

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Харсеева Г.Г.¹, Алиева А.А.¹, Алексеева Л.П.², Мангутов Э.О.¹, Шовкун Л.А.¹

ЦИТОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ В СОСТАВЕ БИОПЛЕНКИ

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;
²ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

При колонизации носоглотки токсигенными штаммами возбудителя дифтерии происходит выделение токсина, способствующего гибели эпителиальных клеток. У бактерионосителей развития клинической картины заболевания не происходит. Это связано с особенностями состояния их иммунной системы, особенностями продукции дифтерийного экзотоксина коринебактериями в составе биопленки. Цель - определение характера цитопатического действия *C. diphtheriae* в составе биопленки на культуре клеток CHO-K1. Исследованы планктонные и биоплёночные (120- и 720-час.) культуры штаммов: *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269, *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенный от больного с диагнозом «дифтерия ротоглотки локализованная» *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» тох-геном. Биоплёночные (120- и 720-ч) культуры штаммов возбудителя дифтерии получали по методике Watnik. ЦПД штаммов коринебактерий исследовали на культуре клеток CHO-K1 с учётом в инвертированном микроскопе. При исследовании ЦПД планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий установлено, что количество живых клеток CHO-K1 уже через 24 ч было незначительным (25,3±1,2%) и резко уменьшилось (2,5±0,5%) через 72 ч культивирования. Под воздействием биоплёночных и, особенно, 720-ч культур обнаружена иная динамика ЦПД: количество живых клеток через 24 ч оставалось значительным (82,5±2,2%), при 72-часовом снижалось до 25,0±3,0%. При исследовании фильтратов планктонных и биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» тох-геном выявлены аналогичные закономерности. Количество живых клеток CHO-K1 при воздействии фильтрата 720-час. биоплёночной культуры было значительно выше ($p \leq 0,05$), чем при исследовании токсигенных штаммов коринебактерий. Рассматривая характер ЦПД обнаружили, что для планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий свойственно изменение монослоя клеток, проявляющееся их истончением и удлинением. При исследовании 720-часовых биоплёночных культур при 72-ч экспозиции обнаружено появление большого количества округлённых клеток (63-69%). Для ЦПД, формирующегося под воздействием фильтратов планктонных и биоплёночных культур *C. diphtheriae* с «молчащим» тох-геном, штаммов недифтерийных коринебактерий, характерно округление клеток и формирование симпластов. В составе биопленки интенсивность ЦПД токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» тох-геном снижалась. ЦПД, проявляющееся истончением и удлинением клеток CHO-K1, связано с действием дифтерийного экзотоксина, округление - ферментов коринебактерий и, по всей видимости, фрагментов поверхностных структур - адгезинов. Пониженное выделение токсина и ферментов за пределы матрикса биопленки *C. diphtheriae* является важной причиной «бессимптомности» носительства при дифтерии.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; цитопатическое действие; планктонные и биоплёночные культуры.

Для цитирования: Харсеева Г.Г., Алиева А.А., Алексеева Л.П., Мангутов Э.О., Шовкун Л.А. Цитопатическое действие возбудителя дифтерии в составе биопленки. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 681-685.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-681-685>

Kharseeva G. G.¹, Alieva A. A.¹, Alekseeva L. P.², Mangutov Ye. O.¹, Shovkun L.A.¹

CYTOPATHIC EFFECT OF DIPHTHERIA PATHOGEN IN THE COMPOSITION OF BIOFILM

¹Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; 344002, Rostov-on-Don, Russian Federation

When the nasopharynx is colonized with toxigenic strains of the diphtheria pathogen, toxin is released, which contributes to the death of epithelial cells. But in bacterial carriers, the development of the clinical picture of the disease does not occur. This is due to the peculiarities of the state of their immune system, as well as the peculiarities of the production of diphtheria exotoxin by corynebacteria in the biofilm. **Goal.** Determining the nature of the cytopathic effect of *C. diphtheriae* as part of a biofilm in CHO-K1 cell culture. The planktonic and biofilm (120- and 720-hour) cultures of the strains were studied: *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269, *C. diphtheriae gravis tox⁺* isolated from a patient with a diagnosis Localized oropharyngeal diphtheria *C. diphtheriae gravis* with a silent tox-gene. Biofilm (120- and 720-hour) cultures of diphtheria pathogen strains were obtained according to the Watnik method. The cytopathic effect of corynebacterial strains was studied on a CHO-K1 cell culture, taking into account in an inverted microscope. When studying the cytopathic effect of planktonic cultures of toxigenic strains of corynebacteria, it was found that the number of living CHO-K1 cells after 24 hours was insignificant (25.3±1.2%) and sharply decreased (2.5±0.5%) after 72 hours of cultivation. Under the influence of biofilm and, especially, 720-hour cultures, a different cytopathic effect dynamics was found: the number of living cells after 24 hours remained significant (82.5±2.2%), while at 72-hour it decreased to 25.0±3.0%. In the study of filtrates of planktonic and biofilm cultures of *C. diphtheriae* strain with a «silent» tox-gene, similar patterns were revealed. However, the number of live CHO-K1 cells

when exposed to the filtrate of a 720-hour biofilm culture was significantly higher ($p \leq 0.05$) than when studying toxigenic strains of corynebacteria. Considering the nature of the cytopathic action, it was found that planktonic cultures of toxigenic strains of corynebacteria are characterized by a change in the cell monolayer, manifested by their thinning and elongation. The study of 720-hour biofilm cultures at 72-hour exposure revealed the appearance of a large number of rounded cells (63-69%). The cytopathic effect, formed under the influence of filtrates of planktonic and biofilm cultures of *C. diphtheriae* with a «silent» tox-gene, as well as strains of non-diphtheria corynebacteria, is characterized by rounding of cells and the formation of symplasts. In the biofilm, the intensity of the cytopathic effect of toxigenic *C. diphtheriae* strains and *C. diphtheriae* strain with a silent tox-gene decreased. CPD, manifested by thinning and lengthening of CHO-K1 cells, is associated with the action of diphtheria exotoxin, and rounding is associated with corynebacterial enzymes and, apparently, fragments of surface structures - adhesins. Decreased release of toxin and enzymes beyond the *C. diphtheriae* matrix is a significant cause of the «asymptomatic» carriage of diphtheria.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; cytopathic effect; planktonic and biofilm cultures.

For citation: Kharseeva G. G., Alieva A. A., Alekseeva L. P., Mangutov Ye. O., Shovkun L.A. Cytopathic effect of diphtheria pathogen in the composition of biofilm. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (11): 681-685 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-681-685>

For correspondence: Kharseeva Galina Georgievna; e-mail: galinagh@bk.ru

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 05.09.2019
Accepted 19.09.2019

Главным фактором патогенности *C. diphtheriae* является дифтерийный экзотоксин, который играет ключевую роль в патогенезе дифтерии и развитии осложнений. Попадая в организм человека, возбудитель дифтерии может вызывать развитие, как манифестированных форм инфекции, так и бессимптомных. В межэпидемический период, когда клинически выраженные формы дифтерии не регистрируются, эпидемический процесс поддерживается за счёт бактерионосителей [1]. При бактерионосительстве процесс колонизации эпителия верхних дыхательных путей ведёт к формированию биоплёнки. В составе биоплёнки адгезивность коринебактерий увеличивается, а инвазивность уменьшается [2]. При колонизации носоглотки токсигенными штаммами возбудителя дифтерии происходит выделение дифтерийного токсина, способствующего гибели эпителиальных клеток [3]. Развития клинической картины заболевания у бактерионосителей не происходит. Это связано с особенностями состояния их иммунной системы (высокий уровень антитоксического иммунитета и низкий – антибактериального, пониженный местный иммунитет) [3; 4]. С другой стороны, существенную роль в этом процессе могут играть и особенности продукции дифтерийного экзотоксина коринебактериями в составе биоплёнки.

Цель исследования - определение характера цитопатического действия *C. diphtheriae* в составе биоплёнки на культуре клеток

Материал и методы. Исследованы планктонные и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры штаммов: *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269, полученные из ГИСК им. Л. А. Тарасевича; *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенный от больного с диагнозом «дифтерия ротоглотки локализованная» бактериологической лабораторией ФГКУ «1002 ЦГСЭН» Минобороны России г. Ростова-на-Дону; *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» tox-геном (отрицательный в тесте Элека и положительный при определении гена дифтерийного токсина в ПЦР), предоставленный МБУЗ «ГБ № 1 им. Н. А. Семашко Ростова-на-Дону». Исследованы планктонные культуры штаммов недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum* – 2 шт., *C. tuberculostearicum* - 1

шт., *C. propinquum* – 5 шт., *C. xerosis* – 1 шт., *C. accolens* – 1 шт., *C. amycolatum* – 1 шт.), выделенные от практически здоровых лиц.

Биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры штаммов возбудителя дифтерии получали по методике Watnik [5]. Определение токсигенности в тесте Элека (реакция преципитации в агаре) проводили в соответствии с указаниями [6]. Для тестирования гена дифтерийного токсина использовали ПЦР со специфическими праймерами, комплементарными двум участкам гена дифтерийного токсина, с помощью программы Vector NTI. Праймеры синтезированы в НПО «Литех» (Москва).

Исследованы фильтраты планктонных и биоплёночных (120 и 720 ч) культур штаммов коринебактерий (использовали мембранные фильтры фирмы «Millipore» (США) с размером пор 0,45 мкм), которые титровали в 96-луночном планшете в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и вносили в лунки с клетками СНО-К1 по 0,05 мл, предварительно удалив питательную среду. Каждый образец фильтрата культур коринебактерий исследовали в 7-8 повторах. Планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч при температуре +37° С, влажности - 90% и концентрации CO₂ - 5%. Учёт производили через 24, 48, 72 часа.

Цитопатическое действие (ЦПД) исследованных культур штаммов коринебактерий на культуру клеток СНО-К1 учитывали в инвертированном микроскопе. Определяли количество жизнеспособных и изменённых клеток в инвертированном микроскопе по морфологическим и деструктивным изменениям в виде истончения, удлинения, округления, образования симпластов. Регистрацию результатов проводили с использованием цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа. Для этого лунки с интактной культурой клеток СНО-К1 (контроль) и лунки с клетками, подвергшимися воздействию фильтратов исследованных культур коринебактерий (опыт) фиксировали на предметном столике. Клетки фотографировали через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз без дополнительного окрашивания.

Концентрацию токсина (Lf/мл) в исследованных фильтратах планктонных и биоплёночных культур штаммов

коринебактерий определяли в соответствии с рекомендациями, изложенными в общей фармакопейной статье [7].

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы *STATISTICA 12.0* (*StatSoftInc*, США) и *MedCalc* (версия 9.3.5.0).

Результаты. Все исследованные культуры коринебактерий предварительно протестированы в ПЦР и тесте Элека. Положительными в ПЦР оказались все планктонные и биоплёночные культуры штаммов *C. diphtheriae*, отрицательными – штаммов недифтерийных коринебактерий. В тесте Элека токсигенность проявили все планктонные и биоплёночные культуры штаммов *C. diphtheriae*, за исключением *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим *tox*-геном») и штаммов недифтерийных коринебактерий.

Исследование динамики ЦПД планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий показало (см. таблицу), что количество живых клеток СНО-К1 уже через 24 ч было незначительным ($25,3 \pm 1,2\%$), уменьшилось до $10,0 \pm 3,2\%$ через 48 ч, до $2,5 \pm 0,5\%$ - через 72 часа. При исследовании фильтратов биоплёночных культур динамика ЦПД иная: количество живых клеток при 24-часовом воздействии оставалось значительным, при 72 ч - резко снижалось. При 72 ч экспозиции наибольшее количество живых клеток ($p \leq 0,05$) обнаружено при исследовании фильтратов 720-часовых биоплёночных культур коринебактерий ($25,0 \pm 3,0\%$). При рассмотрении ЦПД каждого из исследованных токсигенных штаммов коринебактерий (рис. 1) обнаружено, что к 72-му ч воздействия количество живых клеток наименьшее у планктонных и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269.

Результаты реакции флоккуляции показали, что содержание дифтерийного экзотоксина в фильтратах планктонных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* ($50,0 \pm 0,2$ Лф/мл) не отличалось от такового по сравнению с 120-час. биоплёночными культурами, но выше ($p \leq 0,05$), чем у 720-часовых биоплёночных ($36,9 \pm 0,2$ Лф/мл). В фильтратах культур штаммов *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим *tox*-геном») и штаммов недифтерийных коринебактерий дифтерийный экзотоксин в реакции флоккуляции не обнаружен.

При исследовании фильтратов планктонных и биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном (см. табл. 1) выявлены аналогичные за-

кономерности ЦПД. Количество живых клеток СНО-К1 при воздействии фильтрата 720-часовой биоплёночной культуры значительно выше ($p \leq 0,05$), чем при исследовании таких же культур токсигенных штаммов коринебактерий. Фильтраты планктонных культур штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых обследованных, по сравнению с аналогичными культурами возбудителя дифтерии, оказывали менее выраженное ЦПД на клетки СНО-К1. Способность недифтерийных коринебактерий, не продуцирующих токсин, оказывать ЦПД на клетки СНО-К1 свидетельствует о том, что этот эффект может быть вызван не только токсином, но и другими имеющимися у них субстанциями.

При рассмотрении характера ЦПД обнаружено, что для планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий свойственно изменение монослоя клеток, проявляющееся их истончением и удлинением (рис. 2). При исследовании 720-часовых биоплёночных культур при 72-ч экспозиции (см. рис. 1, 2) обнаружено появление большого количества округлённых клеток (63-69%). Для ЦПД, формирующегося под воздействием фильтратов планктонных и биоплёночных культур *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном, штаммов недифтерийных коринебактерий, характерно округление клеток и формирование симпластов.

Обсуждение. ЦПД на клетки СНО-К1 оказывали как токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, так и штамм *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном и недифтерийные коринебактерии, выделенные от практически здоровых лиц. ЦПД штаммов *C. diphtheriae* более выражено, чем недифтерийных коринебактерий. При исследовании биоплёночных культур коринебактерий и, особенно, 720-часовой, интенсивность ЦПД ($p \leq 0,05$) значительно снижалась.

Обнаружены существенные различия характера ЦПД различных культур и штаммов коринебактерий. ЦПД планктонных и биоплёночных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* проявлялось истончением и удлинением клеток СНО-К1, что, по всей видимости, обусловлено действием дифтерийного экзотоксина. У 720-часовых биоплёночных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* при некотором снижении уровня выделения токсина, что показали результаты реакции флоккуляции, помимо истончения и удлинения клеток наблюдалось и округление. Это свидетельствует о снижении интенсивности выделения дифтерийного токсина штаммами *C. diphtheriae* в составе биоплёнки по сравнению с планктонными культурами. Это может быть связано, с одной стороны, с формированием межмикробного матрикса, препятствующего выделению токсина за его пределы. С другой, - со снижением интенсивности процессов метаболизма и синтеза факторов патогенности бактериями в составе биоплёнки. При разрушении биоплёнки с последующим пересевом культуры возбудителя на сыровороточный агар, интенсивность выделе-

Динамика ЦПД фильтратов планктонных и биоплёночных культур коринебактерий

Исследованные штаммы	Культура	Количество живых клеток СНО-К1 (%)		
		24 ч	48 ч	72 ч
Токсигенные штаммы (<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующий), <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> № 665, <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> № 6765, <i>C. diphtheriae mitis tox+</i> № 269)	Планктонная	25,3±1,2	10,0±3,2	2,5±1,0
	120-часовая биоплёночная	86,6±2,2*	17,5±5,0	2,5±1,2
	720-часовая биоплёночная	82,5±2,2*	52,5±2,6*	25,0±3,0*
<i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> -геном)	Планктонная	7,5±1,2	0	0
	120-часовая биопленочная	85,0±5,3*	91,7±5,0*	0
	720-часовая биоплёночная	82,1±3,4*	79,3±4,5*	83,2±4,3*
Недифтерийные коринебактерии (n=11)	Планктонная	57,3±3,3	32,2±2,1	23,6±2,3

Примечание. * - показана достоверность различий ($p \leq 0,05$) между планктонными и биопленочными культурами штаммов коринебактерий при каждой экспозиции культивирования

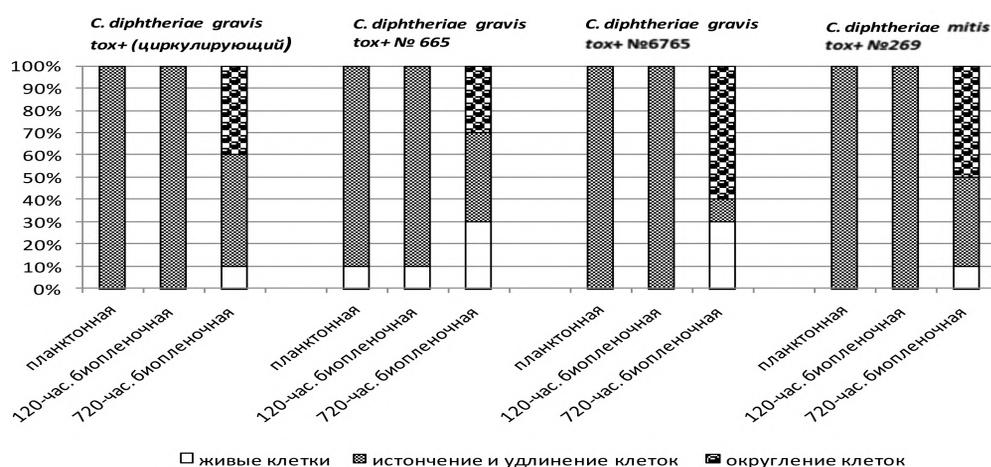


Рис. 1. Характер ЦПД планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* (экспозиция - 72 часа).

ния токсина восстанавливалась. Обнаруженные закономерности имеют и патогенетическое значение: небольшое количество токсина, выделяемое за пределы биоплёнки у бактерионосителей, успешно блокируется антитоксическими антителами и развития клинических проявлений дифтерии не происходит [1]. Причина «бессимптомности» носительства при дифтерии состоит не только в том, что у бактерионосителей, как правило, имеется высокий уровень антитоксических антител, что позволяет полностью нейтрализовать токсин. Важное значение имеет и тот факт, что в их организме формируется биоплёнка и, как следствие этого, количество выделяемого токсина возбудителем за пределы матрикса снижается.

Для планктонных и биопленочных культур штаммов, не продуцирующих дифтерийный экзотоксин

(*C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном и недифтерийных коринебактерий) характерно ЦПД в виде округления клеток СНО-К1 и образования симпластов. Наблюдавшееся нами изменение клеток СНО-К1 в виде округления у биопленочных культур не связано с действием токсина, а может быть обусловлено ферментами коринебактерий (протеаза, нейраминидаза и др.), фрагментами поверхностных структур – адгезинов, проникших через поры бактериальных фильтров. На способность поверхностных структур коринебактерий оказывать повреждающий эффект указывают и другие авторы [8]. Учитывая, что адгезивная активность *C. diphtheriae* в составе биоплёнки увеличивается, изменение характера ЦПД в виде округления у 720-час. биопленочных культур токсигенных штаммов коринебактерий может происходить под влиянием их адгезии на клетках СНО-К1, что и способствует их округлению. При исследовании биопленочных и, особенно 720-час. культур штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном количество изменённых в виде округления клеток СНО-К1 значительно меньше ($p \leq 0,05$), чем у планктонных культур коринебактерий. Округление клеток СНО-К1 с последующим образованием симпластов могло быть результатом как патогенного действия коринебактерий, так и метаболических процес-

оказывать повреждающий эффект указывают и другие авторы [8]. Учитывая, что адгезивная активность *C. diphtheriae* в составе биоплёнки увеличивается, изменение характера ЦПД в виде округления у 720-час. биопленочных культур токсигенных штаммов коринебактерий может происходить под влиянием их адгезии на клетках СНО-К1, что и способствует их округлению. При исследовании биопленочных и, особенно 720-час. культур штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном количество изменённых в виде округления клеток СНО-К1 значительно меньше ($p \leq 0,05$), чем у планктонных культур коринебактерий. Округление клеток СНО-К1 с последующим образованием симпластов могло быть результатом как патогенного действия коринебактерий, так и метаболических процес-

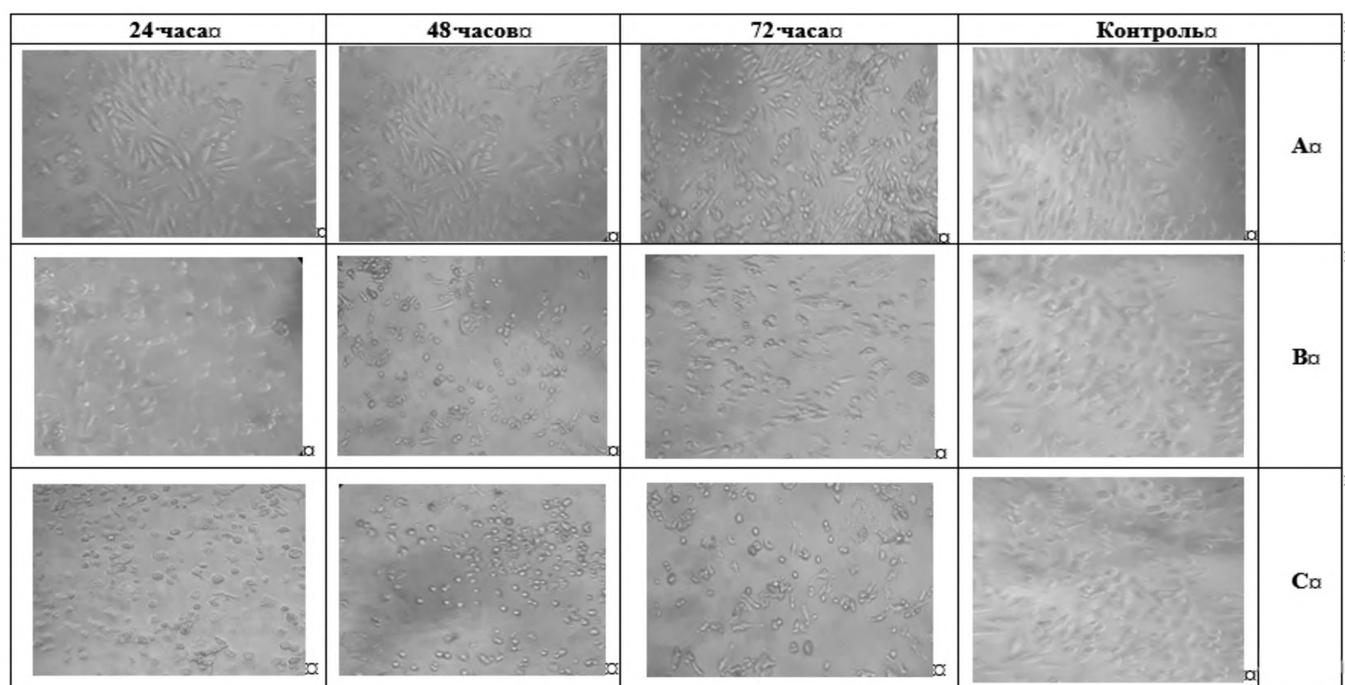


Рис.2. Характер ЦПД планктонных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (А), *C. diphtheriae gravis* (с молчащим *tox*-геном) (В) и недифтерийных коринебактерий (С).

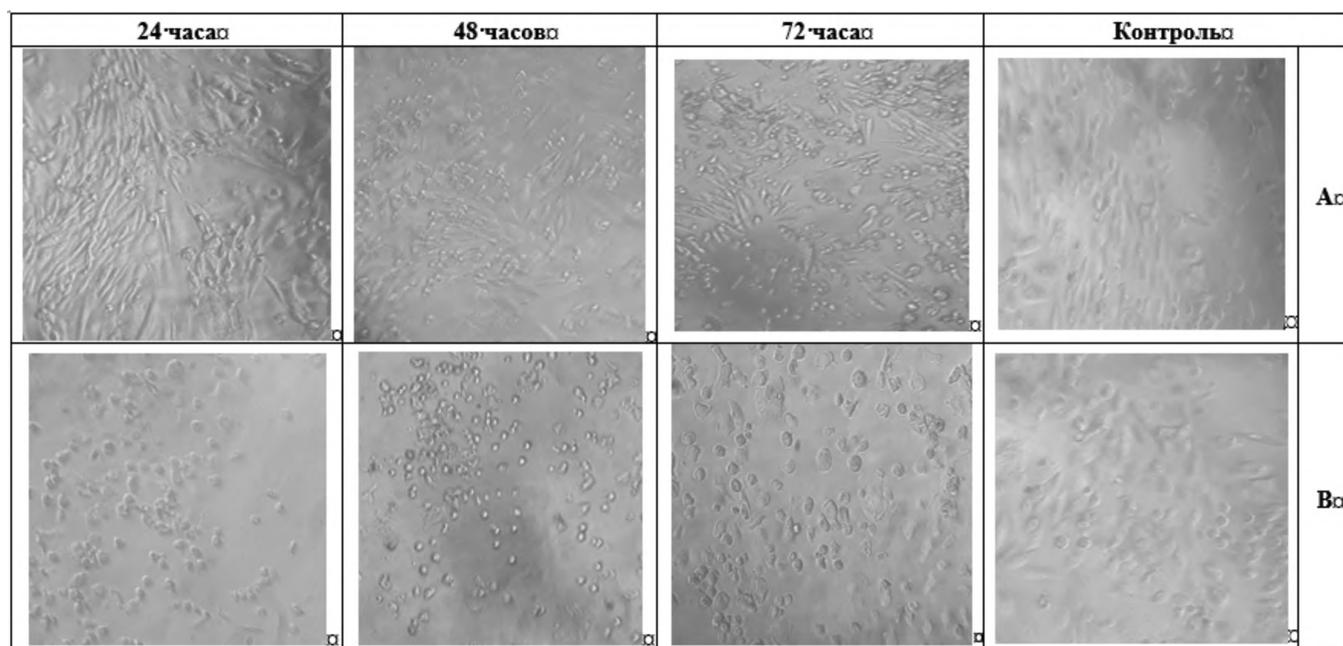


Рис. 3. Характер ЦПД 72-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (А) и *C. diphtheriae gravis* (с молчащим *tox*-геном) (В).

Ув.х 100 раз без дополнительного окрашивания.

сов, интенсивность которых у них резко снижается в составе биоплёнки.

Заключение. В составе биоплёнки интенсивность ЦПД токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном снижалась, что свидетельствует о малой интенсивности выделения факторов патогенности и замедлении метаболических процессов. ЦПД в виде истончения и удлинения клеток СНО-К1, связано с действием дифтерийного экзотоксина, округление – с действием ферментов коринебактерий, и, возможно, фрагментов поверхностных структур – адгезинов. Пониженное выделение токсина и ферментов за пределы матрикса биоплёнки *C. diphtheriae* является важной причиной «бессимптомности» носительства при дифтерии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Дифтерийное бактерионосительство. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 60-70.
2. Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Лабушкина А.В., Воронина Н.А., Тюкавкина С.Ю. Способность к адгезии и инвазии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. *Проблемы медицинской микологии*. 2017; 2 (19): 32.
3. Кветная А.С., Иванов В.В., Корженевская Г.Б., Родионова О.В., Быценко Д.С., Волкова М.О. Адаптационные механизмы формирования бактерионосительства *Corynebacterium diphtheriae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 4: 31-6.
4. Шмелева Е.А., Макарова С.И., Батурина И.Г., Корженкова М.П., Чистякова Г.Г., Ксенофонтова М.П. Специфические антитела и их роль в формировании противодифтерийного иммунитета. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2005; 1: 38-43.
5. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. of Bacteriol.* 2000; 182(10): 2675-9.

6. Лабораторная диагностика дифтерии. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2013.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XII. М.: «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»; 2008.
8. Weerasekera D., Möller J., Kraner E., Antunes K. A., Matos-Guaraldi A.L., Burkovski A. Beyond diphtheria toxin: cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiologi*. 2019. doi: 10.1099/mic.0.000820

REFERENCES

1. Kostyukova N.N., Bechalo V.A. Diphtheria Carriage. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2018;17(5):60-70. (in Russian)
2. Alieva A.A., Kharseeva G.G., Labushkina A.V., Voronina N.A., Tyukavkina S.Ju. The ability to adhesion and invasion of typical and biofilm cultures of toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2017; 2 (19):32.
3. Kvetnaja A.S., Ivanov V.V., Korzhenevskaja G.B., Rodionova O.V., Bycenko D.S., Volkova M.O. Adaptive mechanisms of the formation of the bacteriocarrier *Corynebacterium diphtheriae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 4: 31-6. (in Russian)
4. Shmeleva E.A., Makarova S.I., Baturina I.G., Korzhenkova M.P., Chistjakova G.G., Ksenofontova M.P. Specific antibodies and their role in the formation of anti-diphtheria immunity. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2005; 1: 38-43. (in Russian)
5. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. of Bacteriol.* 2000; 182(10): 2675-9.
6. Laboratory diagnosis of diphtheria. Methodical instructions. Moscow: Federal'nyi tsentr gigeny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2013. (in Russian)
7. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XII. Moscow: Nauchnyi tsentr sredstv ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya; 2008. (in Russian)
8. Weerasekera D., Möller J., Kraner E., Antunes K.A., Matos-Guaraldi A.L., Burkovski A. Beyond diphtheria toxin: cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiologi*. 2019. - doi: 10.1099/mic.0.000820

Поступила 05.09.19

Принята к печати 19.09.19