

И.А. Чагина¹, О.Ю. Борисова^{1,2}, Л.И. Кафарская², С.С. Афанасьев¹,
В.А. Алешкин¹, Ю.В. Несвижский, М.С. Афанасьев³, А.В. Алешкин¹,
Е.В. Юсуф⁴, Т.И. Москвина⁵, Л.И. Пономарева⁶, А.В. Караулов³

СОСТАВ ПОПУЛЯЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИИ

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ³Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; ⁴Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе Югре, Ханты-Мансийск; ⁵Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области, Челябинск; ⁶Центр гигиены и эпидемиологии в республике Удмуртия, Ижевск

Цель. Характеристика клонального состава популяции штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в России с помощью MLST, а также оценка возможности использования этого метода при проведении мониторинга штаммов возбудителя дифтерийной инфекции. **Материалы и методы.** Изучены штаммы *C. diphtheriae*, выделенные в России в 1957 — 2015 гг. и присланные в референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Генотипирование *C. diphtheriae* с помощью MLST проводили на основе секвенирования фрагментов генов «домашнего хозяйства». Идентификацию ST осуществляли согласно PubMLST. **Результаты.** На территории России идентифицированы штаммы *C. diphtheriae* 36 сиквенс-типов (ST) — 27 ранее известных и 9 новых, выявленных нами впервые. Доминирующими были 2 сиквенс-типа ST25 и ST8 (22% и 18%). Показана взаимосвязь между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C. diphtheriae* к определенному сиквенс-типу — токсигенные и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* различных биоваров характеризовались определенными сиквенс-типами. Показаны изменения клонального состава популяции *C. diphtheriae* в динамике эпидемического процесса дифтерийной инфекции. **Заключение.** Использование MLST позволило охарактеризовать клональный состав популяции штаммов *C. diphtheriae* в России и показало перспективность применения этого метода для характеристики популяции возбудителя дифтерии, выявления эпидемически значимых штаммов и расщифровки очагов дифтерийной инфекции.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 50—60

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*, мультилокусное секвенирование ДНК

И.А. Чагина¹, О.Ю. Борисова^{1,2}, Л.И. Кафарская², С.С. Афанасьев¹,
В.А. Алешкин¹, Ю.В. Несвижский, М.С. Афанасьев³, А.В. Алешкин¹,
Е.В. Юсуф⁴, Т.И. Москвина⁵, Л.И. Пономарева⁶, А.В. Караулов³

COMPOSITION OF POPULATION OF DIPHTHERIA CAUSATIVE AGENT STRAINS IN RUSSIA

¹Gabricevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pirogov Russian National Research Medical University, ³Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; ⁴Centre for Hygiene and Epidemiology in Khanty-Mansi Autonomous District Yugra, Khanty-Mansiysk; ⁵Centre for Hygiene and Epidemiology in Chelyabinsk Region, Chelyabinsk; ⁶Centre for Hygiene and Epidemiology in the Udmurt Republic, Izhevsk, Russia

Aim. Characteristics of clonal composition of *Corynebacterium diphtheriae* strain population in Russia using MLST, as well as evaluation of a possibility of using of this method during execution of monitoring of diphtheria infection causative agent strains. **Materials and methods.** *C. diphtheriae* strains, isolated in Russia in 1957 — 2015 and sent to Gabricevsky MRIEM reference centre for diphtheria and pertussis, were studied. Genotyping of *C. diphtheriae* using MLST was carried out based on sequencing of «housekeeping» gene fragments. ST identification was carried

out according to PubMLST. Results. *C. diphtheriae* strains of 36 sequence-types (ST) were identified on the territory of Russia — 27 previously known and 9 novel, detected for the first time. 2 sequence types ST25 and ST8 (22% and 18%) dominated. Inter-relation between phenotype properties (toxigenicity and biovar) and membership of *C. diphtheriae* strains in certain sequence-types was shown — toxigenic and non-toxigenic *C. diphtheriae* strains of various biovars were characterized by certain sequence-types. Changes of clonal composition of *C. diphtheriae* population in dynamics of epidemic process of diphtheria infection were shown. Conclusion. Use of MLST allowed to characterized clonal composition of *C. diphtheriae* strains' population in Russia and has shown perspectives of use of this method to characterize population of diphtheria causative agent, detect epidemically significant strains and decipher foci of diphtheria infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 50—60

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*, multilocus DNA sequencing

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация, классификация и типирование возбудителей инфекционных заболеваний относятся к числу глобальных задач не только прикладной, но и фундаментальной микробиологии и эпидемиологии [13]. Типирование штаммов возбудителей инфекционных заболеваний ставит перед собой несколько задач: выяснить, являются ли выделенные в одном очаге штаммы близкородственными или они не взаимосвязаны между собой; циркулируют ли штаммы на других близлежащих территориях, на других отдаленных территориях и в других странах; появились штаммы недавно или выделялись они в разные временные периоды. Решение таких задач с помощью типирования позволяет изучить и выявить закономерности циркуляции, формирования и эволюционного развития популяций возбудителей инфекционных заболеваний, создание клонов возбудителей и появление эпидемически значимых штаммов.

Изучению штаммов возбудителя дифтерийной инфекции — *Corynebacterium diphtheriae* — посвящено значительное число работ ученых разных стран мира. Биологические свойства оценивались с помощью классических микробиологических (серотипирование, биотипирование, фаготипирование, антибиотико-чувствительность), а также молекулярно-генетических методов, таких как гибридизация ДНК, рестрикционный анализ, ПЦР с универсальными праймерами (УП-ПЦР, RAPD), AFLP, пульс-гель электрофорез (PFGE) (ПЦР-ПДРФ (RFLP), риботипирование, мультилокусный энзимэлектрофорез (МЭЭ), сполитотипирование, а также секвенирование отдельных генов [1 — 17].

В настоящее время, благодаря появлению высокотехнологичных молекулярно-генетических технологий и высокопроизводительного секвенирования стало возможным с новых позиций подойти к изучению биологических свойств и внутривидового разнообразия возбудителей инфекционных заболеваний. Одним из таких методов является мультилокусное секвенирование ДНК (Multilocus sequence typing, MLST, МЛСТ), предложенное Maiden M.C. (1998). МЛСТ в последнее десятилетие стало одним из наиболее распространенных методов генотипирования возбудителей инфекционных заболеваний, которое дает возможность охарактеризовывать штаммы микроорганизмов с использованием ДНК-секвенирования внутренних фрагментов генов. К настоящему времени МЛСТ широко используется для мониторинга *Neisseria meningitidis*, *Vibrio vulnificus*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Bordetella pertussis* и др. Схема проведения МЛСТ для *C. diphtheriae* была разработана

Bolt F. et al. [5] и включала штаммы 79 сиквенс-типов, объединенных в 11 клональных комплексов. К настоящему времени в международной базе данных PubMLST (<http://pubmlst.org/>) представлено более 300 сиквенс-типов, выделенных в различных странах мира при оценке состава циркулирующих популяций возбудителя дифтерийной инфекции.

В связи с этим, целью исследования является характеристика клонального состава популяции штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в России, с помощью МЛСТ, а также оценка возможности использования этого метода при проведении мониторинга штаммов возбудителя дифтерийной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучено 148 штаммов *C.diphtheriae*, выделенных на территории России с 1957 по 2015 гг. и присланных в референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н.Габрического, и два контрольных штамма *C.diphtheriae* № 665 и *C.diphtheriae* PW8. Токсигенных штаммов *C.diphtheriae* было 121, нетоксигенных штаммов — 20 и нетоксигенных токс-несущих штаммов (НТТН-штаммы) — 7. Изученные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к биоварам *gravis* и *mitis*. Выделение штаммов *C.diphtheriae* проводили согласно Методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13. Исследуемый материал засеивали на кровяно-теллуритовую среду (КТА) на основе 2% СПА («Микроген», Махачкала) с 10% ККРС (НПО «Лейтран», Москва) и 0,02 % теллурита калия (ГНЦ ПМБ, Оболенск) и термостатировали 24 — 48 часов при 37⁰С. Выросшие колонии оценивали по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам согласно МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13, а также с использованием тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород).

Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения согласно Маниатис Т., (1984) из 24-часовой культуры *C.diphtheriae*. Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* с помощью МЛСТ проводили согласно международному протоколу [5] с последующей модификацией на основе секвенирования фрагментов 7 генов, являющихся генами «домашнего хозяйства» (*house-keeping genes*) — *atpA* (ATP- 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 *groB* (DNA-direct RNA polymerase beta chain), с последующей идентификацией аллельного профиля каждого штамма. Секвенирование фрагментов генов *groB*, *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* у штаммов *C.diphtheriae* проводили согласно общепринятому методу (Sanger F., 1977) в ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва) и ЗАО «Евроген» (Москва). Идентификацию аллелей осуществляли согласно международной базе данных MLST — PubMLST (<http://pubmlst.org/>). Для кластерного анализа использовали программу построения дерева минимальных расстояний (*minimum spanning tree*) на основе аллельных профилей с помощью MEGA 6.06 (<http://www.megasoftware.net/megamac.php>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди изученных штаммов *C. diphtheriae* при секвенировании выявлено от 4 до 12 аллелей этих генов. Все изученные штаммы *C. diphtheriae* были разделены на 36 сиквенс-типов (ST) (рис. 1) — 27 ранее известных и опубликованных в базе данных — ST5, ST8, ST12, ST17, ST18, ST19, ST24, ST25, ST28, ST29, ST30, ST32, ST40, ST41, ST43, ST44, ST45, ST46, ST47, ST48, ST53, ST60, ST62, ST66, ST67, ST76, ST202 и девять новых, выявленных нами впервые — ST-new1, ST-new2, ST-new3, ST-new4, ST-new5, ST-new6, ST-new7, ST-new8, ST-new9. Из них,

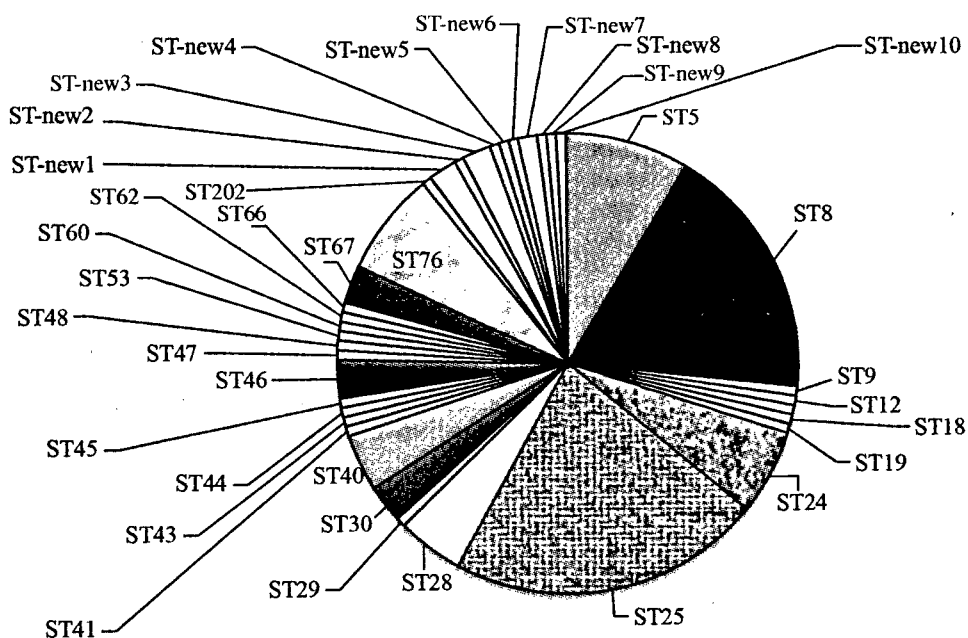


Рис. 1. Удельный вес штаммов *C.diphtheriae* различных сиквенс-типов, выделенных в России в 1957 – 2015 гг.

согласно PubMLST, каждый аллельный профиль соответствовал определенному сиквенс-типу: ST5 – 2-4-4-1-3-3-5 профиль, ST8 – 3-5-6-5-3-3-6, ST12 – 1-5-6-5-3-3-6, ST17 – 5-8-12-10-10-6-4, ST18 – 8-6-7-6-6-3-8, ST19 – 2-6-7-6-6-3-8, ST24 – 2-4-15-6-7-8-9, ST25 – 5-6-7-6-6-3-8, ST28 – 2-9-3-13-3-3-3, ST29 – 10-8-16-14-10-3-5, ST30 – 10-8-16-14-10-3-9, ST32 – 3-1-18-4-13-3-5, ST40 – 8-3-19-2-7-3-3, ST41 – 2-9-22-13-3-3-3, ST43 – 15-1-18-4-13-3-5, ST44 – 14-2-23-4-2-14-2, ST45 – 2-1-2-1-3-1-2, ST46 – 16-4-8-1-7-16-9, ST47 – 2-11-9-19-17-17-9, ST48 – 4-4-25-6-3-5-9, ST53 – 2-1-2-1-3-3-2, ST60 – 2-5-3-1-3-3-9, ST62 – 4-1-18-4-3-16-2, ST66 – 3-5-6-5-11-3-6, ST67 – 3-2-3-6-3-3-2, ST76 – 2-9-1-1-13-3-2, ST202 – 2-4-58-1-3-3-5 профиль. Девять новых сиквенс-типов имели следующий аллельный профиль: ST-new1 – 18-10-27-19-4-3-16 профиль, ST-new2 – 4-1-4-4-3-16-2, ST-new3 – 19-12-4-1-3-3-2, ST-new4 – 19-5-16-5-3-3-6, ST-new5 – 3-8-6-1-10-3-2, ST-new6 – 2-1-20-4-4-3-6, ST-new7 – 16-4-5-1-3-30-9, ST-new8 – 18-10-27-19-20-3-16, ST-new9 – 19-8-16-1-10-3-2 прфиль, нуклеотидные последовательности которых в настоящее время отправлены в международную базу данных.

Среди изученных штаммов *C.diphtheriae* доминирующими были два сиквенс-типа ST25 и ST8, к которым относились 22 и 18% изученных штаммов (рис. 1); 9% штаммов *C.diphtheriae* принадлежали к ST5, 7% – к ST76, 6% – к ST24, 5% – к ST28, 4% – к ST40. С меньшей частотой встречаемости (по 3% штаммов *C.diphtheriae*) были зарегистрированы ST30, ST46, ST67; по 2% штаммов *C.diphtheriae* относилось к ST-new1 и ST-new3. Остальные сиквенс типы среди изученных штаммов *C.diphtheriae* встречались в единичном проценте случаев. Производственный вакцинный штамм *C.diphtheriae* PW8 характеризовался ST44, штаммов с таким сиквенс-типом среди изученных нами штаммов *C.diphtheriae* обнаружено не было. Контрольный токсигенный штамм *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665, выделенный еще в 1960-е годы, относился к ST25.

Далее нами были проанализированы данные о возможной связи способности штаммов *C.diphtheriae* к продукции дифтерийного токсина и принадлежности их к различным сиквенс-типам. Оказалось, что токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к 26 сиквенс-типам, а нетоксигенные штаммы

C. diphtheriae относились к 9 сиквенс-типам. Анализ принадлежности штаммов *C. diphtheriae* разных биоваров к сиквенс-типам показал, что для штаммов различных биоваров характерны определенные сиквенс-типы. Так, штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* принадлежали к 15 сиквенс-типам, а штаммы биовара *mitis* — к 20 сиквенс-типам.

Для большинства токсигенных штаммов *C. diphtheriae* биовара *gravis* были характерны два сиквенс-типа — ST25 (к нему относилось 33 штамма) и ST8 — 27 штаммов; 3 токсигенных штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* относились к ST-new1, к остальным 11 сиквенс-типам принадлежали единичные штаммы (рис. 2). Среди токсигенных штаммов *C. diphtheriae* биовара *mitis* преобладали четыре сиквенс-типа: большинство штаммов (13 штаммов) относились к ST5, 9 штаммов — к ST24, 7 штаммов — к ST28, 4 штамма — к ST46, 3 — к ST-new3, 2 — к ST-new7, остальные сиквенс-типы встречались в единичных случаях (рис. 3). Нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis* разделились следующим образом: большинство штаммов (8 штаммов) относились к ST76, 4 штамма — к ST30, 2 — к ST40, все остальные сиквенс-типы встречались в единичных случаях.

Для оценки филогенетических взаимоотношений между изученными штаммами *C. diphtheriae* и уточнения времени их дивергенции использованы методы определения эволюционных дистанций, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей гомологичных генов. Анализ полученных данных и визуализация филогенетических отношений осуществлялись путем построения дендрограммы (рис. 4). Данный анализ позволяет нам оценить родство сиквенс-типов, а также увидеть, какие сиквенс-типы имеют более раннее в эволюционном плане происхождение.

Анализ показал, что популяция штаммов *C. diphtheriae* обладает высокой степенью гетерогенности. Все изученные штаммы разделились на два кластера. Первый кластер представлен двумя субкластерами, первый из которых включает две ветви. В одну ветвь вошли токсигенные штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST5, выделенные в период 1950 — 1969 гг., и близкие к ним ветви, включающие штаммы *C. diphtheriae*, выделенные в последующие годы, все принадлежащие к биовару *mitis*. Основу второй ветви составили токсигенные

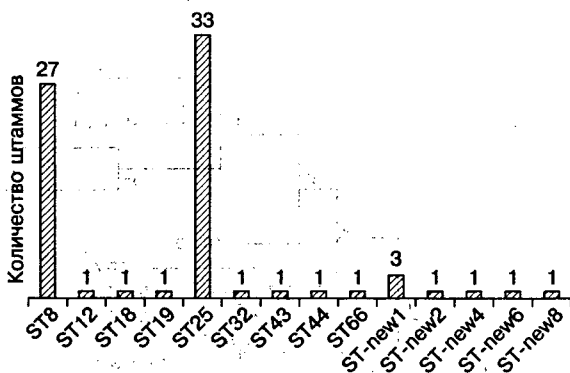


Рис. 2. Частота встречаемости токсигенных штаммов *C. diphtheriae* биовара *gravis* различных сиквенс-типов.

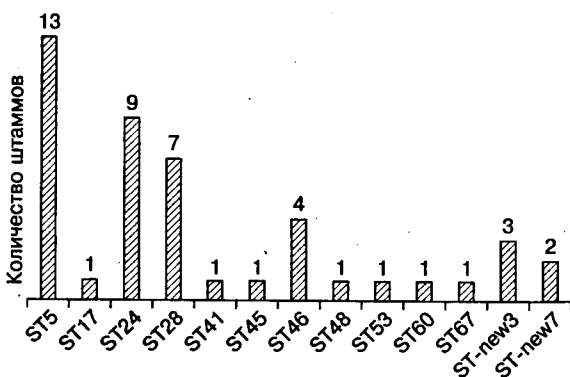


Рис. 3. Частота встречаемости токсигенных штаммов *C. diphtheriae* биовара *mitis* различных сиквенс-типов.

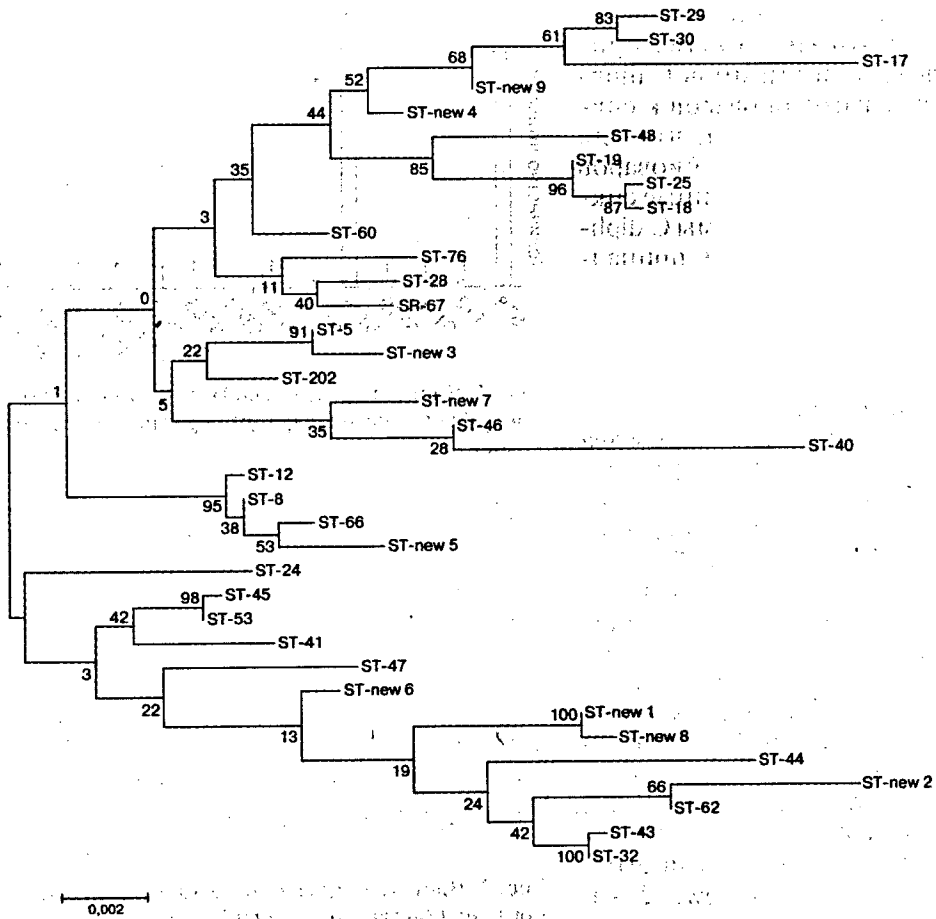


Рис. 4. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений штаммов *C. diphtheriae*, построенная с помощью MEGA 6.06.

штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST25, также выделенные в период 1950 — 1969 гг., и близкие к ним ветви, включающие штаммы *C. diphtheriae*, выделенные в последующие годы, преимущественно биовара *gravis*. Во второй кластер вошли токсигенные штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST24 биовара *mitis*, выделенные, начиная с 1970-х гг. и давшие основу для токсигенных штаммов *C. diphtheriae* двух биоваров, выделенных в 1980-е, 1990-е и 2000-е годы. Вместе с тем, у данного дерева есть недостаток, заключающийся в том, что при проверке достоверности данных с помощью метода «rapid bootstrap» оказалось, что достоверность для оценки эволюционных взаимоотношений падает от «предка к потомку». Скорее всего, это связано с высокой генетической вариабильностью штаммов *C. diphtheriae*. В связи с этим, трудно сделать выводы об эволюционных взаимоотношениях между штаммами. Вместе с тем, при анализе ветвей можно отметить, что есть ветви, включающие современные токсигенные штаммы *C. diphtheriae* (ST28 и ST67, ST-new1, ST-new6 и ST-new8), а есть ветви, состоящие из токсигенных штаммов *C. diphtheriae* более раннего происхождения (ST-new7 и ST46, ST-new3 и ST5). Однако видно, что почти во всех случаях близкородственные штаммы *C. diphtheriae* начинали выделяться приблизительно одновременно.

Учитывая небольшое количество изученных штаммов *C.diphtheriae*, мы предприняли попытку проанализировать распространение штаммов *C.diphtheriae* различных сиквенс-типов в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции. С этой целью все изученные штаммы *C.diphtheriae* были разделены на шесть групп. В первую группу вошли штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в допрививочный период и первые десять лет проведения массовой иммунизации (1957 — 1969 гг.), во вторую группу — штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в 1970 — 1979 гг., в третью группу — штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в 1980 — 1989 гг., в четвертую группу — штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в период подъема и начала снижения заболеваемости дифтерией (1990 — 1999 гг.). Пятая группа состояла из штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2000 — 2009 гг., и в шестую группу вошли штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в последние шесть лет (2010 — 2015 гг.).

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1957 — 1969 гг., были зарегистрированы штаммы четырех сиквенс-типов — ST25, ST5, ST19 и ST62. Из них большинство штаммов (83,0%) принадлежало к биовару *gravis* и сиквенс-типу ST25, который характерен для контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* № 665, выделенного в 1960-е годы. Изученные токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к трем сиквенс-типам, из которых штаммы биовара *gravis* относились к двум сиквенс-типам — ST19 и ST25, а штаммы биовара *mitis* — к одному сиквенс-типу ST5.

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1970 — 1979 гг., были зарегистрированы штаммы шести сиквенс-типов — ST25, ST5, ST24, ST-new2, ST32 и ST202. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к пяти сиквенс-типам — ST25, ST-new2, ST32, ST5 и ST24. Среди них токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* были представлены тремя сиквенс-типами — ST25, ST-new2 и ST32. У токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* зарегистрированы два сиквенс-типа — ST5 и ST24.

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1980 — 1989 гг., было отмечено большее разнообразие циркулирующих сиквенс-типов и зарегистрированы штаммы тринадцати сиквенс-типов — ST5, ST8, ST24, ST25, ST43, ST46, ST47, ST48, ST53, ST60, ST66, ST-new3 и ST-new7. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к двенадцати сиквенс-типам — ST24, ST46, ST5, ST-new3, ST-new7, ST48, ST53 и ST60, ST8, ST25, ST43 и ST 66. Среди токсигенных штаммов *C.diphtheriae* преобладали штаммы биовара *mitis*, у которых выявлено большое разнообразие циркулирующих сиквенс-типов. Зарегистрировано девять сиквенс-типов — ST24, ST46, ST5, ST-new3, ST-new7, ST48, ST53 и ST60 с преобладанием штаммов двух сиквенс-типов — ST24 и ST46. У токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis* выделено четыре сиквенс-типа — ST8, ST25, ST43 и ST 66, из которых преобладали штаммы сиквенс-типа ST8.

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией и начала ее снижения — 1990 — 1999 гг., были зарегистрированы штаммы одиннадцати сиквенс-типов — ST5, ST8, ST12, ST17, ST18, ST24, ST29, ST30, ST40, ST45 и ST-new4. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* относились к восьми сиквенс-типам — ST8, ST12, ST18, ST-new4, ST5, ST24, ST17 и ST45. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* принадлежали к 4 сиквенс-типам — ST8, ST12, ST18 и ST-new4. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* также относились к четырем сиквенс-типам — ST5, ST24, ST17 и ST45.

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в период снижения заболеваемости дифтерией (2000 — 2009 гг.), зарегистрированы штаммы девяти сиквенс-

типов — ST5, ST8, ST25, ST28, ST41, ST-new1, ST-new5, ST-new6 и ST-new8, из которых токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к восьми сиквенс-типам — ST8, ST-new1, ST25, ST-new6, ST-new8, ST28, ST5 и ST41. Из них токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* принадлежали к пяти сиквенс-типам — ST8, ST-new1, ST25, ST-new6 и ST-new8, а токсигенные штаммы биовара *mitis* — к трем сиквенс-типам — ST28, ST5 и ST41.

В последние шесть лет на территории России зарегистрированы штаммы 8 сиквенс-типов — T5, ST8, ST25, ST28, ST40, ST67, ST76 и ST-new9, из которых токсигенные штаммы относились к четырем сиквенс-типам — ST8, ST25, ST5 и ST67. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* представлены двумя сиквенс-типами — ST8 и ST25, токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* также относились к двум сиквенс-типам — ST5 и ST67. Среди выделенных токсигенных штаммов *C.diphtheriae* практически с одинаковой частотой превалировали штаммы биовара *gravis* сиквенс-типа ST8 и биовара *mitis* сиквенс-типа ST67.

ОБСУЖДЕНИЕ

Учеными МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского разработана система эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией, которая опирается на глубокое понимание эпидемиологических закономерностей, особенности клинического течения и предусматривает наблюдение за фенотипическими и генотипическими свойствами штаммов *C.diphtheriae* [1, 2, 3, 9]. И.К. Мазуровой в 1990-е годы разработана комплексная система наблюдения за возбудителем дифтерийной инфекции, основу которой составили классические микробиологические, иммунохимические (реакция непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ) и молекулярно-генетические методики (ДНК-ДНК гибридизация нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция по выявлению гена дифтерийного токсина). Применение такого комплексного подхода позволило установить, что возбудитель дифтерии, его биологические свойства могут влиять на развитие эпидемического и тяжесть инфекционного процесса. С.Ю. Комбарова в дальнейшем расширила систему мониторинга возбудителя дифтерийной инфекции с использованием высокоинформативных молекулярно-генетических технологий — риботипирование, мультилокусный энзимный электрофорез (МЭЭ), полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами (УП-ПЦР) и секвенирование отдельных генов. Многолетний микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг штаммов *C.diphtheriae*, проводимый в МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, позволил установить особенности биологических свойств штаммов и формирования структуры популяции *C.diphtheriae* в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции [1, 2, 3, 9].

Проведенное исследование показало, что для токсигенных штаммов *C.diphtheriae* характерно более выраженное разнообразие сиквенс-типов (26 сиквенс-типов), чем для нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* (9 сиквенс-типов). Кроме того, для штаммов *C.diphtheriae* различных биоваров характерны определенные сиквенс-типы и отмечается более выраженная гетерогенность для штаммов биовара *mitis* (20 сиквенс-типов), чем для штаммов биовара *gravis* (15 сиквенс-типов). Анализ данных о принадлежности токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров к сиквенс-типам показал прямую взаимосвязь между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C.diphtheriae* к определенному сиквенс-типу. Так, токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* принад-

лежали к 14 сиквенс-типам: ST8, ST12, ST18, ST19, ST25, ST32, ST43, ST44, ST66, ST-new1, ST-new2, ST-new4, ST-new6, ST-new8. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* принадлежали к 13 сиквенс-типам: ST5, ST17, ST24, ST28, ST41, ST45, ST46, ST48, ST53, ST60, ST-new3, ST-new7. Нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* относились к ST62. Нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* принадлежали к 8 сиквенс-типам: ST29, ST30, ST40, ST47, ST76, ST202, ST-new5, ST-new9.

Анализ распространения штаммов *C.diphtheriae* различных сиквенс-типов в динамике эпидемического процесса дифтерийной инфекции показал, что среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1957 — 1969 гг., большинство (83,0%) штаммов принадлежало к биовару *gravis* ST25, который характерен и для контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* № 665, выделенного в 1960-е годы. Среди штаммов *C.diphtheriae*, циркулирующих в 1970 — 1979 гг., также преобладали штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* ST25, но удельный вес их снизился, а к концу 1970-х годов увеличился удельный вес штаммов биовара *mitis* ST5. В 1980-е годы у штаммов *C.diphtheriae* отмечено увеличение разнообразия циркулирующих сиквенс-типов, где среди токсигенных штаммов преобладали штаммы биовара *mitis* двух сиквенс-типов — ST24 и ST46, а у штаммов биовара *gravis* — ST8, последний из которых превалировал в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией 1990-х годов и ее снижения (2000 — 2009 гг.). В последние шесть лет на территории России зарегистрированы штаммы 8 сиквенс-типов, из которых токсигенные штаммы относились к четырем сиквенс-типам и с практически одинаковой частотой превалировали штаммы биовара *gravis* ST8 и биовара *mitis* ST67. Причем первый токсигенный штамм *C.diphtheriae* сиквенс-типа ST67 был выделен в Ханты-Мансийском АО в 2012 г., и уже в 2015 г. на этой же территории были идентифицированы три токсигенных штамма этого сиквенс-типа от лиц, не имевших между собой контактов.

Следует отметить, что токсигенные штаммы *C.diphtheriae* сиквенс-типов ST5 и ST25 регистрировали на территории России, начиная с 1960-х годов и по настоящее время, что может свидетельствовать о том, что такие сиквенс-типы циркулируют постоянно на территории России с определенной частотой, варьируя в различные периоды. В то время, как ST8 был зарегистрирован на территории России только в 1980-е годы, что может свидетельствовать о ввозе данных штаммов на территорию России. Штаммы с этим сиквенс-типом заняли доминирующее положение в популяции в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией 1990-х годов и до сих пор выделяются на территории нашей страны. По данным зарубежных исследователей [4, 13], два клональных комплекса, включающих четыре сиквенс-типа — ST8, ST12, ST52 и ST66, связывают с подъемом заболеваемости дифтерией в 1990-х годах, т.е. они имеют, как полагают, наибольшую эпидемиологическую значимость. Однако токсигенные штаммы *C.diphtheriae* ST66 были зарегистрированы только в незначительном проценте случаев в 1980-е годы, а штаммов ST52 вообще не выделяли в России.

Метод МЛСТ используется для характеристики токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* в Англии, Германии, Польше, Франции и Бразилии [5, 6, 10, 14 — 16]. Так, при идентификации генотипа токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в Англии в 2007 — 2013 гг., было обнаружено 8 сиквенс-типов — ST10, ST261, ST262, ST263, ST264, ST265, ST266 и ST267 [6, 15, 16]. Выделенный в Германии в июне 2015 г. от больного дифтерией токсигенный штамм *C.diphtheriae* принадлежал к другому сиквенс-типу

— ST255 [4]. Однако такие сиквенс-типы на территории России не выделяли. Аналогичные исследования *C.diphtheriae* с помощью метода МЛСТ, проведенные в Польше, Франции и Бразилии, были посвящены характеристике нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* [7, 10, 14 — 16]. Идентифицировано от 6 до 11 сиквенс-типов, из них большинство штаммов объединены в три сиквенс-типа — ST8, ST-82 и ST130. Однако нетоксигенных штаммов данных сиквенс-типов также на территории России пока не выделено. Обобщая литературные данные по мультилокусному секвенированию штаммов *C.diphtheriae*, можно сказать, что в настоящее время происходит накопление данных о выделенных сиквенс-типах, которые аккумулируются в международной базе данных PubMLST, где представлено более 300 сиквенс-типов. Вместе с тем, данный метод может быть использован с высокой степенью достоверности для характеристики циркулирующих штаммов возбудителя дифтерии при расследовании вспышек и расшифровке завозных случаев.

Таким образом, впервые в России оценен клональный состав циркулирующей популяции возбудителя дифтерии с помощью МЛСТ. Идентифицированы штаммы *C.diphtheriae* 36 сиквенс-типов, 27 из которых описаны в международной базе PubMLST, и девять новых сиквенс-типов, идентифицированных нами впервые. Среди штаммов *C.diphtheriae* доминировали штаммы ST25 и ST8. Показаны взаимосвязи между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C.diphtheriae* к определенному сиквенс-типу — токсигенные и нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* различных биоваров характеризовались определенными сиквенс-типами. Использование МЛСТ позволило охарактеризовать циркулирующую популяцию штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в России, и показало перспективность применения этого метода для характеристики популяции возбудителя дифтерии, выявления эпидемически значимых штаммов (клональных комплексов) и расшифровки очагов дифтерийной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Комбарова С. Ю., Борисова О. Ю., Мельников В. Г. и др. Полиморфизм генов *tox* и *dtxR* у циркулирующих штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. Журн. микробиол. 2009, 1: 7-11.
2. Мазурова И.К., Комбарова С.Ю., Борисова О.Ю. и др. Мониторинг возбудителя дифтерийной инфекции. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009, 3 (46): 17-22.
3. Мазурова И.К., Борисова О.Ю., Комбарова С.Ю. и др. Характеристика штаммов *C.diphtheriae*, циркулирующих в России в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции. Инфекция и иммунитет. 2012, 2(1 — 2): 294.
4. Berger A., Meinel D.M., Schaffer A. et al. A case of pharyngeal diphtheria in Germany, June 2015. *Infection*. DOI 10.1007/s15010-016-0882-2.
5. Bolt F., Cassidy P., Tondella M. et al. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *C.diphtheriae*. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48 (11): 4177-4185.
6. Both L., Collins S., Zoysa A. et al. Molecular and epidemiological review of toxigenic diphtheria infections in England between 2007 and 2013. *JCM.* 2015, 53 (2): 567-572.
7. Fafour E., Badell E., Zasada A. et al. Characterization and comparison of invasive *C.diphtheriae* isolates from France and Poland. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50 (1): 173-175.
8. Grimont F., Grimont P. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1986, 137 B (2): 165-175.
9. Комбарова С., Kim C., Melnikov V. et al. Rapid identification of *Corynebacterium diphtheriae* clonal group associated with diphtheria epidemic, Russian Federation. *J. Infect. Dis.* 2001, 7, 1: 133-136.
10. Mattos-Guaraldi A. L., Moreira L. O., Damasco P. V. et al. Diphtheria remains a threat to health in developing world — an overview. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz.* 2003, 98: 987-993.

11. Mokrousov I., Narvskaya O., Limeshenko E. et al. Efficient discrimination within *Corynebacterium diphtheriae* clonal group by a novel macroarray-based method. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, № 4: 662-668.
12. Popovic T., Kombarova S. J., Reeves M. W. et al. Molecular epidemiology of diphtheria in Russia. *J. Infectious Diseases.* 1997, 174: 1064-1072.
13. Spratt B. G., Maiden M. C. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philosophical Transactions Royal Society B.* 1999, 354: 701-710.
14. Viguetti S., Pacheco L., Santos L. et al. Multilocus sequence types of invasive *C. diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. *J. Epidemiol. Infect.* 2011, 139: 1-4.
15. Wagner K., White J., Lucenko I. et al. Diphtheria in postepidemic period, Europe, 2000 – 2009. *J. Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18 (2): 217-225.
16. Zakikhany K., Efstratiou A. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol.* 2012, 7 (5): 595-607.
17. Zoysa A., Efstratiou A., Hawkey P. H. et al. Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (*dtxR*) genes present in nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in the United Kingdom. *J. Clinical Microbiology.* 2005, 43, 1: 223-228.

Поступила 01.06.16

Контактная информация: Чагина Ирина Алексеевна,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*С.Б.Яцышина, А.Н.Рентеева, А.В.Валдохина, М.А.Елькина,
А.С.Сперанская, Е.В.Пимкина, Р.Р.Минтаев, М.Л.Маркелов, В.В.Малеев*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА А/Н3N2 И В, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ В 2013 — 2015 ГГ.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

Цель. Установить генетическую характеристику, провести филогенетический анализ и определение молекулярных маркеров резистентности к этиотропным препаратам вирусов гриппа А/Н3N2 и В, циркулировавших в России в 2013 — 2015 гг. *Материалы и методы.* Исследованы 80 биологических образцов, содержащих РНК вируса гриппа А/Н3N2, и 31 образец, содержащий РНК вируса гриппа В. Секвенирование фрагментов ПЦР выполнялось на ABI-3100 PRIZM™ GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems, США) и с использованием MiSeq (Illumina, США). Обработка и анализ данных проводились с помощью программ CLC v.3.6.5., DNASTAR и BioNumerics v.6.5. *Результаты.* В 2013 — 2014 гг. доминировали вирусы гриппа А/Н3N2 клайда 3С.3, подобные вакцинному штамму А/Texas/50/2012, 10% принадлежали к субклайду 3С.2а и 10% — к 3С.3b. Подавляющее большинство (81%) вирусов 2014 — 2015 гг. вошли в клайд 3С.2а, доля вирусов, относящихся к 3С.3b и 3С.3а, составляла 9% и 10%. Среди исследованных вирусов гриппа В преобладали Ямагата-подобные, лишь 1 вирус в 2014 — 2015 гг. относился к линии Виктория, обнаружен 1 реассортант линий Ямагата и Виктория. Во всех вирусах гриппа А/Н3N2 выявлена мутация устойчивости к ремантадину S31N (белок М2). Мутации, определяющие устойчивость к озельтамивиру (ген NA), вирусов гриппа А/Н3N2 и В обнаружены не были. *Заключение.* Подъем заболеваемости гриппом в 2014 — 2015 гг. обусловлен появлением вирусов гриппа А/Н3N2 и В, отличающихся по антигенному составу от циркулировавших ранее и от вошедших в вакцину, что привело к решению ВОЗ заменить компоненты А/Н3N2 и В вакцины 2015 — 2016 гг. Одновременная циркуляция двух линий вируса гриппа В и появление их реассортантов свидетельствует о целесообразности применения четырехвалентной вакцины, включающей обе линии.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 60—72

Ключевые слова: вирусы гриппа, ПЦР, филогенетический анализ