

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Герасимов В.Н.¹, Харсеева Г.Г.², Щербатая О.С.², Котов С.А.¹, Чепусова А.В.²

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СМЕШАННЫХ БИОПЛЕНОК ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», 142279 п. Оболensk, г.о. Серпухов, Московская область, Россия;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, Ростов-на-Дону, Россия

*В постэпидемический период циркуляция возбудителя дифтерии в популяции сохраняется благодаря бактерионосительству. Попадая в организм с высоким уровнем антитоксического иммунитета, возбудитель вступает в межмикробные взаимодействия с представителями условно-патогенной микрофлоры, колонизирующей респираторный тракт, и формирует биоплёнку. Материалы и методы. Моделирование процесса биоплёнокообразования осуществляли с использованием штаммов *C.diphtheriae gravis tox⁺ №665*, *C.pseudodiphtheriticum* и *S.aureus*. Образцы биоплёнок помещали на предметный столик сканирующего электронного микроскопа и напыляли золотом в напылительной вакуумной установке EicolB-3 ioncoater (фирма «Eico», Япония) при ионном токе 6-8 мА. Полученные образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе JEOL 6510LB. (фирма «JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 30 кВ. Результаты. При электронно-микроскопическом исследовании образцов биоплёнок *C.diphtheriae gravis tox⁺ №665* и условно-патогенных микроорганизмов видны группы из 2-7 молодых клеток бактерий, упакованных в единую микрокапсулу. Более объёмные скопления клеток бактерий (более 10-12) характерны для образцов биоплёнок, представленных клетками *C.diphtheriae gravis tox⁺ №665* и *S.aureus*. На поверхности биоплёнки расположены молодые клетки бактерий интактной структурой на различных стадиях активного деления. Конгломераты клеток бактерий, покрытые общим межклеточным матриксом, плотно прилегают друг к другу и формируют многослойную биоплёнку. Заключение. Особенности ультраструктуры биоплёнок, содержащих штаммы *C. diphtheriae* и УПМ, особенно антибиотикорезистентных, колонизирующих респираторный тракт, могут способствовать длительной персистенции *C.diphtheriae* в организме. Они не только значительно затрудняют доступ антибактериальных препаратов, но и препятствуют выделению *C.diphtheriae* при проведении культурального исследования.*

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; условно-патогенные микроорганизмы; респираторный тракт; ультраструктура биоплёнки.

Для цитирования: Герасимов В.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С., Котов С.А., Чепусова А.В. Особенности ультраструктуры смешанных биопленок возбудителя дифтерии и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): 623-628.

DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-623-628>

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед.наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Поступила 01.06.2021

Принята к печати 22.07.2021

Gerashimov V.N.¹, Kharseeva G.G.², Sherbataya O.S.², Kotov S.A.¹, Chepusova A.V.²

PECULIARITIES OF THE ULTRASTRUCTURE OF MIXED BIOFILMS OF THE CAUSING AGENT OF DIPHTHERIA AND CONDITIONALLY PATHOGENIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE HUMAN RESPIRATORY TRACT

¹Federal Budgetary Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Rostov State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don

*In the post-epidemic period, the circulation of the causative agent of diphtheria in the population is maintained due to the carrier of bacteria. Entering an organism with a high level of antitoxic immunity, the pathogen enters into intermicrobial interactions with representatives of the opportunistic microflora inhabiting the respiratory tract and forms a biofilm. Materials and methods. Modeling of the biofilm formation process was carried out using the strains *C.diphtheriae gravis tox⁺ №. 665*, *C.pseudodiphtheriticum*, *S.aureus*. Biofilm samples were placed on the stage of a scanning electron microscope and gold-sputtered in an EicolB-3 ioncoater vacuum deposition unit (Eico, Japan) at an ion current of 6-8 mA. The samples obtained were examined in a JEOL 6510LB scanning electron microscope. («JEOL» company, Japan) at an accelerating voltage of 30 kV. Results. Electron*

microscopic examination of samples of biofilms *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 and opportunistic microorganisms shows groups of 2-7 young bacterial cells packed into a single microcapsule. Much more voluminous accumulations of bacterial cells (more than 10-12) are typical for biofilm samples represented by *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 and *S. aureus* cells. On the surface of the biofilm, young bacterial cells with an intact structure are located at various stages of active division. The conglomerates of bacterial cells, covered with a common intermicrobial matrix, adhere tightly to each other and form a multilayer biofilm. Conclusion. Features of the ultrastructure of biofilms containing strains of *C. diphtheriae* and opportunistic bacteria, especially antibiotic-resistant bacteria inhabiting the respiratory tract, can contribute to long-term persistence of the pathogen of diphtheria in the body. They not only significantly complicate the access of antibacterial drugs, but also interfere with the isolation of *C. diphtheriae* during bacteriological research.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; opportunistic microorganisms; respiratory tract; biofilm ultrastructure.

For citation: Gerasimov V.N., Kharseeva G.G., Sherbataya O.S., Kotov S.A., Chepusova A.V. Peculiarities of the ultrastructure of mixed biofilms of the causing agent of diphtheria and conditionally pathogenic microorganisms isolated from the human respiratory tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 623-628 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-623-628>

For correspondence: Kharseeva Galina Georgievna, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department for Microbiology & Virusology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Gerasimov V.N., <https://orcid.org/0000-0002-0473-7785>;
Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;
Shcherbataya O.A., <https://orcid.org/0000-0002-0507-3853>;
Kotov S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7403-8878>;
Chepusova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4490-7013>.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was conducted at the expense of the Federal budget within the framework of the state task «Markers of pathogenicity and antibiotic resistance of opportunistic microorganisms associated with inflammatory diseases of the respiratory tract».

Received 01.06.2021
Accepted 22.07.2021

Инфекционные заболевания представляют серьёзную угрозу человечеству. Миф о том, что в условиях современной цивилизации с бурным развитием научно-технического прогресса инфекционные болезни остались в прошлом, окончательно разрушен. Свидетельством тому явилось появление новых, не известных ранее патогенов. Не следует забывать и о старых «возвращающихся» инфекциях, к числу которых помимо кори, полиомиелита, туберкулёза, эпидемического паротита, относят дифтерию. Эти инфекции контролируются средствами массовой вакцинации, но именно из-за отказов от прививок в России в 90-е годы произошло развитие эпидемии дифтерии [1,2]. Для вакцинопрофилактики дифтерии используют препараты, содержащие дифтерийный анатоксин, который способствует формированию в организме прививаемого антитоксического, но не антибактериального иммунитета [1,2]. Вследствие этого в популяции с высоким уровнем антитоксического иммунитета сохраняется резервуар возбудителя инфекции в форме бактерионосителя токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* [1]. При снижении охвата прививками населения не минуем подъём заболеваемости дифтерией. В постэпидемический период частота выделения *C. diphtheriae* из респираторного тракта человека резко снижена. В последнее десятилетие в России заболеваемость дифтерией регистрируется только на спорадическом уровне [3]. Учитывая тот факт, что благодаря бактерионосительству элиминации возбудителя из популяции не происходит, возникает вопрос, каковы особенности существования *C. diphtheriae* в постэпидемический период в организме. *C. diphtheriae* обладает способностью формировать биоплёнку [4]. Очевидно, что попадая в организм человека с высоким уровнем антитоксического иммунитета, *C. diphtheriae* вступает в межмикробные взаимодействия с условно-патогенными

микроорганизмами (УПМ) нормальной микрофлоры, колонизирующей респираторный тракт, и формирует биоплёнку. Представляет интерес выяснить особенности ультраструктуры смешанных микробных сообществ при формировании биоплёнок *C. diphtheriae* УПМ, локализующихся на эпителии верхних дыхательных путей.

Цель исследования – изучение ультраструктуры смешанных микробных сообществ *C. diphtheriae gravis tox+* и УПМ при формировании биоплёнок *in vitro*.

Материал и методы. Исследован токсигенный штамм *C. diphtheriae gravis tox+* №665, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ Государственный научно-медицинский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные из верхних дыхательных путей от практически здорового взрослого (*C. pseudodiphtheriticum* №1 – в количестве 10^3 КОЕ/мл) и больных с хроническим тонзиллитом (*C. pseudodiphtheriticum* №2 – в количестве 10^6 КОЕ/мл, *Staphylococcus aureus* – в количестве 10^5 КОЕ/мл) в ГАУ РО «ОКДЦ». Штамм *C. pseudodiphtheriticum* №1 обладал чувствительностью ко всем antimicrobным препаратам (АМП), в соответствии с рекомендациями [5]; *C. pseudodiphtheriticum* №2 – множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) (к бензилпенициллину, эритромицину, рифампицину, линкомицину); *S. aureus* – резистентностью к метициллину.

Для исследования ультраструктуры штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* №665, *C. pseudodiphtheriticum* №1, *C. pseudodiphtheriticum* №2, *S. aureus* биомассу микробных клеток обрабатывали 4% раствором глutarового альдегида в 0,2 М Na-какодилатном буфере, pH 7,2. Фиксацию проводили в течение ночи при температуре +4°C. Дополнительную фиксацию проводили в 4% во-

дном растворе четырёхоксида осмия на буфере Райтер-Келленбергера в течение ночи при температуре +4°C. После фиксации и отмывки в буфере клетки бактерий дегидратировали по 10 мин в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 95%) и 20 мин – в абсолютном спирте при его трёхкратной смене. Далее образцы пропитывали смесями абсолютного этанола и аралдита (соотношения 3:1, 1:1, 1:3) при +37°C в течение суток, переносили в чистый аралдит, выдерживали в вакууме (10^{-2} торр) 1,5 часа при температуре +37°C. Заливали образцы аралдитом и полимеризовали при температуре +40°C в течение ночи, затем при температуре +60°C – одни сутки, при температуре +90°C – двое суток [6]. Срезы фиксированной биомассы получали стеклянным ножом на ультрамикротоме Ultracut (ReichertJung, Австрия). Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе TescnaIG2 SpiritBioTWIN при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от 10000 до 100000 крат. Съёмку производили с помощью высококонтрастной широкоугольной CCD камеры GatanOriusSC200W 120kV, а также – CCD камеры высокого разрешения GatanOriusSC1000B 200kV. Обработку фотографий производили с помощью программ TescnaImagingandAnalysis, Gatandigitalmicrograph.

Электронно-микроскопическое исследование препаратов смешанных микробных сообществ *C.diphtheriae gravis tox⁺* и УПМ при формировании биоплёнок осуществляли путём погружения в среду культивирования нержавеющей подложки для поверхностной адгезии клеток бактерий, формирующих биоплёнку. Образцы биоплёнок *C.diphtheriae gravis tox⁺* №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №1, *C.diphtheriae gravis tox⁺* №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №2, *C.diphtheriae gravis tox⁺* №665 и *S.aureus*, адгезированных к подложке, подвергали химической фиксации. Образцы биоплёнок обрабатывали 4%-ным раствором глутарового альдегида и 40%-ным раствором формальдегида, фиксировали в течение 24 час при комнатной температуре. Указанные образцы биоплёнок после фиксации дегидратировали. Дегидратацию образцов проводили по 15 мин в охлаждённых до +4°C водных растворах этилового спирта возрастающей концентрации для предотвращения экстракции различных компонентов клеток (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) и в 100% ацетоне (двукратно по 10 мин). Затем исследуемые образцы высушивали на воздухе.

Обезвоженные образцы биоплёнок помещали на предметный столик сканирующего электронного микроскопа и напыляли золотом в напылительной вакуумной установке EicoIB-3 ioncoater (фирма «Eico», Япония) при ионном токе 6-8 мА. Полученные образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе JEOL 6510LB. (фирма «JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 30 кВ.

Результаты. Начальным этапом исследования явилась характеристика ультраструктуры и качества биомасс планктонных культур штаммов *C.diphtheriae gravis tox⁺* №665, *C.pseudodiphtheriticum* №1, *C.pseudodiphtheriticum* №2 и *S.aureus* методом ультратонких срезов. Для этого клетки бактерий заливали аралдитом и полимеризовали в объёме. Продолжительная полимеризация в мягких условиях позволила жёстко зафиксировать клетки бактерий в объёме полимера, сохраняя при этом исходную структуру микроорганизмов. Обработка четырёхоксидами осмия заблокировала ферментативную

активность и стабилизировала липопротеиновые комплексы, фосфолипиды мембран, цитоплазму, нуклеоид. Реактив «окрасил» ультратонкие структуры клеток, что улучшило чёткость изображения.

Для характеристики целостности структуры биомассы с помощью электронного микроскопа TescnaIG2 SpiritBioTWIN получили изображения при различной кратности увеличения. На электронно-микроскопическом изображении образца планктонной культуры штамма *C.diphtheriae gravis tox⁺* №665 (рис.1, а) наблюдаются полиморфные клетки палочковидной, кокковидной, овальной формы размером от 0,3-0,5 мкм до 0,5-2,0 мкм. Ультратонкая структура этого образца представлена следующими элементами: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, наружная мембрана, цитоплазма. Клеточная стенка состоит из пептидогликанового слоя толщиной 10-20 нм. Цитоплазматическая мембрана гладкая или волнистая, плотно примыкает к клеточной стенке бактерий или обособлена от неё небольшим периплазматическим пространством. Наружная мембрана у значительной части образцов очень плотно граничит с наружной поверхностью клеточной стенки. Цитоплазма клетки представлена комплексом структурных компонентов: нуклеоид – светлые зоны с низкой электронно-оптической плотностью, рибосомы – мелкозернистые тёмные включения высокой электронно-оптической плотности; полисомы – тяжи различной длины.

В отдельных клетках видны небольшие вакуоли или пузырьки газа и плотные затемнённые области с размытыми контурами, которые могут представлять собой полифосфатные комплексы зёрен волкутина. Видны клетки бактерий на разных стадиях бинарного деления, осуществляемого простой перетяжкой клеток с последующим образованием двух равноценных дочерних клеток. Внутриклеточный мембранный аппарат не развит.

При исследовании морфологии клеток *C.pseudodiphtheriticum* №1 (рис.1, б) обнаружен выраженный полиморфизм: клетки имеют кокковидную (овальную, округлую), веретёнообразную, клиновидную форму. Ряд клеток имеет форму палочек размером 0,3x2,5 мкм. Некоторые клетки имеют перегородки, расположенные на латеральных концах или посередине, делящие клетку на две, не всегда равноценные дочерние клетки. Присутствуют микроорганизмы с нетипичным способом «деления», характеризующимся образованием новых, «молодых» клеток внутри материнской. В них имеются все основные органоиды: нуклеоид, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка и другие органоиды, необходимые для поддержания жизнеспособности клетки. После завершения формирования новой клетки, материнская клетка разрушается. Ультратонкая структура клеток *C.pseudodiphtheriticum* №1 имеет такое же строение, как и *C.diphtheriae gravis tox⁺* №665 (см. рис.1, а), но особенностью является наличие микрокапсул или слизистых чехлов у части клеток.

Особенностями морфологии отличается образец *C.pseudodiphtheriticum* №2 (рис.1, в). Наряду с полиморфизмом и гетерогенностью микроорганизмов следует отметить выраженную склонность большого количества клеток этого фенотипа к образованию внутриклеточных перегородок, так называемых септ, которые придают клеткам характерную исчерченность. Размеры клеток варьируют от 0,5-0,8 мкм до 0,5-4,0 мкм. Толщина клеточной стенки составляет 20-30 нм, толщина септ – 40-80 нм. Многие клетки имеют микрокапсулу, толщина которой составляет 50-80 нм.

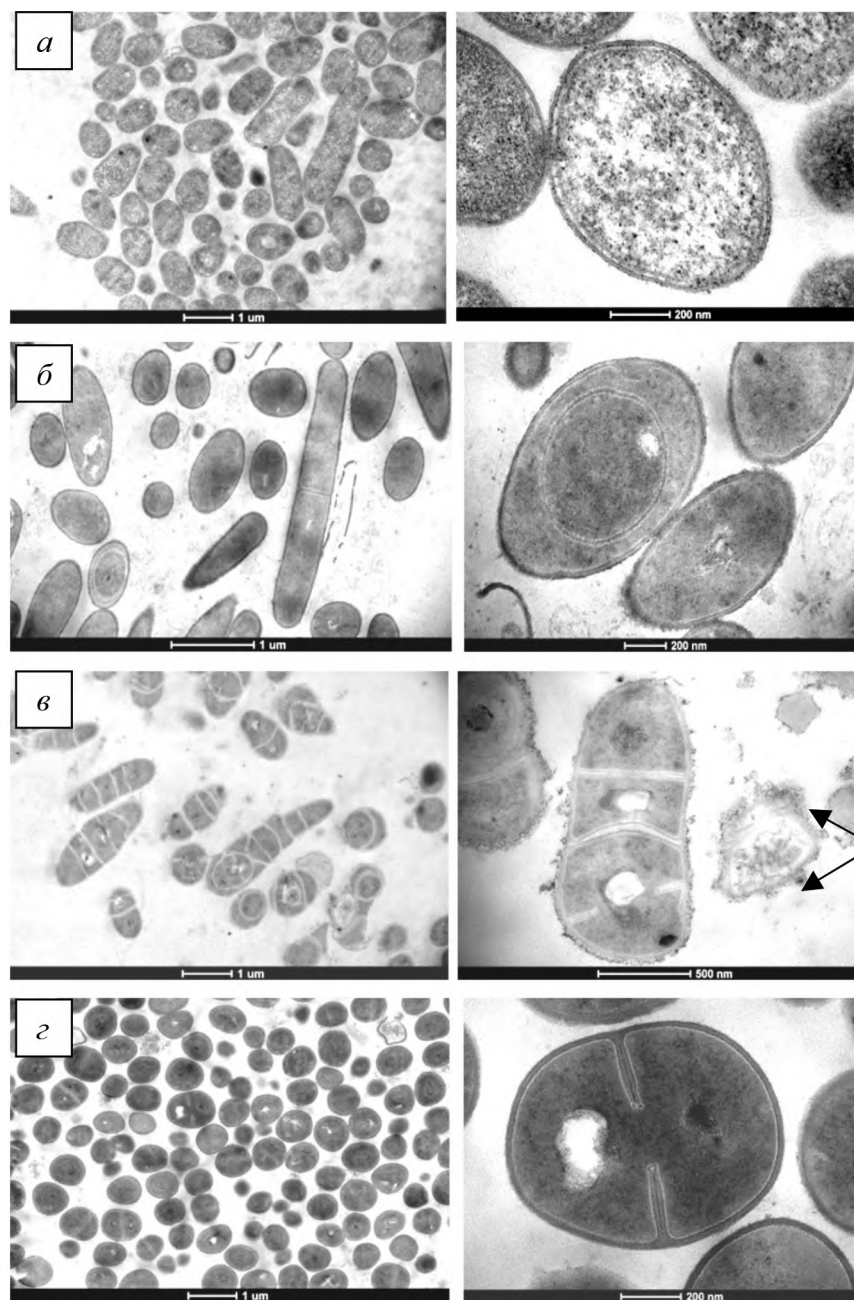


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение ультратонких срезов бактерий в просвечивающем электронном микроскопе TecnaiG2 SpiritBioTWIN: а – *C.diphtheriae* *gravis* *tox*⁺ №665; б – *C.pseudodiphtheriticum* №1; в – *C.pseudodiphtheriticum* №2 (стрелкой показаны внутриклеточные перегородки – септы); г – *S.aureus*.

Клетки штамма *S.aureus* (рис.1, г) имеют кокковидную форму, одинаковое строение и размеры 0,5-0,8-1,0 мкм (в зависимости от стадии развития и деления). Клеточная стенка плотная, гомогенная, толщиной около 20 нм. Особенностью строения *S.aureus* является наличие у них мембранно-стеночного комплекса, в котором внутренняя поверхность клеточной стенки сращена с наружным листком цитоплазматической мембраны, что придает особую устойчивость этому виду бактерий. Цитоплазма неделящихся, находящихся в покое клеток, имеет однородное зернистое строение, упакована различными глобулярными и фибриллярными компонентами. В образце присутствует множество клеток на

разных стадиях деления, у которых хорошо видна вращающаяся от периферии к центру поперечная перегородка. Она состоит из двух лепестков цитоплазматической мембраны и ригидного слоя пептидогликана клеточной стенки, плотно примыкающих друг к другу. Цитоплазма упакована различными глобулярными и фибриллярными компонентами. Мембранный внутриклеточный аппарат не развит.

Электронно-микроскопическое исследование образцов биоплёнок *C.diphtheriae* *gravis* *tox*⁺ №665 и УПМ выявило ряд особенностей их организации, а широкий диапазон увеличения (от x500 до x10000) позволил более подробно оценить процесс биоплён-

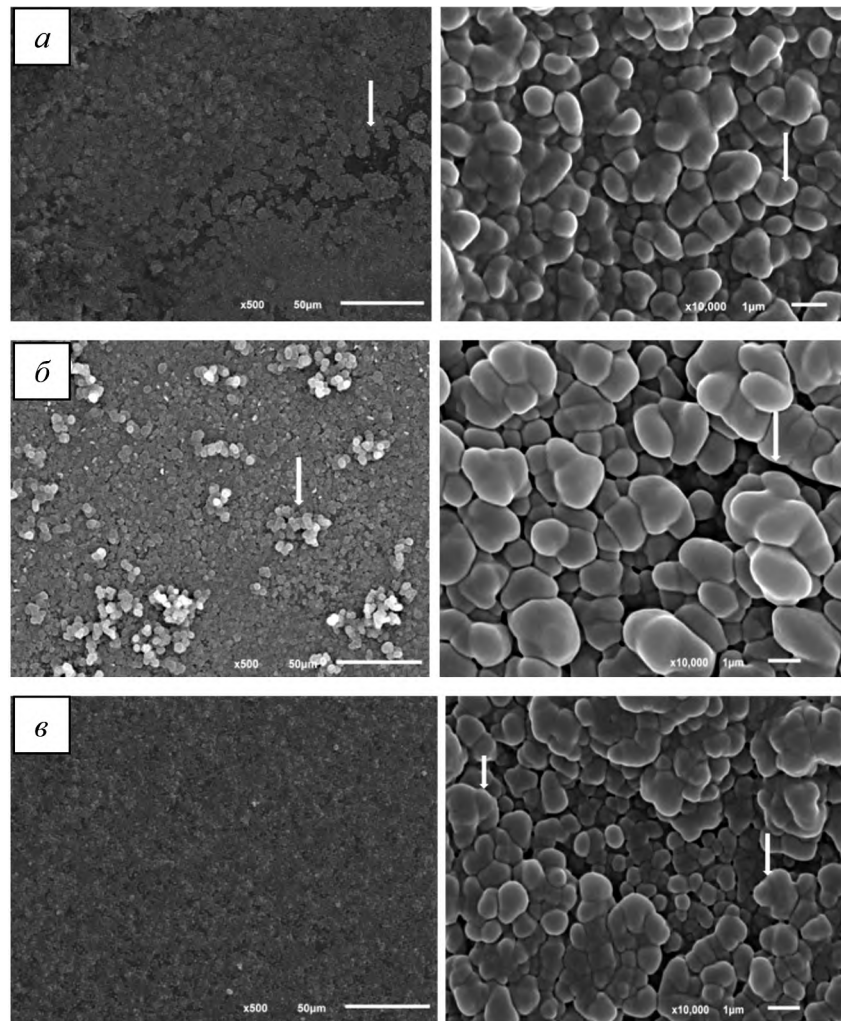


Рис. 2. Трехмерное изображение биопленок штамма *C.diphtheriaeagravistox+* №665 и условно-патогенных бактерий в сканирующем электронном микроскопе JEOL 6510LB. *a* – *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №1 (стрелкой указаны группы из 2-5 молодых бактериальных клеток в единой микрокапсуле); *б* – *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №2 (стрелкой указаны молодые бактериальные клетки с интактной структурой на поверхности биопленки); *в* – *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и *S.aureus* (стрелкой указаны молодые бактериальные клетки с интактной структурой на различных стадиях активного деления).

кообразования. На обзорных снимках (ув. x500) образцов биопленок *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №1 (рис.2, *a*) и *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №2 (рис.2, *б*) видны зоны активного деления бактерий и образования бактериальной биопленки.

Сплошная бактериальная биопленка представлена клетками *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и *S.aureus* (рис. 2, *в*). На фотографиях биопленок, образованных *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и штаммами *C.pseudodiphtheriticum* №1 и *C.pseudodiphtheriticum* №2 (ув. x10000) видны группы из 2-7 молодых клеток бактерий, упакованных в единую микрокапсулу.

Более объёмные скопления клеток бактерий (более 10-12) характерны для образцов биопленок, представленных клетками *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и *S.aureus*. На поверхности биопленки расположены молодые клетки бактерий интактной структурой на различных стадиях активного деления. На снимках видно, что конгломераты клеток бактерий, покрытые

общим межмикробным матриксом, плотно прилегают друг к другу и формируют многослойную биопленку.

Обсуждение. Клетки бактерий исследованных штаммов коринебактерий и *S.aureus*, колонизирующих респираторный тракт, имеют определённые особенности своей морфологии. Для всех исследованных видов коринебактерий характерен полиморфизм, у штамма *C.pseudodiphtheriticum* №2 цитоплазма клеток разделена септами. Этот штамм обладает МЛУ (к четырём АМП), что может явиться следствием формирования у него мутационной изменчивости. Мутации, затрагивающие гены, участвующие в делении клетки, могут привести к неправильной сегрегации генетического материала и нарушениям, связанными с отслоением клеточных стенок и их расхождением после завершения деления [7]. В результате этого происходит образование новых неразделённых клеток, как имеющих нуклеоид, так и лишённых нуклеоида, не несущих генетический материал. Такие особенности морфологической структуры могут существенно затруднять доступ АМП в бактериальную клетку. Формирование

неразделённых клеток бактерий, разграниченных перегородками (септами), может явиться одним из путей формирования антибиотикорезистентности у коринебактерий. Особенностью ультраструктуры клеток *S.aureus* является наличие у них мембранно-стеночного комплекса, в котором внутренняя поверхность клеточной стенки сращена с наружным листком цитоплазматической мембраны, что придает особую устойчивость этому виду бактерий.

Биоплёнки, формируемые этими видами микроорганизмов, имеют сложную, многослойную ультраструктуру. Они представлены конгломератами, состоящими из нескольких клеток бактерий, покрытых общим межмикробным матриксом. Конгломераты плотно прилегают друг к другу, формируя многослойную структуру, в которой глубоко упрятаны клетки *C.diphtheriae*. Такое расположение *C.diphtheriae* в составе биоплёнки значительно ограничивает возможность его выделения культуральным методом при лабораторной диагностике и доступ к нему АМП. Это может усугубляться и особенностями структуры обладающего МЛУ штамма *C.pseudodiphtheriticum* №2, клетки которого разделены септами. Все это создает условия для длительной персистенции *C.diphtheriae* в организме человека и сохранения резервуара возбудителя инфекции в постэпидемический период.

Заключение. Особенности ультраструктуры биоплёнок, содержащих штаммы *C.diphtheriae* и УПМ, особенно антибиотикорезистентных, колонизирующих респираторный тракт, могут способствовать длительной персистенции *C.diphtheriae* в организме. Они не только значительно затрудняют доступ АМП, но и препятствуют выделению *C.diphtheriae* при проведении культурального исследования. В постэпидемический период при высоком уровне противодифтерийного антитоксического иммунитета в популяции сохраняется скрытое бактерионосительство, которое обусловлено, в том числе, и особенностями ультраструктуры смешанной биоплёнки в респираторном тракте носителей.

ЛИТЕРАТУРА (п. 4 см. REFERENCES)

1. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Дифтерийное бактерионосительство. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 60-70. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-60-70>.

2. Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1999; 2: 92-6.
3. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. Доступно по: <https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/>. Ссылка активна на 24 февраля 2021.
5. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста EUCAST, Версия 10.0. 2020. Доступно по: <http://www.eucast.org>. Ссылка активна на 24 февраля 2021.
6. Герасимов В.Н., Дятлов И.А., Храмов М.В., Маринин Л.И., Голов Е.А., Миронова Р.И. и др. Морфопопуляционные и ультраструктурные особенности клеток возбудителя сибирской язвы, выделенных из макроорганизма. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2010; 3: 51-5.
7. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Гурьев А.С., Маянский Н.А. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (2): 116-21.

REFERENCES

1. Kostyukova N.N., Bechalo V.A. Diphtheria Carriage. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2018;17(5):60-70. doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-60-70. (in Russian)
2. Kostyukova N.N. The lessons of Diphtheria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1999;2:92-6. (in Russian)
3. Infectious morbidity in the Russian Federation [Internet]. Available at: <https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials>. Accessed:24 Feb 2021. (in Russian)
4. Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in Microbiology*. 2008;16(1):33-40.doi: 10.1016/j.tim.2007.10.010.
5. Tables of cut-off values for interpretation of MIC values and diameters of EUCAST growth inhibition zones, Version 10.0. 2020 [Internet]. Available at: <http://www.eucast.org>. Accessed: 24 Feb 2021. (in Russian)
6. Gerasimov V.N., Dyatlov I.A., Khramov M.V., Marinin L.I., Golov E.A., Mironova R.I. et al. Morphopopulation and ultrastructure peculiarities of cells-excitors of Siberian plague, isolated from macroorganism. *Doklady Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk*. 2010;3: 51-5. (in Russian)
7. Chebotar' I.V., Bocharova Yu.A., Guryev A.S. Mayansky N.A. Bacteria survival strategies in contact with antibiotics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020;65(2):116-21. doi:10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121. (in Russian)