

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ФАКТОРОВ АДГЕЗИИ У ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM NON DIPHThERIAE*

ANALYSIS OF THE PREVALENCE OF ADHESION FACTORS IN *CORYNEBACTERIUM NON DIPHThERIAE* STRAINS

**T. Kulshan
I. Bugaeva**

Summary. Currently, various species of *Corynebacterium non diphtheriae* cause multiple infectious complications and are resistant to a large arsenal of antimicrobial drugs. Obviously, their acquisition of pathogenicity and virulence factors is a key moment in enhancing their pathogenic potential. Analysis of the prevalence of adhesion factors in the structure of *Corynebacterium non diphtheriae* strains, which allow them to acquire new pathogenic properties in the process of evolution, contributes to understanding the mechanisms of their attachment to various target cells of the macroorganism and the development of more effective therapeutic and prophylactic drugs that prevent the adhesion of bacterial pathogens. In this regard, using the blastp algorithm, the amino acid sequences SpaA, SpaD and SpaH of the reference strain *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129, which mediate bacterial adhesion, were examined for the presence of these homologous sequences in other species of *Corynebacteria*. It has been established that the SpaD and SpaH protein sequences are present in the structure of many species of *Corynebacterium non diphtheriae*, which play a different role in human infectious pathology.

Keywords: *corynebacterium non diphtheriae*, genomes, proteins, adhesion factors, pili, pathogenic and virulent properties.

Кульшань Татьяна Алексеевна

Кандидат медицинских наук, доцент,
Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского
tatjana.kulshan@yandex.ru

Бугаева Ирина Олеговна

Доктор медицинских наук, профессор,
Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского
microbe.sgmu@mail.ru

Аннотация. В настоящее время различные виды *Corynebacterium non diphtheriae* вызывают множественные инфекционные осложнения и обладают устойчивостью к большому арсеналу противомикробных препаратов. Очевидно, что приобретение ими факторов патогенности и вирулентности является ключевым моментом в усилении их патогенного потенциала. Анализ распространенности в структуре штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* факторов адгезии, позволяющих приобретать новые патогенные свойства в процессе эволюции, способствует пониманию механизмов их прикрепления к различным клеткам-мишеням макроорганизма и разработке более эффективных лечебно-профилактических препаратов, предотвращающих адгезию бактериальных патогенов. В этой связи, с помощью алгоритма blastp были исследованы аминокислотные последовательности SpaA, SpaD и SpaH референсного штамма *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129, которые опосредуют бактериальную адгезию, на присутствие данных гомологичных последовательностей у других видов коринебактерий. Установлено, что аминокислотные последовательности SpaD и SpaH присутствуют в структуре многих видов недифтерийных коринебактерий, играющих различную роль в инфекционной патологии человека.

Ключевые слова: *corynebacterium non diphtheriae*, геномы, белки, факторы адгезии, пили, патогенные и вирулентные свойства.

Введение

Corynebacterium non diphtheriae представляют собой грамположительные палочковидные бактерии, которые в настоящее время вызывают особую озабоченность, поскольку являются возбудителями различных инфекций, включая инфекции кожи и мягких тканей, инфекции протезов суставов, инфекции области хирургического вмешательства, бактериемию, респираторные и урогенитальные инфекции, менингит, перитонит, эндокардит и другие [1,2,3,4,5].

Филогенетические исследования, проводимые ранее, установили, важную роль в эволюции *Corynebacterium* генов, связанных с патогенными и вирулентными свойствами, которые передавались между видами с помощью горизонтального переноса [6,7]. В геномах *Corynebacterium non diphtheriae* были обнаружены островки патогенности, которые традиционно ассоци-

ировались с вирулентностью, включая поглощение железа, секретируемые токсины, регионы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), кластеры генов, ответственных за продукцию пилей адгезии и другие [8,9,10,11].

Важным фактором патогенности коринебактерий являются пили, принимающие участие в адгезии, обуславливающую прикрепление и колонизацию тканей хозяина. Кроме того, пили способствуют взаимодействию с другими бактериями в микробиопленке, что обуславливает выживание микроорганизмов, а также их адаптацию к внешним неблагоприятным условиям среды, в том числе к воздействию антимикробных препаратов. Пили участвуют в транслокации ДНК через биологические мембраны и могут служить фаговыми рецепторами [8,10,11,12].

Цель: провести анализ присутствия в структуре штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* аминокислотных

последовательностей SpaA, SpaD и SpaH, опосредующих бактериальную адгезию.

Материалы и методы исследования

Для проведения молекулярно-генетического анализа были выбраны следующие аминокислотные последовательности, ответственные за адгезию коринебактерий: SpaA, SpaD и SpaH. В качестве референсного генома использована последовательность *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129, представленного в базе данных GenBank (NC_002935.2). Аминокислотные последовательности были получены из NCBI GenBank (SpaA (WP_010935504.1), SpaD (WP_010934132.1), SpaH (WP_010935680.1). Для сравнения полученных аминокислотных последовательностей с аналогичными белками различных видов *Corynebacterium non diphtheriae* использовался алгоритм поиска blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение последовательности генома типичного штамма *C. diphtheriae*, выделенного из клинического материала в Соединенном Королевстве (штамм NCTC13129) выявило содержание трех отдельных кластеров генов пилей: spaABC, spaDEF, spaHGI [11,12].

Первый кластер состоит из трех субъединиц spa (sortase-mediated pilus assembly): SpaA, SpaB и SpaC. SpaA основной белок пилей, равномерно распределен вдоль оси пилей и принимает участие в его формировании, SpaB располагается через равные промежутки, а SpaC расположен на конце оси. Для сборки предшественников SpaABC в высокомолекулярный комплекс требуется сортаза SrtA, которая принимает участие в формировании ковалентных связей между белковыми субъединицами пилей, а также между основанием пилей и клеточной стенкой бактерий (рис. 1) [11,12].

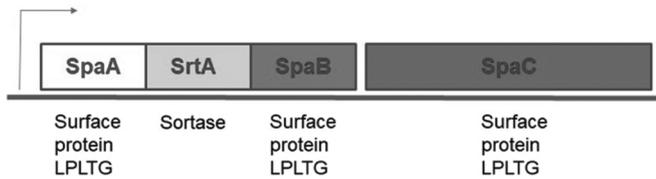


Рис. 1. Структура кластера spaABC *Corynebacterium diphtheriae* (Ton-That H. et al., 2003)

Различные типы пилей (SpaA, SpaD и SpaH) у коринебактерий позволяют им взаимодействовать с разнообразными мишенями клеток-хозяев, обуславливая их тропизм к определенным рецепторам тканей организма или с другими микроорганизмами в различных экологических нишах (рис. 2).

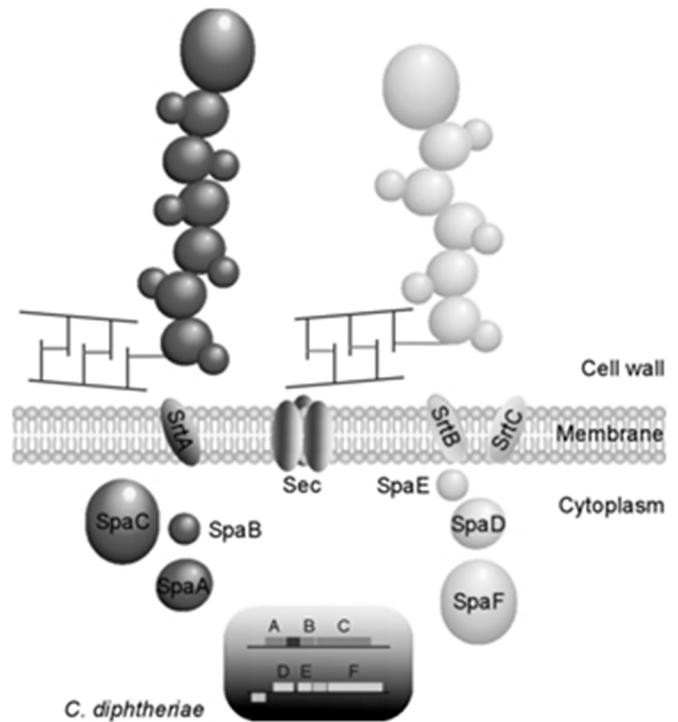


Рис. 2. Структура двух кластеров пилей *Corynebacterium diphtheriae* (Gaspar A. H. et al., 2006)

Установлено, что пили *Corynebacterium diphtheriae* опосредуют адгезию к определенным тканям хозяина: пили типа SpaA опосредуют адгезию коринебактерий к эпителиальным клеткам глотки, тогда как пили SpaD и SpaH проявляют специфичность в отношении связывания с эпителиальными клетками легких и гортани [10,11,12].

По литературным данным, кроме дифтерийных коринебактерий гены пилей были обнаружены у различных видов недифтерийных коринебактерий: *C. accolens*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. glucuronolyticum*, *C. jeikeium*, *C. pseudogenitalium*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum* и *C. urealyticum* [7].

Кластеризация генов, отвечающих за синтез пилей адгезии, может быть результатом горизонтального переноса генов, что способствует приобретению различными видами коринебактерий способности взаимодействовать с несколькими рецепторами клеток-хозяев и приобретать в процессе эволюции селективные свойства, позволяющие занимать новые экологические ниши, в том числе поражать организм человека [7,10,11,12].

В настоящее время различные виды *Corynebacterium non diphtheriae* вызывают множественные инфекционные осложнения и обладают устойчивостью к большому арсеналу противомикробных препаратов [1,2,3,4,5,13]. Очевидно, что приобретение ими факторов патогенности и вирулентности является ключевым моментом

в усилении их патогенного потенциала. Анализ распространенности в структуре штаммов недифтерийных коринебактерий белков-пилинов позволяет оценить адгезивные способности коринебактерий.

В этой связи, с помощью алгоритм поиска blastp были исследованы аминокислотные последовательности SpaA, SpaD и SpaH референсного штамма *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129, ответственные за бактериальную адгезию, на присутствие данных гомологичных последовательностей у других видов коринебактерий.

Было установлено, что аминокислотная последовательность белка SpaA (*Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 (WP_010935504.1) гомологична 100 различным образцам *Corynebacterium diphtheriae* (процент идентичности от 100 до 87,05 %), представленных в молекулярно-генетической базе GenBank. Обнаружение SpaA в большом проценте идентичности только у дифтерийных коринебактерий может быть связано с его функциональным назначением, а именно, адгезия на эпителиальных клетках глотки (первого этапа инфекционного процесса при дифтерии).

Еще одним белком, отвечающим за продукцию пилей является SpaD (*Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 (WP_010934132.1). В ходе исследования установлено, что среди 100 образцов данный белок имели следующие представленные ниже коринебактерии. Процент идентичности составлял:

- *C. diphtheriae* (100–82,49 %),
- *C. striatum* (83,1–75,86 %),
- *C. amycolatum* (78,62–77,08 %),
- *C. tuberculostearicum* (76,53–73,99 %),
- *C. intestinale* (76,37–76,17 %),
- *C. guaraldiae* (75,97–75,31 %),
- *C. minutissimum* (75,71 %),
- *C. aurimucosum* (75,51–74,06 %),
- *C. marquesiae* (75,51 %),
- *C. pseudogenitalium* (74,19 %),
- *C. simulans* (73,4 %).

Белок SpaH (*Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 (WP_010935680.1) был гомологичен:

- *C. diphtheriae* (100–42,99 % идентичности),
- *C. simulans* (90,65 %),
- *C. striatum* (69,50 %),
- *C. aurimucosum* (70,81 %),
- *C. phoceense* (62,59–60,52 %),
- *C. kutscheri* (54,51–47,49 %).

Гомология аминокислотной последовательности и анализ BLASTP показали, что стержневой белок SpaA являлся более консервативным и присутствовал в структуре штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, в то время как белки пилей типа SpaD и SpaH являлись высоко гетеро-

генными среди представленных в молекулярно-генетической базе GenBank штаммов коринебактерий.

В ходе проведенного анализа выявлено, что белки адгезии SpaD и SpaH кроме возбудителя дифтерии были обнаружены у *C. aurimucosum*, *C. simulans*, *C. striatum*.

C. aurimucosum выделяются в основном из урогенитального тракта женщин при соответствующих воспалительных процессах [4].

C. simulans способны вызывать гнойно-воспалительные заболевания различной локализации: абсцессы, фурункулы, пиемию [4].

C. striatum выделяются из носоглотки человека, часто являются нормальными обитателями кожи. Способны колонизировать протезы, катетеры, дыхательные трубки, питательные зонды. Были выделены из урогенитального материала от женщин с преждевременным разрывом околоплодного пузыря, от больных с эндокардитами и бактериемией. Кроме того, могут поражать не только человека, но и животных, вызывая маститы у коров [3,4].

Стоит отметить, что наиболее распространенным белком среди различных видов недифтерийных коринебактерий явился SpaD, который был представлен у десяти видов *Corynebacterium non diphtheriae*, имеющих различное значение в инфекционной патологии человека.

Заключение

На сегодняшний день все больше сведений о способности коринебактерий играть ведущую роль в заболеваниях респираторного и урогенитального трактов, госпитальных, гнойно-воспалительных инфекциях. Это обусловлено присутствием в структуре бактериальной клетки различных факторов патогенности и вирулентности, в том числе пилей адгезии.

Гены spaD и spaH, обнаруженные в геноме некоторых видов недифтерийных коринебактерий, ответственные за синтез белков SpaD и SpaH, обуславливающих адгезию бактерий к эпителиальным клеткам, способствуют колонизации различных тканей макроорганизма.

Адгезивную способность недифтерийных коринебактерий можно расценивать как важный фактор патогенности, так как известно, что адгезия позволяет штаммам бактерий не только выживать в микробиоценозах, но и проявлять свои патогенные, а нередко и вирулентные свойства, существовать в биопленках, защищающих бактерии от воздействия антибактериальных препаратов [5,13]. Вместе с тем, являясь представителями нормальной микробиоты человека, недифтерийные коринебак-

терии могут конкурировать за места адгезии с патогенными микроорганизмами, что обуславливает важную роль в поддержании и сохранении эубиоза [5].

Изучение распространенности и структуры факторов адгезии коринебактерий играет существенную роль

в понимании механизмов прикрепления микроорганизмов к различным тканям, что способствует разработке более эффективных лечебно-профилактических препаратов, предотвращающих адгезию бактериальных патогенов на клетках-мишенях макроорганизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramos J.N. et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* — 2018. — V. 113. — № 9. — P. 1–5.
2. Fernandez L.V., Fortuny A.S., Rodriguez E.F. *Corynebacterium pyruviciproducens* and *Corynebacterium amycolatum* mastitis in immunocompetent no breastfeeding women // *Revista Argentina de Microbiología.* — 2021. — V. 53. — № 11. — P. 39–42.
3. Мантуров Э.О. *Corynebacterium* spp. — проблемные патогенны респираторного тракта человека (обзор литературы) // *Клиническая лабораторная диагностика* — 2021. — №66(8). — С. 502–507.
4. Краева Л.А. Микробиологическая характеристика клинически значимых бактерий рода *Corynebacterium* // *Сибирский медицинский журнал* — 2011. — №1. — С.5–10.
5. Гладышева И.В., Черкасов С.В. Коринебактерии вагинального микробиома — потенциальные патогенны или перспективные пробиотики? // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* — 2019. — №3. — С.1–20.
6. Jesus H.N.R. et al. Pan-genomic analysis of *Corynebacterium amycolatum* gives insights into molecular mechanisms underpinning the transition to a pathogenic phenotype // *Front. Microbiol.* — 2022. — V. 13, — P. 1–11.
7. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А. Факторы патогенности *Corynebacterium non diphtheriae* // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* — 2016. — №3. — С. 97–104.
8. Wen J. et al. Antibiofilm effects of extracellular matrix degradative agents on the biofilm of different strains of multi-drug resistant *Corynebacterium striatum*. // *Journal of Clinical Microbiology.* — 2022. — V. 21. — № 1. — P. 160–163.
9. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А. Коринебактерии: особенности структуры бактериальной клетки // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* — 2017. — №1. — С. 107–114.
10. Харсеева Г.Г., Алиева А.А. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* — 2014. — №4. — С.109–117.
11. Ton-That H., Schneewind O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheria* // *Molecular Microbiology.* — 2003. — V. 50. — № 3. — P. 1429–1438.
12. Gaspar A.H., Ton-That H. Assembly of Distinct Pilus Structures on the Surface of *Corynebacterium diphtheria* // *J. Bacteriol.* — 2006. — V. 188. — № 4. — P. 1526–1533.
13. Neemuchwala A. et al. In Vitro Antibiotic Susceptibility Pattern of Non-diphtheriae *Corynebacterium* Isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016 // *Antimicrob Agents Chemother* — 2018. — V. 62. — № 4. — P. 1–9.

© Кульшань Татьяна Алексеевна (tatjana.kulshan@yandex.ru); Бугаева Ирина Олеговна (microbe.sgmtu@mail.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»