

УДК 504.064.3:579.871]:616.931-036.22(477)

**А.П. Подаваленко, Т.А. Чумаченко\*, Т.Г. Глушкевич\*\*, Л.Л. Шумакова\*\***

*Харьковская медицинская академия последипломного образования*

*\*Харьковский национальный медицинский университет*

*\*\*Центральная санитарно-эпидемиологическая станция МЗ Украины*

### **МОНИТОРИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *CORYNEBACTERIUM* В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ИНТЕНСИВНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ДИФТЕРИИ**

Описаны результаты исследований, которые указывают на изменение биологических свойств возбудителя дифтерии, что может оказать влияние на эпидемическую ситуацию. Увеличение числа штаммов *C. diphtheriae* с репрессированным  $tox^+$ -геном, выделенных от больных дифтерией и лиц с ЛОР-патологией в постэпидемический период, может указывать на этиологическую роль этих микроорганизмов в развитии заболевания дифтерией.

**Ключевые слова:** коринебактерии, биовар *gravis*, биовар *mitis*, токсигенные штаммы, репрессированный  $tox^+$ -ген.

Род *Corynebacterium* (С.) объединяет множество бактерий, большинство из которых являются комменсалами человека, животных и растений, а некоторые вызывают опасные заболевания у людей [4, 13]. Так, *C. diphtheriae*, которые продуцируют экзотоксин, являются возбудителями дифтерии [12]. Отдельные штаммы *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans* также способны продуцировать экзотоксин, который вызывает у людей заболевания, сходные по клиническим проявлениям с дифтерией [9, 11]. В Украине в период эпидемии дифтерии (1991–1999 гг.) были зарегистрированы случаи заболеваний, сходных по клинической симптоматике с дифтерией, но при этом у больных обнаруживали недифтерийные *Corynebacterium* или нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*. Достоверность полученных результатов подтверждалась неэффективным лечением больных противодифтерийной сывороткой в случае выделения у них недифтерийных *Corynebacterium* [4].

С помощью ДНК-ДНК гибридизации было установлено, что *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans* являются само-

стоятельными геновидами [7, 8]. Нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* не имеют основного фактора патогенности  $tox^+$ -гена, поэтому не могут быть этиологическим агентом дифтерии. В связи с этим до 1990-х годов прошлого столетия в Украине случаи выявления нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* не подлежали официальной регистрации. Широкое внедрение молекулярно-генетических методов исследования показало, что 9,4–40 % нетоксигенных *C. diphtheriae* имеют репрессированный ген токсигенности [2, 6]. При определенных условиях действие гена-супрессора прекращается, и штамм может возобновлять способность продуцировать токсин [2, 5]. В таком случае эти штаммы *C. diphtheriae* могут вызывать заболевание дифтерией. Но при каких условиях носители нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, имеющих скрытый  $tox^+$ -ген, могут становиться опасными для окружающих, остается вопросом дискуссии.

В настоящее время в Украине отмечается снижение заболеваемости дифтерией, а также носительства токсигенных и нетоксигенных штаммов [1, 10]. Изменение биоло-

© А.П. Подаваленко, Т.А. Чумаченко, Т.Г. Глушкевич, Л.Л. Шумакова, 2012

гических свойств возбудителя дифтерии при условии снижения уровня противодифтерийного иммунитета среди населения может привести к ухудшению эпидемической ситуации на этой территории [3].

С учетом изложенного выше целью работы стала оценка эпидемической ситуации по дифтерии, а также усовершенствование эпидемиологической диагностики путем анализа случаев дифтерии и мониторинга микроорганизмов рода *Corynebacterium* в Украине в разные периоды интенсивности эпидемического процесса дифтерии.

**Материалы и методы.** Изучали случаи дифтерии и циркулирующие на территории Украины *Corynebacterium*, которые выявляли у больных дифтерией, лиц с ЛОР-патологией и здоровых людей в период эпидемии дифтерии (1994–1999 гг.) и постэпидемический период (2000–2010 гг.). По интенсивности эпидемического процесса дифтерии постэпидемический период разделили на два этапа: I (2000–2005 гг.) характеризовался снижением заболеваемости, II этап (2006–2010 гг.) – стабилизацией показателей заболеваемости дифтерией.

По отчетным данным Центральной санитарно-эпидемиологической станции МЗ Украины (форма № 2) за период 1994–2010 гг. проанализировано 15 424 случая дифтерии. Идентификацию *Corynebacterium* проводили в соответствии с методическими рекомендациями («Про заходи щодо покращання бактеріологічної діагностики дифтерії в Україні», наказ МОЗ України № 192 від 03.08.99). Определяли основные биологические свойства, токсигенность (Elek-тест).

Всего методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными праймерами исследовано 4429 штаммов различных видов бактерий рода *Corynebacterium*, которые в Elek-тесте не образовывали специфических линий преципитации.

Для тестирования гена токсинообразования *Corynebacterium* использовали метод ПЦР с коммерческой тест-системой «AmpliSens» (Москва, Россия).

**Результаты.** С 1994 по 2010 г. было выявлено 15 424 случая дифтерии в Украине, показатель заболеваемости варьировал от 5,79 (1994 г.) до 0,04 на 100 тыс. населения (2010 г.). Среди зарегистрированных случа-

ев 89,9 % лиц переболели дифтерией в период эпидемии (рис. 1).

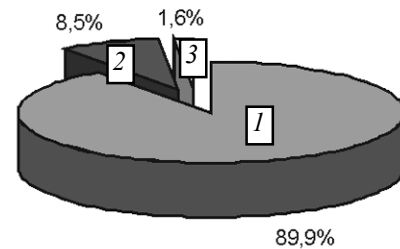


Рис. 1. Распределение случаев дифтерии, зарегистрированных в разные периоды интенсивности эпидемического процесса дифтерии в Украине:

I – период эпидемии, 2 – I этап постэпидемического периода, 3 – II этап постэпидемического периода

От 15 424 больных дифтерией было выделено всего 13 098 (84,9±0,3 %) штаммов *C. diphtheriae*, из которых (88,4±0,3) % были токсигенными. В период эпидемии *C. diphtheriae* обнаруживали у 11817 (85,2±0,3 %) больных дифтерией, (90,4±0,3) % выделенных в этот период штаммов были токсигенными культурами (табл. 1).

За первые пять лет после эпидемии дифтерии (I этап) произошло снижение числа случаев заболеваний в 10,6 раза, при этом от больных дифтерией выделяли (83,7±1,0) % штаммов *C. diphtheriae*, из которых (71,1±1,4) % были токсигенными культурами. Соотношение числа выделенных в период эпидемии от больных дифтерией токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* составляло 1:9,4, а в период снижения заболеваемости (I этап) за счет увеличения частоты выделения нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* соотношение числа токсигенных и нетоксигенных штаммов, выделенных от больных дифтерией, стало 1:2,5.

Установлено существенное различие между частотой выделения токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в период эпидемии и в постэпидемический период ( $p < 0,01$ ), а также между частотой выделения нетоксигенных штаммов в эти же периоды ( $p < 0,01$ ). За следующие пять лет (II этап) число случаев дифтерии в Украине снизилось в 56 раз по сравнению с периодом эпидемии и в 5,2 раза по сравнению с I этапом. Снизилась частота выделения штаммов *C. diphtheriae* от

Таблиця 1. Распределение по токсигенности штаммов *C. diphtheriae*, выделенных от больных дифтерией в разные периоды интенсивности эпидемического процесса дифтерии в Украине за 1994–2010 гг.

Периоды	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> , выделенные от больных					
	всего		в том числе			
	абс. ч.	(M±m) % от числа зарегистр.	токсигенные		нетоксигенные	
абс. ч.			(M±m) %	абс. ч.	(M±m) %	
Период эпидемии (1994–1999 гг.)	11817	85,2±0,3	10680	90,4±0,3	1137	9,6±0,8
Постэпидемический период (I этап 2000–2005 гг.)	1095	83,7±0,3	779	71,1±0,4	296	28,9±1,2
Постэпидемический период (II этап 2006–2010 гг.)	186	75,0±0,1	126	67,7±0,4	60	32,3±1,2
Всего в постэпидемический период (2000–2010 гг.)	1281	82,3±0,9	905	70,6±1,3	376	29,4±1,3
Всего за период наблюдения (1994–2010 гг.)	13098	84,9±0,3	11585	88,4±0,3	1513	11,6±0,3

больных дифтерией в период II этапа на 10,2 % по сравнению с периодом эпидемии, и на 8,7 % в сравнении с I этапом. Соотношение числа токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных от больных дифтерией в период II этапа по сравнению с I этапом осталось на том же уровне и составило 1:2,5. Выявлено достоверное различие между удельным весом высеваемости токсигенных *C. diphtheriae* на разных этапах постэпидемического периода ( $p < 0,01$ ), а также между удельным весом выделенных нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* на I и II этапах ( $p < 0,05$ ). Необходимо отметить, что при сравнении частоты высеваемости *C. diphtheriae* от больных в период эпидемии дифтерии и в постэпидемический период было установлено снижение на 2,9 % частоты выделения *C. diphtheriae* от больных в постэпидемический период. Сравняя высеваемость токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в период эпидемии и в постэпидемический период, выявлено снижение высеваемости токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на 19,8 % и увеличение частоты выделения нетоксигенных штаммов на 19,8 % в постэпидемический период.

За период наблюдения установлена сильная обратная корреляционная связь между числом заболевших дифтерией и удельным весом выделенных от больных нетоксиген-

ных штаммов *C. diphtheriae* ( $r = -0,76 \pm 0,0004$ ). Между числом заболевших дифтерией и удельным весом выделенных штаммов *C. diphtheriae* выявлена сильная прямая корреляционная связь ( $r = 0,75 \pm 0,007$ ).

Анализ структуры штаммов *C. diphtheriae*, циркулировавших в разные периоды интенсивности эпидемического процесса, по биовариантной принадлежности показал, что среди токсигенных штаммов *C. diphtheriae* превалировал биовар *gravis*. Так, в период эпидемии доля этого биовара составила 90,0 %; в период I этапа – 95,1 %, в период II этапа – 96,0 %. Среди нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* доминировал биовар *mitis*: в период эпидемии доля этого биовара составила 58,7 %, в период I этапа – 58,9 %, в период II этапа – 66,7 %.

Сравнивая доли выделенных штаммов *C. diphtheriae* в разные периоды эпидемического процесса, установили, что происходит постепенное увеличение доли биовара *gravis* среди токсигенных штаммов с 90,0 до 96,0 % и доли биовара *mitis* среди нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* с 58,7 до 66,7 % (рис. 2).

Для выяснения причин снижения уровня бактериологического подтверждения случаев дифтерии было изучено в ПЦР 4429 штаммов нескольких видов рода *Corynebacterium*, циркулирующих в разные периоды интенсивности эпидемического процесса. Среди

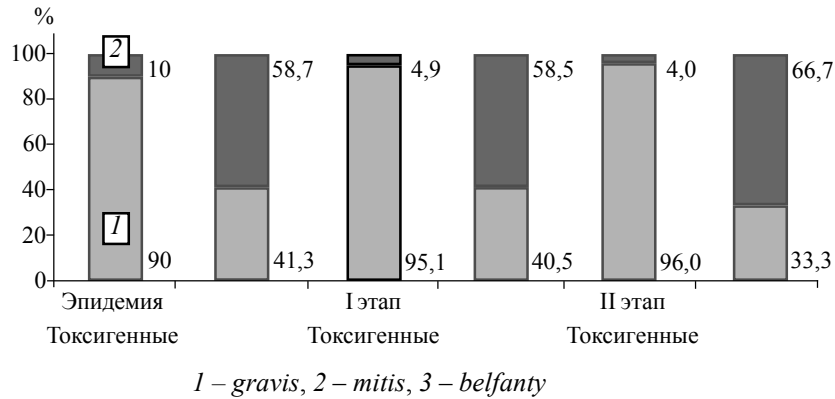


Рис. 2. Розподілення токсигенних і нетоксигенних біоварів *C. diphtheriae*, виділених від хворих дифтерією в різні періоди інтенсивності епідемічного процесу в Україні за 1994–2010 гг.

етих коринебактерій 4 218 (95,2±0,3 %) культур були нетоксигенними штаммами *C. diphtheriae*, 139 (3,2±0,2 %) культур – штаммами *C. pseudotuberculosis* і 72 (1,6±0,2 %) культур – штаммами *C. ulcerans*. Середі ізолятів *C. diphtheriae* біоварианта *gravis* було 1 355 (32,2±0,7 %) культур, *mitis* – 2667 (63,2±0,7 %) і *belfanty* – 196 (4,6±0,3 %) культур.

В період епідемії дифтерії (1994–1999 гг.) вивчали в ПЦР 1128 (25,5±0,6 %) культур різних видів *Corynebacterium*, з яких 1096 (97,2±0,5 %) були штаммами *C. diphtheriae*, 22 (1,9±0,4 %) – штаммами *C. pseudotuberculosis* і 10 (0,9±0,2 %) – штаммами *C. ulcerans*. В постепідемічний період I етапу вивчали 2838 (64,0±0,7 %) штаммів *Corynebacterium*, з яких 2 698 (95,1±0,2 %) культур були штаммами *C. diphtheriae*, 92 (3,2±0,3 %) штамма належали до *C. pseudotuberculosis*

і 48 (1,7±0,2 %) штаммів були ідентифіковані як *C. ulcerans*. В постепідемічний період II етапу вивчили 463 (10,5±0,4 %) культури *Corynebacterium*, з яких 424 (91,6±1,5 %) були віднесені до *C. diphtheriae*, 25 (5,4±1,0 %) штаммів ідентифіковані як *C. pseudotuberculosis* і 14 (3,0±0,40,7 %) – як *C. ulcerans*.

Результати проведених в ПЦР досліджень показали, що 273 (6,2±0,3 %) культури мали «молчачий» *tox<sup>+</sup>*-ген, причому (96,3±1,1) % ізолятів належали до нетоксигенних штаммів *C. diphtheriae* (табл. 2).

Удельний вага виділених культур *C. diphtheriae* з репресованим геном токсигенності варіювала в межах 90,7 (період епідемії) і 98,9 % (I етап постепідемічного періоду). Між кількістю виділених культур *Corynebacterium* з репресованим *tox<sup>+</sup>*-геном в різні періоди інтенсивності епідемічного процесу

Таблиця 2. Число мікроорганізмів роду *Corynebacterium* з «молчачим» геном токсигенності, виділених в різні періоди інтенсивності епідемічного процесу дифтерії в Україні за 1994–2010 гг.

Періоди	<i>Corynebacterium</i>							
	всього		в том числі					
	абс. ч.	(M±m)%	<i>C. diphtheriae</i>		<i>C. pseudotuberculosis</i>		<i>C. ulcerans</i>	
		абс. ч.	(M±m)%	абс. ч.	%	абс. ч.	%	
Епідемія	75	6,6±0,7	68	90,7±3,3	3	4,0	4	5,3
I етап	175	6,2±0,4	173	98,9±0,8	–	–	2	1,1
II етап	23	4,9±1,0	22	95,6±1,2	–	–	1	4,4
Всього	273	6,2±0,3	263	96,3±1,1	3	1,1	7	2,6

дифтерії (епідемія і II етап, I і II етапи) достовірних різниць не виявили ( $p > 0,05$ ). Однак були виявлені суттєві різниці між удільним вимом *C. diphtheriae* з «молчачим» геном токсигенності, які реєстрували в період епідемії і на I етапі постепідемічного періоду ( $p < 0,05$ ).

Аналіз *C. diphtheriae* з репресированим  $tox^+$ -геном по біоваріантній приналежності в різні періоди течення епідемічного процесу показав, що во всі періоди переважав біовар *mitis*, частка якого в середньому становила 89,0 %, однак на II етапі постепідемічного періоду відбулося збільшення частки біовару *gravis* з 11,8 до 31,8 % (рис. 3).

Мікроорганізми різних видів роду *Corynebacterium* з «молчачим» геном токсигенності за 2000–2010 гг. виявляли у хворих дифтерією (6,6 % випадків), у осіб з ЛОР-патологією (56,1 % випадків) і у здорових осіб (37,3 % випадків). Так, за 2000–2005 гг. (I етап) *C. diphtheriae* з «молчачим»  $tox^+$ -геном виділяли в 5,8 % випадків від хворих

Однак слід звернути увагу на можливе змінення біологічних властивостей *C. diphtheriae*. На це косвенно вказує зниження висівності штамів *C. diphtheriae* з зразків матеріалу, отриманих від хворих дифтерією, а також збільшення частки токсигенних культур біовару *gravis* *C. diphtheriae* і частки нетоксигенних штамів *C. diphtheriae*, в основному біоваріанта *mitis*, серед штамів, виділених від хворих дифтерією. На наш погляд це є несприятливим фактором, який може призвести до погіршення епідемічної ситуації по дифтерії.

Зниження висівності *C. diphtheriae* при бактеріологічному обстеженні хворих дифтерією в період стабілізації показателя захворюваності не могло бути пояснено помилками в лабораторних дослідженнях або гіпердіагностикою дифтерії, тому для детального вивчення циркулюючих штамів *Corynebacterium* були проведені молекулярно-генетичні

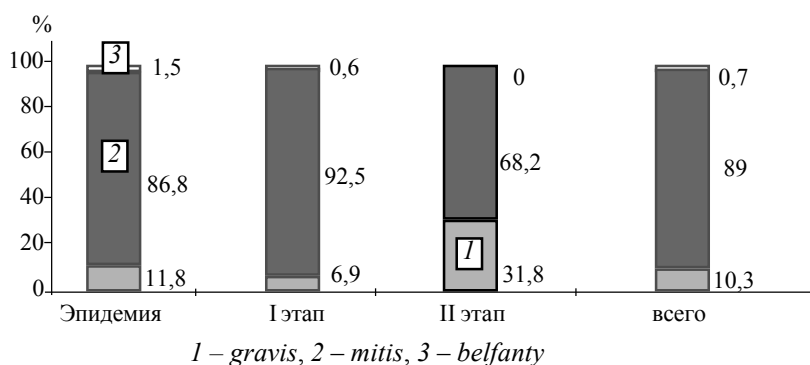


Рис. 3. Розподіл біоварів *C. diphtheriae* з репресированим геном токсигенності в різні періоди інтенсивності епідемічного процесу дифтерії в Україні

дифтерією, в 53,8 % випадків – від осіб з ЛОР-патологією, в 40,5 % випадків – від здорових осіб, а *C. ulcerans* виділяли в єдиничних випадках від осіб з ЛОР-патологією і від здорових. За 2006–2010 гг. (період II етапу) штамми *C. diphtheriae* з «молчачим»  $tox^+$ -геном висівали в 13,0 % випадків від хворих дифтерією, в 74,0 % випадків від осіб з ЛОР-патологією і в 13,0 % випадків від здорових, а штамми *C. ulcerans* виділяли в єдиничних випадках тільки від осіб з ЛОР-патологією.

**Обсуждение.** Суттєве зниження захворюваності дифтерією в Україні в наші часи може свідчити про благополучну епідемічну ситуацію.

Виявлення у хворих дифтерією і у осіб з ЛОР-патологією нетоксигенних штамів *C. diphtheriae* з «молчачим»  $tox^+$ -геном може вказувати на етіологічну роль цих мікроорганізмів в розвитку інфекційного процесу. В користь цього твердження також свідчить зменшення висівності токсигенних штамів *C. diphtheriae* з зразків матеріалу, отриманих від хворих дифтерією, і збільшення висівності культур з репресированим  $tox^+$ -геном. Виявлення у хворих з ЛОР-патологією нетоксигенних штамів *C. diphtheriae* з «молчачим»  $tox^+$ -геном може вказувати на гіподіагностику дифтерії.

Выявленные у больных ЛОР-патологией недифтерийные штаммы *Corynebacterium* являются этиологическим фактором этих заболеваний, что следует учитывать при назначении лечения таким больным.

Таким образом, увеличение в постэпидемический период доли штаммов *C. diphtheriae* с «молчащим»  $tox^+$ -геном от больных дифтерией при снижении высеваемости токсигенных штаммов и увеличении высеваемости нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* от больных дифтерией свидетельствует об этиологической роли нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* с «молчащим»  $tox^+$ -

геном в развитии инфекционного процесса дифтерии.

Учитывая то, что некоторые виды недифтерийных *Corynebacterium* могут продуцировать  $tox^+$ -ген, необходимо проводить дифференциальную диагностику дифтерии с заболеваниями, вызванными недифтерийными *Corynebacterium*.

Представленные материалы подтверждают необходимость тщательного наблюдения за циркуляцией как токсигенных, так и нетоксигенных *C. diphtheriae* в межэпидемический период с применением современных методов лабораторных исследований.

### Список литературы

1. Гладка О. А. Епідеміологічні аспекти носійства збудника дифтерії в постепідемічний період / О. А. Гладка // Профілактична медицина. — 2008. — № 1. — С. 24–28.
2. Краева Л. А. Биологические основы разработки новых технологий для диагностики и мониторинга дифтерии: автореф. дис. на соискание учен. степени док. мед. наук: спец. 03.02.03 «Микробиология» / Л. А. Краева. — СПб, 2011. — 43 с.
3. Краева Л. А. Особенности биологических свойств *Corynebacterium diphtheriae*, циркулирующих в постэпидемический период / Л. А. Краева, Г. Я. Ценева // Журн. микробиол. — 2009. — № 3. — С. 3–6.
4. Митус Н. В. Особливості перебігу запальних захворювань верхніх дихальних шляхів, зумовлених дифтероїдами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.13. «Інфекційні хвороби» / Н. В. Митус. — К., 2002. — 18 с.
5. Патогенные свойства *Corynebacterium diphtheriae*, циркулирующих в г. Ростов-на-Дону и Ростовской области в межэпидемический период / Г. Г. Харсеева, Е. П. Москаленко, А. Л. Трухачева, Т. В. Митрофанова // Журн. микробиол. — 2006. — № 6. — С. 6–9.
6. Послідовність  $tox$ -гена та регуляторного  $dtxR$ -гена у нетоксигенних та токсинопродуруючих штамів *C. diphtheriae* // Н. М. Жеребко, Л. В. Копаниця, С. І. Романюк [та ін.] // Журн. АМН України. — 2005. — Т. 11, № 3. — С. 592–600.
7. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors / E. Trost, A. Arwa Al-Dilaimi, P. Papavasiliou [et al.] // BMS Genomics. — 2011. — Vol. 12. — P. 383.
8. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis / A. Silva, M. P. Schneider, L. Cerdeira [et al.] // J. Bacteriol. — 2010. — Vol. 193. — № 1. — P. 323–324.
9. Detection of differences in the nucleotide and amino acid sequences of diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* causing extrapharyngeal infections / A. Sing, M. Hogardt, S. Bierschenk, J. Heesemann // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — P. 4848–4851.
10. Diphtheria Surveillance Network. Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000–2009 / K. S. Wagner, J. M. White, I. Lucenko [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 18 (2). — P. 217–225.
11. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil / A. L. Mattos-Guaraldi, J. L. Sampaio, C. S. Santos [et al.] // Mem Inst Oswaldo Cruz. — 2008. — Vol. 103. — P. 396–400.
12. Mokrousov I. *Corynebacterium diphtheriae*: genome diversity, population structure and genotyping perspectives / I. Mokrousov // Infect. Gene. Evol. — 2009. — Vol. 9 (1). — P. 1–15.

13. Pigs as source for toxigenic *Corynebacterium ulcerans* / R. Schuegger, C. Schoerner, J. Dlugaczzyk [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 15 (8). — P. 1314–1315.

**А.П. Подаваленко, Т.О. Чумаченко, Т.Г. Глушкевич, Л.Л. Шумакова**

**МОНІТОРИНГ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ CORYNEBACTERIUM У РІЗНІ ПЕРІОДИ  
ІНТЕНСИВНОСТІ ЕПІДЕМІЧНОГО ПРОЦЕСУ ДИФТЕРІЇ**

Подано результати досліджень, які вказують на зміни біологічних властивостей збудників дифтерії, що може вплинути на епідемічну ситуацію. Збільшення кількості штамів *C. diphtheriae* з репресованим *tox<sup>+</sup>*-геном, які були виділені від хворих на дифтерію та осіб з ЛОР-патологією в після-епідемічний період, може вказувати на етіологічну роль цих мікроорганізмів у розвитку захворювань на дифтерію.

**Ключові слова:** коринебактерії, біовар *gravis*, біовар *mitis*, токсигенні штами, репресований *tox<sup>+</sup>*-ген.

**A.P. Podavalenko, T.A. Chumachenko, T.G. Glushkevich, L.L. Shumakova**

**MONITORING OF CORYNEBACTERIUM IN DIFFERENT PERIODS  
OF DIPHTHERIA EPIDEMIC PROCESS INTENSITY**

The change of the biological properties of the *Corynebacterium diphtheriae*, which may impact on the epidemic situation are shown. Increasing the number of strains of *C. diphtheriae* with repressed *tox<sup>+</sup>*-gene, recovered from human clinical material in postepidemic period may indicate an etiological role of these bacterias in the development of diphtheria.

**Key words:** *Corynebacterium*, biovar *gravis*, biovar *mitis*, toxigenic strains, repressed *tox<sup>+</sup>*-gene.

Поступила 11.10.11