ определения антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, И.Н. Чайникова, А.В. Вальшев // Патент РФ № 2236465 от 20.09.2004 г.
7. Власов, В.В. Доказательная медицина как способ решения проблем / В.В. Власов // *Медицинская кафедра*. - 2003. - № 3. - С. 40-41.
8. Гладин, Д.П. Чувствительность к антибактериальным препаратам *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в Санкт-Петербурге / Д.П. Гладин, Н.С. Козлова, Т.К. Зайцева // *Антибиотики и химиотерапия*. – 1999. – Т. 44. – № 5. – С. 17-21.
9. Евстигнеева, Н.П. Микробиота урогенитального тракта пациенток

- репродуктивного возраста, идентифицированная на основе масс-спектров рибосомальных белков / Н.П. Евстигнеева, П.Г. Аминова, Н.А. Герасимова, Н.В. Зильберберг, Н.В. Кунгуров // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 2. – С. 34-39.
10. Заболотных, М.В. Фенотипические формы *Corynebacterium pseudotuberculosis* и их основные свойства / М.В. Заболотных, Н.М. Колычев, И.Г. Трофимов // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4. – С.72-76.
 11. Кобзарь, А.И. Прикладная математическая статистика / А.И. Кобзарь // М.: Физ. Мат. Лит. – 2006. – 816 с.
 12. Колычев, Н.М. Биология коринебактерий / Н.М.Колычев, М.В. Заболотных. – Омск, 2008. – 100 с.
 13. Колычев, Н.М. Характеристика популяций возбудителя казеозного лимфаденита овец / Н.М. Колычев, Л.В. Гежес, Е.В. Лебедеенко, М.В. Заболотных // Ветеринария. – 2002. – № 9. – С. 20-22.
 14. Кондратьева, И.А. Практикум по иммунологии: Учебное пособие / под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. - М., МГУ. - 2001. - 224 с.
 15. Костюкова, Н.Н. Адгезия у *Corynebacterium diphtheriae* / Н.Н. Костюкова, Н.А. Переверзев // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1985. – № 11. – С. 70-72.
 16. Костюкова, Н. Н. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae* / Н.Н. Костюкова, С.Р. Карась // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1987. – № 5. – С. 72-74.
 17. Костюкова, Н.Н. Возбудитель дифтерии и условно-патогенные коринебактерии / Н.Н. Костюкова // Клин. лаб. диагностика. – 2001. – № 6. – С. 25-31.
 18. Костюкова, Н.Н. Опыт проведения внешней оценки качества идентификации видов рода *Corynebacterium* / Н.Н. Костюкова, В.С. Михайлова, В.Н. Малахов, И.Л. Хайдукова // Клин. лаб. диагностика. – 2002. – № 12. – С. 43-45.

19. Костюковская, О.Н. Идентификация недифтерийных бактерий рода *Corynebacterium* и определение их антибиотикочувствительности / О.Н. Костюковская, Е.А. Гладкая // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1992. – 9/10. – С. 29-31.
20. Котельников, Г.П. Доказательная медицина. Научно-обоснованная медицинская практика / Г.П. Котельников, А.С. Шпигель // Самара: СамГМУ. – 2000. – 116 с.
21. Краева, Л.А. Изменение чувствительности к антибиотикам у микроорганизмов рода *Corynebacterium* в Санкт-Петербурге и Ленинградской области / Л.А. Краева, Г.Я. Ценева // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 2. – С. 25-27.
22. Краева, Л.А. Микробиологическая характеристика клинически значимых бактерий рода *Corynebacterium* / Л.А. Краева // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 1. – С. 5-10.
23. Лабинская, А.С. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика / под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой. - М.: Медицина, 2013. – Кн.3, Т. 1. – 752 с.
24. Лабинская, А.С. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. – М.: Медицина, 2012. – 1152 с.
25. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: метод. указания. – М., 1998. – 50 с.
26. Мельников, В.Г. Поверхностные структуры грампозитивных бактерий в межклеточном взаимодействии и пленкообразовании / В.Г. Мельников // Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. – 2010. – № 2. – С. 119-123.
27. Миронов, А.Ю. Молекулярные маркёры патогенов / А.Ю. Миронов, Н.В. Зур // М.: Издательство ООО «Тираж». – 2013. – 184 с.

28. МР 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. – М., 2011. – 55 с.
29. 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.
30. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. – М., 2004. – 91 с.
31. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ Министерства Здравоохранения СССР от 22 апреля 1985 г. № 535. – М., 1985. – 125 с.
32. Патель, Р. MALDI-ToF масс-спектрометрия: трансформативная протеомика для клинической микробиологии // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – № 11. – С. 8-10.
33. Покровский, В.И. Медицинская микробиология / под ред. В.И. Покровского. – М. Гэотар Медицина. – 1998. – С. 230-243.
34. Савичева, А.М. Этиология уретритов у беременных и небеременных женщин / А.М. Савичева, Н.К. Селимян // Журнал акушерства и женских болезней. – 2000. – № 4. – С. 18-22.
35. Сиволодский, Е.П. Идентификация клинических штаммов *Pseudomonas fulva* методами MALDI-ToF масс-спектрометрии и традиционных исследований / Е.П. Сиволодский, Е.В. Зуева, Е.С. Кунилова, Е.А. Богумильчик, Т.В. Домакова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 1. – С. 46-49.
36. Симчера, В.М. Статистика / В.М. Симчера // М.: Финансы и статистика. – 2005. – 428 с.

37. Сорокина Г.А. Набор ДС-ДИФ-КОРИНЕ для идентификации микроорганизмов рода *Corynebacterium*, включая *C.diphtheriae* / Г.А. Сорокина, Н.В. Залесских, А.П. Обрядина // Клин. лаб. диагностика. – 2012. – № 7. – С. 50-53.
38. Страус, Ш.Е. Медицина, основанная на доказательствах / Ш.Е. Страус, В.С. Ричардсон, П. Глацейо, Р.Б. Хэйнс // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 320 с.
39. Строганов, Д.В. Прикладные задачи статистического анализа. Комплексное использование компьютерных методов статистической обработки данных / Д.В. Строганов, А.В. Балдин, В.В. Криницин // М.: МГТУ ГА. – 1998. – 52 с.
40. Тюкавкина, С.Ю. Роль апоптоза в формировании иммунопатологических процессов, способствующих развитию инфекционных заболеваний / С.Ю. Тюкавкина / Иммунология. – 2013. – № 1. – С. 52-57.
41. Харсеева, Г.Г. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования / Г.Г. Харсеева, А.А. Алиева // Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. – 2014. – № 4 – С. 109-119.
42. Харсеева, Г.Г. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты / под ред. Г.Г. Харсеевой. - М.: Практическая медицина. – 2014. – 241 с.
43. Хили, Дж. Статистика. Социологические и маркетинговые исследования / Дж. Хили // СПб.: Питер. – 2005. – 638 с.
44. Ценева, Г.Я. Этиологическое значение *Corynebacterium non diphtheriae* у больных с различной патологией / Г.Я. Ценева, А.Г. Радченко, Л.А. Краева, Ж.Н. Манина // Журн. микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 5. – С. 3-7.
45. Черкасов, С.В. Антибиотикорезистентность коринеформных бактерий репродуктивного тракта женщин / С.В. Черкасов, И.В. Гладышева // Антибиотики и химиотерапия. – 2010. – Т. 55. – № 9/10. – С. 45-49.
46. Швыдченко, И.Н. Цитокин-секретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов / И.Н. Швыдченко, И.В. Нестерова, Е.Ю. Синельникова / Иммунология. – 2005. – № 1. – С. 31-34.

47. Abebe, D. Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia / D. Abebe, S.T. Tessema // *Lett Appl Microbiol.* – 2015. – Vol. 61. – N 5. – P. 469-76.
48. Ahmed, K. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen / K. Ahmed, K. Kawakami, K. Watanabe, H. Mitsushima, T. Nagatake, K. Matsumoto // *Clin. Infect. Dis.* – 1995. – Vol. 20. – N 1. – P. 2041-2046.
49. Alatoon, A.A. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / A.A. Alatoon, C.J. Cazanave, S.A. Cunningham // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50. – P. 160-163.
50. Alderwick, L.J. Deletion of Cg-emb in corynebacteriaceae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core / L.J. Alderwick, E. Radmacher, M. Seidel, R. Gande, P.G. Hitchen, H.R. Morris, A. Dell, H. Sahm // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – N 37. – P. 32362-32371.
51. Aleman, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection / M. Aleman, S.J. Spier // In BP Smith's Large Animal Internal Medicine, 5th ed. St. Louis, MO: Elsevier. – 2015. – P. 1080-1083.
52. Anantharaman, V. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes / V. Anantharaman, L. Aravind // *Genome Biology.* – 2003. – Vol. 4. – N 2. – P. 11.
53. Ang, L.M. *Corynebacterium accolens* isolated from breast abscess: possible association with granulomatous mastitis / L.M. Ang, H. Brown // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – N 5. – P. 1666-1668.
54. Aquino de Sá Mda, C. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis / C. Aquino de Sá Mda, G.V. Gouveia, Cda C. Krewer, J.L. Veschi, A.L. Mattos-Guaraldi, M.M. da Costa // *Genet. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 36. – N 2. – P. 265-268.

55. Aygun, G. A fatal case of urosepsis due to *Corynebacterium riegelii* / G. Aygun, K. Midilli, H. Cilingir, M. Yilmaz, A. Kutuksu, E. Eker // Braz. J. Microbiol. – 2013. – Vol. 44. – N 2. – P. 475-476.
56. Baird, G.J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis / G.J. Baird, M.C. Fontaine // J. Comp. Pathol. – 2007. – Vol. 137. – N 4. – P. 179-210.
57. Baldssari, L. Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus* / L. Baldssari, M.G. Bertuccini, C.R. Ammendolia, C.R. Ariciola, L. Montanaro // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2001. – N 20. – P.343-345.
58. Barksdale, L. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium* / L. Barksdale, R. Linder, I.T. Sulea, M. Pollice // J. Clin. Microbiol. – 1981. – Vol. 13. – N 2. – P. 335-343.
59. Barocchi M.A. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses / M.A. Barocchi, J.Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, B. Albiger, A. Kanth, S. Dahlberg, J. Fernebro, M. Moschioni, V. Massignani / Proc. Natl. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 103. – N 8. – P. 2857-2862.
60. Bayan, N. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications / N. Bayan, C. Houssin, M. Chami, G. Leblon // J. Biotechnol. – 2003. – Vol. 104. – N 1-3. – P. 55-67.
61. Belmares, J. *Corynebacterium endocarditis* species-specific risk factors and outcomes / J. Belmares, S. Detterline, J.B. Pak, J.P. Parada // BMC Infect. Dis. 2007. – N 1. – P. 7-14.
62. Bernard, K.A. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada / K.A. Bernard, C. Munro, D. Wiebe, E. Onqsansoy // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. – N 11. – P. 4375-4381.
63. Bernard, K.A. *Corynebacterium*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [Electronic resource] / K.A. Bernard, G. Funke // Ed. by William

- B. Whitman. – New York: John Wiley & Sons, Ltd, Published Online: 18 mar. 2015. – Mode of access: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm_00026/full. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm_00026 [24.04.2015].
64. Bernard, K.A. *Corynebacterium* species and coryneforms: an update on taxonomy and diseases attributed to these taxa / K.A. Bernard // Clin. Microbiol. Newsl. – 2005. – Vol. 27. - N 2. – P. 9-18.
 65. Bernard, K.A. The Genus *Corynebacterium* and other medically relevant Coryneform-like bacteria / K.A. Bernard // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – N 10. – P. 3152-3158.
 66. Berner, R. Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant / R. Berner, K. Pelz, C. Wilhelm, A. Funke, J.U. Leititis, M. Brandis // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35. – N 4. – P. 1011-1012.
 67. Billington, J.S. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis* / J.S. Billington, P.A. Esmay, J.G. Songer H.B. Jost // FEMS Microbiol. Lett. – 2002. – Vol. 208. – P. 41-45.
 68. Bishai, W.R. Diphtheria and other infections caused by corynebacteria and related species. In: Harrison's principles of internal medicine / W.R. Bishai, J.R. Murray // 17th ed. New York: Mc Graw Hill. – 2008. – Vol. 1. – P. 890-895.
 69. Bonmarin, I. Diphtheriae: a zoonotic disease in France? / I. Bonmarin, N. Guiso, P. Olivier, P.A.D. Grimont, L.B. Daniel // Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – N 31. – P. 4196-4200.
 70. Bregenzer, T. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a butcher / T. Bregenzer, R. Frei, H. Ohnacker, W. Zimmerli // Clin. Microbiol. Infect. – 1997. – Vol. 3. – N 6. – P. 696-698.
 71. Brown, J.M. Phenotypic and genetic characterization of clinical isolates of CDC Coryneform Group A-3: proposal of a new species of *Cellulomonas*, *Cellulomonas denverensis* sp. nov. / J.M. Brown, R.P. Frazier, R.E. Morey, A.G. Steigerwalt, G.J. Pellegrini, M.I. Daneshvar, D.G. Hollis, M.M. McNeil // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – N 4. – P. 1732-1737.

72. Burkovski, A. Cell envelope of *Corynebacteria*: structure and influence on pathogenicity / A. Burkovski // ISRN Microbiol. – 2013. – P. 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/935736>.
73. Carne, H.R. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis* / H.R. Carne, N. Wickham, J.C. Kater // Nature – 1956. – N 178. – P. 701-702.
74. Case, R.J. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies / R.J. Case, Y. Boucher, I. Dahllöf, C. Holmström, W.F. Doolittle, S. Kjelleberg // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73. – N 1. – P. 278-288.
75. Cazanave C. *Corynebacterium* prosthetic joint infection / C. Cazanave, E. Kerryl, Greenwood-Quaintance, A.D. Hanssen, R. Patel // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – N 5. – P. 1518-1523.
76. Cerdeño-Tárraga, A.M. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129 / A.M. Cerdeño-Tárraga, A. Efstratiou, L.G. Dover, M.T. Holden, M. Pallen, S.D. Bentley, G.S. Besra, C. Churcher // Nucleic. Acids. Res. – 2003. – Vol. 31. – N 22. – P. 6516-6523.
77. Chami, M. Organization of the outer layers of the cell envelope of *Corynebacterium glutamicum*: a combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study / M. Chami, N. Bayan, J.C. Dedieu, G. Leblon, E. Shechter, T. Gulik-Krzywicki // Biol. Cell. – 1995. – Vol. 83. – N. 2-3. – P. 219-229.
78. Collins, M.D. *Corynebacterium amycolatum* sp. nov., a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin / M.D. Collins, R.A. Burton, D. Jones // FEMS Microbiol. Lett – 1998. – N 49. – P. 349-352.
79. Colombo, A. V. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes / A. V. Colombo, R. Hirata Jr., C. M. R. de Souza, L.H. Monteiro-Leal, J.O. Previat, L.C. Formiga, A.F. Andrade, A.L. Mattos-Guaraldi // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – Vol. 197. – N 2. – P. 235-239.
80. Connor, K.M. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis / K.M. Connor, M.M. Quirie, G. Baird, W. Donachie // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – N 7. – P. 2633-2637.

81. Costa-Riu, N. Identification of an anion-specific channel in the cell wall of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* / N. Costa-Riu, E. Maier, A. Burkovski, R. Krämer, F. Lottspeich, R. Benz // *Molecular Microbiology*. – 2003. – Vol. 50. – N 4. – P. 1295-1308.
82. Costa-Riu, N. PorA represents the major cell wall channel of the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* / N. Costa-Riu, A. Burkovski, R. Krämer, R. Benz // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – N 16. – P. 4779-4786.
83. Cossart, P. Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? / P. Cossart, R. Jonquieres // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000, Vol. – 97. – N 10. – P. 5013-5015.
84. Coyle, M.B. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects / M.B. Coyle, B.A. Lipsky // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1990. – Vol. 3. – N 3. – P. 227-246.
85. Daffé, M. The cell envelope of corynebacteria. In: Eggeling L, Bott M, editors. *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton, Fla, USA: Taylor & Francis. – 2005. – P.121-148.
86. Daneshvar, M.I. Identification of some charcoal-black-pigmented CDC fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as *Corynebacterium aurimucosum*: proposal of *Rothia dentocariosa* emend. Georg and Brown 1967, *Corynebacterium aurimucosum* emend. Yassin et al. 2002, and *Corynebacterium nigricans* Shukla et al. 2003 pro synonym. *Corynebacterium aurimucosum* / M.I. Daneshvar, D.G. Hollis, R.S. Weyant, J.G. Jordan, J.P. MacGregor, R.E. Morey, A.M. Whitney, D.J. Brenner, A.G. Steigerwalt, L.O. Helsen, P.M. Raney, J.B. Patel, P.N. Levett, J.M. Brown // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42. – N 9. – P. 4189-4198.
87. Dominique, G.J. Hidden microorganisms in abacterial prostatitis prostatodinia / G.J. Dominique, L.G. Human, W.J. Hellstrom // *J. Urol.* – 1997. – Vol. 157. – N 4. – P. 243.
88. Dorella, F.A. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence / F.A. Dorella, L.G.

- Pacheco, S.C. Oliveira, A. Miyoshi, V. Azevedo // *Vet. Res.* – 2006. – Vol. 37. – N 2. – P. 201-218.
89. Dörner, U. Identification of a cell-wall channel in the corynemycolic acid-free Gram-positive bacterium *Corynebacterium amycolatum* / U. Dörner, B. Schiffler, M. A. Lanéelle, M. Daffé, R. Benz // *International Microbiology.* – 2009. – Vol. 12. – N 1. – P. 29-38.
90. Dos Santos, C.S. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages / C.S. dos Santos, L.S. dos Santos, M.C. de Sours // *Microbiol. Immunol.* – 2010. – Vol. 54. – N 1. – P. 1-10.
91. Dramsi, S. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Grampositive bacteria / S. Dramsi, P.H. Trieu-Cuot Bierne // *Res. Microbiol.* – 2005. – Vol. 156. – N 3. – P. 289-297.
92. Eggeling, L. “Structure and synthesis of the cell wall,” in *Corynebacteria*, A. Burkovski / L. Eggeling, S.B. Gurdyal, L. Alderwick // Ed. Caister Academic Press. Norfolk, UK. – 2008. – P. 267-294.
93. EUCAST Definitive document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2015. – Vol. 4. – P. 291-296.
94. Fernandez-Natal, M.I. Isolation of *Corynebacterium ureicelerivorans* from normally sterile sites in humans / M.I. Fernandez-Natal, J.A. Sáez-Nieto, S.Valdezate, R. H. Rodríguez-Pollán, S. Lapeña, F. Cachón, F. Soriano // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 28. – P. 677-681.
95. Ferrer, I. Infección urinaria por *Corynebacterium riegelii* / I. Ferrer, C. Marne, M.J. Revillo, A.I. López, J.J. Velasco, J.B. García-Moya // *Enfermed. Infec. Microbiol. Clín.* – 2001. – Vol. 19. – N 6. – P. 284-285.
96. Funke, G. Clinical microbiology of coryneform bacteria / G. Funke, A. von Graevenitz, J.E. Clarridge, K.A. Bernard // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1997. – Vol. 10. – N 1. – P. 125-159.
97. Funke, G. *Corynebacterium riegelii* sp. nov., an unusual species isolated from

- female patients with urinary tract infections / G. Funke, P.A. Lawson, M.D. Collins // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36. – N 3. – P. 624-627.
98. Gaillot, O. Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine bacterial identification / O. Gaillot, N. Blondiaux, C. Loïez, F. Wallet, N. Lemaître, S. Herwegh, R.J. Courcol // *J. Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49. – N 12. – P. 4412.
99. Gande, R. The two carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* essential for fatty acid and mycolic acid synthesis / R. Gande, L.G. Dover, K. Krumbach // *J. Bacteriol.* – 2007. – Vol. 189. – N 14. – P. 5257-5264.
100. Gaspar, A.H. Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae* / A.H. Gaspar, H. Ton-That // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 6. – N 2. – P. 1526-1533.
101. Gebhardt, H. The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacteriaceae* / H. Gebhardt, X. Meniche, M. Tropis // *Microbiol.* – 2007. – Vol. 153. – N 5. – P. 1424-1434.
102. Hansmeier, N. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae* / N. Hansmeier, T.C. Chao, J. Kalinowski, A. Pühler, A. Tauch // *Proteomics.* – 2006. – Vol. 6. – N 8. – P. 2465-2476.
103. Hard, G.C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages / G. C. Hard // *Infection and Immunity.* – 1975. – Vol. 12. – N 6. – P. 1439-1449.
104. Heggelund, L. Heggelund, L. *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work / L. Heggelund, P. Gaustad, O. E. Håvelsrud, J. Blom, L. Borgen, A. Sundset // *Open Forum Infect Dis* (Spring 2015) 2 (2): doi: 10.1093/ofid/ofv053
105. Hodgson, A.L.M. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D / A.L.M. Hodgson, K. Carter, M. Tachedjian, J. Krywult, L.A. Corner, M. McColl, A. Cameron // *Vaccine.* – 1999. – Vol. 17. – N 7-8. – P. 802-

- 808.
106. Hüntten, P. Identification and characterization of PorH, a new cell wall channel of *Corynebacterium glutamicum* / P. Hüntten, N. Costa-Riu, D. Palm, F. Lottspeich, R. Benz // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2005. – Vol. 1715. – N 1. – P. 25-36.
 107. Indrigo, J. Cord factor trehalose 6,6-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages / J. Indrigo, R.L. Hunter, J.K. Actor // *Microbiology*. – 2003. – Vol.149. – N 8. – P. 2049-2059.
 108. Izurieta, H.S. Exudative pharyngitis possibly due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, a new challenge in the differential diagnosis of diphtheria: report of a case and review / H.S. Izurieta, P.M. Strebel, T. Youngblood, D.G. Hollis, T. Popovic // *Emerg. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 3. – N 1. – P. 65-68.
 109. Kaufman, D. Laryngopharyngitis by *Corynebacterium ulcerans* / D. Kaufman, P. Ott, C. Rueqq // *Infection*. – 2002. – Vol . 30. – N 3. – P. 168-170.
 110. Kawasaki, Y. *Corynebacterium propinquum* as the first cause of infective endocarditis in childhood / Y. Kawasaki, K. Matsubara, H. Ishihara, H. Nigami, A. Iwata, K. Kawaguchi // *J. Infect. Chemother.* – 2014. – Vol. 20. – N 5. – P. 317-319.
 111. Khamis, A. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species / A. Khamis, D. Raoult, B.La Scola // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42. – N 9. – P. 3925-3931.
 112. Knox, K. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae *Corynebacterium* / K. Knox, A.H. Holmes // *Emerg. Infect Dis.* – 2002. – Vol. 8. – N 1. – P. 97-99.
 113. Kochi, S.K. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis / S.K. Kochi, R.J. Collier // *Exp Cell Res.* – 1993. – Vol. 208. – N 1. – P. 296-302.
 114. Konrad, R. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (Maldi-ToF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated

- bacteria / R. Konrad, A. Berger, I. Huber, V. Boshert, S. Hörmansdorfer, U. Busch // Euro Surveill. – 2010. – Vol. 15. – N 43. – P. 1-5.
115. Kuamazawa, N. Chemical properties of the pili of *Corynebacterium renale* / N. Kuamazawa, R. Yanagawa // Infect. Immun. – 1972. – Vol. 5. – N 1. – P. 27-30.
116. Kwaszewska, A.K. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin Corynebacteria / A.K. Kwaszewska, A. Brewczynska, E.M. Szewczyk // Polish J. Microbiol. – 2006. – Vol. 55. – N 3. – P.189-193.
117. Lichtinger, T. The low-molecular-mass subunit of the cell wall channel of the gram-positive *Corynebacterium glutamicum*: immunological localization, cloning and sequencing of its gene *porA* / T. Lichtinger, F. G. Rieß, A. Burkovski, F. Engelbrecht, D. Hesse, H.D. Kratzin, R. Kramer, R. Benz // Eur. J. of Bioch. – 2001. – Vol.268. – N 2. – P. 462-469.
118. Lipsky, B.A. Infection causes by nondiphtheriae corynebacteria / B.A. Lipsky, A.S. Goldberger, L.S. Tomkins, J.J. Plorde // Rev. Infect. Dis. – 1982. – Vol. 4. – N 6. – P. 1220-1235.
119. Mandlik, A. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells / A. Mandlik, A. Swierczynski, A. Das, H. Ton-That // Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 64. – N 1. – P. 111-124.
120. Mandlik, A. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development / A. Mandlik, A. Swierczynski // Trends Microbiol. – 2008. – Vol. 16. – N 1. – P. 33-40.
121. Marchand, C.H. Biochemical disclosure of the mycolate outer membrane of *Corynebacterium glutamicum* / C.H. Marchand, C. Salmeron, R.B. Raad // J. Bacteriol. – 2012. – Vol. 194. – N 3. – P. 587-597.
122. Marienfeld, S. Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wal / S. Marienfeld, E.M. Uhlemann, R. Schmid, R. Krämer, A. Burkovski // Antonie van Leeuwenhoek. – 1997. – Vol. 72. – N 4. – P. 291-297.
123. Martins, C. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study / C. Martins, L. Faria, M. Souza, T. Camello, E. Velasco, J.R. Hirata, L. Thuler, A. Mattos-Guaraldi // Mem. Inst. Oswaldo.

- Cruz. – 2009. – Vol. 104. – N 6. – P. 905-913.
124. Matsunami, M. Urosepsis caused by *Globicatella sanguinis* and *Corynebacterium riegelii* in an adult: case report and literature review / M. Matsunami, Y. Otsuka, K. Ohkusu, M. Soqi, H. Kitazono, N. Hosokawa // J. Infect. Chemother. – 2012. – Vol. 18. – N 4. – P. 552-554.
125. Mattos-Guaraldi, A.L. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae* / A.L. Mattos-Guaraldi, L.C.D. Formiga, G.A. Pereira // Microbes Infect. – 2000. – Vol. 2. – N 12. – P. 1507-1512.
126. May, B.D. *Corynebacterium ulcerans* infections in monkeys / B.D. May // Lab. Anim. Sci. – 1972. – Vol. 22. – N 4. – P. 509-513.
127. McKean, S. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death / S. McKean, J. Davies, R. Moore // Microbiologi. – 2007. – Vol. 153. – N. 7. – P. 2203-11.
128. McKean, S. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction / S. McKean, J. Davies, R. Moore // Microbes Infect. – 2005. – Vol. 7. – N 13. – P.1352-1363.
129. Meinel, D.M. Zoonotic Transmission of Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Strain, Germany, 2012 / D.M. Meinel, R. Konrad, A. Berger, C. König, T. Schmidt-Wieland, M. Hogardt // Emerg Infect Dis. – 2015. – Vol. 21. – N 2. – P. 356-358.
130. Mishra, A.K. Lipoarabinomannan biosynthesis in *Corynebacterineae*: the interplay of two $\alpha(1\rightarrow2)$ -mannopyranosyltransferases MptC and MptD in mannan branching / A.K. Mishra, K. Krumbach, D. Rittmann // Mol. Microbiol. – 2011. – Vol. – 80. – N 5. – P. 1241-1259.
131. Mishra, A.K. Sortase catalyzed assembly of distinct heteromeric fimbriae in *Actinomyces naeshlundii* / A.K. Mishra, A. Das, J.O. Cisar // J. Bacteriol. – 2007. – N. – 189. – P. 3156-3165.
132. Mokrousov, I. *Corynebacterium diphtheriae*: Genome diversity, population structure and genotyping perspectives / I. Mokrousov // J. Infect. Gen. Evol. –

2009. – Vol. 1. – P. 1-15.
133. Moreira, L.O. Effect of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheria* strains / L.O. Moreira, A.F.B. Andrade, MD Vale, S.M. Souza, R. Hirata, L.M. Asad, N. Asad, L.H. Monteiro-Leal, J.O. Previato, A.L. Mattos-Guaraldi // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – N 69. – P. 5907-5913.
134. Moreira, L.O. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells / L.O. Moreira, A.L. Mattos-Guaraldi, A.F.B. Andrade // *Arch Microbiol.* – 2008. – Vol. 19. – N 5. – P. 521-530.
135. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S9. – 1999. – Vol. 19. – N 1.
136. Nelson, A.L. Rrg A is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae* / A.L. Nelson, J. Ries, F. Bagnoli, S. Dahlberg, S. Falker, S. Rounioja, J. Tschop, E. Morfeldt, I. Ferlenghi // *Mol. Microbiol.* – 2007. – N 66. – P. 329-340.
137. Niederweis, M. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins / M. Niederweis, O. Danilchanka, J. Huff, C. Hoffmann, H. Engelhardt // *Trends in Microbiology.* – 2010. – Vol. 18. – N 3. – P. 109-116.
138. Ochrombel, I. Impact of improved potassium accumulation on pH homeostasis, membrane potential adjustment and survival of *Corynebacterium glutamicum* / I. Ochrombel, L. Ott, R. Kramer, A. Burkovski, K. Marin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1807. – N 4. – P. 444-450.
139. Oliveira, M. First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in black alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*) / M. Oliveira, C. Barroco, C. Mottola, R. Santos, A. Lemsaddek, L. Tavares, T. Semedo-Lemsaddek // *BMC Vet. Res.* – 2014. – Vol. 10. – N 1. – P. 218.
140. Olson, M.E. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / M.E. Olson, H. Ceri, D.G. Morck, A.G. Andre, R.R. Read // *Can. J. Vet. Res.* – 2002. – Vol. 66. – N 2. – P. 86-92.
141. Ortiz-Pérez, A. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical

- isolates of *Corynebacterium* species / A. Ortiz-Pérez, N.Z.M de Hijas, J. Esteban, M.I. Fernandez-Natal, J.I. Garcia-Cia, R. Fernandez-Roblas // *Microb. Drug Resist.* – 2010. – Vol. 16. – N 4. - P. 273-277.
142. Ott, L. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells / L.Ott, M. Höller, Gerlach, M. Hensel, J. Rheinlaender, T.E. Schäffer, A. Burkovski // *BMC Microbiology.* – 2010. – Vol. 10. – N 1. – P. 2-10.
143. Ott, L. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells [Electronic resource] / L. Ott, M. Höller, J. Rheinlaender, T.E. Schäffer, M. Hensel, A. Burkovski // *BMC Microbiology.* – 2010. – Vol. 10. – Article 257. - Mode of access: doi:10.1186/1471-2180-10-257. – 14.03.15.
144. Paviour, S. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis / S. Paviour, S. Musaad, S. Roberts, G. Taylor, S. Taylor, K. Shore, S. Lang, D. Holland // *Clin. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 35. – N 11. – P. 1434-1440.
145. Puech, V. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane / V. Puech, M. Chami, A. Lemassu, M.A. Lanéelle, B. Schiffler, P. Gounon, N. Bayan, R. Benz, M. Daffé // *Microbiology.* 2001. – Vol. 147. – N 5. – P.1365-1382.
146. Puliti, M. Experimental model of infection with non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis / M. Puliti, C. von Hunolstein, M. Marangi, F. Bistoni, L. Tissi // *J. Med. Microbiol.* – 2006. – Vol. 55. – N 2. – P. 229-235.
147. Radmacher, E. Two functional FAS-I type fatty acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum* / E. Radmacher, J. Alderwick, G.S. Besra // *Microbiology.* – 2005. – Vol. 151. – N 7. – P. 2421-2427.
148. Reddy, B.S. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids) / B.S. Reddy, A. Chaudhury, U. Kalawat, R. Jayaprada, G. Reddy, B.V. Ramana // *Indian J. Med. Microbiol.* –

2012. – Vol. 30. – N. 1. – P. 52-57.
149. Rennie, R.P. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card / R.P. Rennie, C. Brosnikoff, L. Turnbull, L.B. Reller, S. Mirrett, W. Janda, K. Ristow, A. Krilcich // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – N 8. – P. 2646-2651.
150. Rheinlaender, J. Contour and persistence length of *Corynebacterium diphtheriae* pili by atomic force microscopy / J. Rheinlaender, A. Gräbner, L. Ott, A. Burkovski, T.E. Schaffer // Eur. Biophys. Journal. – 2012. – Vol. 41. – N 6. – P. 561-570.
151. Riegel, P. *Corynebacterium seminale* sp. nov., a new species associated with genital infections in male patients / P. Riegel, R. Ruimy, D. de Briel, G. Prévost, F. Jehl, F. Bimet, R. Christen, H. Monteil // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33. – N 9. – P. 2244-2249.
152. Rock, C.O. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis / C.O. Rock, J.E. Cronan // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – Vol. 1302. – N 1. – P. 1-16.
153. Rogers, E.A. Adhesion by pathogenic *Corynebacteriae* / E. A. Rogers, A. Das, and H. Ton-That // Adv. Exp. Med. Biol. – 2011. – Vol. 715. – N 91. – P. 91-103.
154. Rufael, D.W. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: case report and review / D.W. Rufael, S.E. Cohn // Clin. Infect. Dis. – 1994. – Vol. 19. – N 6. – P. 1054-1061.
155. Ruiz, J.C. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains / J.C. Ruiz, V. D'Afonseca, A. Silva [et al.] // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – N 4. – e1. 8551. doi: 10.1371/journal.pone.0018551.
156. Sabbadini, P.S. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in Hep-2 cells / P.S. Sabbadini, M.C. Assis, E. Trost // Microbial Pathogenesis. – 2012. – Vol. 52. – N 3. – P. 165-176.
157. Sekizuka, T. *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria

- toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage / T. Sekizuka, A. Yamamoto, T. Komiya, T. Kenri, F. Takeuchi, K. Shibayama, M. Takahashi // BMC Microbiol. – 2012. – 12:72 doi:10.1186/1471-2180-12-72.
158. Sjöquist, J. Localization on protein A in the bacteria / J Sjöquist, J. Movitz, I.B. Johansson, H. Hjelm // Eur. J. Biochem. – 1972. – Vol. 30. – P. 190-194.
159. Stackebrandt, E. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards / E. Stackebrandt, J. Ebers // Microbiol. Today. – 2006. – Vol. 33. – P.152-155.
160. Ton-That, H. Assembly of pili in Gram-positive bacteria / H. Ton-That, O. Schneewind // Trends Microbiol. – 2004. – Vol. 12. – N 5. – P. 228-234.
161. Ton-That, H. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae* / H. Ton-That, O. Schneewind // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol. 50. – N 4. – P. 1429-1438.
162. Tsuge, Y. Deletion of cgR_1596 and cgR_2070, encoding NlpC/P60 proteins, causes a defect in cell separation in *Corynebacterium glutamicum* R / Y. Tsuge, H. Ogino, H. Teramoto, M. Inui, H. Yukawa // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190. – N 24. – P. 8204-8214.
163. Venezia, J. Characterization of *Corynebacterium* species in macaques / J. Venezia, K.P. Cassidy, R.P. Marani, Z. Shem, E.M. Buckley, Y. Peters, N. Taylor, F.E. Dewhirst, M.L. Tondella, J.G. Fox // J. Med. Microbiol. – 2012. – Vol. 61. – N 10. – P. 1401-1408.
164. Vila, J. Identification of clinically relevant *Corynebacterium spp.*, *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry / J. Vila, P. Juiz, C. Salas, M. Armela, G.G. de la Fuente, Y. Zboromyrska, J. Navas, J. Bosch, J. Agüero, J.P. de la Bellacasa, L. Martínez-Martínez // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – N 5. – P. 1745-1747.
165. Wagner, J. Infection of the skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria / J. Wagner, R. Ignatius, S. Voss, V. Hopfner, S. Ehlers, G. Funke, U. Weber, H. Hahn // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 33. – N 9. – P. 1598-1600.

166. Welker, M. Proteomics for routine identification of microorganisms / M. Welker // Proteomics. – 2011. – Vol. 11. – N 15. – P. 3143-3153.
167. Yang, Y. Purification and structure analysis of mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* / Y. Yang, F. Shi, G. Tao, X. Wang // J. Bacteriol. – 2012. – Vol. 50. – N 2. – P. 235-240.
168. Yeruham, L. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli dairy cattle / L. Yeruham, D. Elad, S. Friedman, S. Perl // Epidemiol. Infect. – 2003. – Vol. 131. – N 2. – P. 947-955.

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** // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2016. – №4. – С.114-116. (Импакт фактор по РИНЦ 0,297)

Патенты на изобретения:

1. Национальное патентное депонирование. Свидетельство № 207 от 23.12.13г. о депонировании авторского штамма *Corynebacterium riegelii* «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, 2013. – 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. – 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.