



Способность к адгезии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*

Харсеева Г.Г.¹ • Алиева А.А.¹ • Сылка О.И.¹ • Тюкавкина С.Ю.¹ • Алексеева Л.П.²

Актуальность. Адгезия и способность к образованию биопленки рассматриваются среди ведущих факторов патогенности *Corynebacterium diphtheriae*, обуславливающих формирование бактерионосительства. Именно за счет бактерионосительства осуществляется циркуляция штаммов возбудителя дифтерии в межэпидемический период. **Цель** – определение и сравнительный анализ адгезивной активности типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. **Материал и методы.** Исследованы типовые и биопленочные (120- и 720-часовые) культуры штаммов *C. diphtheriae*. Их тестирование на способность формировать биопленку проводили по методике Р. Watnick (2000). Способность к адгезии исследовали на культуре клеток карциномы фарингеального

эпителия НЕР-2 при различных временных экспозициях (2, 8, 18 часов). Количество *C. diphtheriae*, адгезированных на клетках НЕР-2, определяли путем посева смыва на 20% сывороточный агар с последующим подсчетом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. **Результаты.** Все типовые и биопленочные культуры исследованных штаммов токсигенных *C. diphtheriae* обладали адгезивной активностью разной степени выраженности. При этом наиболее высокие показатели адгезии обнаружены у циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (от $0,26 \pm 0,01$ до $203,3 \pm 3,3$ КОЕ/мл), что отличалось от аналогичных показателей у других исследованных штаммов (от $0,03 \pm 0,003$ до $0,20 \pm 0,01$ КОЕ/мл). Наименьшей адгезивной активностью при 2-часовой экспозиции

культивирования обладали как типовая, так и биопленочные культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, при 8- и 18-часовой – штаммов *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269. У всех культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* способность к адгезии в динамике статистически значимо ($p \leq 0,05$) увеличивалась к 8- и 18-му часу культивирования. **Заключение.** Наиболее выраженные адгезивные свойства из всех исследованных токсигенных штаммов возбудителя дифтерии характерны для циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*, адгезия, типовые и биопленочные культуры

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-154-158

Циркуляция токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в популяции сохраняется несмотря на проведение вакцинопрофилактики дифтерийным анатоксином. Это связано с тем, что он не содержит компонентов поверхностных структур бактериальной клетки, не способен прерывать процесс адгезии возбудителя дифтерии и, как следствие, формирование бактерионосительства [1].

Адгезия *C. diphtheriae* играет важнейшую роль в колонизации возбудителем слизистой оболочки зева, а это необходимое условие для дальнейшего развития инфекционного процесса [2]. Способность к адгезии у возбудителя дифтерии рассматривается как один из ведущих факторов патогенности [3, 4]. Различная способность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* к адгезии

обусловлена непосредственно компонентами клеточной стенки, а также поверхностными структурами коринебактерий – пили (фимбрии), липоарабиноманнан (CdiLAM), поверхностные белки DIP0733 (или 67-72p) и DIP1281 [5, 6]. Главным структурным компонентом коринебактерий, способствующим их адгезии, признаны пили (фимбрии), которые ковалентно связаны с пептидогликаном клеточной стенки. CdiLAM, расположенный на поверхности клеточной оболочки *C. diphtheriae*, определяет связывание с эпителиальными клетками хозяина и активирует дендритные клетки и Т-хелперы, взаимодействуя с TLR2 [5, 7]. Белок DIP0733 (или 67-72p), обнаруженный у штаммов *C. diphtheriae*, лишенных фимбрий [7–9], способен распознавать и специфически связываться не только с клетками респираторного тракта, но и с эритроцитами человека,



вызывая их гемагглютинацию [8]. Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* обладают более выраженными адгезивными свойствами, чем нетоксигенные [10].

Одним из факторов, предрасполагающих к длительной персистенции бактерий в человеческом организме, считается их способность образовывать биопленки. Однако биопленкообразующая активность возбудителя дифтерии в литературе описана не достаточно [11, 12]. Предположительно, способность к биопленкообразованию играет важную роль в генезе дифтерийного бактерионосительства. В составе биопленки *C. diphtheriae* обладают меньшими размерами, располагаясь в виде плотно сцепленных кластеров, покрытых общим матриксом. Они оказывают ингибирующее воздействие на функциональную активность макрофагов, индуцируя процессы их апоптоза, а также становятся более устойчивыми к воздействию антибиотиков [12–15].

В связи с этим целью настоящего исследования было определение и сравнительный анализ адгезивной активности типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Материал и методы

Исследованы типовые и биопленочные (120- и 720-часовые) культуры штаммов: *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269, полученных из Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича; *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенного от больного с диагнозом локализованной формы дифтерии бактериологической лабораторией ФГУ «1002 центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора Северо-Кавказского военного округа» Минобороны России г. Ростова-на-Дону; *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном (отрицательный в тесте Элека и положительный в полимеразной цепной реакции при определении гена дифтерийного токсина), предоставленного МБУЗ «Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко города Ростова-на-Дону».

Культивирование штаммов *C. diphtheriae* осуществляли в стеклянных (гидрофильных) пробирках, содержащих 3 мл 20% сывороточного бульона. Тестирование штаммов *C. diphtheriae* на способность формировать биопленку проводили по методике Р. Watnick и соавт. (2000) [16]. Предварительно по стандарту Мак-Фарланда готовили микробную взвесь *C. diphtheriae* густотой

10⁹ КОЕ/мл. Полученную микробную взвесь в разведении 1:100 вносили в объеме 0,1 мл в пробирку с 3 мл 20% сывороточного бульона и инкубировали в термостате при +37 °С 120 и 720 часов.

Способность к адгезии штаммов *C. diphtheriae* исследовали в соответствии с указаниями L. Ott и соавт. [3, 17] на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия HEp-2 при различных временных экспозициях (2, 8, 18 часов). Непосредственно перед опытом *C. diphtheriae* культивировали на кровяном агаре (рН 7,6–7,8) в течение 18 часов. Взвесь *C. diphtheriae* густотой 10⁹ КОЕ/мл вносили в сывороточный бульон (рН 7,6–7,8), выдерживали в термостате (+37 °С) в течение 24 часов. Готовили взвесь дифтерийных микробов в среде RPMI-1640 с добавлением 5% сыворотки эмбриональной бычьей в концентрации 10⁶ КОЕ/мл и по 1 мл вносили в лунки с разреженным монослоем HEp-2. Количество *C. diphtheriae*, адгезированных на клетках HEp-2, определяли путем посева смыва на 20% сывороточный агар с последующим подсчетом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0) по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой статистической значимости показателей и различий по критерию Стьюдента для независимых выборок. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при $p \leq 0,05$. В тексте и таблицах результаты экспериментов представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Результаты

В проведенных нами ранее исследованиях [12, 15] установлено, что пик образования межмикробного матрикса музейным штаммом *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 приходился на ранние сроки (120-й час культивирования), а циркулирующим – на более поздние (720-й час культивирования). В соответствии с этим и было проведено исследование адгезивных свойств 120- и 720-часовых биопленочных культур различных токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Все типовые и биопленочные культуры исследованных токсигенных штаммов *C. diphtheriae* обладали адгезивной активностью разной степени выраженности (таблица), при этом наиболее высокие показатели адгезии ($(КОЕ \pm m) \times 10^2$) среди всех культур обнаружены у циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*. Так, при 2-часовой экспозиции культивирования типовой культуры

Харсеева Галина Георгиевна – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии № 2¹

Алиева Анна Александровна – старший лаборант кафедры микробиологии и вирусологии № 2¹
✉ 344015, г. Ростова-на-Дону, ул. Еременко, 58–74, Российская Федерация.
Тел.: +7 (928) 192 02 06.
E-mail: anna1976rita@mail.ru

Сылка Ольга Ивановна – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии № 2¹

Тюкавкина Светлана Юрьевна – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии № 2¹

Алексеева Людмила Павловна – д-р биол. наук, профессор, заведующая лабораторией гибридом²

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29, Российская Федерация

² ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора; 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, Российская Федерация

Адгезивные свойства типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *Corynebacterium diphtheriae* при различных экспозициях, (КОЕ ± m) × 10²

Штаммы	Типовые культуры			120-часовые биопленочные культуры			720-часовые биопленочные культуры		
	2 часа	8 часов	18 часов	2 часа	8 часов	18 часов	2 часа	8 часов	18 часов
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	0,26 ± 0,01	33,3 ± 3,3**	193,3 ± 3,3**	0,24 ± 0,01	32,3 ± 3,3**	203,3 ± 3,3**	0,26 ± 0,01	34,12 ± 0,14**	201,41 ± 0,35**
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 665	0,13 ± 0,01	26,8 ± 0,36**	113,3 ± 3,3**	0,14 ± 0,01	27,8 ± 0,36**	120,0 ± 0,01**	0,17 ± 0,02	20,72 ± 0,24**	112,0 ± 0,1**
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 6765	0,03 ± 0,003	20,2 ± 2,86**	60,0 ± 5,8**	0,096 ± 0,01	20,2 ± 2,87**	61,0 ± 0,6**	0,05 ± 0,05	19,87 ± 0,17**	60,6 ± 0,57**
<i>C. diphtheriae gravis</i> с «молчащим» tox-геном	0,20 ± 0,01	14,5 ± 0,1**	27,7 ± 0,34**	0,21 ± 0,01	13,7 ± 0,1**	26,7 ± 0,31**	0,19 ± 0,01	15,96 ± 0,08**	18,0 ± 0,01**
<i>C. diphtheriae mitis tox⁺</i> № 269	0,17 ± 0,01	18,02 ± 0,04**	18,9 ± 0,27**	0,22 ± 0,09	17,8 ± 0,04**	19,6 ± 0,22**	0,23 ± 0,01	13,03 ± 0,14**	25,0 ± 0,01**

* Статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) между типовыми и биопленочными культурами внутри каждой временной экспозиции** Статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) между экспозициями 2 часа и 8 часов, 2 часа и 18 часов для каждой культуры (типовой и биопленочной)

циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* этот показатель составил $0,26 \pm 0,01$ КОЕ/мл, что отличалось ($p \leq 0,05$) от результатов определения адгезии других исследованных штаммов (от $0,03 \pm 0,003$ до $0,20 \pm 0,01$ КОЕ/мл). Аналогичные результаты получены при 8- и 18-часовых экспозициях культивирования типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур *C. diphtheriae*. Наименьшей адгезивной активностью при 2-часовой экспозиции культивирования обладали как типовая, так и биопленочные культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, при 8- и 18-часовой – штаммов *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» tox-геном и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269.

При исследовании адгезивных свойств типовых и биопленочных (120- и 720-часовых) культур внутри каждой временной экспозиции (2, 8, 18 часов) при культивировании в течение 2 часов статистически значимых различий обнаружено не было. При 8-часовой экспозиции культивирования адгезивные свойства биопленочных культур исследованных штаммов *C. diphtheriae* не изменялись по сравнению с типовыми, за исключением 720-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269, у которых адгезивность снижалась ($p \leq 0,05$). К 18-му часу культивирования адгезивная активность увеличивалась ($p \leq 0,05$) у 120- и 720-часовых биопленочных культур

штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий), 120-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 и 720-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269. Снижение адгезивных свойств отмечено у 720-часовой биопленочной культуры *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» tox-геном.

Изучение способности к адгезии в динамике показало: и у типовых, и у биопленочных культур всех исследованных штаммов *C. diphtheriae* она статистически значимо ($p \leq 0,05$) увеличивалась к 8- и 18-му часу культивирования.

Обсуждение

Как известно, токсигенные штаммы возбудителя дифтерии обладают более выраженными адгезивными свойствами, чем нетоксигенные. Однако процесс адгезии более интенсивно протекает у убитых культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, чем у живых, что сопряжено с повреждающим действием дифтерийного экзотоксина на клетки [3, 17]. В связи с этим в нашем исследовании мы использовали культуру клеток карциномы фарингеального эпителия НЕр-2, не чувствительную к действию токсина. Установлено, что при исследовании типовых культур *C. diphtheriae* наиболее высокие показатели адгезии при всех временных экспозициях обнаружены у циркулирующего



штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, низкие – у штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765 (при экспозиции 2 часа), а также *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269 (при экспозиции 8 и 18 часов). Аналогичные результаты получены при изучении биопленочных культур *C. diphtheriae*. Таким образом, адгезивный потенциал циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенного от больного, выше такового не только штаммов биовара *mitis*, но и музейных *C. diphtheriae gravis tox⁺*, а также штамма *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном, не способного продуцировать токсин. Поскольку межмикробный матрикс при формировании биопленки возбудителем дифтерии

имеет преимущественно белковую природу, можно предположить, что в его образовании важную роль играют адгезины.

Заключение

Наиболее выраженные адгезивные свойства из всех исследованных токсигенных штаммов возбудителя дифтерии обнаружены у циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, у которого высока и интенсивность биопленкообразования. Выраженная способность к адгезии и, как следствие, к биопленкообразованию позволяет возбудителю колонизировать слизистую оболочку зева и длительно персистировать в организме при бактерионосительстве. ☺

Литература

- Харсеева ГГ, Москаленко ЕП, Трухачев АЛ, Митрофанова ТВ. Патогенные свойства *C. diphtheriae*, циркулирующих в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области в межэпидемический период. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;(6):6–9.
- Костюкова НН, Карась СР. Адгезивная активность дифтерийных штаммов в зависимости от особенностей вызываемого ими инфекционного процесса. Журнал микробиологии. 1991;(11):24–7.
- Ott L, Höller M, Gerlach RG, Hensel M, Rheinlaender J, Schäffer TE, Burkovski A. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. BMC Microbiol. 2010;10:2. doi: 10.1186/1471-2180-10-2.
- Rogers EA, Das A, Ton-That H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. Adv Exp Med Biol. 2011;715:91–103. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_6.
- Burkovski A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. ISRN Microbiol. 2013;2013:935736. doi: 10.1155/2013/935736.
- Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. Trends Microbiol. 2008;16(1):33–40. doi: 10.1016/j.tim.2007.10.010.
- Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL, Andrade AF. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells. Arch Microbiol. 2008;190(5):521–30. doi: 10.1007/s00203-008-0398-y.
- Colombo AV, Hirata R Jr, de Souza CM, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Formiga LC, Andrade AF, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. FEMS Microbiol Lett. 2001;197(2):235–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10609.x.
- Sabbadini PS, Assis MC, Trost E, Gomes DL, Moreira LO, Dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Azevedo VA, Hirata Júnior R, Dos Santos AL, Tauch A, Mattos-Guaraldi 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.
- Харсеева ГГ, Алиева АА. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014;(4):109–17.
- Sued BP, Pereira PM, Faria YV, Ramos JN, Binatti VB, Santos KR, Seabra SH, Hirata R Júnior, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JA. Sphingomonomers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112(3):188–95. doi: 10.1590/0074-0276160381.
- Харсеева ГГ, Миронов АЮ, Фролова ЯН, Лабушкина АВ. Биологические свойства *Corynebacterium diphtheriae* в составе биопленки. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012;(4):88–91.
- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. Cell. 2006;124(4):715–27. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012.
- Харсеева ГГ, ред. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты. М.: Практическая медицина; 2014. 241 с.
- Харсеева ГГ, Миронов АЮ, Фролова ЯН, Лабушкина АВ. Способность к формированию биопленки возбудителем дифтерии. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;(2):36–8.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol. 2000;182(10):2675–9. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
- Ott L, Höller M, Rheinlaender J, Schäffer TE, Hensel M, Burkovski A. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. BMC Microbiol. 2010;10:257. doi: 10.1186/1471-2180-10-257.
- Harseeva GG, Moskalenko EP, Truhachev AL, Mitrofanova TV. Pathogenic properties of *Corynebacterium diphtheriae* circulating in Rostov-on-Don city and Rostov Region during interepidemic period. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2006;(6):6–9. Russian.
- Kostyukova NN, Karas' SR. Adhesivity of diphtheria strains depending on specifics of related infectious process. Journal of Microbiology. 1991;(11):24–7. Russian.
- Ott L, Höller M, Gerlach RG, Hensel M, Rheinlaender J, Schäffer TE, Burkovski A. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. BMC Microbiol. 2010;10:2. doi: 10.1186/1471-2180-10-2.
- Rogers EA, Das A, Ton-That H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. Adv Exp Med Biol.



- 2011;715:91–103. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_6.
5. Burkovski A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiol.* 2013;2013:935736. doi: 10.1155/2013/935736.
 6. Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 2008;16(1):33–40. doi: 10.1016/j.tim.2007.10.010.
 7. Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL, Andrade AF. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells. *Arch Microbiol.* 2008;190(5):521–30. doi: 10.1007/s00203-008-0398-y.
 8. Colombo AV, Hirata R Jr, de Souza CM, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Formiga LC, Andrade AF, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;197(2):235–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10609.x.
 9. Sabbadini PS, Assis MC, Trost E, Gomes DL, Moreira LO, Dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Azevedo VA, Hirata Júnior R, Dos Santos AL, Tauch A, Mattos-Guaraldi 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.
 10. Kharseeva GG, Alieva AA. Adhesion of *Corynebacterium diphtheriae*: the role of surface structures and formation mechanism. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2014;(4):109–17. Russian.
 11. Sued BP, Pereira PM, Faria YV, Ramos JN, Binatti VB, Santos KR, Seabra SH, Hirata R Júnior, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Pereira JA. Sphygmomanometers and thermometers as potential fomites of *Staphylococcus haemolyticus*: biofilm formation in the presence of antibiotics. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(3): 188–95. doi: 10.1590/0074-02760160381.
 12. Kharseeva GG, Mironov AJ, Frolova JN, Labushkina AV. Biological properties of *Corynebacterium diphtheriae* in the composition of biofilm. *Immunopathology, allergology, infectious pathology.* 2012;(4):88–91. Russian.
 13. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 2006;124(4): 715–27. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012.
 14. Kharseeva GG, editor. *Diphtheria: microbiological and immunological aspects.* Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2014. 241 p. Russian.
 15. Kharseeva GG, Mironov AY, Frolova YaN, Labushkina AV. The ability of diphtheria causative agent to form biofilm. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2013;(2):36–8. Russian.
 16. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 2000;182(10):2675–9. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
 17. Ott L, Höller M, Rheinlaender J, Schäffer TE, Hensel M, Burkovski A. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. *BMC Microbiol.* 2010;10:257. doi: 10.1186/1471-2180-10-257.

Adhesivity of standard and biofilm cultures of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains

Kharseeva G.G.¹ • Alieva A.A.¹ • Sylka O.I.¹ • Tyukavkina S.Yu.¹ • Alekseeva L.P.²

Background: Adhesion and ability to form a biofilm are considered among the leading pathogenicity factors of *Corynebacterium diphtheriae*, responsible for bacterial carriage. It is exactly bacterial carriage that ensures the circulation of diphtheria pathogen strains in the inter-epidemic periods. **Aim:** To assess and compare adhesivity of standard and biofilm cultures of toxigenic *C. diphtheriae* strains. **Materials and methods:** We studied standard and biofilm (120 and 720 hour) cultures of *C. diphtheriae* strains. Their ability to form a biofilm was tested according to P. Watnick (2000). Adhesivity was assessed in the pharyngeal epithelial carcinoma Hep-2 cell culture with various time exposures (2, 8, and 18 hours). The amounts of *C. diphtheriae* adhered to Hep-2 cells were measured by culturing the swabs in the 20% serum agar with subsequent calculation of mean numbers of colony-forming units (CFU) per 1 mL. **Results:** All standard and biofilm cultures of the studied toxigenic strains of *C. diphtheriae* had adhesive properties of various degrees. The highest adhesivity was

found in a circulating strain *C. diphtheriae gravis tox⁺* (from 0.26 ± 0.01 to 203.3 ± 3.3 CFU/mL), which differed from the same parameters in other strains studied (from 0.03 ± 0.003 to 0.20 ± 0.01 CFU/mL). The lowest adhesivity after a 2-hour exposure was found both in the standard and biofilm cultures of *C. diphtheriae gravis tox⁺* 6765, whereas after the exposure of 8 and 18 hours, the lowest adhesion properties were demonstrated by *C. diphtheriae gravis* with a “silent” tox gene and *C. diphtheriae mitis tox⁺* 269. All cultures of toxigenic *C. diphtheriae* strains showed a statistically significant increase in their adhesivity (p ≤ 0.05) by 8 and 18 hour of cultivation. **Conclusion:** Circulating *C. diphtheriae gravis tox⁺* strain demonstrated the highest adhesivity among all toxigenic strains of the diphtheria pathogens studied.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*, adhesion, typical and biofilm cultures

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-154-158

Kharseeva Galina G. – MD, PhD, Professor, Head of the Chair of Microbiology and Virology No. 2¹

Alieva Anna A. – Senior Laboratory Assistant, Chair of Microbiology and Virology No. 2¹

✉ 58–74 Eremenko ul., Rostov-on-Don, 344015, Russian Federation. Tel.: +7 (928) 192 02 06. E-mail: anna1976rita@mail.ru

Sylka Olga I. – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Microbiology and Virology No. 2¹

Tyukavkina Svetlana Yu. – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Microbiology and Virology No. 2¹

Alekseeva Lyudmila P. – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of the Laboratory of Hybridomas²

¹Rostov State Medical University; 29 Nakhichevskiy pereulok, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation

²Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; 117/40 M. Gor'kogo ul., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation