

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *DTXR* У СОВРЕМЕННЫХ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

И. А. Чагина¹, Ю. С. Переварова², В. В. Переваров², А. В. Чаплин²✉, О. Ю. Борисова^{1,2}, Л. И. Кафарская², С. С. Афанасьев¹, В. А. Алешкин¹

¹Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского, Москва

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Считается, что патогенез *Corynebacterium diphtheriae* основан на воздействии дифтерийного токсина на синтез белка в клетках человека. Регуляция синтеза токсина находится под контролем белка DtxR. Данный белок осуществляет железоопосредованную репрессию гена дифтерийного токсина, а также координирует работу множества других генов, необходимых для нормальной жизнедеятельности *C. diphtheriae*. Ген, кодирующий DtxR, можно использовать для анализа популяционной структуры вида, так как он присутствует в геноме как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов. В работе было изучено 45 штаммов *C. diphtheriae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2010–2015 гг. Анализ этих штаммов показал, что ген *dtxR* обнаруживается у всех представителей вида и является высококонсервативным участком генома *C. diphtheriae*. Большинство выявленных полиморфизмов были синонимичны (16 из 18 однонуклеотидных замен). Несмотря на низкий уровень филогенетического сигнала, аллельный вариант *dtxR* был ассоциирован с биологическими признаками штамма (биовар, токсигенность). Полученные данные свидетельствуют о высокой активности отрицательного отбора, направленного на поддержание в популяции существующей последовательности белка, и позволяют рекомендовать наработку фрагментов гена *dtxR* методом полимеразной цепной реакции в качестве дополнительного метода идентификации возбудителя, что особенно актуально в условиях растущего числа заболеваний, ассоциированных с нетоксигенными штаммами *C. diphtheriae*.

Ключевые слова: дифтерия, *Corynebacterium diphtheriae*, *dtxR*, мультилокусное сиквенс-типирование, металлорегуляторные белки

Финансирование: исследование выполнено в рамках Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» по проектам № А16-116021550311-2 «Изучение роли микробиоценозов ротоглотки и крови человека при дифтерии, коклюше и других инфекционно-воспалительных заболеваниях» и № АААА-А16-116101810127-7 «Разработка молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша».

✉ Для корреспонденции: Чаплин Андрей Викторович
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; okolomedik@gmail.com

Статья получена: 02.02.2017 Статья принята к печати: 18.02.2017

POLYMORPHISM OF THE *DTXR* GENE IN THE CURRENTLY EXISTING STRAINS OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Chagina IA¹, Perevarova YuS², Perevarov VV², Chaplin AV²✉, Borisova OYu^{1,2}, Kafarskaia LI², Afanas'ev SS¹, Aleshkin VA¹

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The pathogenic mechanism used by *Corynebacterium diphtheriae* is attributed to the ability of the diphtheria toxin to disrupt protein synthesis in human cells. Diphtheria toxin production is regulated by the DtxR protein. The latter is involved in the iron-mediated repression of the toxin gene and coordinates activities of other genes essential for the survival of *C. diphtheriae*. The DtxR-encoding gene occurs in both toxigenic and non-toxigenic strains; therefore it can be used to analyze the population structure of the species. In our work we have studied 45 strains of *C. diphtheriae* isolated in the Russian Federation in 2010–2015. These strains were analyzed to reveal that gene *dtxR* is a highly conservative region of *C. diphtheriae* genome that can be found in all members of the studied species. The majority of the discovered polymorphisms were synonymous (16 of 18 single nucleotide polymorphisms identified). In spite of the low phylogenetic signal, the allelic variant of *dtxR* was associated with the strain's phenotype (biovar, toxigenicity). The obtained data indicate the presence of aggressive negative selection aimed to maintain the existing protein sequence in the population. Based on the results, we recommend *dtxR* polymerase chain reaction as an additional technique for pathogen identification, which is especially relevant considering the increasing prevalence of the disease associated with non-toxigenic *C. diphtheriae* strains.

Keywords: diphtheria, *Corynebacterium diphtheriae*, *dtxR*, multilocus sequence typing, metalloregulatory proteins

Funding: this study was conducted as part of two projects: *The Study of the Role of Microbial Communities in Human Oropharynx and Blood in Diphtheria, Pertussis and Other Infectious Inflammatory Diseases* (Project ID A16-116021550311-2) and *The Development of Molecular-Genetic Methods for Laboratory Diagnosis of Diphtheria and Pertussis* (Project ID АААА-А16-116101810127-7) supported by the Sectoral Research Program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (*Problem-oriented Research in Epidemiological Surveillance of Infectious and Parasitic Diseases in 2016-2020*).

✉ Correspondence should be addressed: Andrei Chaplin
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; okolomedik@gmail.com

Received: 02.02.2017 Accepted: 18.02.2017

Дифтерия, несмотря на эффективность вакцинопрофилактики, остается актуальной инфекцией в условиях спорадической заболеваемости и циркуляции возбудителя среди населения. Способность *Corynebacterium diphtheriae* вызывать дифтерию ассоциирована с выработкой дифтерийного токсина, последовательность которого кодируется геном *tox* [1]. Механизм действия дифтерийного токсина основан на АДФ-рибозилировании фактора элонгации 2, что приводит к нарушению синтеза белка в клетках человека [2]. Стоит отметить, что наличие *tox* в геноме *C. diphtheriae* не всегда свидетельствует о токсигенности штамма. Отдельного рассмотрения требуют нетоксигенные *tox*-несущие штаммы (НТН-штаммы), которые в результате различных мутационных событий потеряли способность синтезировать полноценный токсин [3, 4].

Несмотря на то, что *tox* является частью генома коринефага, железоопосредованная репрессия дифтерийного токсина осуществляется металлорегуляторным белком DtxR — продуктом хромосомного гена *dtxR*. Таким образом, транскрипция *tox* непосредственно связана с гомеостазом железа, низкая концентрация которого индуцирует экспрессию данного гена и, соответственно, синтез дифтерийного токсина [5].

Ген *dtxR* присутствует у токсигенных и нетоксигенных штаммов [6], что свидетельствует о наличии у него других функций помимо регуляции синтеза дифтерийного токсина. Согласно исследованиям, регулон DtxR может включать еще 20 локусов, в том числе гены, ответственные за усвоение железа. Так, на сегодняшний день известно, что у *C. diphtheriae* посредством DtxR регулируется синтез сидерофоров и высокоаффинная транспортная система (ciuABCDEF), транскрипция трех локусов, вовлеченных в работу гем-монооксигеназы (*hmuO*) [1, 7]. Возможна также дополнительная роль DtxR в регуляции вирулентности [7].

Железо, которое не является легкодоступным элементом, необходимо микроорганизмам в больших количествах. В то же время его избыток приводит к образованию токсичных активных форм кислорода. Уменьшение концентрации свободного железа в организме млекопитающего представляет собой один из эволюционно сложившихся механизмов неспецифической противоиной защиты и достигается путем связывания этого металла специфическими белками [8, 9].

Выживание и распространение патогена в организме хозяина, таким образом, становится зависимым и от его способности усваивать различные ионы металлов из комплексов с белками. Для этого существуют разные системы захвата, кодируемые генами. Экспрессию генов контролируют металлорегуляторные белки — высококонсервативные регуляторы транскрипции [10, 11]. Такие транскрипционные факторы при связывании со специфичным ионом металла претерпевают конформационные изменения, в результате чего происходит активация или угнетение связывания активного центра с оператором регулируемого гена [12].

DtxR является одним из классических представителей металлорегуляторных белков. Кристаллографические исследования показывают, что в неактивном состоянии DtxR представляет собой мономер, который состоит из двух доменов: большой консервативный N-концевой домен содержит два сайта связывания для иона железа, а также мотив спираль-поворот-спираль (*helix-turn-helix*), способный взаимодействовать с ДНК; малый менее консервативный C-концевой домен имеет сходство с SH3-доменами эукариот. При соединении ионов железа с каждым

из сайтов связывания происходит активация репрессора с последующей его димеризацией [13].

Два домена DtxR соединяются между собой посредством богатого пролином пептидного сегмента. При неактивном состоянии репрессора данный участок связывается с SH3-подобным доменом, что приводит к образованию комплекса пролилпептид-SH3 (Pr-SH3). Таким образом происходит стабилизация неактивного состояния репрессора. При активации DtxR посредством специфического связывания железа N-концевым доменом комплекс Pr-SH3 диссоциирует, после чего пролиновый сегмент стабилизирует спирали N-концевого домена, что приводит к димеризации двух субъединиц белка [14].

Учитывая значимость DtxR для *C. diphtheriae*, молекулярно-генетическое исследование кодирующего его гена *dtxR* позволит более подробно изучить патогенный потенциал *C. diphtheriae*, особенности формирования популяции циркулирующих штаммов в эволюционном развитии данного вида, а также оценить возможность использования *dtxR* в качестве мишени при ПЦР-диагностике дифтерии и инфекций, ассоциированных с нетоксигенными штаммами *C. diphtheriae*. В связи с этим целью данной работы являлось определение генетического полиморфизма DtxR и последующий анализ структуры популяции штаммов *C. diphtheriae*, циркулирующих на территории России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучены генотипические свойства 45 штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в 2010–2015 гг. и относящихся к биоварам *gravis* и *mitis*. Штаммы *C. diphtheriae* были присланы в Референс-центр по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского из бактериологических лабораторий лечебно-профилактических организаций и Центров гигиены и эпидемиологии 14 регионов Российской Федерации. Исследованные в работе штаммы выделялись с диагностической, с профилактической целями или по эпидемическим показаниям. В работе использованы коллекционные штаммы: *C. diphtheriae* 178-01 (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), *C. diphtheriae* PW 8 (НЦЭСМП, Москва, Россия). Помимо этого, в качестве отрицательного контроля для ПЦР в работу включили по 1 штамму *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *C. amycolatum*, *C. glucuronolyticum*, *C. xerosis*, *C. afermentans subsp. afermentans*, *C. afermentans subsp. lipophilum*, *C. coyleae*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. macifaciens*, *C. simulans*, *C. durum* из рабочей коллекции МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского.

Выделение штаммов *C. diphtheriae* проводили согласно методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13. Исследуемый материал засеивали на кровяно-теллуритовую среду на основе 2 % сухого питательного агара («Микроген», Россия) с 10 % крови крупного рогатого скота («ЛейТран», Россия) и 0,02 % теллурита калия (ГНЦ ПМБ, Россия) и термостатировали 24–48 ч при 37 °С. 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 биохимической тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Россия).

Хромосомную ДНК выделяли методом кипячения из 24-часовой культуры *C. diphtheriae*, выросшей на 2 %

сухом питательном агаре с добавлением 10 % крови крупного рогатого скота. Петлю суточной культуры суспендировали в 100 мкл деионизированной воды, инкубировали 20 мин при 95 °C и подвергли центрифугированию, полученный супернатант использовали для проведения ПЦР.

ПЦР для амплификации гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae* проводили с использованием одной пары праймеров, охватывающей всю область гена *dtxR*: ранее предложенного F₁ 5'-GGGACTACAACGCAACAAGAA-3' [15] и R₁ 5'-TCATCTAATTCGCCGCTTTA-3', подобранного с использованием приложения PerlPrimer v1.1.21 [16]. Видовая специфичность используемых праймеров была проверена путем поиска схожих последовательностей у других видов рода *Corynebacterium* в базе данных NCBI Nucleotide с помощью программы BLASTn.

Реакционная смесь содержала ПЦР-буфер с 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого праймера, 200 мМ каждого dNTP, 1 мкл раствора ДНК, 1 е. а. Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва) в объеме 50 мкл. Амплификация фрагментов гена выполнялась в автоматическом режиме на приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Детекцию результатов амплификации проводили путем электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Наработанные фрагменты нуклеотидных последовательностей подвергали последующему секвенированию в компании «Евроген» (Россия).

Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* проводили с помощью мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) согласно международному протоколу [17] на основе секвенирования фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства» (house-keeping genes): *atpA* (кодирует α-субъединицу АТФ-синтазы), *dnaE* (кодирует α-субъединицу холофермента ДНК полимеразы III), *dnaK* (кодирует шаперон Hsp70), *fusA* (кодирует фактор элонгации G), *leuA* (кодирует 2-изопропилмалатсинтазу), *odhA* (кодирует компоненты E1 и E2 комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы) и *rpoB* (кодирует β-субъединицу РНК-полимеразы) — с последующей идентификацией аллельного профиля каждого штамма.

Результаты секвенирования сопоставляли с опубликованными в международной базе данных генотипов GenBank нуклеотидными последовательностями генов. В качестве референса использовали последовательность *dtxR* из генома *C. diphtheriae* PW8 (идентификатор доступа: Genbank NC_016789.1).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MUSCLE [18]. Положение полиморфизмов относительно структурных элементов белка анализировали по базе данных PDB. Поиск в базе данных NCBI Nucleotide осуществляли с помощью программы BLASTn. Для идентификации аллелей генов «домашнего хозяйства» *C. diphtheriae* использовали программное обеспечение международной базы данных PubMLST. Для оценки мутационного отбора гена *dtxR* рассчитывали индекс K_a/K_s — отношение количества синонимичных (K_s) и несинонимичных (K_a) замен на сайт последовательности — с использованием метода Nei-Gojobori [19]. Точный критерий Фишера для таблиц сопряженности произвольного размера рассчитывали с использованием алгоритма AS159 [20] с помощью R 3.3.2. Реконструкция филогении осуществлялась методом присоединения соседей (neighbor-joining) на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена *dtxR*. Для построения филогенетического дерева *dtxR* исследованных штаммов помимо *C. diphtheriae* PW8 были использованы нуклеотидные последовательности *C. diphtheriae* NCTC 13129

и *C. diphtheriae* 178-01 (идентификаторы доступа: Genbank NC_016789.1, BX248353.1 и NZ_JZUJ01000001.1). Эволюционные расхождения были вычислены с использованием MCL-метода (Maximum Composite Likelihood method) [21] в единичах количества замен оснований, приходящихся на сайт. Эволюционные анализы проводили в программе MEGA7 v.7.0.21 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В поставленных ПЦР ген *dtxR* выявлен в 100 % случаев как у токсигенных, так и у нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*. Кроме того, результат ПЦР у всех проверенных штаммов родственных видов в 100 % случаев был отрицательным.

В результате секвенирования образцов и сопоставления с опубликованными в базе данных GenBank последовательностями гена *dtxR* у изученных 45 штаммов *C. diphtheriae* нами были выявлены полиморфизмы в 18 позициях гена: 66, 126, 225, 273, 358, 402, 440, 474, 504, 507, 516, 558, 564, 579, 639, 640, 654 и 685 (табл. 1).

Большинство замен нуклеотидов относительно референсной последовательности *dtxR* оказались синонимичными. В частности, наиболее распространенная однонуклеотидная замена в 273 позиции гена *dtxR*, обнаруженная у 14 из 45 изученных штаммов *C. diphtheriae*, не влияла на последовательность белка.

Выявленные полиморфизмы в положениях 440 и 640, приводящие к заменам A147V и L214I соответственно, предположительно, не оказывают значительного влияния на функцию DtxR. В соответствии с трехмерной структурой белка, опубликованной в базе данных PDB (идентификатор 2QO9), аминокислотная позиция 147 расположена в неструктурированном богатом пролином (Pr) участке. Т. к. этот сегмент участвует в димеризации белка, нельзя исключать, что аминокислотная замена в нем может повлиять на процесс активации DtxR. Замена лейцина на изолейцин в положении 214, находящемся в С-концевом домене белка, предположительно, также не влияет на фолдинг белка, т. к. данные аминокислоты обладают схожими свойствами. Таким образом, выявленные несинонимичные замены с высокой вероятностью не влияют на функцию DtxR.

Многие из вариантов последовательностей были описаны ранее, но нами впервые обнаружен однонуклеотидный полиморфизм в положении 358, также не затрагивающий аминокислотную последовательность. При поиске в базе данных NCBI Nucleotide с помощью программы BLASTn такой вариант замены нуклеотида обнаружен не был.

Полиморфизмы в гене *dtxR* относительно референсной последовательности у штаммов *C. diphtheriae* встречались в различных комбинациях. Согласно выявленным сочетаниям нуклеотидных замен исследованные изоляты были разделены на группы (табл. 2).

Более половины (55 %) нуклеотидных последовательностей были отличны от референса. Стоит отметить, что впервые выявленная замена в положении 358 обнаружена у единственного штамма, отнесенного к группе 5, который, кроме того, имеет наибольшее количество замен относительно референсной последовательности, в том числе несинонимичных.

На основании полученного выравнивания последовательностей *dtxR* была построена дендрограмма филогенетических взаимоотношений (рисунок).

Таблица 1. Частота встречаемости замен нуклеотидов в гене *dtxR* у исследованных штаммов *C. diphtheriae* относительно штамма PW8

Положение нуклеотида в гене <i>dtxR</i>	Замена нуклеотидов	Кодируемая аминокислота	Замена аминокислоты	Число штаммов
66	A-T	22	-	5
126	C-T	42	-	5
225	T-C	75	-	6
273	C-T	91	-	14
358	T-C	120	-	1
402	T-A	134	-	1
440	C-T	147	Аланин (А)-Валин (V)	6
474	C-T	158	-	6
504	T-A	168	-	6
507	C-T	169	-	6
516	T-C	172	-	6
558	C-T	186	-	2
564	T-A	188	-	6
579	C-T	193	-	2
639	C-T	213	-	4
640	C-A	214	Лейцин (L)-Изолейцин (I)	2
654	T-C	218	-	2
685	C-T	229	-	1

Таблица 2. Комбинации полиморфизмов гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheria*

Группа штаммов	Число штаммов (n = 45)	Положение нуклеотида в нуклеотидной последовательности <i>dtxR</i>																	
		66	126	225	273	358	402	440	474	504	507	516	558	564	579	639	640	654	685
1	20 (44 %)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
2	5 (11 %)	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
3	9 (20 %)	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
4	5 (11 %)	*	*	C	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	
5	1 (2 %)	*	*	C	*	C	A	I	T	A	T	C	T	A	T	T	A	C	T
6	1 (2 %)	T	*	*	*	*	*	I	T	A	T	C	T	A	T	T	A	C	*
7	4 (9 %)	T	*	*	*	*	*	I	T	A	T	C	*	A	*	*	*	*	*
Референсный штамм PW8	-	A	C	T	C	T	T	C	C	T	C	T	C	T	C	C	C	T	C

Примечание. * — совпадение нуклеотида; T, A — полиморфизм с заменой аминокислоты.

Реконструкция порядка ветвления в значительной степени условна, что связано с большим сходством анализируемых последовательностей и, следовательно, низким уровнем филогенетического сигнала. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений изучаемых штаммов представлена без укоренения дерева в связи с невозможностью подобрать подходящую внешнюю группу.

При более подробном изучении были проанализированы соотношения состава групп с такими параметрами, как токсигенность, принадлежность к определенному биовару и сиквенс-тип (ST) по МЛСТ (табл. 3). Данные о принадлежности штаммов НТТН описаны в работе [23].

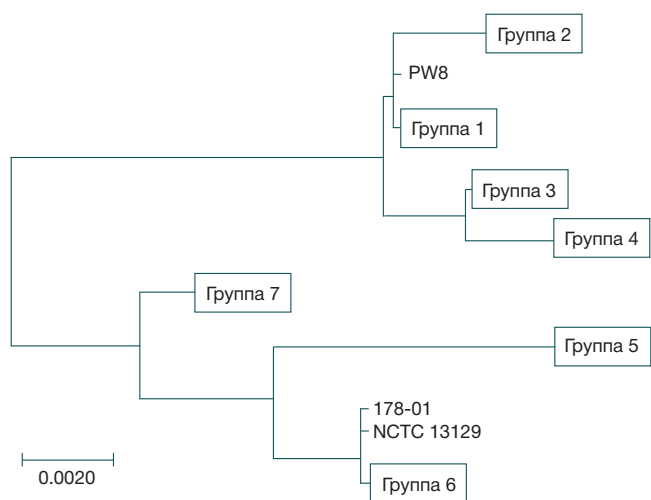
На основании данных о распределении относительно каждого аллеля *dtxR* токсигенных и нетоксигенных штаммов различных биоваров был проведен точный тест Фишера. Тест выполняли в таблицах сопряженности 2×7 для распределения биовара относительно варианта аллеля *dtxR* ($p = 0,00078$) и 3×7 для распределения токсигенности относительно варианта аллеля *dtxR* ($p = 2,8 \cdot 10^{-9}$). Полученные результаты позволяют утверждать, что распределение таких признаков, как биовар и токсигенность, относительно варианта аллеля *dtxR* не является случай-

ным, что свидетельствует о наличии филогенетического сигнала, который складывается из взаимосвязей между аллельным вариантом *dtxR* и биологическими признаками штаммов. Распределение по сиквенс-типу оказалось неоднородным, одинаковые сиквенс-типы в большинстве случаев не встречались в разных группах.

Для оценки мутационного отбора гена *dtxR* в отношении сделанного выравнивания был произведен расчет индекса K_a/K_s , который составил 0,0526. Полученное значение индекса ($K_a/K_s < 1$) свидетельствует о выраженном отрицательном отборе, т. е. давление естественного отбора направлено на сохранение существующей последовательности белка [24].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование подтвердило важную роль DtxR в жизнедеятельности *C. diphtheriae* как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов. Обнаруженные полиморфизмы предоставляют новую информацию о современной изменчивости *C. diphtheriae* на территории России.



Дендрограмма филогенетических взаимоотношений гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae*

Дерево изображено в масштабе, с длинами ветвей в тех же эволюционных расстояниях, которые использовались для построения филогенетического дерева. Масштаб соответствует 0,1 замене на 200 п. н. Последовательности внутри групп полностью идентичны.

Аллельные варианты *dtxR* на уровне нуклеотидных и аминокислотных последовательностей изучались ранее при разной интенсивности эпидемического процесса дифтерии [25–27]. В данной работе в условиях спорадической заболеваемости проводился комплексный анализ нуклеотидных последовательностей в соотношении их с такими свойствами штамма, как токсигенность, принадлежность к определенному биофарму и сиквенс-типу. Такой подход позволил нам на основании полученных данных глубже исследовать структуру популяции современных штаммов *C. diphtheriae*.

Предположение о значительном влиянии горизонтального переноса генов на формирование популяции *C. diphtheriae* высказывалось и ранее [17]. Так, описаны механизмы переноса генов, ответственных за антибиотикоустойчивость [28] и факторы патогенности [29]. Состав DtxR-регулона в различных штаммах *C. diphtheriae* также может изменяться вследствие получения, утраты, частичной делеции генов, оказывающих влияние на обеспечение бактериальной клетки железом и, следовательно, на экспрессию гена *tox* [1, 30]. Обнаруженная нами взаимосвязь между сиквенс-типом и аллелем *dtxR* подтверждает ранее

высказанную идею, что наличие гомологичной рекомбинантной изменчивости у *C. diphtheriae* не перекрывает полностью филогенетический сигнал [17]. В то же время проведенный нами анализ структуры популяции *C. diphtheriae* не показал прямого соответствия между биофармом и аллелем *dtxR*, что подтверждает отсутствие филогенетической основы данной классификации, обусловленное, предположительно, распространенностью горизонтального переноса генов [31].

Сравнение последовательностей *dtxR* исследуемых штаммов показало, что менее половины (45 %) из них идентичны референсной. Из 18 полиморфизмов лишь один был выявлен впервые (позиция 358), однако он не затрагивал аминокислотную последовательность. Наиболее распространенным был синонимичный полиморфизм в позиции 273 гена *dtxR*, который встречался у 14 штаммов *C. diphtheriae*. В сравнении с другими работами современные штаммы, выделенные на территории РФ, обладают относительно малым разнообразием вариантов первичной структуры DtxR [26, 27].

Стоит отметить, что, хотя *dtxR* влияет на устойчивость бактерий к окислительному стрессу, он не является жизненно важным геном для *C. diphtheriae* в обычных условиях [32], что подтвердил эксперимент с мутантным штаммом с нарушенной функцией DtxR [33]. Тем не менее в изученных последовательностях значимых изменений, которые могли бы привести к синтезу функционально неактивного белка, обнаружено не было. Два повторно выявленных однонуклеотидных полиморфизма действительно приводили к замене аминокислот, однако данные изменения согласно анализу структур, представленных в базе данных PDB, предположительно, не оказали влияния на фолдинг белка. Вероятно, функционально значимые полиморфизмы в гене *dtxR* снижают приспособленность штаммов к существованию внутри организма млекопитающего, таким образом ограничивая распространение в популяции *C. diphtheriae* аллелей, приводящих к синтезу дефектного белка. Предположение о том, что DtxR находится под контролем стабилизирующего отбора подтверждает полученное значение индекса K_a/K_s .

Реализация патогенного потенциала *C. diphtheriae* не всегда связана со способностью штамма к выработке дифтерийного токсина. Так, нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* в настоящее время стали чаще являться причиной серьезных заболеваний, в частности, эндокардитов [34], артритов [35] и остеомиелитов [36]. Особую

Таблица 3. Состав групп в соответствии с комбинацией полиморфизмов в гене *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae*

Группа	Количество замен в гене <i>dtxR</i> относительно штамма PW8	Число штаммов	Биофарм (число штаммов)	Токсигенность (число штаммов)	Сиквенс-тип
1	–	20	mitis (18), gravis (2)	нетоксигенные (15)	*
				НТТН-штаммы (3)	76
				токсигенные (2)	5, 46
2	1	5	mitis	НТТН-штаммы	40
3	1	9	gravis (1), mitis (8)	токсигенные (8)	25
				нетоксигенные (1)	123
4	3	5	mitis	токсигенные	28, 67
5	15	1	mitis	нетоксигенный	–
6	12	1	gravis	токсигенный	8
7	7	4	gravis	токсигенные	8

Примечание. * — МЛСТ не проводили, – — ST не обнаружен в базе данных.

опасность нетоксигенные штаммы представляют для иммунокомпрометированных лиц [37, 38]. Данный факт требует расширения подходов к идентификации *C. diphtheriae*, т. к. существующие методы в большинстве случаев ориентированы на выявление токсигенных штаммов.

Проведенные нами исследования подтвердили наличие *dtxR* в геноме токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, что позволяет говорить о практической ценности ПЦР-идентификации *C. diphtheriae*, предложенной ранее [39]. Последующее секвенирование показало преимущественное расположение полиморфизмов в части последовательности, соответствующей С-концевому домену DtxR [15]. Тем не менее варианты замен нуклеотидов, в том числе впервые выявленный, встречались и в других частях гена (позиции 66, 126, 225, 273, 358). Одна из таких замен (позиция 126), обнаруженная у 5 штаммов (группа 2), находилась в области праймера, предложенного для ПЦР-*dtxR* в нескольких других работах [15, 39]. Апробированная в данном исследовании пара праймеров обладала высокой специфичностью, что подтверждено отсутствием ложноположительных результатов. Таким образом, идентификация *C. diphtheriae* методом ПЦР представляет собой перспективное направление в диагностике дифтерии и инфекций, ассоциированных с нетоксигенными штаммами.

ВЫВОДЫ

В исследовании проведен анализ структуры популяции *C. diphtheriae*, основанный на вариантах аллеля гена *dtxR*. Отличными от референсной последовательности *dtxR* оказались 55 % штаммов, при этом большинство обнаруженных однонуклеотидных полиморфизмов было синонимичным. Отсутствие в исследованиях диких штаммов с нарушенной продукцией DtxR и высокое сходство анализируемых нуклеотидных последовательностей позволяет говорить о высокой активности отрицательного отбора, направленного на поддержание в популяции существующей последовательности репрессора дифтерийного токсина.

Наличие гомологичной рекомбинантной изменчивости действительно снижает уровень филогенетического сигнала, но не перекрывает его полностью. В результате проведенной работы были обнаружены определенные ассоциации между аллельными вариантами *dtxR* и такими параметрами, как токсигенность и принадлежность к биовару.

Полученные нами результаты позволяют заключить, что *dtxR* является консервативной последовательностью, и рекомендовать детекцию продуктов ПЦР *dtxR* как точный метод идентификации токсигенных и в особенности нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Литература

1. Trost E, Blom J, Soares S de C, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schröder J, et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *J Bacteriol.* 2012 Jun; 194 (12): 3199–215.
2. Deng Q, Barbieri JT. Molecular Mechanisms of the Cytotoxicity of ADP-Ribosylating Toxins. *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62 (1): 271–88.
3. Комбарова С. Ю., Борисова О. Ю., Мельников В. Г., Наумов Л. С., Нарвская О. В., Мокроусов И. В. и др. Наблюдение за циркуляцией штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, различающихся по признаку токсигенности. *Мед. альманах.* 2009; (2): 108–11.
4. Мельников В. Г., Комбарова С. Ю., Борисова О. Ю., Воложанцев Н. В., Вережкин В. В., Волковой К. И. и др. Характеристика нетоксигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, несущих ген дифтерийного токсина. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2004; (1): 3–7.
5. Merchant AT, Spatafora GA. A role for the DtxR family of metalloregulators in gram-positive pathogenesis. *Mol Oral Microbiol.* 2014 Feb; 29 (1): 1–10.
6. Dinu S, Damian M, Badell E, Dragomirescu CC, Guiso N. New diphtheria toxin repressor types depicted in a Romanian collection of *Corynebacterium diphtheriae* isolates. *J Basic Microbiol.* 2014 Oct; 54 (10): 1136–9.
7. Yellaboina S, Ranjan S, Chakhaiyar P, Hasnain SE, Ranjan A. Prediction of DtxR regulon: identification of binding sites and operons controlled by Diphtheria toxin repressor in *Corynebacterium diphtheriae*. *BMC Microbiol.* 2004 Sep 24; 4: 38.
8. Agranoff DD, Krishna S. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol Microbiol.* 1998 May; 28 (3): 403–12.
9. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12 (10): 1161–208.
10. Rolerson E, Swick A, Newlon L, Palmer C, Pan Y, Keeshan B, et al. The SloR/Dlg metalloregulator modulates *Streptococcus mutans* virulence gene expression. *J Bacteriol.* 2006 Jul; 188 (14): 5033–44.
11. Reyes-Caballero H, Campanello GC, Giedroc DP. Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. *Biophys Chem.* 2011 Jul; 156 (2–3): 103–14.
12. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. *Lewin's Genes XI.* 11th ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning; 2014.
13. D'Aquino JA, Ringe D. Mechanism of metal ion activation of the diphtheria toxin repressor DtxR. *AIP Conf Proc.* 2006; 851: 196–8.
14. Bhattacharya N, Yi M, Zhou HX, Logan TM. Backbone Dynamics in an Intramolecular Polyprotein-SH3 Complex from the Diphtheria Toxin Repressor, DtxR. *J Mol Biol.* 2007 Dec 7; 374 (4): 977–92.
15. Nakao H, Mazurova IK, Glushkevich T, Popovic T. Analysis of heterogeneity of *Corynebacterium diphtheriae* toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, by direct sequencing. *Res Microbiol.* 1997 Jan; 148 (1): 45–54.
16. Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics.* 2004 Oct 12; 20 (15): 2471–2.
17. Bolt F, Cassiday P, Tondella ML, DeZoysa A, Efstratiou A, Sing A, et al. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Clin Microbiol.* 2010 Nov; 48 (11): 4177–85.
18. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004 Mar 19; 32 (5): 1792–7.
19. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* 1986 Sep; 3 (5): 418–26.
20. Patefield WM. Algorithm AS 159: An Efficient Method of Generating Random $R \times C$ Tables with Given Row and Column Totals. *J R Stat Soc Ser C Appl Stat.* 1981; 30 (1): 91–7.
21. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 27; 101 (30): 11030–5.
22. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016 Jul; 33 (7): 1870–4.
23. Борисова О. Ю., Чагина И. А., Чаплин А. В., Комбарова

- ва С. Ю., Кафарская Л. И., Алешкин В. А. Особенности структуры гена *tox*, кодирующего дифтерийный токсин штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России в 2010–2015 гг. *Инфек. бол.* 2015; 13 (3): 12–7.
24. Yang Z, Bielawski JP. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol.* 2000 Dec 1;15(12):496-503.
 25. Комбарова С. Ю., Мазурова И. К., Мельников В. Г., Костокова Н. Н., Волкова К. И., Борисова О. Ю. и др. Генетическая структура штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России при разной интенсивности эпидемического процесса дифтерии. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2001; (3): 3–8.
 26. De Zoysa A, Efstratiou A, Hawkey PM. Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (*dtxR*) genes present in nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan; 43 (1): 223–8.
 27. Комбарова С. Ю., Борисова О. Ю., Мельников В. Г., Губина Н. И., Лосева Л. В., Мазурова И. К. Полиморфизм генов *tox* и *dtxR* у циркулирующих штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2009; (1): 7–11.
 28. Serwold-Davis TM, Groman N, Rabin M. Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum*, and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jul; 84 (14): 4964–8.
 29. Sangal V, Blom J, Sutcliffe IC, von Hunolstein C, Burkovski A, Hoskisson PA. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. *BMC Genomics.* 2015 Oct 9; 16: 765.
 30. Drazek ES, Hammack CA, Schmitt MP. *Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. *Mol Microbiol.* 2000 Apr; 36 (1): 68–84.
 31. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, Edwards B, Blom J, Hoskisson PA. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing. *Infect Genet Evol.* 2014 Jan; 21: 54–7.
 32. Oram DM, Avdalovic A, Holmes RK. Construction and characterization of transposon insertion mutations in *Corynebacterium diphtheriae* that affect expression of the diphtheria toxin repressor (*DtxR*). *J Bacteriol.* 2002 Oct; 184 (20): 5723–32.
 33. Boyd JM, Hall KC, Murphy JR. DNA sequences and characterization of *dtxR* alleles from *Corynebacterium diphtheriae* PW8(-), 1030(-), and C7hm723(-). *J Bacteriol.* 1992 Feb; 174 (4): 1268–72.
 34. Muttaiyah S, Best EJ, Freeman JT, Taylor SL, Morris AJ, Roberts SA. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: A case series and review of the treatment approach. *Int J Infect Dis.* 2011 Sep; 15 (9): e584–8.
 35. Barakett V, Morel G, Lesage D, Petit JC. Septic arthritis due to a nontoxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* subspecies *mitis*. *Clin Infect Dis.* 1993 Sep; 17 (3): 520–1.
 36. Farfour E, Badell E, Zasada A, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, et al. Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. *J Clin Microbiol.* 2012 Jan; 50 (1): 173–5.
 37. Lake JA, Ehrhardt MJ, Suchi M, Chun RH, Willoughby RE. A Case of Necrotizing Epiglottitis Due to Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Pediatrics.* 2015 Jul; 136 (1): e242–5.
 38. Wojewoda CM, Koval CE, Wilson DA, Chakos MH, Harrington SM. Bloodstream Infection Caused by Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in an Immunocompromised Host in the United States. *J Clin Microbiol.* 2012 Jun; 50 (6): 2170–2.
 39. Pimenta FP, Matias GA, Pereira GA, Camello TC, Alves GB, Rosa AC, et al. A PCR for *dtxR* gene: Application to diagnosis of non-toxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Cell Probes.* 2008 Jun; 22 (3): 189–92.

References

1. Trost E, Blom J, Soares S de C, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schröder J, et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *J Bacteriol.* 2012 Jun; 194 (12): 3199–215.
2. Deng Q, Barbieri JT. Molecular Mechanisms of the Cytotoxicity of ADP-Ribosylating Toxins. *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62 (1): 271–88.
3. Kombarova SU, Borisova OU, Melnikov VG, Naumov LS, Narvskaya OV, Mokrousov IV, et al. [Observation of circulation of *Corynebacterium diphtheriae* strains differing in toxigenicity character]. *Meditsinskii al'manakh.* 2009; (2): 108–11. Russian.
4. Mel'nikov VG, Kombarova Slu, Borisova Olu, Volozhantsev NV, Verevkin VV, Volkovoj KI, et al. [*Corynebacterium diphtheriae* nontoxigenic strain carrying the gene of diphtheria toxin]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2004 Jan–Feb; (1): 3–7. Russian.
5. Merchant AT, Spatafora GA. A role for the *DtxR* family of metalloregulators in gram-positive pathogenesis. *Mol Oral Microbiol.* 2014 Feb; 29 (1): 1–10.
6. Dinu S, Damian M, Badell E, Dragomirescu CC, Guiso N. New diphtheria toxin repressor types depicted in a Romanian collection of *Corynebacterium diphtheriae* isolates. *J Basic Microbiol.* 2014 Oct; 54 (10): 1136–9.
7. Yellaboina S, Ranjan S, Chakhaiyar P, Hasnain SE, Ranjan A. Prediction of *DtxR* regulon: identification of binding sites and operons controlled by Diphtheria toxin repressor in *Corynebacterium diphtheriae*. *BMC Microbiol.* 2004 Sep 24; 4: 38.
8. Agranoff DD, Krishna S. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol Microbiol.* 1998 May; 28 (3): 403–12.
9. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12 (10): 1161–208.
10. Rolerson E, Swick A, Newlon L, Palmer C, Pan Y, Keeshan B, et al. The SloR/Dlg metalloregulator modulates *Streptococcus mutans* virulence gene expression. *J Bacteriol.* 2006 Jul; 188 (14): 5033–44.
11. Reyes-Caballero H, Campanello GC, Giedroc DP. Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. *Biophys Chem.* 2011 Jul; 156 (2–3): 103–14.
12. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. *Lewin's Genes XI.* 11th ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning; 2014.
13. D'Aquino JA, Ringe D. Mechanism of metal ion activation of the diphtheria toxin repressor *DtxR*. *AIP Conf Proc.* 2006; 851: 196–8.
14. Bhattacharya N, Yi M, Zhou HX, Logan TM. Backbone Dynamics in an Intramolecular Prolylpeptide-SH3 Complex from the Diphtheria Toxin Repressor, *DtxR*. *J Mol Biol.* 2007 Dec 7; 374 (4): 977–92.
15. Nakao H, Mazurova IK, Glushkevich T, Popovic T. Analysis of heterogeneity of *Corynebacterium diphtheriae* toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, by direct sequencing. *Res Microbiol.* 1997 Jan; 148 (1): 45–54.
16. Marshall OJ. *PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR.* *Bioinformatics.* 2004 Oct 12; 20 (15): 2471–2.
17. Bolt F, Cassidy P, Tondella ML, DeZoysa A, Efstratiou A, Sing A, et al. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Clin Microbiol.* 2010 Nov; 48 (11): 4177–85.
18. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004 Mar 19; 32 (5): 1792–7.
19. Nei M, Gojbori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* 1986 Sep; 3 (5): 418–26.

20. Patefield WM. Algorithm AS 159: An Efficient Method of Generating Random $R \times C$ Tables with Given Row and Column Totals. *J R Stat Soc Ser C Appl Stat.* 1981; 30 (1): 91–7.
21. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 27; 101 (30): 11030–5.
22. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016 Jul; 33 (7): 1870–4.
23. Borisova OYu, Chagina IA, Chaplin AV, Kombarova SYu, Kafarskaya LI, Aleshkin VA. [Specificities of the structure of the tox gene encoding diphtheria toxin of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Russia in 2010–2015]. *Infektsionnye bolezni.* 2015; 13 (3): 12–7. Russian.
24. Yang Z, Bielawski JP. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol.* 2000 Dec 1; 15(12):496–503.
25. Kombarova Slu, Mazurova IK, Mel'nikov VG, Kostiu-kova NN, Volkovoj KI, Borisova Olu, et al. [Genetic structure of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Russia during epidemics of various intensity]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2001 May–Jun; (3): 3–8. Russian.
26. De Zoysa A, Efstratiou A, Hawkey PM. Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (dtxR) genes present in nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan; 43 (1): 223–8.
27. Kombarova Slu, Borisova Olu, Mel'nikov VG, Gubina NI, Loseva LV, Mazurova IK. [Polymorphism of tox and dtxR genes in circulating strains of *Corynebacterium diphtheriae*]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2009 Jan–Feb; (1): 7–11. Russian.
28. Serwold-Davis TM, Groman N, Rabin M. Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum*, and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jul; 84 (14): 4964–8.
29. Sangal V, Blom J, Sutcliffe IC, von Hunolstein C, Burkovski A, Hoskisson PA. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. *BMC Genomics.* 2015 Oct 9; 16: 765.
30. Drazek ES, Hammack CA, Schmitt MP. *Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. *Mol Microbiol.* 2000 Apr; 36 (1): 68–84.
31. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, Edwards B, Blom J, Hoskisson PA. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing. *Infect Genet Evol.* 2014 Jan; 21: 54–7.
32. Oram DM, Avdalovic A, Holmes RK. Construction and characterization of transposon insertion mutations in *Corynebacterium diphtheriae* that affect expression of the diphtheria toxin repressor (DtxR). *J Bacteriol.* 2002 Oct; 184 (20): 5723–32.
33. Boyd JM, Hall KC, Murphy JR. DNA sequences and characterization of dtxR alleles from *Corynebacterium diphtheriae* PW8(-), 1030(-), and C7hm723(-). *J Bacteriol.* 1992 Feb; 174 (4): 1268–72.
34. Muttaiyah S, Best EJ, Freeman JT, Taylor SL, Morris AJ, Roberts SA. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: A case series and review of the treatment approach. *Int J Infect Dis.* 2011 Sep; 15 (9): e584–8.
35. Barakett V, Morel G, Lesage D, Petit JC. Septic arthritis due to a nontoxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* subspecies mitis. *Clin Infect Dis.* 1993 Sep; 17 (3): 520–1.
36. Farfour E, Badell E, Zasada A, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, et al. Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. *J Clin Microbiol.* 2012 Jan; 50 (1): 173–5.
37. Lake JA, Ehrhardt MJ, Suchi M, Chun RH, Willoughby RE. A Case of Necrotizing Epiglottitis Due to Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Pediatrics.* 2015 Jul; 136 (1): e242–5.
38. Wojewoda CM, Koval CE, Wilson DA, Chakos MH, Harrington SM. Bloodstream Infection Caused by Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in an Immunocompromised Host in the United States. *J Clin Microbiol.* 2012 Jun; 50 (6): 2170–2.
39. Pimenta FP, Matias GA, Pereira GA, Camello TC, Alves GB, Rosa AC, et al. A PCR for dtxR gene: Application to diagnosis of non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Cell Probes.* 2008 Jun; 22 (3): 189–92.