

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Мангутов Э.О.¹, Харсеева Г.Г.¹, Подойницына О.А.², Кругликов В.Д.², Носков А.К.², Алутина Э.Л.¹,
Балахнова В.В.¹, Алиева А.А.¹, Воронина Н.А.¹, Письменский И.Д.¹, Ковалевич А.А.²

CORYNEBACTERIUM SPP.: ОТЛИЧИЯ ФЕНО- И ГЕНОТИПИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПАТОГЕННОСТИ ИЗОЛЯТОВ ОТ БОЛЬНЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА И ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

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

Цель исследования - провести сравнительный анализ гено- и фенотипических маркеров патогенности изолятов *Corynebacterium spp.* от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц. У изолятов *Corynebacterium spp.* от больных (99 шт.) и практически здоровых лиц (33 шт.), идентифицированных масс-спектрометрическим методом, определены фено- и генотипические маркеры патогенности методом полногеномного секвенирования. Высоковирулентные изоляты *C. falsenii* R132 и *C. striatum* R546 от больных обладали генами патогенности (*DIP0733*, *fadD2*, *otsA*, *deoC*, *pld* и *spaD*, *spaE*, *spaF*, *srtB*, *srtC*, *fadD2*, *pccB*, *pccB1*, *pccB2*, *otsA*, *deoC*, *cwlh* соответственно). Умеренно- и низковирулентные штаммы, выделенные от больных (*C. amycolatum* R2, R3, *C. afermentans* R12, *C. pseudodiphtheriticum* R7, R9, R11) и практически здоровых лиц (*C. pseudodiphtheriticum* Дон2,4,5,6), содержали гены патогенности, однако их фенотипические проявления отсутствовали у изолятов от здоровых лиц. При проведении микробиологической диагностики воспалительных заболеваний респираторного тракта диагностическое значение имеет выделение вида *C. striatum*, и *C. falsenii*. В отношении других видов недифтерийных коринебактерий (*C. amycolatum*, *C. afermentans*, *C. pseudodiphtheriticum*) необходимо учитывать их штаммовую принадлежность, принимая во внимание фенотипические маркеры патогенности и количество в биоматериале.

Ключевые слова: *Corynebacterium spp.*; фено- и генотипические маркеры патогенности, воспалительные заболевания респираторного тракта, полногеномное секвенирование.

Для цитирования: Мангутов Э.О., Харсеева Г.Г., Подойницына О.А., Кругликов В.Д., Носков А.К., Алутина Э.Л., Балахнова В.В., Алиева А.А., Воронина Н.А., Письменский И.Д., Ковалевич А.А. *Corynebacterium spp.*: отличия фено- и генотипических маркеров патогенности изолятов от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (10): 604-611.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-604-611>.

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии и вирусологии; e-mail: galinagh@bk.ru

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.09.2023

Принята к печати 02.10.2023

Опубликовано 00.10.2023

*Mangutov E.O.¹, Kharseeva G.G.¹, Podoinitsyna O.A.², Kruglikov V.D.², Noskov A.K.², Alutina E.L.¹, Balakhnova V.V.¹,
Alieva A.A.¹, Voronina N.A.¹, Pismensky I.D.¹, Kovalevich A.A.²*

CORYNEBACTERIUM SPP.: DIFFERENCES IN PHENOTYPICAL AND GENOTYPIC MARKERS OF PATHOGENICITY OF ISOLATES FROM PATIENTS WITH INFLAMMATORY DISEASES OF THE RESPIRATORY TRACT AND PRACTICALLY HEALTHY INDIVIDUALS

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

²Federal public health institution Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор; 344002, Rostov-on-Don, Russian Federation

The aim of the study is to conduct a comparative analysis of geno- and phenotypic markers of pathogenicity of *Corynebacterium spp.* isolates from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract and practically healthy persons. In isolates of *Corynebacterium spp.* pheno- and genotypic markers of pathogenicity were determined using genome-wide sequencing in patients (99 pcs.) and practically healthy individuals (33 pcs.) identified by mass spectrometry. Highly virulent isolates of *C. falsenii* R132 and *C. striatum* R546 from patients possessed pathogenicity genes (*DIP0733*, *fadD2*, *otsA*, *deoC*, *pld* and *spaD*, *spaE*, *spaF*, *srtB*, *srtC*, *fadD2*, *pccB*, *pccB1*, *pccB2*, *otsA*, *deoC*, *cwlh*, respectively). Medium- and low-virulent strains isolated from patients (*C. amycolatum* R2, R3, *C. afermentans* R12, *C. pseudodiphtheriticum* R7, R9, R11) and practically healthy individuals (*C. pseudodiphtheriticum* R2,4,5,6) contained pathogenicity genes, but their phenotypic manifestations were absent in isolates from healthy individuals. Thus, when conducting microbiological diagnostics of inflammatory diseases of the respiratory tract, the isolation of the species *C. striatum*, as well as *C. falsenii*, is of diagnostic importance. With respect to other species of non-diphtheria corynebacteria (*C. amycolatum*, *C. afermentans*, *C. pseudodiphtheriticum*), it is necessary to take into account their

strain affiliation, taking into account the phenotypic markers of pathogenicity and the amount in the biomaterial.

Key words: *Corynebacterium* spp.; pheno- and genotypic markers of pathogenicity; inflammatory diseases of the respiratory tract; whole-genome sequencing.

For citation: Mangutov E.O., Kharseeva G.G., Podoynitsyna O.A., Kruglikov V.D., Noskov A.K., Alutina E.L., Balakhnova V.V., Alieva A.A., Voronina N.A., Pismensky I.D., Kovalevich A.A. *Corynebacterium* spp.: differences in pheno- and genotypic markers of pathogenicity of isolates from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract and practically healthy individuals. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (10): 604-611.(in Russ.) DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-604-611.

For correspondence: Kharseeva Galina Georgievna, MD, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru.

Information about authors:

Mangutov E.O., <https://orcid.org/0000-0001-6959-2540>;
Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;
Podoynitsyna O.A., <https://orcid.org/0000-0002-9996-4189>;
Kruglikov V.D., <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>;
Noskov A.K., <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>;
Alutina E.L., <https://orcid.org/0000-0001-6968-0583>;
Balakhnova V.V., <https://orcid.org/0000-0001-8832-7419>;
Alieva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3260-0209>;
Voronina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-9655-6876>;
Pismensky I.D., <https://orcid.org/0009-0002-4044-9702>;
Kovalevich A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6926-0239>.

Financing. The study was carried out at the expense of the federal budget within the framework of the state task "Pathogenicity and antibiotic resistance markers of opportunistic microorganisms associated with inflammatory diseases of the respiratory tract" and the Rospotrebnadzor Industry Program.

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

Received 12.09.2023

Accepted 02.10.2023

Published 00.10.2023

Недифтерийные коринебактерии, являясь условно-патогенными микроорганизмами, входят в состав микробиома кожи и слизистых оболочек человека [1-3]. В последние годы существенно увеличилось количество сообщений о серьёзных инфекциях, вызываемых этими микроорганизмами. При ослаблении естественной резистентности организма, особенно у иммунокомпрометированных лиц, они могут способствовать развитию инфекционного процесса в респираторном и урогенитальном тракте, бактериемии, септицемии и др. [4, 5]. Особую важность имеет способность этих микроорганизмов вызывать нозокомиальные инфекции, что связывают с их склонностью к формированию биоплёнки, множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и возможностью передачи от пациента к пациенту [6-8]. Род *Corynebacterium* включает более 150 различных видов коринебактерий, около 50 из которых имеют медицинское значение [9]. В связи с достаточно широким использованием молекулярно-генетических методов исследования значительно расширены представления о недифтерийных коринебактериях: усовершенствованы методы их идентификации и, как следствие, описаны новые виды, способные вызывать развитие коринебактериальной инфекции. В 2018 году новыми патогенами человека признаны *C. striatum* - возбудитель нозокомиальных инфекций, отличающийся повышенной способностью к биоплёнкообразованию и МЛУ [10] и *C. belfantii*, способный вызывать ларин-

гит и бронхит [11, 12]. В 2020 году выделен от собак и идентифицирован *C. rouxii*, способный вызывать поражения кожных покровов у людей [12, 13]. В 2021 году идентифицирован *C. silvaticum*, вызывающий заболевания животных (косули, кабаны) и филогенетически связанный с известным патогеном человека и животных *C. pseudotuberculosis*. *C. silvaticum* оказывает цитотоксическое действие на различные линии клеток человека, соразмерное действию экзотоксина *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* [14, 15]. В 2023 году от пациентов с заболеваниями почек выделен и идентифицирован с помощью мультилокусного анализа последовательностей генов (16S рРНК и groB) новый вид *C. guaraldiae* sp.nov. [16]. В этом же году идентифицированы и описаны восемь новых видов коринебактерий (*C. lehmanniae*, *C. meitnerae*, *C. evansiae*, *C. curieae*, *C. macclintockiae*, *C. hessae*, *C. marquesiae*, *C. yonathiae*) – представителей микробиома урогенитального тракта женщин [17]. Значение этих новых видов недифтерийных коринебактерий в патологии человека ещё предстоит установить.

Несмотря на значительные успехи в изучении возбудителей коринебактериальной инфекции, их патогенный потенциал охарактеризован недостаточно. Это указывает на значимость и перспективу исследования маркёров патогенности этих микроорганизмов и, особенно, взаимосвязи наличия генов, кодирующих факторы патогенности, и их фенотипических проявлений.

Цель исследования - провести сравнительный анализ гено- и фенотипических маркёров патогенности изолятов *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц.

Материал и методы. Исследованы штаммы *Corynebacterium* spp., выделенные в 2017-2021 гг. из верхних дыхательных путей (нос, зев) от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (тонзиллит, ангина, назофарингит, бронхит (8 штаммов) и практически здоровых лиц (4 штамма) в бактериологической лаборатории МБУЗ «Детская городская больница № 1 города Ростова-на-Дону» и ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России. Штаммы *Corynebacterium* spp. выделены от больных в количестве 10^5 КОЕ/мл и более, практически здоровых лиц - 10^4 КОЕ/мл и менее, их идентификация проведена масс-спектрометрическим методом (MALDI-ToF MS) на приборе Bruker Daltonics Biotyper (Германия). Изоляты *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (*C. pseudodiphtheriticum* R7, R9, R11; *C. amycolatum* R2, R3, *C. afermentans* R12, *C. falsenii* R132, *C. striatum* R546) и практически здоровых лиц (*C. pseudodiphtheriticum* Дон2, Дон4, Дон5, Дон6) депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболensk». Аннотированные последовательности генома депонированы в базе данных GenBank как проект секвенирования PRJNA339674 с регистрационными номерами: SAMN31031755, SAMN31031754, SAMN31031753, SAMN31031752, SAMN31031751, SAMN31031750, SAMN31031749, SAMN31031748, SAMN31031747, SAMN31031746, SAMN31031745, SAMN31031744. Для проведения филогенетического анализа использованы нуклеотидные последовательности штаммов, взятые из базы данных NCBI: *C. afermentans* subsp. *lipophilum* DSM 44282, *C. striatum* FDAARGOS 1197, *C. amycolatum* FDAARGOS 1108, *C. falsenii* 355 CFAL, *C. falsenii* FN1-14, *C. falsenii* FDAARGOS 1494, *C. falsenii* FDAARGOS 1493, *C. falsenii* DSM 44353 BL 8171, *C. falsenii* ChiHeje3B27, *C. ulcerans* strain FDAARGOS 1118, *C. ulcerans* strain 0211, *C. ulcerans* 809, *C. pseudotuberculosis* strain 34, *C. pseudotuberculosis* strain 32, *C. pseudotuberculosis* FRC41, *C. glutamicum* strain BE chromosome, *C. glutamicum* ATCC. 13032, *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* strain FDAARGOS, *C. diphtheriae* strain CD1032, *C. diphtheriae* NCTC 13129, *C. diphtheriae* bv mitis ISS 3319, *C. diphtheriae* 13129, *Mycobacterium tuberculosis* KZN 605, *M. tuberculosis* CTRL-2.

Полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ. Тотальная ДНК штаммов недифтерийных коринебактерий выделена с помощью набора PureLink™ Mini (Thermo Fisher Scientific, США). Полногеномное секвенирование осуществлено на платформе MGI (MGI Tech Co., Ltd, США) с использованием наборов MGIEasy FS DNA Library Prep Kit и MGI-Seq 2000RS High-throughput sequencing kit PE200 (MGI Tech Co., Ltd, США) согласно инструкции производителя. Единичные прочтения собирали в контиги с помощью программного обеспечения

SPAdes 3.9.0 [18].

Анализ качества сборки проведён с использованием пакета quast 5.0.2 [19], поиск генов патогенности - база данных факторов вирулентности (VFDB) [20]. Аннотация последовательностей геномов проведена программой Prokka 1.14.5 [21].

Детекция генов патогенности проведена с использованием Blastn для сравнения нуклеотидных последовательностей *Corynebacterium* spp. с базой данных факторов вирулентности (VFDB) [20]. Анализировались только результаты с охватом выравнивания >80% и идентичностью >60%.

Филогенетический анализ проведён на основании множественного выравнивания общих генов исследуемой группы штаммов с использованием программы goary (v.3.13.0) [22]. Множественное выравнивание проведено для последовательностей, имеющих сходство, соответствующее значениям 80% и выше.

Адгезивные свойства исследованы на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Her-2 при экспозиции 18 часов в соответствии с методикой [23]. Количество коринебактерий, адгезированных на клетках Her-2, определяли путём посева смыва на мясопептонный агар с добавлением 20% сыворотки лошадиной нормальной для культивирования микроорганизмов с последующим подсчётом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл и выражали в (КОЕ/мл±m)×10².

Инвазивные свойства исследованы на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Her-2 при экспозиции 18 ч. [23]. Инвазивные свойства штаммов *Corynebacterium* spp. выражали в (КОЕ/мл±m)×10².

Цитопатическое действие (ЦПД) фильтратов планктонных культур штаммов *Corynebacterium* spp., полученных с использованием мембранных фильтров фирмы «Millipore» (США) с размером пор 0,45 мкм, исследовали на культуре овариальных клеток китайских хомячков CHO-K1. Фильтраты титровали в 96-луночной планшете в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и вносили в лунки с клетками CHO-K1 по 0,05 мл, предварительно удалив питательную среду. Каждый образец фильтрата культур коринебактерий исследован в 7-8 повторях. Планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч при +37 °С, влажности 90% и 5% концентрации CO₂. Учёт количества жизнеспособных и погибших, морфологически изменённых клеток произведён с использованием цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа. Для этого лунки с интактной культурой клеток CHO-K1 (контроль) и лунки с клетками, подвергшимися воздействию фильтратов исследованных культур коринебактерий (опыт), фиксировались на предметном столике. Затем клетки фотографировали через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз без дополнительного окрашивания.

Вирулентность штаммов *Corynebacterium* spp. определяли на модели личинок восковой моли *Galleria mellonella*, поддерживаемых в лаборатории паразитологии отдела дезинфектологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора. Готовились 10-кратные разведения культур *Corynebacterium* spp. и высевались на

плотные питательные среды для подсчёта численности колониеобразующих единиц (КОЕ). Личинки *G. mellonella* заражали взвесью коринебактерий густотой 10^7 , 10^8 и 10^9 КОЕ/мл и содержали при $+37^\circ\text{C}$ в течение 7 суток. Ежедневно подсчитывали число погибших особей. Оценка вирулентности штаммов *Corynebacterium spp.* осуществлялась по характеру кривой выживаемости личинок и по величине параметра LD_{50} каждого штамма для личинок *G. mellonella* [24].

Гемолитическую и уреазную активность штаммов недифтерийных коринебактерий исследовали в соответствии с рекомендациями [25].

Статистическая обработка данных проведена с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoftInc, США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты. При исследовании фенотипических

проявлений патогенности изоляты *Corynebacterium spp.* от больных с патологией респираторного тракта и практически здоровых лиц (табл. 1) подразделены по характеру кривой выживаемости личинок восковой моли *G. mellonella* и величине параметра LD_{50} на высоко-, средне- и низковирулентные (1×10^6 , $(1-4) \times 10^7$ и 5×10^7 КОЕ/особь соответственно). По степени выраженности адгезивности и инвазивности на клеточной линии Нер-2 выделены штаммы с высокой (I ($7,3-17,3$ (КОЕ/мл) $\times 10^2$) и ($3,2-6,7$ (КОЕ/мл) $\times 10^2$)), средней (II ($4,0-6,0$ (КОЕ/мл) $\times 10^2$) и ($2,5$ (КОЕ/мл) $\times 10^2$)) и низкой (III ($0,6-1,6$ (КОЕ/мл) $\times 10^2$) и ($0,7-0,9$ (КОЕ/мл) $\times 10^2$)) активностью. При оценке цитотоксичности на культуре клеток СНО-К1 *Corynebacterium spp.* подразделены на изоляты с высоким (I (80-100%)) и низким (III (20-30%)) уровнем ЦПД.

Таблица 1

Фено- и генотипические маркеры патогенности изолятов *Corynebacterium spp.* от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта

Наименование штамма	Гены патогенности			Фенотип патогенности			
	синтез поверхностных структур (пилей, фимбрий)	синтез миколовых кислот и пептидогликана	токсино-продукция	адгезия	инвазия	ЦПД	гемолитическая активность
<i>C.falsenii</i> R 132	DIP0733	<i>fadD2, otsA, deoC</i>	<i>pld</i>	III	III	I	++
<i>C.striatum</i> R546	<i>spaD, spaE, spaF, srtB, srtC</i>	<i>fadD2, pccB, pccB1, pccB2, otsA, deoC, cwlh</i>	-	II	II	I	+
<i>C. amycolatum</i> R2	<i>spaD, spaF, srtB</i>	<i>fadD2, pccB, pccB1, deoC</i>	-	I	I	I	-
<i>C. amycolatum</i> R3	<i>spaD, spaF, srtB</i>	<i>fadD2, pccB, pccB1, deoC</i>	-	I	I	I	-
<i>C. afermentans</i> R12	RS23695, <i>srtB</i>	<i>fadD2, pccB, pccB1, otsA</i>	-	I	III	I	+
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> R7	<i>srtD</i>	<i>fadD2, pccB1, pccB2, otsA</i>	-	II	I	I	+
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> R9	<i>srtD</i>	<i>pccB, pccB1, pccB2, otsA</i>	-	II	III	I	+
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> R11	<i>srtD</i>	<i>fadD2, pccB1, pccB2, otsA</i>	-	II	III	I	+

По результатам полногеномного секвенирования установлено (см. табл. 1), что у высоковирулентного изолята *C. falsenii* R132 обнаружен ген, кодирующий выработку поверхностного белка DIP0733, что фенотипически проявлялось выраженной гемолитической активностью. Однако этот штамм имел низкий адгезивно-инвазивный потенциал. У этого изолята обнаружен *pld*-ген, кодирующий выработку токсина-предшественника PLD (фосфолипазы D) - основного фактора вирулентности *C. pseudotuberculosis*. В геноме другого высоковирулентного изолята *C. striatum* R546 обнаружен кластер генов *spaDEF*, кодирующий синтез фимбрий соответствующих типов, которые собираются сортами *SrtB* и *SrtC*. Помимо этого, широко представлены гены, кодирующие синтез миколовых кислот и пептидогликана: *fadD2* (лигаза длинноцепочечных жирных кислот-КоА), активирующая жирные кислоты путём связывания с коэнзимом А; *pccB*

(субъединица β ацил-КоА карбоксилазы); *pccB1* (пропионил-КоА карбоксилаза бета-цепь 1) (аналогична белку TR DtsR2 *Corynebacterium glutamicum*); *pccB2* (субъединица β пропионил-КоА карбоксилазы); *otsA* (трегалозо-6-фосфат синтаза), *deoC* (деоксирибоза-фосфат альдолаза)(фосфодоксирибоальдолаза), *cwlh* (белок пептидазы клеточной стенки NlpC/P60).

У штаммов со средней вирулентностью (*C. amycolatum* R2, R3, *C. afermentans* R12) обнаружены гены, кодирующие синтез пилей (*spaD, spaF*) и гликозилтрансфераза RS23695, а также *srtB*, обеспечивающая «заякоривание» фимбрий в клеточной стенке коринебактерий [26]. Эти изоляты обладали высокой адгезивной и цитотоксической активностью. Штаммы *C. amycolatum* R2, R3, помимо этого, проявляли высокую инвазивность, тогда как *C. afermentans* R12 - низкую. У изолятов *C. pseudodiphtheriticum*, обнаружены только гены *srtD*, что сопровождалось средней

степенью адгезивной активности и высокой инвазивности у средневирulentного штамма *C. pseudodiphtheriticum* R7. Низковирulentные штаммы *C. pseudodiphtheriticum* R9, R11 отличались низкой инвазивностью. При этом все исследованные изоляты от больных характеризовались высокой цитотоксической активностью.

При исследовании изолятов *C. pseudodiphtheriticum* от практически здоровых лиц установлено (табл. 2), что все они обладали низкой адгезивностью, инвазивностью и цитотоксичностью и не обладали ге-

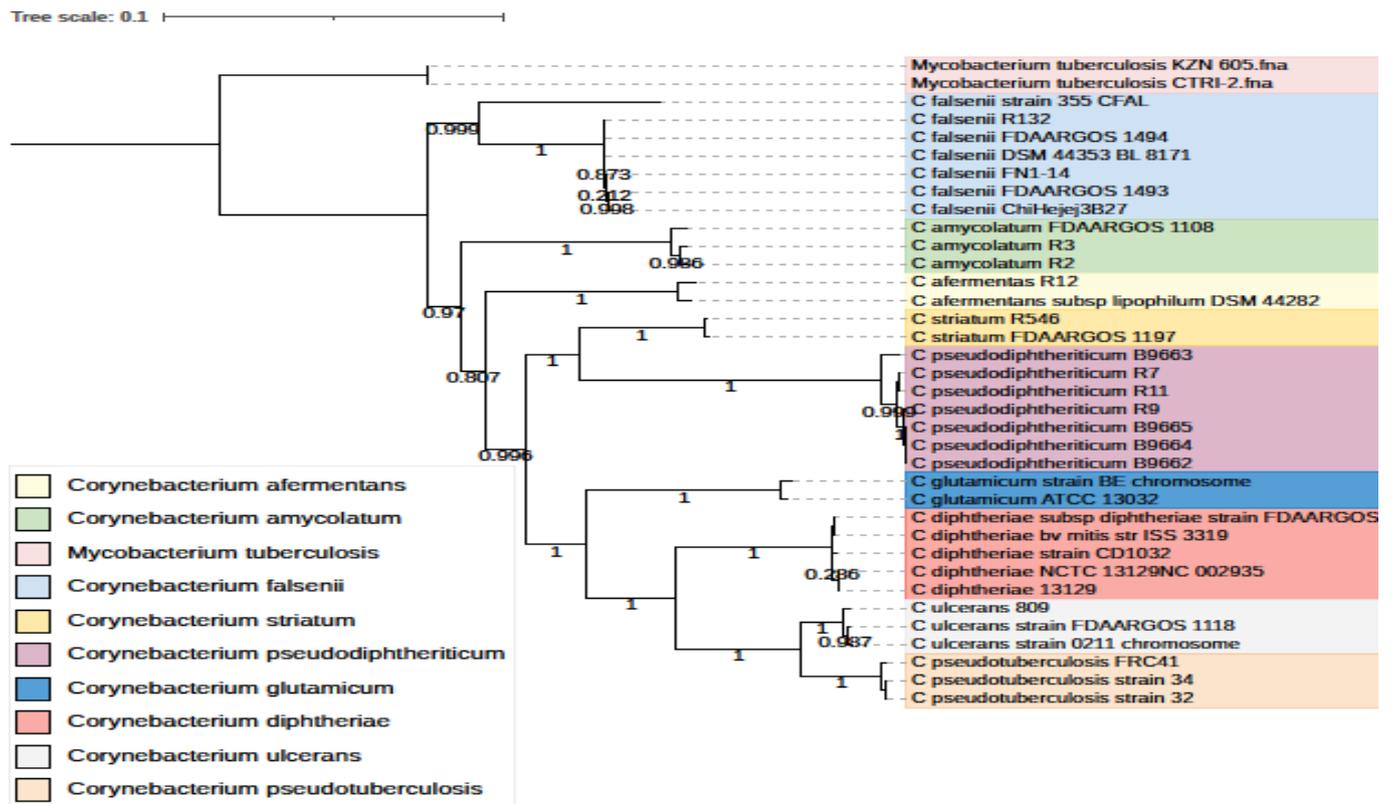
молитической активностью, однако относились к средневирulentным. Набор генов патогенности у них не отличался от такового у штаммов, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта.

На основании общих генов штаммов *Corynebacterium* spp. построено филогенетическое древо (см. рисунок), показывающее степень родства исследованных изолятов, других коринебактерий и микобактерий, геномы которых размещены в базе данных NCBI.

Таблица 2

Фено- и генотипические маркеры патогенности изолятов *Corynebacterium* spp. от практически здоровых лиц

Наименование штамма	Гены патогенности			Фенотип патогенности			
	синтез поверхностных структур (пилей, фимбрий) <i>srtD</i>	синтез миколовых кислот и пептидогликана	Токсипродукция	адгезия	инвазия	ЦПД	гемолитическая активность
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> Дон2	<i>srtD</i>	<i>pccB1, pccB2, otsA</i>	-	II	III	III	-
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> Дон4	-	<i>fadD2, pccB, pccB1, otsA</i>	-	III	III	III	-
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> Дон5	<i>srtD</i>	<i>pccB1, pccB2, otsA</i>	-	III	III	III	-
<i>C.pseudodiphtheriticum</i> Дон6	<i>srtD</i>	<i>pccB1, pccB2, otsA</i>	-	III	III	III	-



Филогенетическое древо на основании последовательностей корового генома. Значения поддержки топологии (bootstrap) указаны для внутренних узлов.

Обсуждение. По результатам определения вирулентности на модели личинок восковой моли *G. mellonella* штаммы *Corynebacterium* spp., выделенные от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, разделены на высоко-, средне- и низковирулентные. К высоковирулентным отнесены изоляты двух видов *C. falsenii* R132 и *C. striatum* R546, имеющие существенные различия по наличию генов патогенности. У изолята *C. falsenii* R132 обнаружен ген, кодирующий синтез поверхностного белка DIP0733, способствующего адгезии и инвазии коринебактерий, агглютинации и гемолизу эритроцитов, и апоптозу фагоцитирующих клеток [27]. Фенотип патогенности этого штамма характеризовался низкой способностью к адгезии и инвазии при наличии выраженной цитотоксической и гемолитической активности. Возможно, вирулентные свойства и цитотоксичность этого изолята связаны с наличием гена *pld*, кодирующего выработку токсина-предшественника PLD (фосфолипазы D). Известно, что PLD действует как сфингомиелиназа, разрушающая сложноэфирную связь в сфингомиелиновых компонентах клеточных мембран млекопитающих [28], вызывая повышенную проницаемость сосудов и лизис клеток [29]. В базе данных NCBI размещены в настоящее время геномные последовательности семи штаммов *C. falsenii*, шесть из которых обладают геном *pld*, а один штамм не содержит его в своем геноме. Это указывает на то, что наличие гена *pld*, обуславливающего патогенные свойства, может быть связано не только с видовой, но и штаммовой принадлежностью *C. falsenii*.

У другого высоковирулентного штамма *C. striatum* R546 обнаружены гены *spaD*, *spaE*, *spaF*, *SrtB*, *SrtC*, играющие ключевую роль в образовании пилей, обеспечивающих взаимодействие с эпителиальными клетками гортани и лёгких [30], а также формирование биоплёнок. Помимо этого, у *C. striatum* R546 наиболее широко по сравнению с другими исследованными изолятами коринебактерий представлены гены, кодирующие синтез миколовых кислот и пептидогликана клеточной стенки (*fadD2*, *pccB*, *pccB1*, *pccB2*, *otsA*, *deoC*, *cwlh*). Коринебактерии и микобактерии относятся к порядку *Actinomycetales* и имеют сходное строение клеточной стенки, содержащей *cord*-фактор, являющийся основным фактором патогенности *M. tuberculosis* [25, 31]. Это подтверждают результаты филогенетического исследования изолятов *Corynebacterium* spp. по данным полногеномного секвенирования, что является косвенным свидетельством возможной роли компонентов клеточной стенки в развитии патологических процессов у человека при коринебактериальной инфекции. Наличие генов, ответственных за формирование пилей и компонентов клеточной стенки, обуславливает способность коринебактерий к усиленной колонизации эпителиальных клеток человека этими микроорганизмами [32].

Средневирулентные штаммы (*C. amycolatum* R2, R3 и *C. afermentans* R12), характеризовались меньшим по сравнению с *C. striatum* R546 набором генов адге-

зинов (*spaD*, *spaF*, *SrtB* и R23695, *SrtB* соответственно) и клеточной стенки (*fadD2*, *pccB*, *pccB1*, *deoC*). Однако эти изоляты отличались высокой адгезивностью и цитотоксичностью. Следует отметить, что высоко- и средневирулентные штаммы, содержали гены поверхностного белка DIP0733 (*C. falsenii* R132), способствующего связыванию коринебактерий с белками внеклеточного матрикса [26], и *SrtB* (*C. striatum* R546, *C. amycolatum* R2, R3, *C. afermentans* R12), кодирующей продукцию коллаген-связывающего белка, связывающегося с C_{1q}-компонентом комплемента [33-35]. Это может способствовать ускользанию коринебактерий от иммунного ответа хозяина, формированию биоплёнки и развитию инфекционного процесса.

Среди коринебактерий, относящихся к виду *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных, обнаружен один средневирулентный и два низковирулентных штамма. Все четыре исследованных изолята *C. pseudodiphtheriticum* от практически здоровых лиц относились к средневирулентным. Результаты полногеномного секвенирования не показали существенных отличий в содержании генов патогенности изолятов от больных и практически здоровых лиц, однако их фенотипические проявления отличались. Изоляты *C. pseudodiphtheriticum* от больных обладают гемолитической активностью, высокой цитотоксичностью и средней адгезивностью, от практически здоровых лиц – низкой цитотоксичностью, адгезивностью и инвазивностью при отсутствии гемолитической активности. Это может свидетельствовать о том, что фенотипические проявления патогенности наиболее часто выделяемого от людей вида *C. pseudodiphtheriticum* [36] обусловлены, прежде всего, состоянием иммунной системы пациентов. По нашим данным, штаммы *Corynebacterium* spp. выделялись от больных в количестве 10⁵ КОЕ/мл и более, практически здоровых лиц – 10⁴ КОЕ/мл и менее. Это свидетельствует о том, что при формирующемся под воздействием различных причин дисбалансе иммунной системы происходит усиленное размножение условно-патогенных микроорганизмов, в том числе, и недифтерийных коринебактерий, сопровождающееся экспрессией генов, кодирующих их факторы патогенности.

Заключение. Наряду с общепризнанным патогеном *C. striatum*, высоким патогенным потенциалом обладает вид *C. falsenii*, содержащий гены *pld* и белка DIP0733. Другие виды недифтерийных коринебактерий (*C. amycolatum*, *C. afermentans*, *C. pseudodiphtheriticum*), обладая гено- и фенотипическими маркерами патогенности, могут рассматриваться как потенциальные патогены респираторного тракта человека. При проведении микробиологической диагностики воспалительных заболеваний респираторного тракта диагностическое значение имеет выделение вида *C. striatum*, а также *C. falsenii*. В отношении прочих видов недифтерийных коринебактерий (*C. amycolatum*, *C. afermentans*, *C. pseudodiphtheriticum*) необходимо учитывать их штаммовую принадлежность, принимая во внимание фенотипические маркеры патогенности и количество в биоматериале.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-6, 8-23, 25-35 см.
REFERENCES)

7. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Гасретова Т.Д., Тюкавкина С.Ю., Сылка О.И., Миронов А.Ю. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в стационарах Ростова-на-Дону и Ростовской области. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(8): 502-6.
25. Лабинская А.С., Костоюкова Н.Н., Иванова С.М. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. М.: Медицина; 2012. ISBN 978-5-9518-0412-9.
36. Харсеева Г.Г., Мангутов Э.О., Бут О.М., Чепусова А.В., Алутина Э.Л. Анализ частоты выделения недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(7): 430-4.

REFERENCES

1. Valdoleiros S.R., Neves C.S., Carvalho J.A., Gonçalves C., Pereira P., Vasconcelos O. et al. Infection and colonization by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a 9-year observational study in a university central hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(9): 1745-52. DOI: 10.1007/s10096-020-03891-y.
2. Chauvelot P., Ferry T., Tafani V., Diot A., Tasse J., Conrad A. et al. Bone and joint infection involving *Corynebacterium* spp.: from clinical features to pathophysiological pathways. *Front Med. (Lausanne)*. 2021; 7: 539501. DOI: 10.3389/fmed.2020.539501.
3. Clariot S., Constant O., Lepeule R., Fihman V., Razazi K., Cook F. et al. Clinical relevance and impact of *Corynebacterium* isolation in lower respiratory tract of critically ill patients requiring mechanical ventilation. *Infection*. 2020; 48(3): 413-20. DOI:10.1007/s15010-020-01411-w.
4. Heggendorf L.H., Gomes S.W.C., Sant'Anna L.O., Longo L., Farsura A.F., Ramos J.N. et al. Virulence potential and characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium amycolatum* strains isolated from nosocomial infections. *Ijsrm. Human*. 2022; 22(4): 1-24. DOI: 10.25166/IJSRM/2022.22.4.2.
5. Kang Y., Chen S., Zheng B., Du X., Li Z., Tan Z. et al. Epidemiological investigation of hospital transmission of *Corynebacterium striatum* infection by core genome multilocus sequence typing approach. *Microbiol. Spectr.* 2023; 11(1): e0149022. DOI: 10.1128/spectrum.01490-22.
6. Wang X., Zhou H., Chen D., Du P., Lan R., Qiu X. et al. Whole-genome sequencing reveals a prolonged and persistent intrahospital transmission of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 2019; 57(9): e00683-19. DOI: 10.1128/JCM.00683-19.
7. Kharseeva G.G., Voronina N.A., Gasretova T.D., Tyukavkina S.Yu., Sylka O.I., Mironov A.Yu. Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium non diphtheriae* strains isolated in hospitals in Rostov-on-Don and the Rostov region. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 62(8): 502-6. (in Russian)
8. Wang X., Zhou H., Du P., Lan R., Chen D., Dong A. et al. Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of China: an emerging national nosocomial epidemic. *J. Hosp. Infect.* 2021; 110: 67-75. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.10.005.
9. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Available at: <https://www.bacterio.net/genus/corynebacterium>. (accessed 2 august 2023).
10. Shariff M., Aditi A., Beri K. *Corynebacterium striatum*: an emerging respiratory pathogen. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2018; 12(7): 581-6. DOI:10.3855/jidc.10406.
11. Dazas M., Badell E., Carmi-Leroy A., Criscuolo A., Brisse S. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar *Belfanti* and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018; 68: 3826-31. DOI: 10.1099/ijsem.0.003069.
12. Prygiel M., Polak M., Mosiej E., Wdowiak K., Formińska K.,

- Zasada A. A. New *Corynebacterium* species with the potential to produce diphtheria toxin. *Pathogens*. 2022; 11(11): 1264. DOI: 10.3390/pathogens1111264.
13. Badell E., Hennart M., Rodrigues C., Passet V., Dazas M., Panunzi L. et al. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. *Res. Microbiol.* 2020; 171(3-4): 122-7. DOI: 10.1016/j.resmic.2020.02.003.
14. Möller J., Busch A., Berens C., Hotzel H., Burkovski A. Newly isolated animal pathogen *Corynebacterium silvaticum* is cytotoxic to human epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(7): 3549. DOI: 10.3390/ijms22073549.
15. Möller J., Musella L., Melnikov V., Geißdörfer W., Burkovski A., Sangal V. Phylogenomic characterisation of a novel corynebacterial species pathogenic to animals. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020; 113(8): 1225-39. DOI: 10.1007/s10482-020-01430-5.
16. de Oliveira Sant'Anna L., Dos Santos L.S., Araújo M.R.B., da Rocha D.J.P.G., Ramos J.N., Baio P.V.P. et al. *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov.: a new species of *Corynebacterium* from human infections. *Braz. J. Microbiol.* 2023; 54(2): 779-90. DOI: 10.1007/s42770-023-00938-y.
17. Cappelli E.A., Ksiezarek M., Wolf J., Neumann-Schaal M., Ribeiro T.G., Peixe L. Bacterial diversity of the female urinary microbiome: description of eight new *Corynebacterium* species. *Microorganisms*. 2023; 11(2): 388. DOI: 10.3390/microorganisms11020388.
18. Prijbelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2020; 70(1): e102. DOI: 10.1002/cpbi.102.
19. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29(8): 1072-5. DOI:10.1093/bioinformatics/btt086.
20. Database of virulence factors (VFDB). Available at: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/> (accessed 2 august 2023).
21. Seemann T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics*. 2014; 30(14): 2068-9. DOI:10.1093/bioinformatics/btu153.
22. Page A.J., Cummins C.A., Hunt M., Wong V.K., Reuter S., Holden M.T.G. et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015; 31(22): 3691-3. DOI: <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.
23. Ott L., Höller M., Rheinlaender J., Schäffer T.E., Hensel M., Burkovski A. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. *BMC Microbiology*. 2010; 10: 257. DOI: 10.1186/1471-2180-10-257.
24. Tsai C.J.Y., Loh J. M. S., Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016; 7(3): 214-29.
25. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., Ivanova S.M. Manual of Medical Microbiology. Private medical microbiology and etiological diagnosis of infections. Moscow: Meditsina; 2012. ISBN 978-5-9518-0412-9. (in Russian)
26. Li G., Wang S., Zhao S., Zhou Y., Pan X. Whole genome sequence of a non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strain from a hospital in southeastern China. *BMC Genom. Data*. 2021; 22(1): 42. DOI: 10.1186/s12863-021-00998-9.
27. Sabbadini P.S., Assis M.C., Trost E., Gomes D.L., Moreira L.O., Dos Santos C.S. et al. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in Hep-2 cells. *Microb. Pathog.* 2012; 52(3): 165-76. DOI: 10.1016/j.micpath.2011.12.003.
28. Santana-Jorge K.T., Santos T.M., Tartaglia N.R., Aguiar E.L., Souza R.F., Mariutti R.B. et al. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. *Microb. Cell Fact.* 2016; 15: 83. DOI: 10.1186/s12934-016-0479-6.
29. Guimarães A.D.S., Borges F., Pauletti R.B., Seyffert N., Ribeiro D., Lage A.P. et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *OAB J.* 2011; 2: 33-43.
30. Timms V.J., Nguyen, T., Crighton, T., Sintchenko V. Genome-wide comparison of *Corynebacterium diphtheriae* isolates from Australia identifies differences in the Pan-genomes between respiratory and cutaneous strains. *BMC Genomics*. 2018; 19: 869. DOI: 10.1186/

- s12864-018-5147-2.
31. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (10): 3152-58. DOI: 10.1128/JCM.00796-12.
 32. Qiu J., Shi Y., Zhao F., Xu Y., Xu H., Dai Y. et al. The pan-genomic analysis of *Corynebacterium striatum* revealed its genetic characteristics as an emerging multidrug-resistant pathogen. *Evol. Bioinform. Online.* 2023; 19:11769343231191481. DOI: 10.1177/11769343231191481.
 33. Donahue E.H., Dawson L.F., Valiente E., Firth-Clark S., Major M.R., Littler E. et al. *Clostridium difficile* has a single sortase, SrtB, that can be inhibited by small-molecule inhibitors. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 219. DOI: 10.1186/s12866-014-0219-1.
 34. Kang C.Y., Huang I.H., Chou C.C., Tsai-Yu W., Chang J.C., Hsiao Y.Y. et al. Functional analysis of *Clostridium difficile* sortase B reveals key residues for catalytic activity and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 2020; 295: 3734-45. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011322.
 35. Chambers C.J., Roberts A.K., Shone C.C., Acharya K.R. Structure and function of a *Clostridium difficile* sortase enzyme. *Sci. Rep.* 2015; 5: 9449. DOI: 10.1038/srep09449.
 36. Kharseeva G.G., Mangutov E.O., But O.M., Chepusova A.V., Alutina E.L. Analysis of the frequency of isolation of non-diphtheria *Corynebacteria* from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2019; 64 (7): 430-4. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-7-430-434. (in Russian)