

## BUTUN GENOMI ASOSIDA TERI INFEKSIYASIDAN AJRATILGAN BRAZILIYA CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE SHTAMMINING VIRULENTLIGI VA MUTATSIYALARINI TAHLIL QILISH

Ilmiy rahbar: **Aitmuratova Gauzar Abatovna** – o‘qituvchi

**Aliyev Muhammadali Jamshid o‘g‘li** – talaba

**Anarbayev Abay Akbar o‘g‘li** – talaba

Toshkent davlat tibbiyot universiteti, Toshkent, O‘zbekiston

### **Annotatsiya**

Ushbu maqola Braziliya *Corynebacterium diphtheriae* difteriyaning O‘zbekistonda kam o‘rganilgan shtammlaridan biri bo‘lmish notoksigen *Corynebacterium diphtheriae* shtammlari haqida turli xil adabiyotlar tahlili asosida tayyorlandi. *Corynebacterium diphtheriae* teri infeksiyalari va endokarditni o‘z ichiga olgan bir qancha kasalliklar bilan bog‘langan bo‘lsa-da, ular ko‘plab mamlakatlarda nazorat qilinmaydi va ularning virulentlik va antibakterial qarshilik mexanizmlari yetarlicha o‘rganilmagan. Maqolaning asosiy mavzusi sifatida ajratib olingan shtamm in vitro sharoitida biofilm hosil qilish qobiliyatiga ega ega ekanligi va birinchi marta amalga oshirilgan *rpoB* genining struktura tahlili asosida kuzatilgan mutatsiyalarning *Corynebacterium diphtheriae* dagi rifampinga qarshilik qilishi mumkinligi ilgari surilgan. Ma’lumotlar shuni ko‘rsatdiki, *Corynebacterium diphtheriae* toksin hosil qiluvchi bo‘lmasa-da, antibakterial qarshilik va virulentlik bilan bog‘liq bir qancha genlarni o‘z ichiga oladi, bu esa toksin hosil qilmaydigan shtammlar ustida kengroq nazorat va funksional tadqiqotlar olib borish zaruratini o‘rtaga chiqaradi.

**Kalit so‘zlar:** *Corynebacterium diphtheriae*, rezistentlik, antibakterial qarshilik, in vivo, in vitro, biofilm, teri infeksiyalari, endokardit, notoksigen, virulentlik, difteriya toksini (DT), patogenlik.

# WHOLE-GENEUM ANALYSIS OF VIRULENCE AND MUTATIONS OF A BRAZILIAN CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE STRAIN ISOLATED FROM A SKIN INFECTION

Scientific supervisor: **Aitmuratova Gaukhar Abatovna** – teacher

**Aliyev Muhammadali Jamshid oqli** – student

**Anarbayev Abay Akbar oqli** – student

Tashkent State Medical University, Tashkent, Uzbekistan

## Annotation

This article was prepared based on a review of various literature on nonoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains, one of the least studied strains of Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* in Uzbekistan. Although *Corynebacterium diphtheriae* is associated with several diseases, including skin infections and endocarditis, they are not controlled in many countries, and their virulence and antibacterial resistance mechanisms are not sufficiently studied. The main focus of the article is the ability of the isolated strain to form biofilms in vitro and the possibility of mutations in *Corynebacterium diphtheriae* to resist rifampin based on the structural analysis of the *rpoB* gene, which was performed for the first time. The data showed that *Corynebacterium diphtheriae*, although not a toxin-producing strain, contains several genes associated with antibacterial resistance and virulence, which highlights the need for more extensive control and functional studies on non-toxin-producing strains.

**Keywords:** *Corynebacterium diphtheriae*, resistance, antibacterial resistance, in vivo, in vitro, biofilm, skin infections, endocarditis, non-toxigenic, virulence, diphtheria toxin (DT), pathogenicity.

## ПОЛНОГЕННЫЙ АНАЛИЗ ВИРУЛЕНТНОСТИ И МУТАЦИЙ БРАЗИЛЬСКОГО ШТАММА CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КОЖНОЙ ИНФЕКЦИИ

Научный руководитель: **Айтмуратова Гаухар Абатовна** – преподаватель

Алиев Мухаммадали Джамшид огли – студент

Анарбаев Абай Акбар огли – студент

Ташкентский государственный медицинский университет

Ташкент, Узбекистан

### **Аннотация**

Данная статья подготовлена на основе обзора различной литературы по неоксигенным штаммам *Corynebacterium diphtheriae*, одному из наименее изученных штаммов бразильской *Corynebacterium diphtheriae* в Узбекистане. Хотя *Corynebacterium diphtheriae* ассоциируется с рядом заболеваний, включая кожные инфекции и эндокардит, во многих странах они не контролируются, а механизмы их вирулентности и антибактериальной резистентности недостаточно изучены. Основное внимание в статье уделяется способности выделенного штамма образовывать биопленки *in vitro* и возможности мутаций в *Corynebacterium diphtheriae*, обеспечивающих устойчивость к рифампицину, на основе впервые проведенного структурного анализа гена *groV*. Полученные данные показали, что *Corynebacterium diphtheriae*, хотя и не является токсинпродуцирующим штаммом, содержит несколько генов, связанных с антибактериальной резистентностью и вирулентностью, что подчеркивает необходимость более тщательного контроля и функциональных исследований нетоксигенных штаммов.

**Ключевые слова:** *Corynebacterium diphtheriae*, резистентность, антибактериальная резистентность, *in vivo*, *in vitro*, биопленка, кожные инфекции, эндокардит, нетоксигенный, вирулентность, дифтерийный токсин (ДТ), патогенность.

### **Kirish**

*Corynebacterium* turi hozirda 167 ta haqiqiy turni o'z ichiga oladi [1,9], eng yaxshi tanilganlari esa *Corynebacterium diphtheriae* bo'lib, u difteriya kasalligining asosiy sababchisi hisoblanadi, bu kasallik nafas yo'llariga va ba'zida teriga ta'sir qilishi mumkin bo'lgan xavfli kasallikdir [2,5,12]. Difteriya toksini (DT) *Corynebacterium diphtheriae*ning asosiy virulentlik omilidir, u *Corynebacterium* turlarini lizogenlashtira

oladigan korinabakteriofaglar tomonidan olib yuriladigan tox geni tomonidan kodlanadi, bu esa toksin hosil qilmaydigan ajratib olingan shtammni toksin hosil qiladigan shtammga aylantiradi [2,3].

Difteriya toksoidiga qarshi emlash difteriya kasalliklarining dunyo bo‘ylab sonini sezilarli darajada kamaytirgan bo‘lsa-da, kasallik hanuz qayd etilmoqda. So‘nggi yillarda Hindiston, Jazoir, Gvineya, Niger va Nigeriya kabi mamlakatlarda avj olish holatlari kuzatilgan [4,6]. Evropaning ayrim davlatlarida ham, asosan teri shaklida, difteriya holatlari qayd etilgan; faqat 2022- va 2023-yillar orasida 281 holat hujjatlashtirilgan bo‘lib, ularning aksariyati Germaniya va Belgiya tomonidan bildirilgan [3,5]. Difteriya holatlarining davomiyligi, asosan, yetarli emlash qamrovining yo‘qligi bilan izohlanadi. Biroq, aylanuvchi shtamlarda tox genining variantlari aniqlanganini hisobga olsak [6,9,11], emlash bilan hosil bo‘lgan immunitetni chetlab o‘tishga qodir bo‘lgan, tuzilish jihatdan farq qiluvchi DT hosil qiluvchi shtamlarning paydo bo‘lishi ehtimoli ham e‘tiborga olinishi kerak.

*Corynebacterium diphtheriae*ning toksin hosil qilmaydigan shtamlari ham inson infeksiyalari, shu jumladan, invaziv kasalliklar va teri infeksiyalari bilan bog‘liq bo‘ladi [4,6,7]. Ma‘lumki, toksin hosil qiluvchi va hosil qilmaydigan *Corynebacterium diphtheriae* mavjud bo‘lgan teri jarohatlarini, masalan, jarrohlik yaralari, kuyishlar va hasharot chaqishi kabi oldindan mavjud bo‘lgan jarohatlarda kolonizatsiya qilishi mumkin, asosan, oyoqlar, oyoq va qo‘llarda. Ushbu infeksiyalangan jarohatlar ushbu patogenning rezervuarlar sifatida xizmat qiladi, ular atrof-muhitni ifloslantirishi va farengial infeksiyalariga nisbatan inson infeksiyalarini samaraliroq yuzaga keltiradi, zaif aholida difteriya epidemiyalari va mavjud og‘ir holatlarning kuchayishiga hissa qo‘shadi [8,10].

Butun genetik ketma-ketlikni (WGS) aniqlash bakterial patogenlarni kuzatish bo‘yicha global nazorat dasturlarida keng qo‘llanilmoqda. So‘nggi tadqiqotlar, jumladan, Jahon sog‘liqni saqlash tashkilotining pandemik va epidemik ehtimolga ega patogenlar uchun global genom kuzatuv strategiyasi (2022–2032) (Jahon sog‘liqni saqlash tashkiloti, 2022) jamoat salomatligini nazorat qilish va javob berishda WGSning muhim rolini ko‘zda tutadi. Shu nuqtai nazardan, genom ketma-ketlik *Corynebacterium diphtheriae*

shtammlarini aniqlash, molekulyar turkumlash va xususiyatlarini belgilash uchun qoʻllaniladi [6,10], bu turning genom xilma-xilligi va evolyutsiyasini tushunishga yordam beradi. Biroq, toksigen shtamlardan farqli oʻlaroq, notoksigen *Corynebacterium diphtheriae* koʻplab hududlarda, ayniqsa rivojlanayotgan mamlakatlarda yetarlicha nazorat olinmayapti, bu esa ularning epidemiologiyasi va klinik taʼsiri haqida cheklangan maʼlumotlarga olib keladi. Bundan tashqari, ularning antibakterial qarshiligi va virulentlik mexanizmlari kam oʻrganilgan boʻlib, ular gen qarshiligi, virulentlik rezervuarlari va ular ishtirokidagi umumiy kasalliklarda ularning ehtimoliy roli borligi boʻyicha xavotirlarni keltirib chiqaradi.

Ushbu tadqiqotda olingan genom in vitro va in vivo tahlillari birlashtirilib, Braziliya shtatida yashovchi emlangan oʻsmirning oyoq yarasidan ajratilgan, toksigen boʻlmagan, lekin virulent shtammning integratsiyalashgan xususiyati aniqlandi. Bundan tashqari, birinchi marta bu shtammdan rifampin qarshiligiga bogʻliq boʻlishi mumkin boʻlgan mutatsiyalarning strukturaviy tahlili ham tadqiq qilindi.

### **Material va metodlar**

#### **Bakterial shtamlarning kelib chiqishi**

Seara shtati qishloq hududida yashovchi 16 yoshli braziliyalik bemor, ilgari tashxis qoʻyilgan qoʻshimcha kasalliklari boʻlmagan va sogʻliqni saqlash tizimiga murojaat qilishning qiyin boʻlishi sababli, oyoqlarida yarali oʻchoqlar bilan qabul qilindi. Shifokor bilan maslahatlashgandan soʻng, yara suyuqligidan tampon olinib, laboratoriyada tahlil qilish uchun yuborildi.

Kultura tampon yordamida 5% qoʻy-qonli agar ustiga surtilgan va 37 °C da 48 soat davomida inkubatsiya qilingan. Shtamlarni aniqlash uchun MALDI-TOF MS tahlili (matritsa-yordamli lazerli desorbsiya-ionizatsiya massaspektrometriya) yarim avtomatik VITEK MS tizimida qoʻllanilgan. 1–3 koloniyali bakterial tomchini kerakli stakanga 1 mkl  $\alpha$ -siano-4-gidroksitsiankislota qoʻshib aralashtirilgan. Matritsa va namunalar qurib kristallasgandan soʻng, stakan VITEK MS tizimiga, asosan, ribosomal oqsillar massaspektrlarini olish uchun kiritilgan. Olingan massaspektrlar klinik ishlatish uchun tavsiya etilgan MYLA dasturiy taʼminoti 4.7.1 versiyasi maʼlumotlar bazasi yoki faqat

tadqiqotlar uchun Ruo SARAMIS dasturiy ta'minoti 4.16 versiyasi - Spectral Archive and Microbial Identification System bilan solishtirilgan, bu esa ularni aniqlash imkonini berdi.

### **In vitro antibakterial sezgirligi**

Testlarning sifat nazorati ham BrCAST hujjati (Braziliya antibakterial qarshilik testi qo'mitasi (BrCAST)) tomonidan tavsiya qilinganidek amalga oshirildi va *Streptococcus pneumoniae* ning ishlatilishini ham o'z ichiga oldi. Bunda antibiotiklardan: benzilpenitsilin (1 U), siprofloksotsin (5 µg), klindamitsin (2 µg), eritromitsin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), rifampin (5 µg) va trimethoprim-sulfametoksazol (1.25/23.75 µg) lar ishlatildi.

### **Biofilm hosil qilish qobiliyati, in vivo virulentligi tahlili va bakterial o'zaro ta'siri**

In vivo virulentlik testi modifikatsiyalar bilan o'tkazildi. Buning uchun, BHI o'rnatilgan *Corynebacterium diphtheriae* 1 kun davomida o'stirildi, kulturalari  $1 \times 10^{10}$  hujayra/mL ga moslashtirildi va ketma-ket  $1 \times 10^3$  hujayra/mL ga suyultirildi (1:10 v/v). 250–300 mg vaznli va melanizatsiya belgilaridan xoli bo'lgan o'nlab *Galleria mellonella* lichinkalari guruhi tanlandi. Bakterial hujayralar (10 µL) Hamilton shpritsi orqali har bir lichinkaning oxirgi o'ng oyog'i orqali to'g'ridan-to'g'ri gemotselga yuborildi. Lichinkalar 37 °C haroratda qorong'ida inkubatsiya qilindi va tirik qolish har 12 soatda 10 kun davomida kuzatildi. Tajriba uch marta takrorlandi va statistika farqlari log-rank testi yordamida aniqlandi.

### **Mutatsiyalarning strukturaviy tahlili**

Avvaliga, *Corynebacterium diphtheriae* RNK polimeraza Beta qismi (rpoB) dan olingan ketma-ketlikni BLAST orqali mutatsiyasiz ketma-ketlik (*Corynebacterium diphtheriae*) bilan solishtirildi. Rifampinga qarshilikka aloqador deb taxmin qilinadigan rpoB genidagi ushbu mutatsiyani tahlil qilish uchun, rifampin bilan *Mycobacterium tuberculosis* rpoB kompleksi va serin hamda asparaginni o'z ichiga olgan *Corynebacterium diphtheriae* rpoB PDB va NCBI ma'lumotlar bazalarida BLAST yordamida *Corynebacterium diphtheriae* rpoB (ushbu tadqiqotda fenilalanin va tirozin mavjud) maqsadli ketma-ketlikdan o'xshashlikni qidirish orqali olindi.

Shuningdek, rpoB TM-align algoritmining standart parametrlari orqali oqsil juftliklari oʻrtasida strukturaviy moslashuvlarni bajaradi [3,11]. Shu tarzda, mos keluvchi kontaktlarning oʻrtacha AVD (Mean Vector Distance) asosida ikkala *Corynebacterium diphtheriae* rpoB oʻrtasidagi farqlarni oʻlchash mumkin boʻldi [2,4,12].

### **Natijalar**

Inkubatsiyadan soʻng, yengil gemolizni amalga oshirgan oq, shaffof boʻlmagan koloniyalarning oʻsishi kuzatildi. Ushbu koloniyalarning Gram bilan boʻyash orqali optik-mikroskopik tekshiruv hujayralar orasidagi burchakli shakllar bilan siyrak joylashgan grammanfiy tayoqcha shakllarni koʻrsatdi. MALDI-TOF MS ushbu bakterial shtammni 99% ehtimol bilan *Corynebacterium diphtheriae* sifatida aniqladi. API Coryne tizimi shtammni *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis (96%) sifatida aniqladi. Shtamm tetrasiklin (16 mm; qarshilik chegarasi < 24 mm) va rifampin (13 mm; qarshilik chegarasi < 24 mm) ga qarshilik koʻrsatdi. Biroq, shtamm klindamitsin (30 mm; chegarasi  $\geq$  15 mm), eritromitsin (43 mm; chegarasi  $\geq$  24 mm; D-test manfiy), linezolid (35 mm; chegarasi  $\geq$  25 mm) va trimetoprim-sulfametoksazol (32 mm; chegarasi  $\geq$  23 mm) ga sezgir edi. Benzilpenitsillin (22 mm; chegarasi 12–49 mm) va siprofloksasin (36 mm; chegarasi 24–49 mm) ga yuqori taʼsir bilan sezgir edi. Benzilpenitsillin bilan yuqori taʼsirda sezgirligi tasdiqlandi.

### **Xulosa**

Ushbu tadqiqotda eʼtiborga olinishi kerak boʻlgan maʼlum cheklovlar mavjud. Eng muhimi, tahlillar yagona toksigen boʻlmagan *Corynebacterium diphtheriae* shtammi asosida oʻtkazilgan boʻlib, bu olingan natijalarni boshqa shtammlar yoki epidemiologik sharoitlarga umumlashtirish darajasini cheklaydi. Filogenetik jihatdan bogʻliq shtammlar bilan qiyosiy genom tahlillari oʻtkazgan boʻlsa-da, virulentlik potentsiali va antibakterial qarshilik mexanizmlari boʻyicha xulosalar *Corynebacterium diphtheriae* populyatsiyasini toʻliq aks ettirmasligi mumkin. Ushbu kuzatuvlarni tasdiqlash va kengaytirish uchun katta va turli xil toksigen boʻlmagan shtammlar toʻplamlarini oʻz ichiga olgan qoʻshimcha tadqiqotlar zarur. Oʻtkazilgan tadqiqotda olingan maʼlumotlar shuni koʻrsatadiki, teridan ajratib olingan toksigen boʻlmagan *Corynebacterium diphtheriae* shtammlari eʼtiborsiz

qoldirilmasligi kerak, chunki ular boshqa turdagi bakteriyalarning inson nishon hujayralariga oʻrnashishini qulaylashtirishi va pnevmoniya kabi ogʻir infeksiyalarning rivojlanishiga imkon berishi mumkin boʻlgan muhim virulenlilik omillaridan tashqari antibakterial qarshilik genlarini ham oʻz ichiga olishi mumkin. Bundan tashqari, toksigen boʻlmagan *Corynebacterium diphtheriae* shtammlari lizogeniya qobiliyati va DT ishlab chiqarishga qodir boʻlishi mumkinligini taʼkidlash muhimdir. Shunday qilib, ushbu shtammlar ajratib olingan joyidan qatʼi nazar ham kuzatib borilishi va mustaqil ravishda oʻrganilishi kerak.

### **Foydalanilgan adabiyotlat:**

1. Parte A., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J., Reimer L., Göker M. (2020). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70:5607–5612. 10.1099/ijsem.0.004332.
2. Prygiel M., Polak M., Mosiej E., Wdowiak K., Formińska K., Zasada A., (2022). New corynebacterium species with the potential to produce diphtheria toxin. *Pathogens* 11:1264. 10.3390/pathogens11111264.
3. Sangal V., Hoskisson P., (2020). Evolution, epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: New perspectives on an old foe. *Infect. Genet. Evol.* 43:364–370. 10.1016/j.meegid.2016.06.024.
4. Africa Centres for Disease Control and Prevention. (2023). *Diphtheria outbreak in Africa: Strengthening response capacities*. Available online at: <https://africacdc.org/news-item/diphtheria-outbreak-in-africa-strengthening-response-capacities/> (accessed October 11, 2023).
5. European Centre for Disease Prevention and Control. (2023). *Epidemiological update: Diphtheria cases in Europe*. Available online at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-diphtheria-cases-europe> (accessed August 18, 2023).
6. Will R., Ramamurthy T., Sharma N., Veeraraghavan B., Sangal L., Haldar P., et al (2021). Spatiotemporal persistence of multiple, diverse clades and toxins of *Corynebacterium diphtheriae*. *Nat. Commun.* 12:1500. 10.1038/s41467-021-21870-5.

7. Batista Araújo M., Bernardes Sousa M., ÂSeabra L. F., Caldeira L. A., Faria C. D., Bokermann S. et al (2021). Cutaneous infection by non-diphtheria-toxin producing and penicillin-resistant *Corynebacterium diphtheriae* strain in a patient with diabetes mellitus. *Access. Microbiol.* 3:284. 10.1099/acmi.0.000284.
8. Chêne L., Morand J., Badell E., Toubiana J., Janvier F., Marthinet H. et al (2024). Cutaneous diphtheria from 2018 to 2022: An observational, retrospective study of epidemiological, microbiological, clinical, and therapeutic characteristics in metropolitan France. *Emerg. Microbes Infect.* 13:2408324. 10.1080/22221751.2024.2408324.
9. World Health Organization. (2022). *Global genomic surveillance strategy for pathogens with pandemic and epidemic potential*. Geneva: World Health Organization.
10. Chorlton S., Ritchie G., Lawson T., Romney M., Lowe C. (2020). Whole-genome sequencing of *Corynebacterium diphtheriae* isolates recovered from an inner-city population demonstrates the predominance of a single molecular strain. *J. Clin. Microbiol.* 58:e01651-19. 10.1128/JCM.01651-19.
11. Zhang Y., Skolnick J. (2005). TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* 33:2302–2309. 10.1093/nar/gki524.
12. Pimentel V., Mariano D., Cantão L., Bastos L., Fischer P., de Lima L. et al (2021). VTR: A web tool for identifying analogous contacts on protein structures and their complexes. *Front. Bioinform.* 1:730350. 10.3389/fbinf.2021.730350.