

ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

О.Ю. Борисова^{1,2}, Н.Т. Гадуа¹, А.С. Пименова¹, А.В. Чаплин^{1,2}, И.А. Чагина¹,
Ю.Н. Урбан¹, Н.М. Максимова¹, М.П. Корженкова¹, С.С. Афанасьев¹,
Л.И. Кафарская², М.С. Афанасьев³, В.В. Крикун⁴, О.Ю. Якунина⁵

¹ ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ БУХМАО — Югры Нижневарттовская окружная клиническая детская больница, г. Нижневарттовск, Россия

⁵ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Цель исследования — характеристика токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных на территории России в 2017–2019 гг. В исследование включено 12 токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в период с января 2017 г. по июнь 2019 г. Изучение штаммов *C. diphtheriae* проводили по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам. Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* осуществляли с помощью мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) и секвенирования гена *dtxR* с последующим проведением биоинформационного анализа. **Результаты.** Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* были выделены в Новосибирской, Самарской и Челябинской областях, Ханты-Мансийском автономном округе — Югре и Республике Северная Осетия — Алания. Среди изученных штаммов 5 штаммов были выделены от больных дифтерией (из которых только в одном случае была средне-тяжелая форма клинического течения и в остальных — легкая форма) и 7 штаммов — от бактерионосителей. У больных дифтерией в двух случаях идентифицированы штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащие к сиквенс-типу ST25, в одном случае — штамм биовара *gravis* ST8 и в двух случаях — штаммы биовара *mitis* ST67. У бактерионосителей токсигенных *C. diphtheriae* в двух случаях идентифицированы штаммы биовара *gravis* сиквенс-типа ST25 и в 4 случаях — штаммы биовара *mitis* ST67. В одном случае идентифицировать сиквенс-тип не удалось. Все выявленные сиквенс-типы широко распространены в мире и представлены большим количеством изолятов в базе данных PubMLST, а также характеризуются значительным количеством производных сиквенс-типов. При этом они входят в различные клональные комплексы и значительно отличаются друг от друга, что способствует их надежному различению в МЛСТ. Изучение особенностей структуры гена *dtxR* показало, что все выявленные аллельные варианты гена являются типичными для представителей этих сиквенс-типов, новых аллельных варианты гена *dtxR* у изученных штаммов не было обнаружено. Показано, что несинонимичная замена С440Т с заменой аминокислоты А147V встречается в пределах

Адрес для переписки:

Борисова Ольга Юрьевна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10,
ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (906) 747-64-84 (служебн.), 8 (916) 147-19-60 (моб.).
E-mail: olgborisova@mail.ru

Contacts:

Olga Yu. Borisova
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (906) 747-64-84 (office), 8 (916) 147-19-60 (mobile).
E-mail: olgborisova@mail.ru

Для цитирования:

Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Чаплин А.В., Чагина И.А.,
Урбан Ю.Н., Максимова Н.М., Корженкова М.П., Афанасьев С.С.,
Кафарская Л.И., Афанасьев М.С., Крикун В.В., Якунина О.Ю.
Характеристика токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*,
выделенных на территории России // Инфекция и иммунитет. 2021.
Т. 11, № 4. С. 683–691. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1272

Citation:

Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Chaplin A.V., Chagina I.A.,
Urban Y.N., Maksimova N.M., Korzhenkova M.P., Afanasiev S.S.,
Kafarskaya L.I., Afanasiev M.S., Krikun V.V., Yakunina O.Yu. Characterization
of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Russia //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,
vol. 11, no. 4, pp. 683–691. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1272

только одного аллеля, характерного для представителей сиквенс-типов ST8, ST185, ST195 и ST451, что говорит о поздно произошедшей мутации. Полиморфизм C640A с заменой аминокислоты L214I присутствует не только в данном аллеле, но и в более базальных ветвях дерева, что свидетельствует об изолейцине как о предковом состоянии белка.

Ключевые слова: дифтерия, *C. diphtheriae*, токсигенные штаммы, больные, бактерионосители, мультилокусное сиквенс-типирование.

CHARACTERIZATION OF TOXIGENIC *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* STRAINS ISOLATED IN RUSSIA

Borisova O.Yu.^{a,b}, Gadua N.T.^a, Pimenova A.S.^a, Chaplin A.V.^{a,b}, Chagina I.A.^a, Urban Y.N.^a, Maksimova N.M.^a, Korzhenkova M.P.^a, Afanasiev S.S.^a, Kafarskaya L.I.^b, Afanasiev M.S.^c, Krikun V.V.^d, Yakunina O.Yu.^e

^a G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

^c I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

^d Nizhnevartovsk District Clinical Children's Hospital, Nizhnevartovsk, Russian Federation

^e Center of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to characterize toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* by examining 12 toxigenic strains of *C. diphtheriae* isolated in Russia between January, 2017 to June, 2019. The morphological, toxigenic and biochemical properties of *C. diphtheriae* was studied. Genotyping of *C. diphtheriae* strains was performed using MLST and *dtxR* gene sequencing with subsequent phylogenetic analysis. **Results.** Toxigenic strains of *C. diphtheriae* were isolated in the Novosibirsk, Samara and Chelyabinsk Regions, the Khanty-Mansi Autonomous Okrug — Yugra as well as the Republic of Northern Ossetia — Alania. Among these strains, 5 were isolated from diphtheria patients (moderate disease found in one case, mild course — remaining patients) and 7 strains were isolated from bacterial carriers. In two cases *C. diphtheriae* from diphtheria patients were identified as ST25 sequence type, *gravis* variant; in one case — ST8 type, *gravis* variant; two cases — ST67 sequence type, *mitis* variant. In asymptomatic carriers of tox-positive *C. diphtheriae* strains they belonged to ST25 sequence type, *gravis* variant — in two cases, ST67 type, *mitis* variant — in four cases. A sequencing type was not identified in one case. All sequence types were widespread globally being presented by a large number of isolates in the PubMLST and characterized by a substantial amount of derivative sequence types. At the same time, they belonged to different clonal complexes and differed markedly from each other contributing to their reliable difference as assessed by MLST. Study of gene *dtxR* sequence diversity showed that all allelic variants were typical for the representatives of these sequence types. New alleles of gene *dtxR* were not revealed in strains examined. It was shown that non-synonymous substitution C440T leading to A147V amino acid substitution was found solely in one allele distributed in ST8, ST185, ST195 and ST451 types suggesting at late mutation. In contrast, the polymorphism C640A resulting in the amino acid substitution L214I was found not only in the same allele, but also in the basal tree branches indicating that isoleucine was in the ancestral sequence of the protein.

Key words: diphtheria, *C. diphtheriae*, toxigenic strains, patients, carriers, MLST.

Введение

Дифтерия — острая бактериальная инфекция, характеризующаяся развитием фибринозного воспаления в месте «входных ворот», явлениями общей интоксикации и специфическими признаками поражения сердечно-сосудистой, нервной и выделительной систем. Вызывается грамположительными бактериями *Corynebacterium diphtheriae*, продуцирующими дифтерийный токсин, и может сопровождаться высокой летальностью, которая обусловлена возникновением тяжелых осложнений. Источником инфекции является больной или носитель токсигенных коринебактерий. Передача возбудителя происходит, как правило, воздушно-капельным путем от человека к человеку [2, 3, 5].

Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, дифтерия по-прежнему является серьезной проблемой общественного здравоохранения и причиной детской смертности в странах с недостаточным уровнем охвата населения профилактическими прививками. По данным ВОЗ и CDC, в Индии, Индонезии, Пакистане, Иране, Непале, Гане, Бразилии, Гаити, Доминиканской Республике дифтерия по сей день остается эндемичным заболеванием, течение которого характеризуется многообразием клинических форм и различной локализацией [11, 18]. Также в течение последних пяти лет регистрируются локальные вспышки в Таиланде, Лаосе и странах Африки. Наряду с этим в странах Европы стали появляться сообщения о случаях заболевания дифтерией среди мигрантов и туристов, посетивших эндемичные по этой

инфекции территории [9, 17]. Согласно данным, опубликованным на сайте Регионального бюро ВОЗ для стран Америки, в Бразилии, Венесуэле, Гаити, Доминиканской Республике и Колумбии в 2015 г. был зафиксирован подъем заболеваемости дифтерией [16]. Наиболее тяжелое положение отмечается в Боливарианской Республике Венесуэле. В период с 2016 по 2018 г. на территории этой страны было зарегистрировано 2572 случаев заболеваний дифтерией (324 случаев в 2016 г., 1040 в 2017 г., 1208 в 2018 г.), 271 из которых закончился летальным исходом (17 случаев в 2016 г., 103 в 2017 г., 151 в 2018 г.). В соответствии с данными, опубликованными 15 августа 2019 г., в Венесуэле и сейчас продолжают регистрировать как новые случаи заболевания (384 случая), так и смертельные исходы (16 случаев).

В России широкую иммунизацию детей АКДС-вакциной против дифтерии начали проводить с 1959 г. Достигнутые результаты подтвердили значимость массовой специфической иммунопрофилактики среди населения для поддержания в стране санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции [3, 4, 5, 8].

В течение последних 40 лет в России были отмечены два периода усиления эпидемического процесса дифтерийной инфекции [3, 4, 5]. Так, с 1978 г. появились предвестники первого подъема заболеваемости, пик которого регистрировался в 1984 г. (показатель заболеваемости составил 0,9 на 100 тыс. населения, показатель смертности — 0,001 на 100 тыс. населения). Следует отметить тот факт, что начиная с 1980-х гг. происходило изменение структуры заболевших. Впервые подъем был обусловлен преимущественным заболеванием взрослых, в основном в возрасте 20–39 лет. С 1990 г. в России начался второй периодический подъем заболеваемости, пик которого пришелся на 1994 г. (показатель заболеваемости составил 26,8 на 100 тыс. населения, показатель смертности — 0,8 на 100 тыс. населения). Такой подъем был обусловлен рядом социальных факторов и недостатками в осуществлении профилактических мероприятий: во-первых, накоплением неиммунных лиц в результате низкого уровня охвата прививками детей раннего возраста и взрослых, в частности медицинских работников, во-вторых, миграционными процессами с территориями стран бывшего СССР, неблагополучных по заболеваемости дифтерией. Кроме того, ухудшению эпидемиологической ситуации по дифтерии способствовал экономический кризис, который привел к ухудшению социальных условий жизни значительной части населения. За период с 1990 по 1996 гг. заболело 111 144 человека (35 928 детей, 15 776 подростков и 59 450 взрослых), умерло 3047 человек (729 де-

тей, 37 подростков и 2281 взрослый). В большинстве случаев (95%) умершие не были привиты от дифтерии [5].

В настоящее время в условиях поддержания высокого уровня привитости (95% и более) достигнута стабилизация заболеваемости [3, 4, 8]. Согласно данным государственной статистической отчетности, в период с 2001 по 2018 г. показатель заболеваемости снизился с 0,63 до 0,003 случаев на 100 тыс. населения. В течение последних пяти лет выявляются единичные случаи бактерионосительства, не регистрируются вторичные случаи в очагах и летальные исходы [4, 8]. В структуре клинических форм преобладают легкие локализованные формы дифтерии [2, 4, 8].

Однако актуальность проблемы дифтерийной инфекции в условиях единичных случаев заболевания по сей день сохраняется [4, 8]. Во-первых, утрачивается опыт клинического и бактериологического распознавания дифтерии. Во-вторых, существует риск завоза дифтерии с неблагополучных территорий в результате сезонной миграции туристов и трансграничной трудовой миграции, что, в свою очередь, может привести к ухудшению эпидемиологической ситуации за счет распространения возбудителя среди восприимчивых лиц. В-третьих, эпидемический процесс протекает среди привитого населения. Также продолжают регистрировать случаи заболевания как среди непривитых детей, так и среди непривитых взрослых. Следует отметить тот факт, что в условиях спорадической заболеваемости главная роль в распространении инфекции отводится носителям токсигенных коринибактерий, поскольку они являются резервуаром возбудителя и поддерживают его существование как биологического вида.

Цель настоящей работы — характеристика токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных на территории России в 2017–2019 гг.

Материалы и методы

В исследование включено 12 токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, полученных в период с января 2017 г. по июнь 2019 г. из бактериологических лабораторий лечебно-профилактических организаций и центров гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ — Новосибирской, Самарской и Челябинской областях, в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре (ХМАО — Югра), в Республике Северная Осетия — Алания. Из них 6 штаммов относились к биовару *gravis* и 6 штаммов — к биовару *mitis*. Все штаммы были выделены при обследовании с диагностической целью.

Изучение штаммов *C. diphtheriae* проводили согласно МУ 4.2.3065-13 «Лабораторная диагно-

стика дифтерийной инфекции». Исследуемый материал засеивали на кровяно-теллуритовую среду на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран», Москва) и теллуриата калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и термостатировали в течение 24–48 ч при температуре 37°C. Выросшие колонии *C. diphtheriae* оценивали по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам. Токсигенность штаммов *C. diphtheriae* оценивали в реакции преципитации в агаре с использованием «Коринетоксагара» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением сыворотки крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран», Москва) и дисков, пропитанных дифтерийным антитоксином (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород). Биохимические свойства выделенных культур изучали по оценке цистинозной, уреазной, сахаролитической и нитратредуктазной активностей на средах, приготовленных в лабораторных условиях, а также с использованием набора реагентов «ДС-Диф-Корине» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород).

Хромосомальную ДНК выделяли методом кипячения из 24-часовой культуры *C. diphtheriae*, выращенной на ГРМ-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10% крови крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран», Москва).

Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* с помощью мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) проводили согласно международному протоколу [10] с модификацией на основе секвенирования фрагментов семи генов, являющихся генами «домашнего хозяйства» (house-keeping genes), — *atpA* (АТФ — synthase alpha chain), *dnaE* (DNA polymerase III alpha subunit), *dnaK* (chaperone protein), *fusA* (elongation factor G), *leuA* (2-isopropylmalate synthase), *odhA* (2-oxoglutarate dehydrogenase E1 and E2 components) и *rpoB* (DNA-direct RNA polymerase beta chain). Реакционная смесь содержала 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,0 мкл каждого праймера (по 10 пмоль/мкл), по 200 мкМ каждого dNTP, 1 мкл ДНК и 1 U Taq DNA-полимеразы (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва) в окончательном объеме 27 мкл. Амплификация фрагментов гена выполнялась в следующем режиме: 96°C — 1 мин; 96°C — 1 мин, 58°C — 1 мин, 72°C — 2 мин (35 циклов); 72°C — 5 мин.

ПЦР для выявления гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae* проводили с использованием одной пары праймеров, охватывающей всю область гена *dtxR*: 5'-GGGACTACAACGCAACAAGAA-3' [14] и 5'-TCATCTAATTTTCGCCGCTTTA-3' [7]. Реакционная смесь содержала 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,0 мкл каждого праймера (по 10 пмоль/мкл),

по 200 мкМ каждого dNTP, 1 мкл ДНК и 1 U Taq DNA-полимеразы (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва) в окончательном объеме 25 мкл.

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50x TAE-буфере (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва) в камере SUB-CELL® GT (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве маркера молекулярных весов ДНК использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва). Электрофорез проводили при напряжении 160 В в течение 60 мин. Продукты амплификации визуализировали с помощью геледокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

Секвенирование фрагментов генов *rpoB*, *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* и *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae* проводили согласно общепринятому методу Сэнгера (Sanger F., 1977) в ЗАО «Евроген» (Москва). Идентификацию аллелей осуществляли согласно международной базе данных PubMLST (<http://pubmlst.org>). Для кластерного анализа сиквенс-типов использовали программу построения дерева минимальных расстояний (minimum spanning tree) на основе аллельных профилей с помощью PHYLONiZ 2.0 [15]. Для сравнения последовательностей *dtxR* с известными штаммами из базы данных EMBL/Genbank были взяты публично доступные последовательности генов 197 штаммов *C. diphtheriae*, а также геном *C. ulcerans* BR-AD22 в качестве внешней группы. Поиск гена *dtxR* проводился путем вычисления групп ортологичных генов с помощью программного обеспечения OrthoMCL 2.0.4 [13]. Реконструкция филогенетического дерева и восстановление предковых последовательностей проводились по алгоритму максимального правдоподобия с использованием модели замены Тамуры–Нея в программном обеспечении MEGA X [12].

Результаты

В 2017 г. случаи заболевания дифтерией не регистрировали. Выявлено два случая бактерионосительства у детей 6 месяцев и 8 лет в Самарской и Челябинской областях соответственно. Изучение биологических свойств показало, что в обоих случаях обнаружены токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis*. Штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, выделенный от 6-месячного ребенка, принадлежал к сиквенс-типу ST25, для которого характерен 5-6-7-6-6-3-8-аллельный профиль генов *atpA-dnaE-dnaK-fusA-leuA-odhA-rpoB* в МЛСТ.

В 2018 г. зарегистрировано четыре случая заболевания дифтерией. Два случая были выявле-

ны в ХМАО — Югре у взрослых 35 и 32 лет, у одного из которых данные о прививках отсутствовали, а другой был привит; заболевание в обоих случаях протекало в легкой форме. Один случай дифтерии зарегистрирован в Новосибирской области у взрослого 58 лет, который был не привит и у которого диагностирована средне-тяжелая форма инфекции. Один случай дифтерии зарегистрирован в Республике Северная Осетия — Алания у взрослого 40 лет, который был привит и у которого диагностирована легкая форма. У заболевших в ХМАО — Югре обнаружены токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis*, принадлежащие к сиквенс-типу ST67, для которого характерен 3-2-3-6-3-3-2-аллельный профиль в МЛСТ. У заболевшего в Новосибирской области выявлен токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащий к сиквенс-типу ST25, и у заболевшего в Республике Северная Осетия — Алания обнаружен токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащий к сиквенс-типу ST8, для которого характерен 3-5-6-5-3-3-6-аллельный профиль. В 2018 г. зарегистрированы три случая бактерионосительства, один из которых был у ребенка 6 лет. Все случаи бактерионосительства диагностированы у привитых лиц. У взрослых бактерионосителей выявлены токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis*, принадлежащие к сиквенс-типу ST67, а у ребенка — токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащий к сиквенс-типу ST25.

В 2019 г. в ХМАО — Югре зарегистрировано два случая бактерионосительства у привитых взрослых 35 и 32 лет и один случай заболевания локализованной формой у непривитого ребенка в возрасте 2 лет. У бактерионосителей обнаружены токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis*, принадлежащие к сиквенс-типу ST67, у заболевшего ребенка выявлен токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащий к сиквенс-типу ST25.

Все обнаруженные сиквенс-типы являются широко распространенными в мире и представлены большим количеством изолятов в базе данных PubMLST, а также характеризуются значительным количеством производных сиквенс-типов (рис. 1). При этом они входят в различные клональные комплексы и значительно отличаются друг от друга, что способствует их надежному различению в МЛСТ. Географическое распространение выявленных сиквенс-типов, по данным МЛСТ, также достаточно велико: штаммы ST8 и ST25 выделялись помимо РФ в Румынии и Беларуси. Также ST8 обнаруживался в Бельгии и Великобритании, ST25 выделялся на Украине. Представители ST67 кроме России выделялись в Бельгии, Франции, Вьетнаме и на Филиппинах.

Для выделенных штаммов был проведен анализ последовательности гена *dtxR* как дополнительного генетического маркера для исследования внутривидовой изменчивости, который потенциально может быть связан с уровнем экспрессии дифтерийного токсина. В результате не было выявлено новых, не встречавшихся ранее аллелей этого гена. Аллель *dtxR*, выявленный у штамма ST8 (группа 6, по данным Чагиной И.А. и соавт. [7]), был типичен для представителей данного сиквенс-типа, таких как NCTC 13129 (идентификатор доступа NCBI Refseq NC_002935.2), а также представителей ST185, ST195 и ST451. Необходимо отметить, что данный аллель отличается от других встреченных в этом исследовании последовательностью кодируемого белка за счет замен A147V и L214I.

Штаммы ST67 (группа 6, по данным Чагиной И.А. и соавт. [7]) имели одинаковый аллель, объединяющий представителей сиквенс-типов ST67, ST28, ST53, ST141, ST378 и др. Штаммы ST25 имели аллель, характеризующийся заменами T225C, C273T и C639A относительно референсного штамма PW8 (идентификатор доступа NCBI Refseq NC_016789.1), общий с другими представителями ST25, ST32, ST50, ST395 и др.

Для сравнения аллелей *dtxR* было реконструировано филогенетическое дерево на основании последовательностей генов публично доступных геномных последовательностей (рис. 2), однако внутренние узлы обладали низкими уровнями поддержки, не позволяющими однозначно установить топологию. Было показано, что несинонимичная замена C440T относительно референсной последовательности PW8, приводящая к замене аминокислоты A147V, встречается в пределах только одного аллеля, характерного для представителей сиквенс-типов ST8, ST185, ST195 и ST451, что говорит о поздно произошедшей мутации. Напротив, полиморфизм C640A, приводящий к замене аминокислоты L214I, наличествует не только в данном аллеле, но и в более базальных ветвях дерева, что свидетельствует об изолейцине в 214 положении как о предковом состоянии белка.

Обсуждение

Нами проведено сопоставление полученных результатов с данными о клональном составе циркулирующей популяции токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на территории России [1, 6]. Так, токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* сиквенс-типа ST25 выделялись на территории России с 1950-х гг., и они составляли большинство (83%) в циркулирующей популяции. Наряду с ним в 1950–1960-е гг. циркулировали штаммы еще трех сиквенс-

типов — ST5, ST19 и ST62. Сиквенс-тип ST25 характерен и для типового токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, выделенного в 1960-е гг., который используется в качестве контрольного при проведении контроля качества сред первичного посева, при постановке пробы на токсигенность и биохимических тестов. В 1970-е гг. штаммы этого сиквенс-типа продолжали преобладать (57% случаев), однако к концу 1970-х гг. удельный вес штаммов сиквенс-типа ST25 снизился, и увеличился удельный вес штаммов биовара *mitis* ST5 (11%). В последующие годы удельный вес штаммов ST25 не превышал 6%, однако следует отметить, что

штаммы данного сиквенс-типа не исчезают из циркулирующей популяции.

Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST8 стали регистрировать в 11% случаев в циркулирующей популяции в 1980-х гг., когда в клональном составе отмечалось значительное разнообразие и были зарегистрированы штаммы тринадцати сиквенс-типов [6]. В период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией в 1990-х гг. штаммы сиквенс-типа ST8 заняли доминирующее положение (93%). Среди штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в период снижения заболеваемости дифтерией (2000–2009 гг.), зарегистрированы штаммы девяти

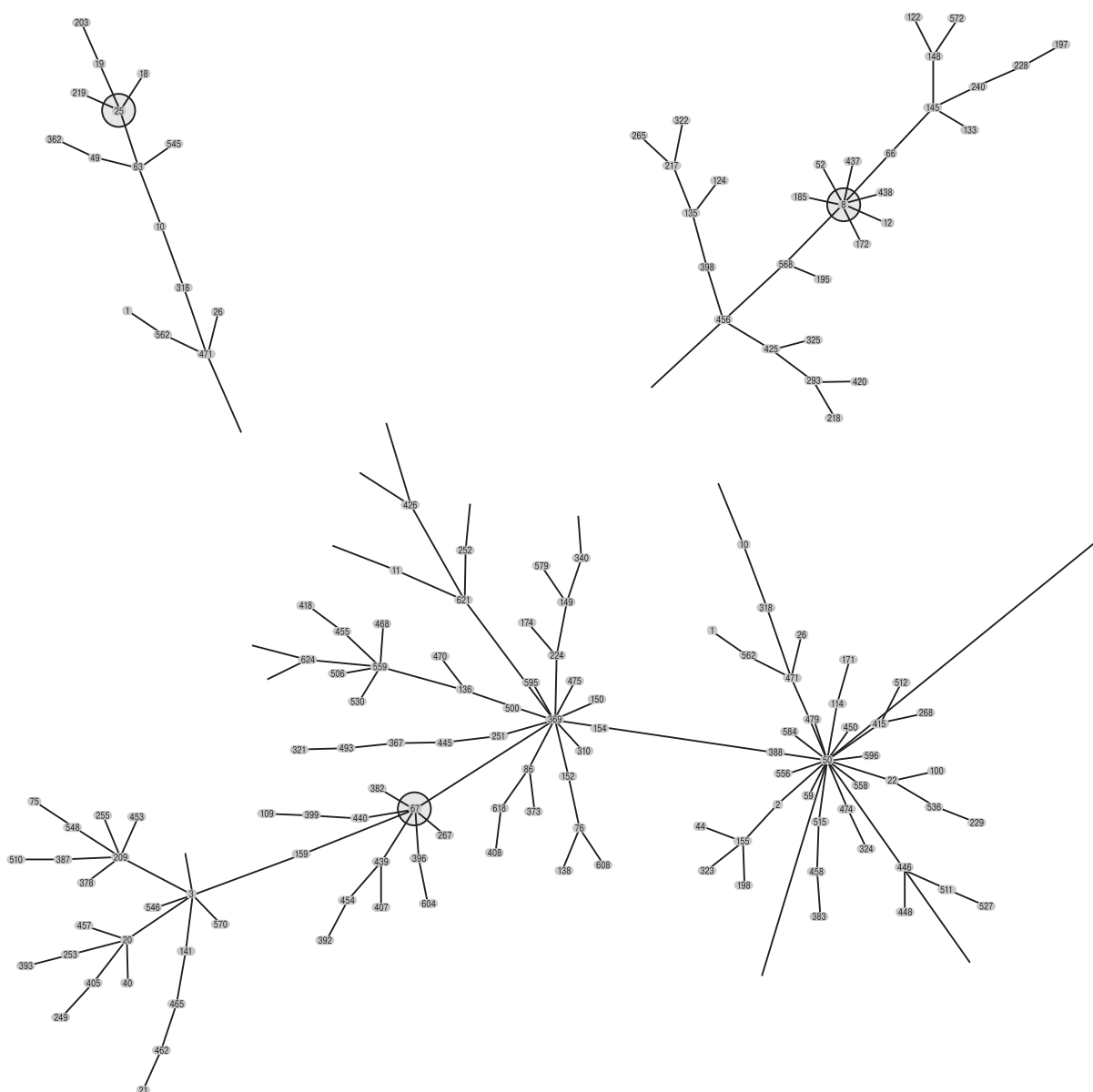


Рисунок 1. Фрагменты минимального остовного дерева, реконструированного с помощью алгоритма goeBURST в программном обеспечении PHYLOViZ 2.0

Figure 1. Fragments of Minimum spanning tree reconstructed using goeBURST in PHYLOViZ 2.0 software

Примечание. Сиквенс-типы токсигенных штаммов, выделенных на территории России в 2017–2019 гг., отмечены кругами.
Note. Sequence types of the toxigenic strains isolated in Russia in 2017–2019 are marked with circles.

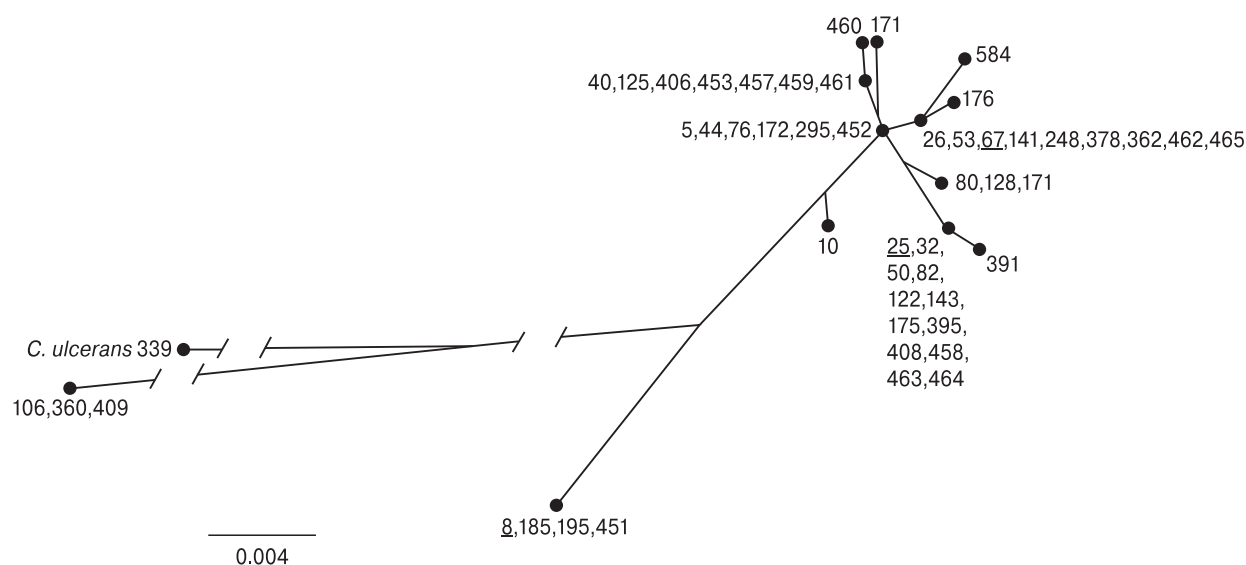


Рисунок 2. Филогенетическое дерево последовательностей генов *dtxR* в публично доступных геномных последовательностях *C. diphtheriae*, а также *C. ulcerans* BR-AD22 в качестве внешней группы

Figure 2. Phylogenetic tree of *dtxR* gene sequences from publicly available genomic sequences *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* BR-AD22 was added as an external group

Примечание. В качестве листьев на дереве отмечены сиквенс-типы штаммов, послуживших источником последовательности *dtxR*. Длины ветвей, отмеченных разрывами, сокращены для упрощения восприятия схемы. Шкала отображает оцененное число замен на одну нуклеотидную позицию.

Note. Sequence types of strains, used as sources of *dtxR* sequences, are marked as tip labels on the tree. The lengths of branches marked with breaks are shortened to simplify the scheme. Scale bar indicates estimated number of substitutions per nucleotide position.

сиквенс-типов, среди которых по-прежнему доминировали штаммы ST8 (57% случаев).

В 2010–2016 гг. на территории России зарегистрированы штаммы восьми сиквенс-типов [6], из которых практически с одинаковой частотой преобладали штаммы биовара *gravis* сиквенс-типа ST8 и биовара *mitis* сиквенс-типа ST67. Токсигенный штамм сиквенс-типа ST67 впервые на территории России был зарегистрирован в ХМАО — Югре в 2012 г. от бактерионосителя. В 2015 г. на этой территории было идентифицировано три токсигенных штамма этого сиквенс-типа от лиц, не имевших между собой контактов, два из которых выделены от заболевших локализованной формой дифтерии, которые были привиты, и один штамм — от привитого бактерионосителя. В 2016 г. был выделен один токсигенный штамм этого же сиквенс-типа из носа у пациента с острым тонзиллитом.

Обращает на себя внимание тот факт, что токсигенные штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST25 регистрируют на территории РФ, начиная с 1960-х гг. и по настоящее время, что может свидетельствовать о том, что этот сиквенс-тип, наряду с сиквенс-типом ST5, циркулирует постоянно на территории России с определенной частотой, варьируя в различные периоды. В то же время ST8 зарегистрирован на территории России только в 1980-е гг., что может свидетель-

ствовать о ввозе этих штаммов на территорию РФ, где они заняли доминирующее положение в популяции в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией 1990-х гг. и до сих пор выделяются на территории нашей страны [1, 6].

Все обнаруженные сиквенс-типы являются широко распространенными в мире и представлены большим количеством изолятов в базе данных PubMLST. Они входят в различные клональные комплексы, значительно отличающиеся друг от друга, а также характеризуются значительным количеством производных сиквенс-типов. Изучение особенностей структуры гена *dtxR* показало, что все выявленные аллельные варианты гена являются типичными для представителей этих сиквенс-типов, новых аллельных вариантов гена *dtxR* у изученных штаммов не было обнаружено.

Таким образом, в связи с ростом количества случаев дифтерии в эндемичных странах и в странах с широким охватом иммунизацией усиление транспортных и миграционных процессов, а также продолжающаяся циркуляция возбудителя на территории нашей страны, в том числе скрытое бактерионосительство, свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга возбудителя дифтерийной инфекции. Применение МЛСТ решает некоторые проблемы, возникавшие ранее при ис-

пользовании других методов типирования, путем прямой индексации вариаций нуклеотидов в нескольких основных метаболических генах, обеспечивая, таким образом, данные высокого разрешения, подходящие для эволю-

ционных и эпидемиологических исследований. Результаты изучения последовательности гена *dtxR* подтверждают данные МЛСТ, свидетельствуя о высокой клональности популяции возбудителя.

Список литературы/References

1. Борисова О.Ю., Мазурова И.К., Чагина И.А., Пименова А.С., Донских Е.Е., Алешкин В.А. Мультилокусное секвенирование токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России в 2002–2012 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 4. С. 17–23. [Borisova O.Yu., Mazurova I.K., Chagina I.A., Pimenova A.S., Donskikh E.E., Aleshkin V.A. Multilocus sequencing of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Russia in 2002–2012. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 4, pp. 17–23. (In Russ.)]
2. Корженкова М.П. Клиника дифтерии в период высокой и низкой заболеваемости // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2006. Т. 14, № 3. С. 4–6. [Korzhenkova M.P. Clinic of diphtheria in the period of high and low morbidity. *Vaktsinatsia. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccine Prevention News*, 2006, vol. 14, no. 3, pp. 4–6. (In Russ.)]
3. Корженкова М.П., Малышев Н.А., Максимова Н.М., Маркина С.С., Черкасова В.В., Шестакова О.М., Базарова М.В. Уроки дифтерии // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2011. Т. 42, № 2. С. 30–35. [Korzhenkova M.P., Malyshev N.A., Maksimova N.M., Markina S.S., Cherkasova V.V., Shestakova O.M., Bazarova M.V. The lessons of diphtheria. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2011, vol. 42, no. 2, pp. 30–35. (In Russ.)]
4. Максимова Н.М., Якимова Т.Н., Маркина С.С., Яцковский К.А., Адугюзелов С.Э. Дифтерия в России в 21 веке // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16, № 5 (96). С. 4–15. [Maksimova N.M., Yakimova T.N., Markina S.S., Yatskovsky K.A., Aduguzelov S.E. Diphtheria in Russia in the 21st century. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2017, vol. 16, no. 5 (96), pp. 4–15. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-5-4-15
5. Покровский В.И., Онищенко Г.Г., Черкасский Б.Л. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. Москва: Медицина, 2003. 664 с. [Pokrovsky V.I., Onischenko G.G., Cherkassky B.L. Evolution of infectious diseases in Russia in the XXth century. *Moscow: Medicine*, 2003. 664 p. (In Russ.)]
6. Чагина И.А., Борисова О.Ю., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Афанасьев М.С., Алешкин А.В., Юсуф Е.В., Москвина Т.И., Пономарева Л.И., Караулов А.В. Состав популяции штаммов возбудителя дифтерии, циркулирующих в России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 5. С. 50–60. [Chagina I.A., Borisova O.Yu., Kafarskaya L.I., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A., Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev M.S., Aleshkin A.V., Yusuf E.V., Moskvina T.I., Ponomareva L.I., Karaulov A.V. Composition of population of diphtheria causative agent strains in Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 5, pp. 50–60. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2016-5-50-60
7. Чагина И.А., Переварова Ю.С., Переваров В.В., Чаплин А.В., Борисова О.Ю., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. Полиморфизм гена *dtxR* у современных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* // Вестник Российской государственной медицинской университета. 2017. № 1. С. 34–41. [Chagina I.A., Perevarova Yu.S., Perevarov V.V., Chaplin A.V., Borisova O.Yu., Kafarskaya L.I., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A. Polymorphism of the *dtxR* gene in the currently existing strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, 2017, no. 1, pp. 34–41. (In Russ.)] doi: 10.24075/brsmu.2017-01-03
8. Якимова Т.Н., Маркина С.С., Максимова Н.М. Эпидситуация по дифтерии в России и в субъектах Российской Федерации с 2005–2011 гг. // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 87, № 5–1. С. 151–154. [Yakimova T.N., Markina S.S., Maksimova N.M. Epidemiological situation of diphtheria in Russia and in the regions of the Russian Federation since 2005 to 2011. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of East Siberian scientific center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, vol. 87, no. 5–1, pp. 151–154. (In Russ.)]
9. Berger A., Meinel D.M., Schaffer A., Ziegler R., Pitteroff J., Konrad R., Sing A. A case of pharyngeal diphtheria in Germany, June 2015. *Infection*, 2016, vol. 44, no. 5, pp. 673–675. doi: 10.1007/s15010-016-0882-2
10. Both L., Collins S., de Zoysa A., White J., Mandal S., Efstratiou A. Molecular and epidemiological review of toxigenic diphtheria infections in England between 2007 and 2013. *J. Clin. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 2, pp. 567–572. doi: 10.1128/JCM.03398-14
11. Faulkner A., Bozio C.H., Acosta A., Tiwari T.S.P. Diphtheria. In: Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. *CDC. URL: https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt01-dip.html (10.08.2019)*
12. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
13. Li L., Stoeckert C.J., Roos D.S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.*, 2003, vol. 13, no. 9, pp. 2178–2189. doi: 10.1101/gr.1224503
14. Nakao H., Mazurova I.K., Glushkevich T., Popovic T. Analysis of heterogeneity of *Corynebacterium diphtheriae* toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, by direct sequencing. *Res. Microbiol.*, 1997, vol. 148, no. 1, pp. 45–54. doi: 10.1016/S0923-2508(97)81899-2
15. Nascimento M., Sousa A., Ramirez M., Francisco A.P., Carrico J.A., Vaz C. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*, 2017, vol. 33, no. 1, pp. 128–129. doi: 10.1093/bioinformatics/btw582

16. PAHO, WHO. Epidemiological update: Diphtheria. 15 November 2017. *Washington, D.C.: PAHO/WHO, 2017. 2 p.*
17. Skogmar S., Tham J. Severe diphtheria with neurologic and myocardial involvement in a Swedish patient: a case report. *BMC Infect. Dis., 2018, vol. 18, no. 1, p. 359. doi: 10.1186/s12879-018-3264-9*
18. WHO. Review of the epidemiology of diphtheria — 2000–2016. URL: https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2017/april/presentations_background_docs/en (10.08.2019)

Авторы:

Борисова О.Ю., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

Гадуа Н.Т., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Пименова А.С., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Чаплин А.В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

Чагина И.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва;

Урбан Ю.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Максимова Н.М., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории эпиднадзора за дифтерией и коклюшем ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Корженкова М.П., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эпиднадзора за дифтерией и коклюшем ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Афанасьев С.С., д.м.н., главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Кафарская Л.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

Афанасьев М.С., д.м.н., профессор кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Крикун В.В., зав. бактериологической лабораторией БУ ХМАО — Югры Нижневартовская окружная клиническая детская больница, г. Нижневартовск, Россия;

Якунина О.Ю., зав. бактериологической лабораторией ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Borisova O.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Gadua N.T., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Pimenova A.S., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Chaplin A.V., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Chagina I.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Urban Y.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Maksimova N.M., PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Laboratory of Epidemiological Surveillance for Diphtheria and Pertussis, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Korzhenkova M.P., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Epidemiological Surveillance for Diphtheria and Pertussis, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Afanasiev S.S., PhD, MD (Medicine), Head Researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Kafarskaya L.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Afanasiev M.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Allergology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Krikun V.V., Head of the Bacteriological Laboratory, Nizhnevartovsk District Clinical Children's Hospital, Nizhnevartovsk, Russian Federation;

Yakunina O.Yu., Head of the Bacteriological Laboratory, Center of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russian Federation.