На правах рукописи

Чагина Ирина Алексеевна

Антибиотикочувствительность и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae*

03.02.03 - микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2016

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:
доктор медицинских наук **Борисова Ольга Юрьевна**

Официальные оппоненты:
Быков Анатолий Сергеевич - доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, профессор кафедры

Тец Виктор Вениаминович - доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. академика Д.К. Заболотного, заведующий кафедрой

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи)

Защита состоится «___» _____2016 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, http://www.gabrich.ru

Автореферат разослан “___”_____2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Масовая иммунизация населения, проводимая с середины 1950-х годов, изменила характер течения эпидемического процесса дифтерийной инфекции и показала положительный эпидемиологический и социально-экономический эффект для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия по дифтерии в Российской Федерации (Онищенко Г.Г., 2010). Однако, несмотря на очевидные успехи вакцинопрофилактики, актуальность проблемы дифтерии в условиях спорадической заболеваемости сохраняется. Эпидемический процесс поддерживается наличием скрытых источников инфекции, когорты лиц, восприимчивых к инфекции, заболеваемостью среди привитых, а также бактерионосительством, что свидетельствует о продолжающейся циркуляции штаммов *Corynebacterium diphtheriae* среди населения (Маркина С.С., 2002, 2005; Максимова Н.М., 2009, 2010; Якимова Т.Н., 2012, 2014).

Изучению штаммов возбудителя дифтерийной инфекции посвящено значительное число работ ученых разных стран мира (Nakao H., 1996, 1997; Engler K., Efstratiou A., 1998, 2010; Grimont P., 1986, 2000; Popovic T., 2000; Titov L., Kolodkina V., 2000, 2003; Mattos-Guaraldi A., 2000, 2003; Damian M., 2004; de Zoysa A., 2005). Биологические свойства оценивались с помощью классических микробиологических (удельных вес биоваров, антибиотикочувствительность) и молекулярно-генетических методов, таких как гибридизация ДНК, рестрикционный анализ, ПЦР с универсальными праймерами (УП-ПЦР, RAPD), ПЦР-ПДРФ (RFLP), риботипирование, мультилокусный энзим электрофорез (МЭЭ), а также секвенирование отдельных генов.

Многолетний микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг штаммов *C.diphtheriae*, проводимый в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, позволил установить особенности биологических свойств штаммов и формирования структуры популяции *C.diphtheriae* в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции (Мазурова И.К., 1993, 2000, 2009; Комбарова С.Ю., 1995, 2007, 2009, 2010; Мельников В.Г., 2000, 2002; Борисова О.Ю., 1998, 2009). Было показано, что популяция штаммов *C.diphtheriae* гетерогенна и по чувствительности к антибиотикам, которые применяются для санации дифтерийных бактерионосителей, в комплексной терапии отдельных форм дифтерии, а также для лечения инвазивных заболеваний, вызванных нетоксигенными *C.diphtheriae* (Gladin D.P., 1994; Maple P.A., 1994; Мельников В.Г., 1997; Kneen R., 1998; von Hunolstein C., 2002; Корженкова М.П., 2006; Pereira G., 2008; Краева Л.А., 2009; Barraud O., 2011; Mina N., 2011; Fafour E., 2012). В различные годы были выявлены штаммы *C.diphtheriae*, обладающие резистентностью к макролидам и пенициллинам (Jellard C.H., 1973; Rockhill R., 1982; Maple P.A., 1994; Гладин Д.П., 1995; Patey O., 1996; Engler K.H., 1998; Kneen R., 1998; von Hunolstein C., 2002; Pereira G., 2008; Краева Л.А., 2011; Mina N., 2011).

В настоящее время, благодаря появлению высокотехнологичных молекулярно-генетических технологий, высокопроизводительного секвенирования и развитию метагеномики и сравнительной геномики, стало возможным с новых позиций подойти к изучению биологических свойств и внутривидового разнообразия возбудителей инфекционных заболеваний, а также изучению молекулярных механизмов антибиотикорезистентности. 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, который 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. с соавторами (2010) и включала штаммы 79 сиквенс-типов, объединенных в 11 клональных комлексов. К настоящему времени в международной базе данных PubMLST (http://pubmlst.org/) представлено более 300 сиквенс-типов. Вместе с тем, данный метод еще не использовался для характеристики штаммов *C.diphtheriae*, циркулирующих в России. Применение новых биоинформационных технологий, подходов и концепций в области получения и анализа генетической информации позволит проводить более глубокое изучение токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae*.

Степень разработанности темы исследования

К настоящему времени накоплен значительный научный потенциал о биологических свойствах возбудителя дифтерии, который формировался несколькими поколениями ученых и основывался на уровне методологической, информационной и материально-технической оснащенности каждого временного периода (Костюкова Н.Н., 1968, 1971, 1999; Суслова В.С., 1964; Маркина С.С., 1971; Крылова М.Д., 1973,1976; Сухорукова Н.Л., 1978; Бочкова В.А., 1978; Мазурова И.К., 1993, 1998, 2000, 2009; Шмелева Е.А, 1991; Черкасова В.В., 1988; Мокроусов И.В., Нарвская О.В., 1996, 2005, 2009; Комбарова С.Ю., 1995, 2000, 2007, 2009; Ценева Г.Я., 2000; Краева Л.А., 2007, 2009, 2011; Мельников В.Г., 2000, 2002; Борисова О.Ю.,1999, 2009).

Учеными ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора разработана система эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией, которая опирается на знание эпидемиологических закономерностей, особенности клинического течения и предусматривает наблюдение за фенотипическими и генотипическими свойствами штаммов *C.diphtheriae* (Фаворова Л.А., 1993; Маркина С.С., Максимова Н.М., 1989,1993; Мазурова И.К. 1993). И.К. Мазуровой в 1990-е годы (1993) разработана комлексная система наблюдения за возбудителем дифтерийной инфекции, основу которой составляли классические микробиологические, а также иммунохимические и молекулярно-генетические методики. Применение такого комплексного подхода позволило установить, что биологические свойства возбудителя дифтерии могут влиять на развитие эпидемического и тяжесть инфекционного процесса. В дальнейшем система мониторинга возбудителя дифтерийной инфекции была расширена с помощью использования молекулярно-генетических технологий – риботипирования, МЭЭ, УП-ПЦР и секвенирования отдельных генов (Комбарова С.Ю., 1995, 2000, 2007, 2009). В результате многолетних наблюдений за штаммами *C. diphtheriae* были определены «индикаторные» признаки, отражающие фенотипические и генотипические особенности состава популяции *C. diphtheriae*: удельный вес биоваров *gravis* и *mitis*, генетическая структура хромосомной ДНК, патогенные свойства (Мазурова И.К., Комбарова С.Ю., Мельников В.Г., Борисова О.Ю., 1999, 2002, 2004)

В связи с этим, учитывая результаты многолетних предыдущих исследований, проведенных в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, об изменчивости возбудителя дифтерии, большое значение приобретает постоянное наблюдение за биологическими свойствами *C.diphtheriae* при помощи развивающихся молекулярно-генетических технологий. Это позволит расширить знания о биологии возбудителя и формировании популяции циркулирующих штаммов *C.diphtheriae*, которые могут оказывать влияние на течение эпидемического и инфекционного процессов.

Цель исследования - определение антибиотикочувствительности и молекулярно-генетических особенностей структуры токсигенных и нетоксигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* для оптимизации мониторинга возбудителя в системе эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией

Задачи исследования:

1. Оценить антибиотикочувствительность у штаммов *C.diphtheriae*, выделенных на территории России.
2. Установить молекулярные механизмы резистентности у штаммов *C.diphtheriae* к макролидам и рифампицину.
3. Провести полноразмерное секвенирование генома мультирезистентного токсигенного штамма *C.diphtheriae.*
4. Провести генотипирование штаммов *C.diphtheriae,* выделенных в России, с помощью метода мультилокусного секвенирования ДНК (МЛСТ).
5. Изучить особенности структуры генов *tox* и *dtxR* у современных штаммов *C.diphtheriae.*

Научная новизна

Проведенный мониторинг антибиотикочувствительности штаммов *C.diphtheriae* показал, что 5,6% штаммов *C.diphtheriae* являются резистентными к антибактериальным препаратам пенициллинового ряда, 3,6 – 3,7% штаммов к макролидам и 4,7% штаммов - к рифампицину; множественной резистентностью обладают 3,8% штаммов.

Молекулярный механизм резистентности штаммов *C.diphtheriae* к макролидам обусловлен наличием гена *erm(X)*, расположенного на плазмиде; резистентность к рифампицину заключается в наличии мутаций в трех позициях гена *rpoB* - 1291, 1307 и 1484, затрагивающих кодоны аминокислот H431N, S436F, S436Y, P495L и P495Q в β субъединице РНК-полимеразы.

В результате впервые проведенного полноразмерного секвенирования получен драфтовый сиквенс генома мультирезистентного штамма *C.diphtheriae*, нуклеотидная последовательность которого депонирована в международную базу данных GenBank: JZUJ00000000 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JZUJ00000000.1).

У токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010-2015 гг., выявлены мутации в 6 позициях гена *tox*, из которых впервые показаны мутации в позиции (-19) в промоторной области и у четырех штаммов *C.diphtheriae* - в позиции 913 (A305T) в T домене B субъединицы дифтерийного токсина; в гене *dtxR* обнаружены мутации в 15 позициях, из которых новая мутация в позиции (-23) промоторной области и ранее описанные мутации в позициях 440 (A147V) и 640 (L214I) гена *dtxR*, что подтверждает нарастание у современных штаммов *C.diphtheriae* полиморфизма в генах, кодирующих дифтерийный токсин и регуляторный DtxR белок.

Расшифрован молекулярный механизм отсутствия экспрессии гена *tox* у четырех НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010 – 2015 гг., заключающийся в выпадении нуклеотида G в позиции 55 гена *tox*, приводящем к сдвигу рамки считывания и нефункциональности гена. В структуре гена *dtxR* впервые у НТТН-штаммов *C.diphtheriae* выявлено наличие двух мутаций, одна из которых была ранее описана у токсигенных штаммов и вторая новая мутация в позиции 126 гена *dtxR*.

Впервые с помощью мультилокусного секвенирования ДНК (МЛСТ) охарактеризована популяция циркулирующих штаммов *C.diphtheriae* в России; идентифицировано 36 сиквенс-типов с доминированием штаммов двух сиквенс-типов - 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, а также НТТН-штаммы *C.diphtheriae* с различным механизмом отсутствия экспрессии гена

дифтерийного токсина характеризовались определенными сиквенс-типами.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные об антибиотикочувствительности штаммов *C.diphtheriae* дополняют знания о биологических свойствах возбудителя дифтерии, а также расширяют представления о молекулярных механизмах, обуславливающих резистентность у возбудителей инфекционных заболеваний, подтверждающих возможность передачи генетической информации между микроорганизмами в одном биотопе макроорганизма, и нарастающей тенденции роста антибиотикорезистентности возбудителей инфекций верхних дыхательных путей.

Проведение генотипирования с помощью мультилокусного секвенирования ДНК (МЛСТ) и полученные данные о сиквенс-типах циркулирующих штаммов *C.diphtheriae* расширяют знания о клональной организации популяции, закономерностях циркуляции штаммов, степени их филогенетического родства и эволюции возбудителя дифтерии.

Своевременное выявление антибиотикорезистентных штаммов *C.diphtheriae* и слежение за их распространением позволит проводить адекватную антибиотикотерапию и ее коррекцию при санации дифтерийных бактерионосителей.

Определены возможности использования мультилокусного секвенирования для генотипирования штаммов *C.diphtheriae*, что будет способствовать повышению эффективности эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией при установлении источника и расшифровке очагов инфекции, выявлении эпидемических клональных комплексов, слежении за появлением и распространением генотипов, и завозных случаев на территорию России.

Тринадцать штаммов *C.diphtheriae* депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (В-7390, В-7389, В-7388, В-7387, В-4398, В-7391, В-7813, В-7815, В-7817, В-7816, В-7819, В-7818, В-7820) в качестве контрольных штаммов для проведения внешнего контроля качества бактериологических исследований при лабораторной диагностике дифтерийной инфекции, и для генотипирования *C.diphtheriae* при проведении молекулярно-генетического мониторинга возбудителя дифтерийной инфекции и изучения антибиотикорезистентности в системе эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией.

Создана коллекция ДНК из штаммов *C.diphtheriae*, обладающих различным уровнем антибиотикочувствительности и характеризующихся принадлежностью к разным сиквенс-типам, который можно использовать в дальнейших исследованиях для прогнозирования распространения эпидемически значимых штаммов возбудителя дифтерии, а также изучения у них молекулярно-генетических механизмов резистентности к антибактериальным препаратам.

Результаты микробиологического и молекулярно-генетического мониторинга штаммов *C.diphtheriae* в рамках работы референс-центра по мониторингу возбудителей кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии были использованы для подготовки информационного-методического Письма Роспотребнадзора от 16.12.2015 № 01/15524-15-27 "О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по диагностике дифтерии и качества питательных сред в Российской Федерации» и в лекционном материале на совещании с практическим семинаром по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша для бактериологов Уральского Федерального Округа России (01.10.2012 – 05.10.2012 гг., Екатеринбург); на семинарах по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша на курсах информации и стажировки для бактериологов филиалов ФБУЗ ЦГиЭ в административных округах г. Москвы (2011 г., 2012 г., 2013 г., 2014 г., 2015 г., Москва); на Региональных семинарах для специалистов лабораторной сети по диагностике дифтерии и коклюша для субъектов

Дальневосточного федерального округа России (22.06.2013 – 29.06.2013 гг., Хабаровск); субъектов – Республик Горный Алтай, Хакассия, Бурятия, Тыва и Алтайского края, (23.06.2014 – 27.06.2014 гг., Горно-Алтайск); субъектов Южного и Северо-Кавказского федеральных округов (22.06.2015 – 26.06.2015 гг., Ростов-на-Дону) (акты внедрения от 28.01.2016 г., 02.02.2016 г.).

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы спланирована согласно поставленной цели исследования и включает последовательное применение методов научного познания для определения характеристик компонентов, необходимых для решения поставленных задач.

Предметом изучения явились биологические свойства штаммов *C.diphtheriae*. Анализ научной литературы, посвящённой оценке молекулярных маркеров, используемых для дифференциации штаммов *C.diphtheriae,* проведён на основе формально-логических методов исследования. Работа выполнена в формате сравнительного открытого исследования с использованием бактериологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов.

Штаммы микроорганизмов

В работе изучены фенотипические и генотипические свойства штаммов *C.diphtheriae,* выделенных в период 1957 – 2015 гг. от больных дифтерией и бактерионосителей. Штаммы *C.diphtheriae,* выделенные в период 2010 – 2015 гг., получены из бактериологических лабораторий 66 регионов 7 федеральных округов России, а штаммы прошлых лет взяты из лабораторной коллекции микроорганизмов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора. В работе также использованы коллекционные штаммы – *C.diphtheriae* № 665, *C.diphtheriae* Park Williams 8 (PW 8), *C.ulcerans № 675, C.pseudodiphtheriticum «Соколов», Staphylococcus aureus № 25923* (из ФГБУ НЦЭСМП Минздрава РФ), *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 10648 (National Collection of Type Cultures). Объем проведенных исследований и количество изученных штаммов *C.diphtheriae* представлено в таблице 1.

Таблица 1 - Объем проведенных исследований

Количество постановок		ПЦР	1746
		Секвенирование фрагментов ДНК	1650
Количество изученных штаммов	Генотипирование с помощью МЛСТ		148
	Антибиотикочувствительность	ДДМ	888
		Е-тест	107
		Молекулярные механизмы резистентности	416
	Филогенетический анализ		55
	Полноразмерное секвенирование генома		1
	Структура генов патогенности	*dtxR*	17
		tox	16

Микробиологические методы исследования

Бактериологические методы

Идентификацию C.diphtheriae проводили согласно Методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» (МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13). Исследуемый материал засевали 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 37^0С. 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). Токсигенность штаммов *C.diphtheriae* оценивали в РП с использованием Коринетоксагара (ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением СКРС (НПО «Лейтран», Москва) и дисков с антитоксином дифтерийным (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород).

Изучение антибиотикочувствительности штаммов C.diphtheriae осуществляли согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотическим препаратам», стандартам комитета NCCLS (National committee for Clinical Laboratory Standards) и протоколам, рекомендуемым Институтом клинических и лабораторных стандартов (Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third information supplement M100-S_{23}; Clinical and Laboratory Standarts Institute, CLSI). Исследование проводили двумя методами: диско-диффузионным и методом «E-test». В качестве антимикробных препаратов использовали диски с - эритромицином (15 мкг/мл), азитромицином (15 мкг/мл), рифампицином (5 мкг/мл), пенициллином (10 мкг/мл), ампициллином (10 мкг/мл), имипенемом (10 мкг/мл), линкомицином (15 мкг/мл), клиндамицином (10 мкг/мл), офлоксацином (5 мкг/мл), ципрофлоксацином (10 мкг/мл) («HiMedia», Индия); Е-полоски - с градиентом концентраций антибиотиков – эритромицина (240 - 0,001 мкг/мл и 4 – 0, 0001 мкг/мл), азитромицина (128 – 0,01 мкг/мл и 2 – 0,0001 мкг/мл), пенициллина (256 - 0,015 мкг/мл) и рифампицина (240 – 0,01 мкг/мл и 32 – 0,001 мкг/мл) («HiMedia», Индия; «Oxoid», США). В работе использовали отечественную питательную среду АГВ-агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10% СКРС (НПО «Лейтран», Москва).

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение ДНК из C.diphtheriae

Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения согласно (Маниатис Т., 1984 г.) из 24-часовой культуры *C.diphtheriae* с 10% кровяного агара (СПА, «Микроген», Махачкала; ККРС, НПО «Лейтран», Москва). Петлю суточной культуры суспендировали в 100 мкл деионизованной воды, инкубировали 20 мин при 95^oС, центрифугировали 30 сек при 14000 об/мин.

Выделение плазмидной ДНК *C.diphtheriae* проводили с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit («Thermo SCIENTIFIC», Литва).

Для выделения тотальной ДНК *C.diphtheriae* выращивали суточную культуру *C.diphtheriae* в 5 мл сердечно-мозгового бульона («HiMedia», Индия) в концентрации 10^9 клеток/мл. Взвесь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин и удаляли супернатант. Полученый осадок ресуспендировали в 1,5 мл TES до гомогенной суспензии; центрифугировали 5 мин при 15000 об/мин. Полученый осадок ресуспендировали в 200 мкл смеси (TES/сахароза, лизоцим и мутанолизин), выдерживали 1 час при 42^0С. Далее добавляли 3 мкл раствора РНКазы и выдерживали 30 мин при 37^0С. Добавляли 15 мкл раствора протеиназы К, термостатировали при 37^0С 16 часов. После чего добавляли 800 мкл лизирующего раствора и оставляли на 10 мин при 60^0С. Центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин. Далее наносили супернатант по 500 мкл на колонку, каждый раз центрифугируя при 10000 об/мин 1 мин. Дважды промывали колонку промывочным буфером. Элюирование ДНК проводили ТЕ-буфером 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 10000 об/мин 1 мин.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для выявления фрагментов генов, кодирующих резистентность к эритромицину (ermX) и рифампицину (rpoB), у штаммов C.diphtheriae. Дизайн праймеров для амплификации фрагментов генов *ermX* и *rpoB* осуществляли на основе международной базы данных GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez). ПЦР смесь содержала 1,5mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,0 мкМ каждого праймера, по 200 мкМ каждого dNTPs, 1 мкл ДНК и 1 ед. Taq DNA-полимеразы («Fermentas», Литва). Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Москва). Детекцию результатов амплификации проводили путем электрофореза в 1,5% агарозном геле при 160V в течение 1 часа с последующим сравнением электрофоретической подвижности специфических светящихся фрагментов амплифицированных продуктов с подвижностью фрагментов маркера молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). Учет результатов реакции осуществлялили с помощью гель документирующей системы «Vilber Lourmat Quantum ST-4-1100/26M».

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для выявления фрагментов гена tox у нетоксигенных штаммов C.diphtheriae. Выявление фрагментов гена *tox* у нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* проводили с помощью коммерческой тест-системы “Ампли-Сенс-ПЦР” («Интерлабсервис», Москва) в соответствии с инструкцией производителя, а также в соответствии с опубликованным протоколом (Pallen M.J., 1994).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для выявления фрагментов гена tox и dtxR у токсигенных и НТТН-штаммов C.diphtheriae. ПЦР проводили с использованием четырех пар праймеров, охватывающих всю область гена *tox*, и двух пар праймеров, охватывающих всю область гена *dtxR*, согласно (Nakao H.,1996, 1997).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для выявления фрагментов генов «домашнего хозяйства» (house-keeping genes), - atpA, dnaE, dnaK, fusA, leuA, odhA и rpoB у штаммов C.diphtheriae. Генотипирование штаммов *C.diphtheriae* с помощью мультилокусного секвенирования ДНК осуществляли в соответствии с опубликованным протоколом (Bolt F., 2010) с последующей модификацией на основе секвенирования фрагментов 7 генов: *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), *rpoB* (DNA-direct RNA polymerase beta chain).

Секвенирование фрагментов хромосомы C.diphtheriae. Секвенирование фрагментов генов *ermX*, *rpoB*, *tox*, *dtxR*, *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* у штаммов *C.diphtheriae* проводили согласно общепринятому методу Сенгера (Sanger F., 1977) с помощью ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing ready reaction kit на ABI DNA-секвенаторе («Perkin Elmer Applied Biosystems») в ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва) и ЗАО «Евроген» (Москва).

Полноразмерное секвенирование генома C.diphtheriae. Геномная ДНК была выделена с использованием ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit («Zymo Research», США). Секвенирование генома выполнено с применением 454 пиросеквенирующей технологии на GS Junior («Roche», Швейцария). Библиотеки сконструированы с использованием GS Rapid Library reagents («Roche», Швейцария) со средним размером фрагментов в 800 п.н. Концентрации библиотек определены с помощью Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit («Life Technologies», США). Секвенирование проведено с GS Junior emPCR and sequencing kits («Roche», Швейцария). Сборку контигов проводили с помощью программного обеспечения Newbler v 2.7. Скаффолды (последовательности, состоящие из нескольких контигов), получали с использованием программы Mauve. Ориентацию скаффолдов проводили относительно генома *C. diphtheriae* NCTC 13129 (BX248355.1.)

Ресеквенирование участков, содержащих пробелы, осуществляли методикой genome walking (“прогулка по хромосоме”).

Биоинформационные и статистические методы исследования

Статистическую обработку результатов и анализ полученных данных осуществляли с помощью общепринятых алгоритмов в программах Microsoft Office 2007. Достоверность результатов оценивали с помощью определения доверительных интервалов по методу Клоппера-Пирсона. В процессе работы использовали специальное программное обеспечение с целью подбора последовательности специфических праймеров для проведения амплификации фрагментов выбранных генов DNASIS-MAX 5.0. («MiraBio», Hitachi). Результаты секвенирования, полученные в формате хроматограммы, обрабатывали в программе ChromasLite для дальнейшего сопоставления с опубликованными нуклеотидными последовательностями генов в международной базе данных генотипов EMBL/GenBank на сайте Национального центра биотехнологической информации США, NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Идентификацию аллелей генов «домашнего хозяйства» (house-keeping genes) *C.diphtheriae* осуществляли согласно международной базе данных MLST - PubMLST (http://pubmlst.org/).

Построение филогенетических деревьев осуществляли с использованием программы MEGA 6.06 (http://www.megasoftware.net/megamac.php). Визуализация трехмерных структур осуществляли с помощью программы PyMol (http://www.pymol.org/).

Личное участие автора в получении результатов

Автором составлен план исследования, проведен аналитический обзор литературы, выполнен весь объем бактериологических и молекулярно-генетических исследований. Полногеномное секвенирование и анализ сиквенса проведен совместно с к.м.н. А.Н. Шкопоровым, А.В. Чаплиным, д.м.н., профессором Б.А. Ефимовым и д.м.н., профессором Л.И. Кафарской на кафедре микробиологии и вирусологии педиатрического факультета ГОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Автор провела анализ результатов, статистическую обработку полученных данных, сформулировала выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Проведенный мониторинг антибиотикочувствительности штаммов *C.diphtheriae* на территории России показал, что 5,6% штаммов являются резистентными к антибактериальным препаратам пенициллинового ряда, 3,6 – 3,7% штаммов к макролидам и 4,7% - к рифампицину. Молекулярный механизм резистентности штаммов *C.diphtheriae* к макролидам обусловлен наличием гена *erm(X)*, расположенного на плазмиде, к рифампицину - в наличии мутационных изменений в трех позициях гена *rpoB* - 1291, 1307 и 1484, затрагивающих кодоны аминокислот H431N, S436F, S436Y, P495L и P495Q в β субъединице РНК-полимеразы.
2. У токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010-2015 гг., обнаруженные впервые и ранее описанные мутационные изменения в генах *tox* и *dtxR*, кодирующих дифтерийный токсин и регуляторный DtxR белок, свидетельствуют о закреплении мутационных изменений и тенденции к нарастанию полиморфизма в генах патогенности у возбудителя дифтерийной инфекции.
3. Мультилокусное секвенирование ДНК является оптимальным методом генотипирования штаммов *C.diphtheriae* при проведении мониторинга

возбудителя в системе эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией при установлении источника и расшифровке очагов инфекции, слежении за появлением и распространением генотипов, и завозных случаев на территорию России.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О степени достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки изученных штаммов *C.diphtheriae* (912 штаммов) и большой объем проведенных исследований. Результаты молекулярно-генетических исследований штаммов *C.diphtheriae*, в частности, секвенирование фрагментов генов, МЛСТ и полногеномное секвенирование ДНК, полученные с использованием современных высокочувствительных, специфичных и высокоинформативных методов, достоверны и воспроизводимы. При проведении бактериологических и молекулярно-генетических исследований использовано сертифицированное и поверенное оборудование. Экспериментальные данные подвергнуты обработке и систематизации с помощью методов описательной статистики, пакетов компьютерных программ, информационных баз данных и представлены в виде таблиц и графических изображений.

Диссертация апробирована на объединенном заседании секций Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора «Медицинская биотехнология» и «Эпидемиология, микробиология, клиника инфекционных заболеваний», протокол № 3 от 12 ноября 2015 г.

Результаты исследований представлены на: Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа рисков здоровью населения» (2012 г., Пермь); V Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (2013 г., Москва); Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (2013 г., Санкт-Петербург); Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных заболеваний» (2013 г., Новосибирск); XII Конгресс детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики» (2013 г., Москва); VI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (2014 г., Москва); XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (2014 г., Москва); на Заседании секции медицинской и фармацевтической микробиологии Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (2014 г., Москва); VIII Всероссийском форуме «Здоровье нации – основа процветания России» (2014 г., Москва), VII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (2015 г., Москва).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 5 статей опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 1 – в другом издании, 8 – в материалах конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 206 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и преспектив дальнейшей разработки темы. Диссертация иллюстрирована 22 таблицами и 37 рисунками. Список литературы содержит 324 источников, в том числе 143 - отечественных и 183 - зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Антибиотикочувствительность штаммов *C.diphtheriae*, выделенных на территории России

Изучение распространенности антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов и механизмов резистентности к антибиотикам является актуальной задачей медицинской микробиологии. Учитывая общую тенденцию к росту

антибиотикорезистентности микроорганизмов – возбудителей инфекций верхних и нижних дыхательных путей, целью исследования явилось изучение распространенности и механизмов данного явления у 888 штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1977 – 2014 гг. в различных регионах России. Большинство изученных штаммов оказались чувствительными ко всем используемым антибиотикам (Таблица 2). Промежуточный уровень резистентности имели от 0,2% до 0,56% штаммов. Устойчивость обнаружена к 7 антибиотикам: 5,6% штаммов - к пенициллину и 2,5% штаммов - к ампициллину; 3,7% штаммов - к эритромицину и 3,6% штаммов - к азитромицину; 1,2% штаммов - к линкомицину и 2,8% штаммов - к клиндамицину; 4,7% штаммов - к рифампицину.

Таблица 2 - Чувствительность штаммов *C.diphtheriae* к антибиотикам

Антибиотик	Содержание антибиотика в диске, мкг	Распределение штаммов по категориям чувствительности n=888 / 95% доверительный интервал		
		Ч	ПР	Р
Penicillin	10	838 (94,4%) 92,6%-95,8%	___	50 (5,6%) 4,2%-7,4%
Ampicillin	10	866 (97,5%) 96,3%-98,4%	___	22 (2,5%) 1,6%-3,7%
Imipenem	10	888 (100%) 99,6%-100%	0 (0%) 0%-0,4%	0 (0%) 0%-0,4%
Erythromycin	15	852 (96%) 94,4%-97,1%	3 (0,3%) 0,07%-1%	33 (3,7%) 2,6%-5,2%
Azithromycin	15	852 (96%) 94,4%-97,1%	4 (0,4%) 0,12%-1,2%	32 (3,6%) 2,5%-5,1%
Lincomycin	15	877 (98,8%) 97,8%-99,4%	0 (0%) 0%-0,4%	11 (1,2%) 0,6%-2,2%
Clindamycin	10	862 (97%) 95,7%-98,1%	2 (0,2%) 0,03%-0,8%	25 (2,8%) 1,8%-4,1%
Ofloxacin	5	888 (100%) 99,6%-100%	0 (0%) 0%-0,4%	0 (0%) 0%-0,4%
Ciprofloxacin	10	883 (99,44%) 98,7%-99,8%	5 (0,56%) 0,18%-1,3%	0 (0%) 0%-0,4%
Rifampicin	5	843 (95%) 93,3%-96,3%	3 (0,3%) 0,07%-1%	42 (4,7%) 3,4%-6,3%

Множественной резистентностью, то есть устойчивостью к двум, трем или более антибиотикам, обладали 3,8% исследованных штаммов *C.diphtheriae*. Устойчивыми к двум антибактериальным препаратам были 1% штаммов, к трем - 1,85% штаммов, к четырем - 0,65% штаммов, к пяти - 0,2% штаммов и 1 (0,1%) штамм был устойчивым к 6 антибиотикам.

Изучение МПК Е-тестом у резистентных штаммов *C.diphtheriae* показало, что 15 (45,5%) и 15 (47%) штаммов были полностью резистентными к эритромицину и азитромицину, для 18 (54,5%) и 17 (53%) штаммов МПК была в интервале 16 – 32 мкг/мл; к рифампицину 18 (43%) штаммов были полностью резистентными и для 24 (57%) штаммов МПК - в интервале 16 – 32 мкг/мл.

Изучение молекулярных механизмов резистентности к макролидным антибиотикам у штаммов *C.diphtheriae*

У большинства бактерий устойчивость к макролидам связана с метилированием 23S субъединицы рРНК. К настоящему времени известно около 40 генов *erm* (erythromycin ribosome methylation), кодирующих фермент метилазу, которые

ассоциированы с транспозонами или могут локализоваться как на плазмидах, так и на хромосомах.

Для расшифровки молекулярных механизмов резистентности к эритромицину и частоты распространения генов резистентности штаммы *C.diphtheriae*, устойчивые к этому антибиотику, проанализированы в ПЦР со специфическими ErmX-F – ErmX-R праймерами для секвенирования целевого гена *erm(X)*. После проведения электрофореза продуктов ПЦР во всех ДНК образцах резистентных штаммов *C.diphtheriae* выявлен фрагмент размером 855 п.н., соответствующий амплифицируемому участку гена *erm(X)* (Рисунок 1). В результате секвенирования полученных ПЦР-продуктов идентифицированы нуклеотидные последовательности, которые полностью соответствовали последовательности гена *erm(X)*, опубликованной в GenBank (access. no. U21300).

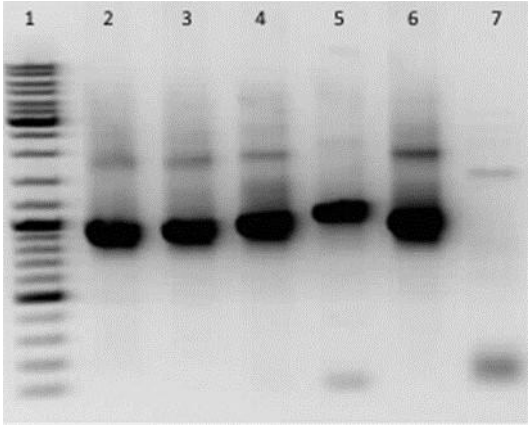


Рисунок 1 - Типичная электрофореграмма продуктов ПЦР фрагментов гена *erm*(X) штаммов *C.diphtheriae*

Примечание: 1 – маркер молекулярных масс 100 bp DNA Ladder Plus («Fermentas», Литва); 2, 3, 4, 5, 6 – ДНК штаммов *C.diphtheriae*, резистентных к эритромицину; 7 – отрицательный контроль

Исследованиями, проведенными (Schiller J., 1983) при изучении штаммов *C.diphtheriae*, выделенных от больных с кожной формой дифтерии, было показано, что резистентность к макролидам у этих штаммов оказалась связанной с наличием R-плазмиды pnG2. С помощью коммерческой тест-системы GeneJET Plasmid Miniprep Kit («Thermo SCIENTIFIC», Литва) у изученных штаммов *C.diphtheriae* нам удалось выделить плазмидную ДНК. Однако дальнейшее изучение выделенной плазмидной ДНК из резистентных штаммов *C.diphtheriae* с помощью эндонуклеаз рестрикции, предложенных для идентификации плазмиды pnG2 (Schiller J., 1983), не привело к положительному результату. Это дало нам основание полагать, что выделенная плазмидная ДНК не является плазмидой pnG2.

С целью установления взаимосвязи между фенотипической и генотипической изменчивостью, нами были изучены 137 чувствительных к макролидам штаммов *C.diphtheriae*. Проведение ПЦР со специфическими ErmX-F – ErmX-R праймерами, показано, что у всех этих штаммов, отсутствует ген резистентности *erm(X)*.

Другим распространенным механизмом резистентности к макролидам является наличие транспортной системы, обеспечивающейся продуктами генов семейства *mef*, которая осуществляет активное выведение антибиотика из бактериальной клетки. Однако в результате проведения ПЦР с праймерами, согласно опубликованным в GenBank известным последовательностям генов *mefA/E*, нам не удалось выявить фрагменты этих генов у резистентных к макролидам штаммов *C.diphtheriae*.

Изучение молекулярных механизмов антибиотикорезистентности у штаммов *C.diphtheriae* к рифампицину

Одним из наиболее распространенных молекулярных механизмов резистентности к рифампицину у микроорганизмов являются мутационные изменения в гене *rpoB*, кодирующем β-субъединицу РНК-полимеразы (Ramaswamy S., 1998; Heep M., 2001; Hu H., 2002; Шемякин И.Г., 2005; Bergman M., 2006; Tupin A., 2010).

Для расшифровки молекулярного механизма резистентности к рифампицину у *C.diphtheriae* на основе последовательности геномов штаммов *C.diphtheriae* NCTC13129 (BX248355.1) и *C.diphtheriae* CIP 100721 (AY492230.1) нами синтезированы 5 пар праймеров для секвенирования нуклеотидной последовательности целевого гена *rpoB*. В результате секвенирования ПЦР-продуктов, полученных с тремя парами специфических праймеров (rpoB-1F – rpoB-1R, rpoB-2F – rpoB-2R, rpoB-5F – rpoB-5R) оказалось, что в этих фрагментах гена *rpoB* мутаций у резистентных к рифампицину штаммов *C.diphtheriae* не было обнаружено. В то время как при секвенировании в образцах ДНК штаммов *C.diphtheriae*, полученных с праймерами rpoB-3F – rpoB-3R и rpoB-4F – rpoB-4R, у всех резистентных штаммов *C. diphtheriae* обнаружены мутации в 29 позициях, из которых в 26 позициях мутации не сопровождались изменениями, затрагивающими кодоны аминокислот. Однако в трех позициях - 1291, 1307 и 1484 выявлены мутации, затрагивающие кодоны аминокислот (Таблица 3).

Таблица 3 - Частота встречаемости замен нуклеотидов в гене *rpoB* у штаммов *C.diphtheriae*

Положение нуклеотида в гене *rpoB*	Замены нуклеотидов	Кодируемая аминокислота	Замена аминокислоты	Число штаммов	
				Абс	%
1291	C – A	431	гистидин (H) – аспарагин (N)	3	21,4%
1307	C - T	436	серин (S) – фенилаланин (F)	8	57,1%
	C - A		серин (S) – тирозин (Y)	2	14,3%
1484	C - T	495	пролин (P) – глутамин (Q)	1	7,1%
	C – A		пролин (P) – лейцин (L)	10	71,4%

Мутационные изменения в гене *rpoB* у штаммов *C.diphtheriae* встречались в различных сочетаниях и штаммы были объединены в семь групп (Таблица 4).

Таблица 4 - Комбинации мутационных изменений в гене *rpoB* у штаммов *C.diphtheriae.*

Группы штаммов	Количество штаммов n=14	Положение нуклеотида в нуклеотидной последовательности				
		1291	1307		1484	
Чувствительные штаммы	25	C	C		C	
1 группа	3	*	T			A
2 группа	1	*		A	T	
3 группа	3	*	*			A
4 группа	2	*	T		*	
5 группа	3	A	T			A
6 группа	1	*		A		A
7 группа	1	*	*		*	

Примечание: * – наличие аналогичного нуклеотида

Наиболее часто (35,8%) у резистентных к рифампицину штаммов *C.diphtheriae* встречались мутации в двух позициях – 1307 и 1484, в одинаковом проценте случаев (по 21,4%) в трех позициях (1291, 1307 и 1484) и одной позиции (1484), в 14,3% случаев - в одной позиции 1307. Следовательно, молекулярный механизм резистентности штаммов *C.diphtheriae* к рифампицину обусловлен наличием мутационных изменений в трех позициях гена *rpoB* - 1291, 1307 и 1484, приводящих к изменениям кодонов аминокислот (H431N, S436F, S436Y, P495L и P495Q) в β субъединице РНК-полимеразы.

Полноразмерное секвенирование генома мультирезистентного токсигенного штамма *C.diphtheriae*

С целью изучения особенностей структуры ДНК проведено полноразмерное секвенирование генома токсигенного штамма *C.diphtheriae* 17801 биовара *gravis*, резистентного к пенициллину, ампициллину, эритромицину, азитромицину, линкомицину и клиндамицину.

Секвенирование генома штамма *C.diphtheriae* производилось на платформе 454 GS Junior, сборка осуществлялась при помощи программного обеспечения Newbler v. 2.7. В результате сборки получено 36 контигов размером от 780 до 840 954 п.н. Суммарная длина полученной геномной последовательности составила 2 492 191 п.н., среднее покрытие прочтениями равно 31x. GC-состав был равен 53.5%, что соответствует данным о других представителях вида *C.diphtheriae* (53.3%-53.7% в штаммах, представленных в NCBI Genome). Общее число генов составило 2 321, также алгоритмом аннотации обнаружено 42 псевдогена. Полногеномное выравнивание последовательности генома *C.diphtheriae* 17801 с финализированными геномами 13 штаммов *C.diphtheriae* из GenBank/NCBI при помощи программного обеспечения progressiveMauve (http://omictools.com/progressivemauve-s9137.html) (Рисунок 2) показало их полную синтеничность и очень высокий уровень гомологии между собой.

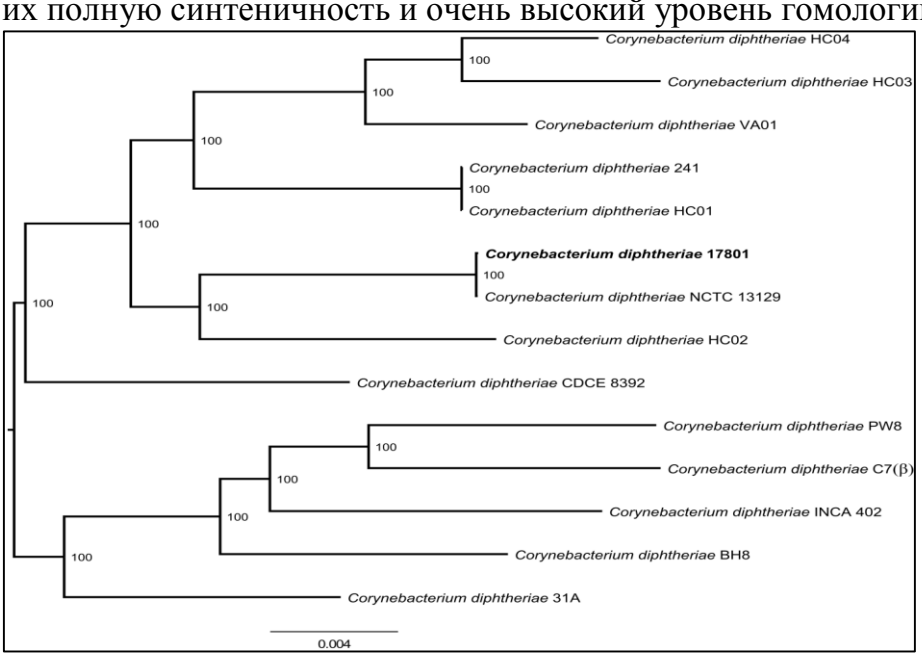


Рисунок 2 - Филогенетическое дерево, построенное в RaxML по полным аннотированным в GenBank/NCBI геномным последовательностям 13 штаммов *C.diphtheriae*, выровненным с помощью Mauve

Примечание: цифры в узлах дерева обозначают уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap. Корень дерева был расположен в средней точке наиболее длинного пути.

Наиболее интересным оказалось то, что штамм *C.diphtheriae* 17801 является очень близким родственником ранее исследованного штамма *C.diphtheriae* NCTC 13129, выделенного в Великобритании в 1997 г. (уровень сходства составил 98,2%). Вместе с

тем, сравнение обоих пар локусов CRISPR в геномах штаммов *C.diphtheriae* 17801 и NCTC 13129 показало, что эти штаммы дивергировали от общего предка приблизительно в одно время.

Проведенный анализ отсеквенированного генома *C.diphtheriae* 17801 показал, что контиг 18 (Genbank: JZUJ01000018) содержит гены, предполагающие плазмидное происхождение данного региона. Были подобраны праймеры на концы данного контига (последовательности CCTGATGGTCGAGCTGTT и GCTGTCCGTGATCGATAC), направленные наружу. С них был получен ПЦР-продукт длиной 2,1 kb, который был просеквенирован методом primer walking. Полученные данные свидетельствовали о том, что исследуемый участок ДНК является кольцевым эписомальным элементом, содержащим ген резистентности к макролидным антибиотикам - *erm(X)* (Рисунок 3).

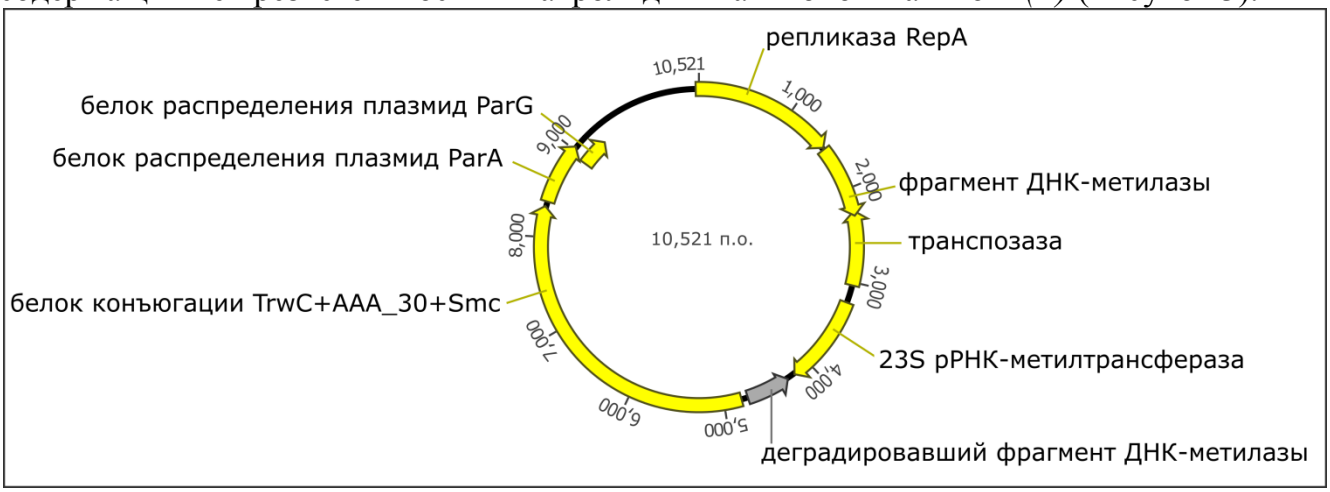


Рисунок 3 - Карта аннотированной в NCBI PGAP последовательности плазмиды генома штамма *C.diphtheriae* 17801, несущей ген резистентности к эритромицину - *erm(X)(23S рРНК-метилтрансфераза)*

Полученные данные полноразмерного секвенирования позволили подтвердить, что молекулярный механизм резистентности *C.diphtheriae* к сульфаниламидным препаратам, также как и у других микроорганизмов, обусловлен наличием в геноме добавочного локуса, кодирующего фермент дегидроптероатсинтазу. Также среди контигов был обнаружен дополнительный локус *pBp*, кодирующий пенициллинсвязывающий белок pBp, по аналогии с механизмом резистентности к пенициллинам, описанным для MRSA. Вместе с тем, проведение ПЦР со специфическими праймерами на локус *pBp* показало отсутствие данного фрагмента у других резистентных к пенициллину штаммов *C.diphtheriae*.

Драфтовый геном мультирезистентного штамма *C.diphtheriae* депонирован в международную базу данных GenBank/NCBI: JZUJ00000000 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JZUJ00000000.1).

Мультилокусное секвенирование штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в России

Ранее многолетними исследованиями, проведенными в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора с помощью молекулярно–генетических методов - риботипирования, мультилокусного энзимного электрофореза (МЭЭ), УП-ПЦР изучена структура популяции штаммов *C.diphtheriae*, циркулировавших на территории России, и показана её клональность в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции (Мазурова И.К., 1998, 2000, 2009; Комбарова С.Ю., 1995,1998, 2000, 2007, 2009).

В последнее время одним из перспективных методов молекулярно-генетического типирования патогенных микроорганизмов является мультилокусное секвенирование ДНК (МЛСТ). В связи с этим, нами проведено генотипирование штаммов *C.diphtheriae* с

помощью МЛСТ с целью оценки возможности использования этого метода для наблюдения за молекулярно-генетической структурой современной популяции штаммов *C.diphtheriae*. Изучено 148 штаммов *C.diphtheriae*, выделенных на территории России с 1957 по 2015 гг., и два контрольных штамма *C.diphtheriae* № 665 и *C.diphtheriae* PW8. МЛСТ проводили путем секвенирования фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства» (house-keeping genes) - *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* и *rpoB*, с последующей идентификацией аллельного профиля каждого штамма, представляющего собой перечисление номеров аллелей в порядке - *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* и *rpoB*, и определяющего его сиквенс-тип (ST – sequence type) с помощью международной базы данных PubMLST (http://pubmlst.org/).

Среди изученных штаммов *C. diphtheriae* при секвенировании выявлено от 4 до 12 аллелей этих генов.

Все изученные штаммы *C. diphtheriae* были разделены на 27 генотипов или ST – 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, которые описаны в международной базе PubMLST, и девять новых сиквенс-типов, идентифицированных нами впервые, - ST-new1, ST-new2, ST-new3, ST-new4, ST-new5, ST-new6, ST-new7, ST-new8, ST-new9. У изученных штаммов доминировали ST25 и ST8 (22% и 18% штаммов, соответственно) (Рисунок 4).

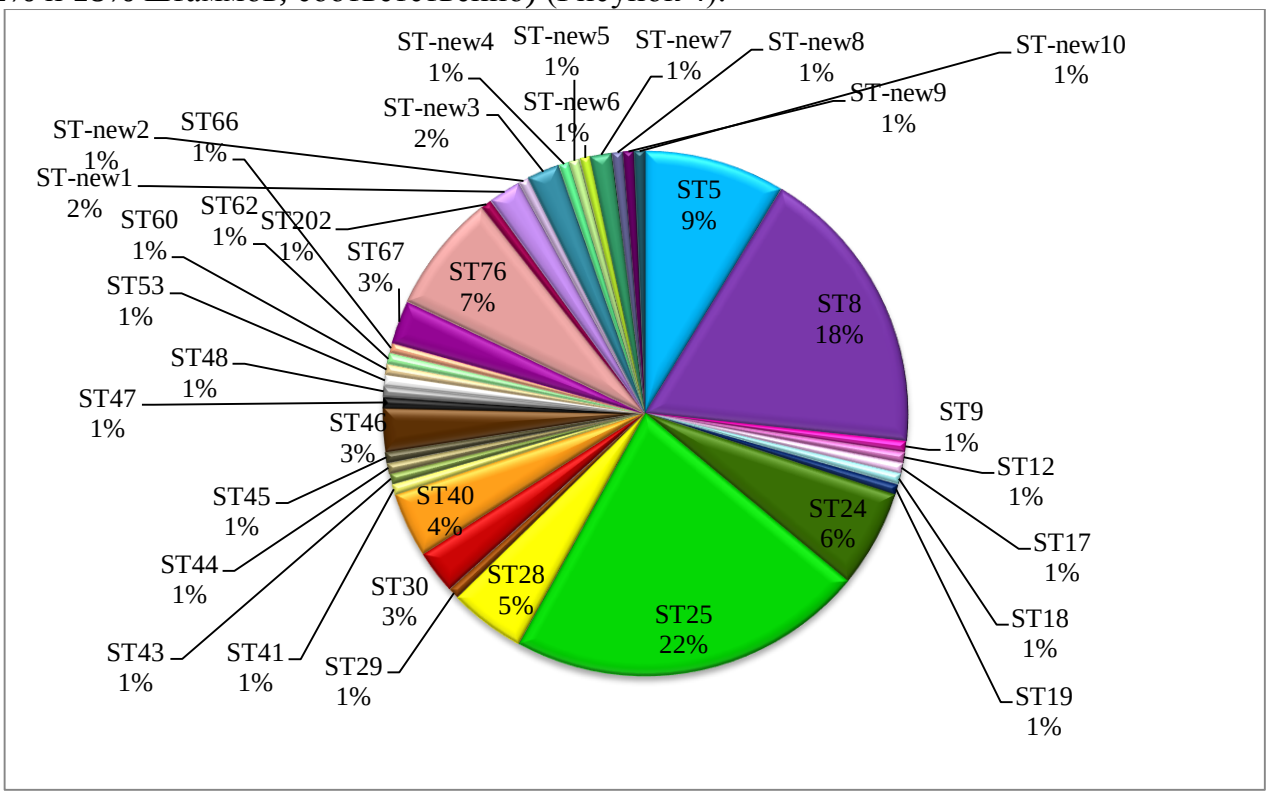
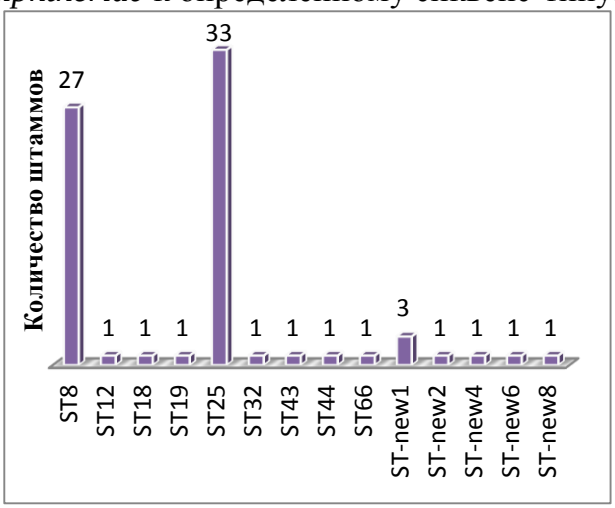


Рисунок 4 - Удельный вес штаммов *C.diphtheriae* различных сиквенс-типов, выделенных в России в 1957 - 2015 гг.

Для токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* различных биоваров были характерны определенные сиквенс-типы. Так, токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* принадлежали к 14 сиквенс-типам: ST8, ST12, ST18, ST19, ST25, ST32, ST43, ST44, ST66, ST-new1, ST-new2, ST-new4, ST-new6, ST-new8 (Рисунок 5А); токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* - к 13 сиквенс-типам: ST5, ST17, ST24, ST28, ST41, ST45, ST46, ST48, ST53, ST60, ST67, ST-new3, ST-new7 (Рисунок 5Б). 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. Следовательно, прослежена взаимосвязь между

фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C.diphtheriae* к определенному сиквенс-типу.

А. 

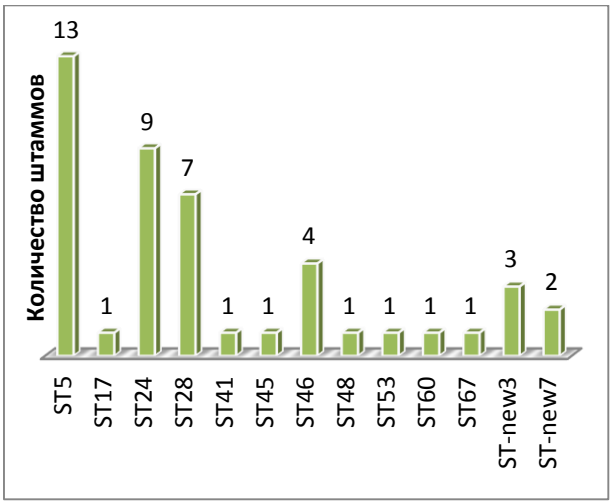
Б. 

Рисунок 5 - Частота встречаемости токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* (А) и *mitis* (Б) различных сиквенс-типов

Нами предпринята попытка с помощью МЛСТ проанализировать распространение штаммов *C.diphtheriae* различных сиквенс-типов в разные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции. Исследование показало, что штаммы *C.diphtheriae* ST25 и ST5 циркулируют на территории России с 1957 по 2015 гг., а штаммы *C.diphtheriae* ST8, которые зарубежные ученые относят к эпидемической клональной группе, вызвавшей эпидемию 1990-ых годов (Bolt F., 2010), появились на территории нашей страны только в 1980-ые годы. В последние пять лет на территории России зарегистрированы штаммы 8 сиквенс-типов - ST5, ST8, ST25, ST28, ST40, ST67, ST76 и ST-new9, из которых токсигенные штаммы относились к четырем сиквенс-типам - ST8, ST25, ST5 и ST67.

Кластерный анализ полученных в МЛСТ данных и визуализация филогенетических отношений путем построения дендрограммы с помощью программы MEGA 6.06 (http://www.megasoftware.net/megamac.php) подтвердили ранее полученные данные (Комбаровой С.Ю., 2007), что популяция штаммов *C.diphtheriae* по-прежнему характеризуется высокой степенью гетерогенности (Рисунок 6). Первый кластер представлен двумя субкластерами, первый из которых состоит из двух ветвей. В одну вошли токсигенные штаммы *C.diphtheriae* ST5, выделенные начиная с 1950 - 1969 гг., и близкие к ним ветви, включающие штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в последующие годы, все биовара *mitis*. Основу второй ветви составили токсигенные штаммы *C.diphtheriae* ST25, также выделенные начиная с 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* 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.

Следовательно, использование МЛСТ позволило охарактеризовать современную циркулирующую популяцию штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в России, показало возможности применения этого метода в качестве приемственного метода риботипированию, МЭЭ и УП-ПЦР для мониторинга за возбудителем дифтерии.

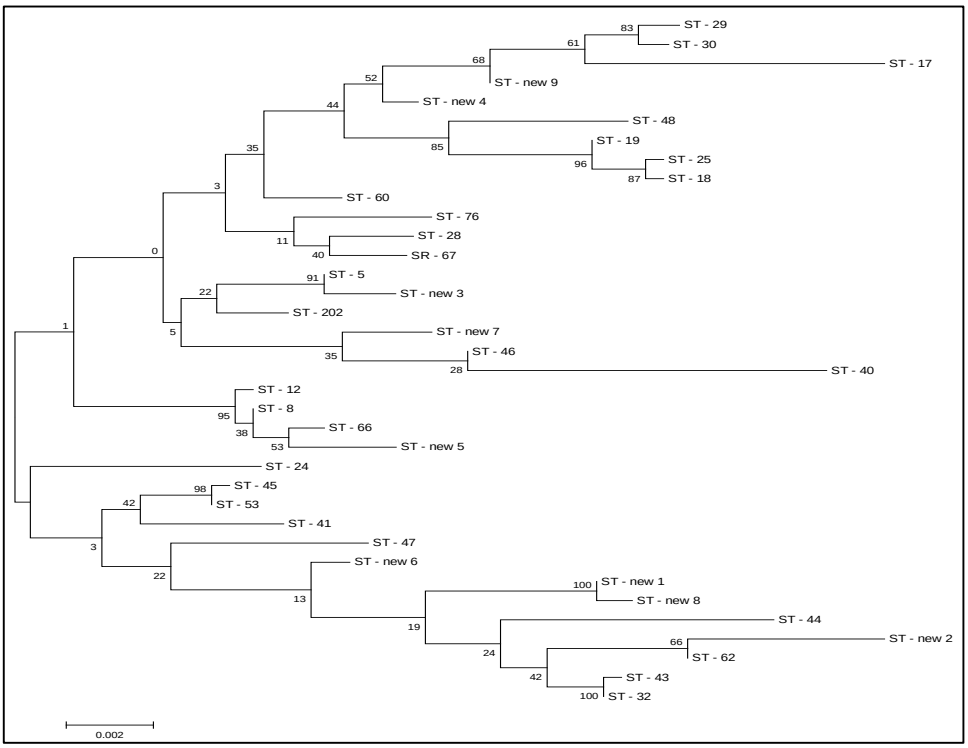


Рисунок 6 - Диаграмма филогенетических взаимоотношений штаммов *C.diphtheriae*, построенная с помощью программы MEGA 6.06.

Изучение особенностей структуры генов *tox* и *dtxR* у штаммов *C.diphtheriae*

Одной из задач микробиологического мониторинга циркулирующих штаммов *C.diphtheriae* является изучение генетических особенностей структуры детерминант - генов *tox* и *dtxR*, кодирующих основной фактор патогенности возбудителя дифтерии - дифтерийный токсин и его регуляторный DtxR белок. В ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора на протяжении многих лет проводилось изучение особенностей структуры этих генов у токсигенных штаммов *C.diphtheriae* (Комбарова С.Ю., 2007, 2009, 2010; Борисова О.Ю., 2009). Нами продолжены эти исследования и изучены особенности структуры генов *tox* и *dtxR* у токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в различных регионах России в 2010 - 2015 гг., и их взаимосвязь с сиквенс-типом. С этой целью проведена ПЦР с четырьмя парами специфических праймеров, используемых для секвенирования целевого гена *tox*. Идентифицированные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности сопоставлены с последовательностями гена *tox* 12 штаммов *C.diphtheriae*, опубликованными в EMBL/GenBank. Выявлены мутации в 6 позициях – две мутации (-58) и (-19) в промоторной области гена и четыре мутации в позициях 913, 1083, 1233 и 1590 в В субъединице гена *tox* (Таблица 5).

Таблица 5 - Замены нуклеотидов в гене *tox* у штаммов *C.diphtheriae*

Положение нуклеотида в гене *tox*	Замены нуклеотидов	Кодируемая аминокислота	Замена аминокислоты	Число штаммов	
				Абс	%
-58	C – T	-	-	1	6,2%
-19	C - G	-	-	1	6,2%
913	G - A	305	аланин (A) – треонин (T)	4	25,0%
1083	G - A	361	-	3	18,7%
1233	G - A	411	-	9	56,2%
1590	G - A	530	-	3	18,7%

У современных токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010 – 2015 гг., мутационные изменения выявлены в тех же позициях, что и у штаммов, выделенных в прошлые годы (Комбарова С.Ю., 2007, 2009, 2010; Борисова О.Ю., 2009). Однако нами обнаружены новые мутации: в позиции (-19) промоторной области гена *tox* и мутация (замена нуклеотида G на A) в позиции 913, сопровождающаяся изменением кодона аминокислоты (A305T). Последняя из них обнаружена у четырех современных токсигенных штаммов *C.diphtheriae*. Данная аминокислотная позиция расположена в домене T, который отвечает за трансмембранный перенос A субъединицы дифтерийного токсина в клетку макроорганизма. Анализ трехмерной структуры, расположенной в базе данных PDB (идентификатор 1F0L), показал, что аминокислотный остаток в позиции 305 (280 после отщепления сигнального пептида) находится в альфа-спирали, и его радикал расположен на поверхности белковой глобулы (Рисунок 7). Замена A305T, по-видимому, не приводит к значительным изменениям третичной структуры белка, хотя потенциально способна влиять на его функционирование.

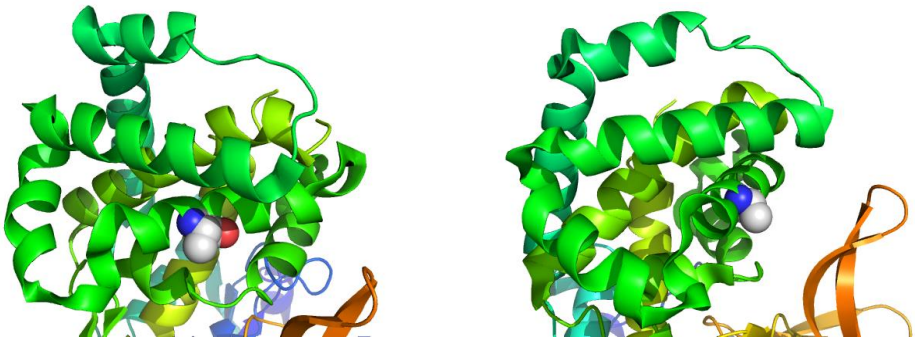


Рисунок 7 - Трехмерная структура домена T дифтерийного токсина под разными углами обзора.

Примечание: остаток аланина в позиции 305 отображен сферами, расцветка которых соответствует типу атома. Визуализация осуществлялась в программном обеспечении PyMol (https://www.pymol.org/)

Так же как и в прошлые годы наиболее распространенной (у 9 из 16 изученных штаммов *C.diphtheriae*) была замена нуклеотида в позиции 1233, т.е. во фрагменте, кодирующем R-домен B субъединицы, которая преимущественно была распространена у штаммов риботипов ‘Sankt-Peterburg’/‘Rossija’ энзимтипа комплекса 8, распространенных в период подъема заболеваемости дифтерией в 1990-е годы (Комбарова С.Ю., 2007). У четырех штаммов мутации были в позиции 913, у трех штаммов – в позициях 1083 и 1590 гена *tox* и по одному штамму имели замены в двух позициях нуклеотидной последовательности (-58) и (-19) промотора гена *tox*. Мутационные изменения в гене *tox* у штаммов *C.diphtheriae* встречались в различных сочетаниях и штаммы были объединены в пять групп (Таблица 6).

Таблица 6 - Комбинации мутационных изменений в гене *tox* у штаммов *C.diphtheriae*

Группы штаммов	Количество штаммов	Удельный вес, %	Положение нуклеотида в нуклеотидной последовательности гена *tox*					
			-58	-19	913	1083	1233	1590
1 группа	8	50,0%	*	*	*	*	A	*
2 группа	2	12,5%	*	*	*	A	*	A
3 группа	1	6,25%	*	G	*	*	A	*
4 группа	4	25,0%	*	*	A	*	*	*
5 группа	1	6,25%	T	*	*	A	*	A

Примечание: * – наличие аналогичного нуклеотида

При сопоставлении данных о комбинации мутаций и сиквенс-типов штаммов *C.diphtheriae* обнаружено, что штаммы, вошедшие в 4 группу и имевшие мутацию в 913

положении, относятся к одному сиквенс-типу - ST67. Данный сиквенс-тип на территории России впервые зарегистрировали в 2012 году и ранее не выявляли.

Для изучения особенностей структуры гена *dtxR* у токсигенных штаммов *C.diphtheriae* проведена ПЦР с двумя парами праймеров для секвенирования нуклеотидной последовательности целевого гена *dtxR*, и последующее секвенирование ПЦР-продуктов. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей гена *dtxR* штаммов *C.diphtheriae* с опубликованными в EMBL/GenBank *C.diphtheriae* C7 (beta) и *C.diphtheriae* PW8 показал наличие мутаций в 15 позициях, из которых три мутации (-38), (-23) и (-21) локализовались в промоторной области и двенадцать мутаций в позициях - 66, 225, 273, 440, 474, 504, 507, 516, 579, 639, 640 и 654 гена *dtxR*. Из них в двух позициях - 440 и 640 были мутации с затрагиванием кодонов аминокислот (Таблица 7).

Таблица 7 - Частота встречаемости замен нуклеотидов в гене *dtxR* у штаммов *C.diphtheriae*

Положение нуклеотида в гене *dtxR*	Замены нуклеотидов	Кодируемая аминокислота	Замена аминокислоты	Число штаммов	
				Абс	%
-38	C – T	-	-	3	17,6%
-23	C - T	-	-	4	23,5%
-21	C - T	-	-	3	17,6%
66	A - T	22	-	5	29,4%
225	T - C	75	-	3	17,6%
273	T - C	91	-	6	35,3%
440	C - T	147	аланин (A) – валин (V)	5	29,4%
474	C - T	158	-	5	29,4%
504	T - A	168	-	5	29,4%
507	C - T	169	-	5	29,4%
516	T - C	172	-	5	29,4%
579	C - T	193	-	5	29,4%
639	C - T	213	-	8	47,1%
640	C - A	214	лейцин (L) – изолейцин (I)	5	29,4%
654	T - C	218	-	5	29,4%

У современных токсигенных штаммов *C.diphtheriae* мутационные изменения выявлены в тех же позициях, что и у штаммов, выделенных в прошлые годы (Комбарова С.Ю., 2007, 2009, 2010). Вместе с тем, нами обнаружена новая мутация в позиции (-23) промоторной области гена *dtxR*, которая выявлена у 17,6% современных токсигенных штаммов и ранее не была зарегистрирована. Наиболее распространенной (47,1%) была замена нуклеотида в позиции 639 гена *dtxR*. Мутация в позиции 440 приводит к замене A147V. В соответствие с трехмерной структурой (Рисунок 8), расположенной в базе данных PDB (идентификатор 2QQ9), данная аминокислотная позиция расположена в неструктурированном пролин-богатом участке, связывается с С-терминальным доменом в неактивном состоянии репрессора или с N-терминальным доменом в активном состоянии (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2266074/).

Мутация в позиции 640, приводящая к замене лейцина на изолейцин L214I, предположительно, не влияет на фолдинг исследуемого белка, так как лейцин и изолейцин являются схожими по свойствам. Соответствующие аминокислотные остатки расположены в С-концевом домене белка DtxR (Рисунок 8).

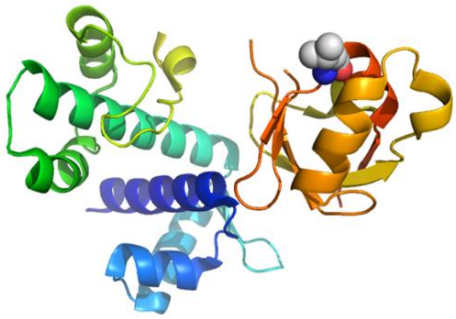


Рисунок 8 - Трехмерная структура белка DtxR.

Примечание: остаток лейцина в позиции 214 отображен сферами, расцветка которых соответствует типу атома. Координаты неструктурированного участка, содержащего позицию 147, не определены вследствие фундаментальных ограничений рентгеноструктурного анализа, место его расположения обозначено стрелкой. Визуализация осуществлялась в программном обеспечении PyMol.

С целью сопоставления комбинаций выявленных мутаций в гене *dtxR* с сиквенс-типом штаммы *C.diphtheriae* были объединены в пять групп (Таблица 8). Оказалось, что каждому сиквенс-типу характерна определенная комбинация мутаций в гене *dtxR*. Штаммы *C.diphtheriae* из первый группы, не имеющие мутаций, относились к ST28. Штаммы из второй группы, имеющие одну мутацию в промоторной области, относились к ST67. Один штамм, входящий в третью группу и имеющий одну мутацию в позиции 273, относился к ST5. Штаммы, входящие в состав четвертой группы, с двумя мутациями в промоторной области и двумя в самом гене, относились к ST25. Штаммы из пятой группы, имеющие наибольшее (11) количество мутаций, относились к ST8. Интересным оказалось то, что штаммы из первых трех групп относились к биовару *mitis*, а штаммы из четвертой и пятой групп (с большим количеством мутаций) относились к биовару *gravis*. Из чего можно предположить, что штаммы бивара *gravis* больше подвержены мутационным изменениям.

Таблица 8 - Корреляция выявленных мутационных изменений в гене *dtxR* и сиквенс-типа у штаммов *C.diphtheriae*

Группа	ST	-38	-23	-21	66	126	225	273	440	474	504	507	516	579	639	640	654
C7		C	C	C	T	C	T	T	C	C	T	C	T	C	C	C	T
1	28	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	67	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	5	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4	25	T	*	T	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*
5	8	*	*	*	A	*	*	C	T	T	A	T	C	T	T	A	C

Нами проведен скрининг 625 нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010-2015 гг., и выявлено 7 НТТН-штаммов биовара *mitis*. С целью установления молекулярного механизма отсутствия экспрессии гена *tox* и, учитывая данные прошлых лет (Мельников В.Г., 2002; Воложанцев Н.В., 2004), проведена ПЦР с четыремя парами специфических праймеров, используемых для секвенирования целевого гена *tox*. В четырех образцах, содержавших ДНК НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, выявлены все фрагменты гена *tox*. Секвенирование этих ПЦР-продуктов показало, что у данных штаммов имеется выпадение нуклеотида G в позиции 55 гена *tox*, приводящее к сдвигу рамки считывания и нефункциональности гена. В отстальных трех ДНК-образцах - выявлены только два фрагмента гена *tox*. Данные НТТН-штаммы *C.diphtheriae* будут

подвергнуты дальнейшему исследованию. Изучение особенностей структуры гена *dtxR* у 7 НТТН-штаммов *C.diphtheriae* в ПЦР с двумя парами специфических праймеров, используемых для секвенирования целевого гена *dtxR*, и последующее их секвенирование выявило наличие мутаций в позиции 126 (замена нуклеотида С на Т) и позиции 273 (нуклеотида Т на С).

Генотипирование НТТН-штаммов *C.diphtheriae* с помощью МЛСТ показало их принадлежность к двум сиквенс-типам - ST40 и ST76. Причем интересным является тот факт, что 4 НТТН-штамма *C.diphtheriae* с выпадением нуклеотида G в позиции 55 гена *tox* и двумя мутациями в позициях 126 и 273 гена *dtxR* принадлежали к ST40. В то время как другие 3 НТТН-штамма *C.diphtheriae* с предположительно инсерционым механизмом отсутствия экспрессии гена *tox* и мутацией в позиции 126 гена *dtxR* принадлежали к ST76.

Следовательно, полученные результаты подтверждают данные о штаммах *C.diphtheriae* прошлых лет и свидетельствуют о том, что гены *tox* и *dtxR* у современных токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010 – 2015 гг., обладают генетической вариабельностью, не затрагивающей в большинстве случаев кодоны аминокислот. Вместе с тем, выявленные у современных штаммов *C.diphtheriae* мутации, ранее зарегистрированные у штаммов прошлых лет, свидетельствуют о том, что эти мутации закрепились в геноме возбудителя дифтерии и получили распространение в современной циркулирующей популяции. Кроме того, впервые обнаруженные мутации в промоторной области и в позиции 913 гена *tox* могут свидетельствовать о тендеции к нарастанию генетического полиморфизма в современной популяции возбудителя дифтерии.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный мониторинг антибиотикочувствительности штаммов *C.diphtheriae* выявил, что 5,6% циркулирующих штаммов являются резистентными к антибактериальным препаратам пенициллинового ряда, 3,6% - 3,7% штаммов - к макролидам и 4,7% штаммов - к рифампицину; множественной резистентностью обладают 3,8% исследованных штаммов.
2. Молекулярный механизм резистентности штаммов *C.diphtheriae* к макролидам обусловлен наличием плазмиды, несущей ген *erm(X)*; молекулярный механизм резистентности к рифампицину объясняется наличием мутационных изменений в трех позициях гена *rpoB* - 1291, 1307 и 1484, затрагивающих кодоны аминокислот (H431N, S436F, S436Y, P495L и P495Q, соответственно) в β субъединице РНК-полимеразы.
3. У токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010-2015 гг., в гене *tox* выявлены мутации в 6 позициях, из которых впервые показаны мутации в позиции (-19) в промоторной области и у четырех штаммов в позиции 913 (A305T); в гене *dtxR* - обнаружены мутации в 15 позициях, из которых выявлены новая мутация в позиции (-23) промоторной области гена *dtxR* и ранее описанные две мутации, затрагивающие кодоны аминокислот (A147V и L214I) в регуляторном DtxR белке, что подтверждает нарастание у современных штаммов *C.diphtheriae* полиморфизма в генах, кодирующих дифтерийный токсин и регуляторный DtxR белок.
4. Молекулярный механизм отсутствия экспрессии гена *tox* у четырех НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010 – 2015 гг., связан с выпадением нуклеотида G в позиции 55 гена *tox*, приводящем к сдвигу рамки считывания и отсутствию функциональности гена. В структуре гена *dtxR* впервые у НТТН-штаммов *C.diphtheriae* выявлено наличие двух мутаций, одна из которых была

ранее описана у токсигенных штаммов и вторая новая мутация в позиции 126 гена *dtxR*.

5. Впервые с помощью мультилокусного секвенирования ДНК (МЛСТ) охарактеризована циркулирующая популяция штаммов *C.diphtheriae* в России; идентифицировано 36 сиквенс-типов, из которых 27 представлены в базе данных PubMLST и 9 новых, ранее не описанных сиквенс-типов. Показаны взаимосвязи между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C.diphtheriae* к определенному сиквенс-типу.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая вариабельность фенотипических и генотипических свойств штаммов возбудителя дифтерии необходимо постоянно проводить микробиологический мониторинг за циркулирующими штаммами *C.diphtheriae* с целью поддержания эпидемиологического благополучия по дифтерийной инфекции в России.
2. Применение мультилокусного секвенирования для генотипирования штаммов *C.diphtheriae* даст возможность проводить расшифровку очагов с установлением источника инфекции, следить за распространением генотипов и завозными случаями дифтерии на территорию России.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Необходимо продолжить изучение механизмов резистентности штаммов *C.diphtheriae* к β-лактамным антибактериальным препаратам с целью расширения представлений о молекулярных механизмах резистентности у возбудителей инфекционных заболеваний.
2. С целью слежения за генетической структурой циркулирующих штаммов *C.diphtheriae* целесообразно создание и расширение базы генотипов, идентифицированных в МЛСТ.
3. Продолжение изучения особенностей структуры генов патогенности, в том числе, и у НТТН-штаммов будет способствовать расширению знаний о генетическом полиморфизме *C.diphtheriae*, как адаптационном потенциале возбудителя дифтерии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мазурова, И.К. Характеристика штаммов *C.diphtheriae*, циркулирующих в России в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции / И.К. Мазурова, О.Ю. Борисова, С.Ю. Комбарова, И.А. Рудакова, Н.Т. Гадуа, Г.А. Ивашинникова, А.С. Пименова // Инфекция и иммунитет. – 2012. - Т. 2, № 1 – 2. - С. 294.**
2. **Рудакова, И.А.** Особенности циркуляции токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae,* циркулирующих в России в 1993 – 2011 гг. / **И.А. Рудакова**, О.Ю. Борисова, Г.А. Ивашинникова, Н.Т. Гадуа, А.С. Пименова, И.К. Мазурова // Материалы Всеросс. научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 16 -18 мая. - Пермь, 2012. - Т. 2. - С. 148 - 151.
3. Борисова, О.Ю. Применение метода мультилокусного секвенирования для наблюдения за циркулирующими штаммами *Corynebacterium diphtheriae* / О.Ю. Борисова, **И.А. Чагина**, И.К. Мазурова, В.А. Алешкин // Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, 25 – 27 марта, г. Москва. Приложение № 1 к журналу «Инфекционные болезни». – 2013. – т. 11. – С. 69.
4. **Борисова, О.Ю. Генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae* с помощью мультилокусного секвенирования / О.Ю. Борисова,**

И.А. Чагина, А.С. Пименова, В.А. Алешкин // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. 3. - № 2. - С. 117 - 118.

5. **Борисова, О.Ю. Мультилокусное секвенирование токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России в 2002 - 2012 гг. / О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова, И.А. Чагина, А.С. Пименова, Е.Е. Донских, В.А. Алешкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - № 4. - С. 17 - 23.**
6. **Чагина, И.А.** Мультилокусное секвенирование штаммов *Corynebacterium diphtheriae,* выделенных на территории России в 2010 – 2012 гг. / **И.А. Чагина**, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, В.А. Алешкин // Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных заболеваний», 26 – 28 сентября. - Новосибирск, 2013. - С. 159 - 161.
7. Пименова, А.С. Применение мультилокусного секвенирования для наблюдения за циркулирующими штаммами *Corynebacterium diphtheriae* и *Bordetella pertussis*. / А.С. Пименова, **И.А. Чагина**, О.Ю. Борисова // Материалы научно-практической конференции ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 7 – 11 октября. - Пермь, 2013. - С. 249.
8. **Чагина, И.А.** Анализ чувствительности штаммов *Corynebacterium diphtheriae* к антибактериальным препаратам in vitro / **И.А. Чагина**, А.С. Пименова, О.Ю. Борисова // Материалы XII Конгресса детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики», 11 – 13 декабря. - Москва, 2013. - С. 75.
9. Борисова, О.Ю. Мониторинг циркуляции токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России в 2010 – 2012 гг. / О.Ю. Борисова, **И.А. Чагина**, В.А. Алешкин, М.П. Корженкова, И.П. Требунских, Д.Д. Васильева, Л.Я. Журавлева, Г.А. Галеева, Е.Е. Якименко, Е.В. Говязина, В.В. Булыгина, И.М. Дегтярева, Е.В. Овчинникова, Л.М. Абросимова // Материалы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, 24 – 26 марта, г. Москва. Приложение № 1 к журналу «Инфекционные болезни». – 2014. – т. 12. – С. 48.
10. **Чагина, И.А.** Определение корреляции между генетической и фенотипической резистентностью *Corynebacterium diphtheriae* к макролидным препаратам / **И.А. Чагина**, О.Ю. Борисова, Н.В. Воложанцев, В.А. Баннов, В.А. Алешкин // Сборник материалов XXI Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 7 – 11 апреля. - Москва, 2014. - С. 155.
11. **Чагина, И.А. Чувствительность штаммов *Corynebacterium diphtheriae* к антибактериальным препаратам / И.А. Чагина, О.Ю. Борисова, В.Г. Мельников, Г.А. Ивашинникова, А.С. Пименова, Е.Е. Донских, Л.И. Кафарская, В.А. Алешкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2014. - № 4. - С. 8 - 13.**
12. **Чагина, И.А.** К вопросу о молекулярном механизме резистентности штаммов *Corynebacterium diphtheriae* к макролидам / **И.А. Чагина**, О.Ю. Борисова, В.А. Алешкин // Медицинское обозрение. Наука и практика. - 2015. - №1 (3). - С. 53 - 54.
13. Комбарова, С.Ю. Достижения и проблемы в профилактике дифтерии / С.Ю. Комбарова, Н.М. Максимова, С.С. Маркина, А.А. Мельникова, Н.А. Кошкина, И.К. Мазурова, О.Ю. Борисова, М.П. Корженкова, Т.Н. Якимова, К.Я. Яцковский, И.А. Чагина // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, 30 марта – 1 апреля, г.

Москва. Приложение № 1 к журналу «Инфекционные болезни». - 2015. – т. 13. – С. 162.

14. **Борисова, О.Ю. Особенности структуры гена *tox*, кодирующего дифтерийный токсин, штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России в 2010 – 2015 гг. / О.Ю. Борисова, И.А. Чагина, А.В. Чаплин, С.Ю. Комбарова, Л.И. Кафарская, В.А. Алешкин // Инфекционные болезни. - 2015. - Т. 13, № 3. - С. 12 - 17.**

Список сокращений

ДДМ	диско-диффузионный метод
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТ	дифтерийный токсин
ККРС	кровь крупного рогатого скота
КТА	кровяно-теллуритовый агар
МЛСТ	мультилокусное секвенирование ДНК
МПК	минимальная подавляющая концентрация
МЭЭ	мультилокусный энзимный электофорез (энзимтипирование)
НТТН	нетоксигенные токс-несущие штаммы
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РП	реакция преципитации в агаре
СКРС	сыворотка крупного рогатого скота
СПА	сухой питательный агар
УП-ПЦР	полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats, сгруппированные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы
dNTP	дезоксинуклеозидтрифосфаты
dtxR	ген, кодирующий регуляторный DtxR белок
DtxR	белок-репрессор, кодируемый геном *dtxR*
EMBL/GenBank	European molecular biology laboratory, база данных генотипов
ermX	ген, кодирующий фермент 23S рРНК-метилтранферазу
NCBI	National Center for Biotechnology Information, национальный центр биотехнологической информации
MRSA	methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, метициллинорезистентный *Staphylococcus aureus*
RAPD	random amplified polimorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rpoB	ген, кодирующий β субъединицу РНК-полимеразы
ST	сиквенс-тип
tox	ген, кодирующий дифтерийный токсин