

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 577.21:[579.871:616.931]-084/.085.375

КОЛОДКИНА
Валентина Леонидовна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ
ФОРМИРОВАНИЯ ПРОТЕКТИВНОГО
ПРОТИВОДИФТЕРИЙНОГО ИММУНИТЕТА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Минск 2019

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Научный консультант: **Титов Леонид Петрович**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, иностранный член РАН, заведующий лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Официальные оппоненты: **Жаворонок Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры инфекционных болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Коломиец Наталья Дмитриевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Максимова Наталья Павловна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой генетики биологического факультета Белорусского государственного университета

Оппонирующая организация: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии»

Защита состоится 22 мая 2019 года в 12.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, телефон: 8 (017) 277-16-21, e-mail: uchsovet@bsmu.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 03.18.04,
кандидат медицинских наук, доцент



А.П. Музыченко

ВВЕДЕНИЕ

Дифтерия – острое инфекционное заболевание, которое продолжает встречаться на всех континентах. Его вызывают токсигенные *Corynebacterium diphtheriae* (WHO, http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidencediphtheria.html). В результате реализации Расширенной программы иммунизации, принятой ВОЗ в 1974 г., заболеваемость дифтерией в мире значительно снизилась (с сотен тысяч случаев в 1980 г. до нескольких тысяч в 2006 г.). В 2005–2015 гг. в мире ежегодно регистрировалось около 5000 случаев (Clarke E.N.K., 2017), однако с 2016 г. начался подъем заболеваемости и в 2017 г. зарегистрировано 8819 случаев, из них 7053 – в странах Юго-Восточной Азии.

Крупнейшая вспышка дифтерии, возникшая в 90-е годы XX в. в странах бывшего Советского Союза (более 157 000 зарегистрированных случаев, 5000 – с летальным исходом за период 1990–1998 гг.) (Zakikhany K., Efstratiou A., 2012), оказалась самой большой от начала реализации Расширенной программы иммунизации, коснулась она и Республики Беларусь. Вспышка в стране свидетельствовала о необходимости проведения комплекса молекулярно-генетических исследований возбудителя для получения новых знаний и разработки мер по обеспечению и поддержанию контроля над инфекцией и дальнейшего совершенствования системы иммунопрофилактики. Эпидемия дифтерии, начавшись в эру вакцинации, показала недостаточность знаний о биологии возбудителя, факторов вирулентности, молекулярных основ патогенности, эволюции *C. diphtheriae*. Эрадикация возбудителя дифтерии как биологического вида не представляется возможной, поскольку антитоксический иммунитет, создаваемый анатоксином в результате иммунизации, не препятствует формированию бактерионосительства, поддерживающего скрытое течение инфекции и таким образом способствующего сохранению его в популяции человека. Все указанное свидетельствует о важности и необходимости изучения генома патогена, структуры его популяции, использования методов генотипирования для надзора и глобального мониторинга *C. diphtheriae*, выявления ведущих факторов, вирулентности и трансмиссивности.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Тема диссертационной работы соответствует пп. 4.2, 4.4 и 4.7 перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг. (Постановление Совета Министров Республики Беларусь № 512 от 17 мая 2005 г.), пп. 3.2, 4.1, 4.2 и 4.4 перечня приоритетных направлений научных исследований Республики

Беларусь на 2011–2015 гг. (Постановление Совета Министров Республики Беларусь № 585 от 19.04.2010) и п. 4 Указа Президента Республики Беларусь № 166 от 22 апреля 2015 г. «О приоритетных направлениях научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 гг.».

Диссертационное исследование выполнено в рамках НИР: «Молекулярно-биологическая характеристика коринебактерий дифтерии, циркулирующих в Республике Беларусь в период эпидемии дифтерии» (ГНТП «Инфекционные болезни», № гос. регистрации 19974335, 1997–1999 гг.); «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг в системе определения тактики элиминации дифтерии» («Фундаментальные и поисковые исследования», № гос. регистрации 20002768, 2000–2002 гг.); «Идентифицировать сайты точечных мутаций гена регулятора *dtxR* *C. diphtheriae* и определить ассоциацию с уровнем токсинопродукции. Адаптировать *signature-tagged mutagenesis* (STM) для идентификации генов вирулентности» (ГНТП «Разработка и использование генно-инженерных биотехнологий в интересах сельского хозяйства и медицины (Генетическая инженерия)», 2003–2006 гг.); «Разработать ускоренную индикацию и дать молекулярно-генетическую характеристику токсигенным штаммам рода *Corynebacterium* в клиническом материале больных разными формами дифтерии и носителей» (ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии», № гос. регистрации 20062778, 2006–2008 гг.); «Микробиологический надзор за дифтерией в Восточной Европе», (проект INCO-COPERNICUS IC15.СТ.98.0302, 1998–2001 гг.); «Изучение роли нетоксигенных *Corynebacterium diphtheriae* в эпидемиологии дифтерийной инфекции» (проект INTAS 01-2289, 2002–2004 гг.); «Европейская лабораторная сеть по надзору за дифтерией» (DG SANGO DIPNET S12.324473 (2001CVG4-012), 2003–2008 гг.); «Геномика и функциональная характеристика *Corynebacterium diphtheriae*» (договор о сотрудничестве между Республиканским научно-практическим центром эпидемиологии и микробиологии (РНПЦ ЭМ) и Университетом Нортумбрии в Ньюкасле, Великобритания, 2014–2016 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель: определить биологические и молекулярно-генетические маркеры эпидемических и неэпидемических вариантов *C. diphtheriae*, установить механизмы регуляции адгезии и токсинообразования, роль кор- и пан-генома, сиквенс-типов и механизмов изменчивости в распространении и элиминации штаммов и роль иммунологического пресса в контроле заболеваемости дифтерией.

Задачи исследования:

1. Установить фено- и генотипическую структуру (расшифровать биотипы и риботипы) популяции *C. diphtheriae*, выявить эпидемически значимые генотипы и динамику их распространения в разные периоды эпидемического процесса.

2. Определить роль нетоксигенных токснесущих штаммов в дифтерийной инфекции, изучить первичную структуру промоторной области гена *tox* и гена *dtxR*, оценить связь мутаций с уровнем токсинообразования.

3. Определить характер мутационного давления в гене *dtxR* *C. diphtheriae* и его влияние на экспрессию токсина. Установить иммуногенные области дифтерийного токсина и оценить перспективы их использования для создания новых вакцин.

4. Выявить отличительные адгезивные свойства эпидемических и неэпидемических штаммов *C. diphtheriae*, получить трансформанты со сниженной адгезивной активностью и выявить гены, ответственные за адгезию.

5. Провести полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей геномов эпидемических и неэпидемических *C. diphtheriae*, установить особенности кор- и пан-генома, доминирующие сиквенс-типы, характер генетической изменчивости и их связь с агрессивностью микроба.

6. Провести динамическое наблюдение за состоянием популяционного иммунитета к дифтерии и обосновать тактику вакцинации в разные периоды эпидемического процесса.

Объект исследования: изоляты, геномы *C. diphtheriae*, сыворотка крови.

Предмет исследования: адгезия, токсинопродукция *C. diphtheriae*, изменчивость, филогенетическое родство, эволюция *C. diphtheriae*, отличительные особенности эпидемических и неэпидемических риботипов, сиквенс-типов *C. diphtheriae*, сиквенсы геномов *C. diphtheriae*, популяционный иммунитет.

Научная новизна

1. Получены новые научные данные по фено- и генотипической характеристике *C. diphtheriae*, свидетельствующие, что в период эпидемии дифтерии в популяции *C. diphtheriae* доминировали штаммы эпидемического клона, относящиеся к биотипу *gravis*, риботипам Sankt-Peterburg и Rossija, сиквенс-типу (ST) ST8, циркулирующие на территории Беларуси. Показано, что на этапе снижения заболеваемости популяция *C. diphtheriae* еще длительное время сохраняет гомогенную структуру, обусловленную широким распространением доминирующих штаммов. Доказано, что выявленные в эпидемический период (1996–2002 гг.) нетоксигенные токснесущие штаммы (НТТН) (51 штамм) являлись нетоксигенными, не имеющими существенной значимости в эпидемическом процессе. Расшифрован молекулярный механизм отсутствия экспрессии гена *tox*, который заключается в делеции нуклеотида G в положении 52 гена *tox*, приведшей к сдвигу рамки считывания и экспрессии пептида из 37 аминокислот вместо полноценной молекулы дифтерийного токсина из 560 аминокислот.

2. Установлено наличие в структуре гена *dtxR* трех миссенс-мутаций в позициях 440 (A 147 V), 640 (L 214 I), 662 (I 221 T), не ассоциированных с уровнем токсинопродукции, и редко встречающейся мутации в промоторной области гена *tox* в позиции -54, определяющей повышенный уровень токсинопродукции у неэпидемических штаммов. Выявлена высокая степень генетической стабильности гена *tox*. Все 8 нуклеотидных замен, обнаруженных в генах *tox* секвенированных токсигенных штаммов в сравнении с геном *tox* вакцинного штамма PW8, являлись синонимичными, что обеспечивает стойкое сохранение иммуногенности токсина и эффективности используемой для иммунизации населения вакцины.

3. Впервые установлено наличие двух филогенетических линий патогена в результате филогенетического анализа, проведенного методом максимального правдоподобия (ML) нуклеотидных последовательностей кор-генома (1267 консервативных генов), полученных секвенированием 93 штаммов, изолированных в стране, двух референс штаммов: CCUG 2706A редкого биотипа *intermedius*, изолированного в довакцинальный период, и CCUG 5865 биотипа *belfanti*, и ранее опубликованных сиквенсов геномов 22 штаммов. Линия 1 включала 116 штаммов, относящихся к четырем биотипам, линия 2 – штамм CCUG 5865 биотипа *belfanti*, ST106. Все 93 штамма, изолированных в стране, относились к линии 1.

4. Впервые выявлены различия в механизмах молекулярной эволюции токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*. Показано, что главной движущей силой в эволюции нетоксигенных штаммов ST5 является рекомбинация. Мутации играют большую роль в обеспечении разнообразия токсигенного клона ST8, что может быть результатом потенциального влияния вакциноиндуцированного иммунологического пресса.

5. Впервые установлены молекулярные механизмы варибельности *C. diphtheriae* по уровню адгезивной активности на клетках HEp-2 как в пределах одного клона, так и между разными клонами, обусловленные отсутствием одного из кластера генов, кодирующих три типа пилей (SpaA, SpaD, SpaH), утратой функции некоторыми генами в кластерах генов пилей, а также наличием или отсутствием гена *sapA* и генов, кодирующих другие типы адгезинов. Установлено, что штаммы ST8 могут обладать более высокой способностью к адгезии и инвазии клеток хозяина в отличие от штаммов ST5, у которых отсутствовали ген *sapA*, Sdr-подобный адгезин и кластер генов пилей SpaA. Впервые установлено, что ген DIP1621, кодирующий инвазион-ассоциированную гидролазу, участвует в процессе адгезии у *C. diphtheriae*, что подтверждает мультифакторный механизм адгезии.

6. Впервые установлено, что штаммы эпидемического клона ST8 риботипов Sankt-Peterburg и Rossija имели большее число генов, участвующих

в адгезии в отличие от токсигенных штаммов неэпидемических клонов. У штаммов риботипа Lyon (ST25) отсутствовали все гены кластера пилей SpaH, ген *sarA* (DIP2066), а у штаммов риботипа Otchakov (ST28, 41, 53) отсутствовали гены, кодирующие минорные субъединицы SpaI, SpaG пилей SpaH, гены, кодирующие минорную субъединицу SpaE и ген *srtC* пилей SpaD, ген (DIP2093), кодирующий адгезин семейства Sdr. Установлено, что некор-геномы эпидемических и неэпидемических штаммов различались по содержанию белок-кодирующих последовательностей по 12 категориям функциональной активности COG. Среди эпидемических штаммов выявлены белки категории COG G, связанные с транспортом и метаболизмом углеводов, которые отсутствовали среди неэпидемических штаммов. Эпидемические штаммы имели большее число белков категории COG X, связанных с мобильностью и горизонтальной передачей генов, а также категории COG M, связанных с клеточной и внешней мембранами. Доля белков категории COG с множественными функциями также была больше среди эпидемических штаммов. Показано, что выявленные различия в основном обусловлены белок-кодирующими последовательностями, содержащимися в геномных островках, поэтому потенциально могут быть вовлечены в вирулентность или другие фенотипические характеристики, обеспечивающие преимущества эпидемическим штаммам. Только штаммы эпидемического клона, в отличие от неэпидемических, имели нуклеотидные замены в гене *dtxR* в положении 440 (С на Т) и 640 (С на А), которые привели к замене аминокислот в белке DtxR в положении 147 аланин → валин и в положении 214 лейцин → изолейцин.

7. Серологические исследования, проведенные до, во время эпидемии и в последующий период, впервые выявили закономерности формирования протективного противодифтерийного популяционного иммунитета и его роль в регуляции контроля интенсивности эпидемического процесса дифтерии. Обоснована и предложена тактика 3-кратной иммунизации взрослых старше 35 лет. Доказано, что эпидемия дифтерии развилась на фоне снижения иммунной прослойки среди населения до 79,6% с провалом в иммунитете у взрослых (54,2%) и долей серопозитивных у лиц старше 35 лет (31,2%). Уровень популяционного иммунитета в 1999–2001 гг. 92,4% с иммунной прослойкой 82,4% у лиц старше 40 лет и долей серопозитивных 77,6% в возрастной группе 45–54 года сдерживал эпидемический процесс на уровне единичных случаев. Установлено, что в 2017 г. уровень популяционного иммунитета 96,7% с колебаниями в возрастных группах от 87,7 до 100% позволил полностью контролировать инфекцию.

Положения, выносимые на защиту

1. Эпидемические подъемы заболеваемости дифтерией, как в довакцинальный период, так и в период вакцинации, обусловлены

биологической и генетической изменчивостью клональных вариантов возбудителя. В годы подъема заболеваемости дифтерией (1996–1997 гг.) и в начальный период ее снижения (1998–2001 гг.) в популяции *C. diphtheriae* доминировали штаммы биотипа *gravis* (61,1% и 56,7% соответственно), представленные риботипами Sankt-Peterburg и Rossija, составляющими эпидемический клон. Биотип *gravis* был доминирующим среди штаммов, выделенных из разных источников, особенно у пациентов с дифтерией (87,3% и 95,5% соответственно). Период низкой регистрации случаев (2002–2010 гг.) характеризовался сменой ведущего биотипа *C. diphtheriae*, которым стал биотип *mitis* (58,1%). Доля токсигенных штаммов биотипа *gravis* снизилась с 63,1% до 18,2%, биотипа *mitis* – с 9,8 до 2%, произошла элиминация из популяции редко встречающихся токсигенных и нетоксигенных риботипов.

2. Уровень токсинопродукции *C. diphtheriae* в цитотоксическом тесте в культуре клеток VERO варьировал от 40 до 20 480 VERO CD50/ml. Частота выявления штаммов с низким (40–80 VERO CD50/ml), средним (160–320 VERO CD50/ml) и высоким уровнем токсинопродукции (640–2560 VERO CD50/ml) среди эпидемических и неэпидемических штаммов не различалась и составила соответственно 10,5%, 38,6%, 50,9% и 12,5%, 29,2%, 50,0%, что указывает на отсутствие связи между токсинообразованием и формированием эпидемических клонов.

Замена нуклеотида Т на С в позиции –54, расположенной в палиндроме длиной 9 п.н., который перекрывает –10 последовательность промотора и область оператора гена *tox*, обусловила повышенный уровень токсинопродукции у двух штаммов неэпидемического риботипа (Close to Nan). Мутация отсутствовала у штаммов эпидемических риботипов Sankt-Peterburg и Rossija, характеризовавшихся низким, средним и высоким уровнями токсинопродукции. Две миссенс-мутации (А 147 V и L 214 I) в С-концевом, третьем домене регуляторного белка DtxR у штаммов риботипов Sankt-Peterburg и Rossija не сказывались на уровне токсинопродукции.

Адгезивная активность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* при исследовании в культуре клеток HEp-2 варьировала от 1 до 40%. Средний показатель адгезии в группе штаммов эпидемических риботипов Rossija и Sankt-Peterburg (70 штаммов, 8,1%) выше адгезивной активности штаммов неэпидемических риботипов (30 штаммов, 3,3%). Снижение адгезивной активности полученного транспозонным мутагенезом мутанта *C. diphtheriae* обусловлено вставкой транспозона в ген, кодирующий инвазион-ассоциированную гидролазу (DIP1621).

3. Полногеномное секвенирование штаммов *C. diphtheriae* позволяет получить новую информацию о геноме возбудителя, углубить понимание генетической структуры популяции, вирулентности, оценить значимость

молекулярных методов типирования и биотипирования, понять механизм клональной экспансии у *C. diphtheriae*.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей кор-генома (1267 генов) 117 штаммов, в том числе 93 изолированных в Республике Беларусь, 2 референс штаммов CCUG 2706A биотипа *intermedius*, изолированного в довакцинальный период, CCUG 5865 биотипа *belfanti*, сиквенс-типа ST106 и 22 штаммов, полученных из GenBank, выявил наличие 2 филогенетических линий: линия 1 включала 116 штаммов, относящихся к 4 биотипам *C. diphtheriae*, линия 2 – 1 штамм CCUG 5865 биотипа *belfanti*. Все 93 штамма трех биотипов (*gravis*, *mitis*, *belfanti*), изолированных в стране, относились к линии 1.

Основные сиквенс-типы и риботипы циркулирующих штаммов возбудителя дифтерии ассоциированы с группированием их на основе филогенетического анализа кор-генома и не согласовывались с данными биотипирования. Относительная роль рекомбинаций и мутаций в эволюции двух доминирующих клонов нетоксигенного сиквенс-типа ST5 и токсигенного клона сиквенс-типа ST8 различалась. Главной движущей силой в эволюции нетоксигенных штаммов ST5 была рекомбинация. Мутации играют большую роль в обеспечении разнообразия и распространения токсигенного клона сиквенс-типа ST8.

4. Анализ пан-генома (2884 гена, из них 1630 генов были кор-генами, 1254 – некор-генами) 33 штаммов *C. diphtheriae* (25 эпидемических, 8 неэпидемических), выявленных в Республике Беларусь, показал наличие существенных различий между эпидемическими и неэпидемическими штаммами: 52 гена присутствовали среди всех 25 эпидемических штаммов и отсутствовали среди неэпидемических, 38 генов присутствовали у неэпидемических и отсутствовали у эпидемических штаммов; выявлены белок-кодирующие последовательности, связанные с транспортом и метаболизмом углеводов категории COG G, которые отсутствовали у неэпидемических штаммов; эпидемические штаммы обладали всеми тремя кластерами генов, кодирующих 3 типа пилей SpaA, SpaD, SpaH, геном, кодирующим *BigA*-подобный адгезин (DIP2014), геном *sapA* (DIP2066), большинство штаммов имели ген (DIP2093), кодирующий адгезин семейства Sdr.

5. Динамическое наблюдение за частотой и уровнем антител к токсину *C. diphtheriae* показало наличие обратной связи между состоянием популяционного иммунитета и количеством случаев заболевания. Подъем заболеваемости дифтерией развился при снижении иммунной прослойки у населения менее 80,0%, ее провалом у взрослых (менее 55,0%) и особенно – резким дефицитом у лиц старше 35 лет (31,2%). Фактором, сдерживающим заболеваемость на спорадическом уровне, была иммунная прослойка 82,4% лиц старше 40 лет. Достижение уровня популяционного иммунитета 96,7%

с колебаниями в возрастных группах от 87,7 до 100% позволило полностью контролировать распространение инфекции.

Личный вклад соискателя ученой степени

Организация экспериментальных исследований, теоретическое обобщение полученных результатов, написание всех разделов работы и выводов выполнены лично автором. Автором совместно с научным консультантом сформулированы цели и задачи исследования. Данные биотипирования *C. diphtheriae*, анализа токсигенности штаммов в Elek-тесте и цитотоксическом тесте в культуре клеток VERO, анализа первичной структуры промоторной области гена *tox* и гена *dtxR*, транспозонного мутагенеза *C. diphtheriae*, адгезивной активности штаммов, анализа токсина, серологические исследования проведены на базе лаборатории иммунопрофилактики БелНИИЭМ (с 2009 г. – ГУ РНПЦ ЭМ) и представлены в публикациях [1, 3, 6, 8–20, 22, 24–26, 31–45, 47, 49–51, 53–57], личный вклад соискателя – 95%. Фаготипирование штаммов проводилось совместно с сотрудниками института Кантакузино (Бухарест, Румыния), риботипирование штаммов – совместно с сотрудниками института Центральной лаборатории общественного здравоохранения (Лондон, Великобритания), анализ НТТН штаммов методом блокирования полимеразной цепной реакции (ПЦР) пептидо-нуклеиновой кислотой (ПНК) выполнен совместно с сотрудниками ГНЦ прикладной микробиологии (Оболensk, Россия) участие которых отражено в совместных публикациях [2, 4, 5, 7, 27, 28, 29, 30, 46, 48, 52, 58], вклад соискателя – 70%. Анализ результатов полногеномного секвенирования штаммов, проведенного в Университете Нортумбрии (Ньюкасл, Великобритания), отражен в совместных публикациях [21, 23, 59], вклад соискателя – 70%. В соавторстве получено 2 патента [60–61], вклад соискателя – 85%, подготовлены и утверждены 3 инструкции по применению [62–64], вклад – 75%.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Основные результаты исследований доложены и обсуждены на организованном ВОЗ Региональном семинаре «Лабораторная диагностика дифтерии» (Гродно, 1996), на 6 республиканских конференциях и семинарах: «Актуальные вопросы эпидемиологии и лабораторной диагностики дифтерии» (Гомель, 1996), «Актуальные проблемы эпидемиологии и лабораторной диагностики вакциноуправляемых инфекций в Республике Беларусь» (Минск, 1999; Минск, 2005; Минск, 2008; Минск, 2011); «Эпидемиология управляемых и аэрозольных инфекций, эпидситуация, перспективы совершенствования эпиднадзора» (Минск, 2007); на 2 международных конференциях «Идеи Пастера в борьбе с инфекцией» (Санкт-Петербург, 1998, 2003); на 5-м и 6-м международных форумах по глобальной вакцинологии «Вакцины и иммунизация» (Минск, 2001, 2003); на 2 научно-практических конференциях

РНПЦ ЭМ с международным участием: «Юбилейная конференция, посвященная 80-летию БелНИИЭМ» (Минск, 2004) и «Современные концепции и методы в микробиологии, вирусологии, иммунологии» (Минск, 2017), на совещаниях Международной лабораторной рабочей группы ВОЗ по дифтерии и Проекта по контролю за дифтерией в странах Европейского Союза (Бухарест, 1997; Халкидики, 1998; Брюссель, 2000; Вена, 2002; Копенгаген, 2004; Вольягмени, 2006; Ларнака, 2008; Рига, 2009), на Международной конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, 2018).

Результаты диссертации были использованы при разработке диагностической тест-системы для выявления дифтерийного токсина методом иммунодот-анализа «Дот коринетокс», регистрационное удостоверение № ИМ-7.95188/0911 от 03.03.2009, совершенствовании системы эпидемиологического надзора и тактики иммунизации взрослых против дифтерии, что нашло отражение в нормативно-правовых актах Министерства здравоохранения Республики Беларусь 1996 г., 1999 г., 2000 г., 2004 г.

Опубликование результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано 59 научных работ, в том числе 23 статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих п. 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь» (19,64 авторских листа), из них в зарубежных научных изданиях – 12 (9 статей в странах дальнего зарубежья, 3 статьи в странах ближнего зарубежья) (11,93 авторских листа); 10 статей в сборниках научных трудов и материалах конференций (2,42 авторских листа); 26 тезисов докладов (2,31 авторских листа). Общий объем опубликованных материалов составил 24,37 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 205 страницах компьютерного текста, проиллюстрирована 25 таблицами и 37 рисунками (всего – 31 страница), состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, материала и методов исследования, 5 глав результатов собственных исследований, заключения, списка использованных источников литературы, включающего 14 русскоязычных и 237 англоязычных авторов (29 страниц), списка публикаций соискателя и 4 приложений (13 страниц).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

В работе исследованы 4385 изолятов *C. diphtheriae*, выделенных во всех областях Беларуси у пациентов с дифтерией (400), с тонзиллофарингитом (2628), контактных лиц (450) и здоровых носителей (907) в период 1996–2015 гг., 12 079 образцов сывороток крови, собранных в период 1989–2017 гг.

Определение биотипа, анализ токсигенности в Elek-тесте 4385 изолятов проводились в соответствии с руководством ВОЗ по лабораторной диагностике дифтерии (Efstratiou A., 1994).

Уровень токсинопродукции (УТ) изучен у 81 штамма *C. diphtheriae* в цитотоксическом тесте в культуре клеток VERO в соответствии с методикой, описанной J.R. Murphy и соавт. (1978).

Фаготипирование 284 штаммов проводилось с использованием двух типизирующих схем для *C. diphtheriae*: первоначальной, описанной A. Saragea и соавт., и дополнительной, описанной P. Maximescu и соавт.

Риботипирование 478 штаммов выполнено в соответствии с рекомендациями Международной лабораторной рабочей группы ВОЗ по дифтерии (Grimont P. и соавт., 2004).

Нетоксигенные в Elek-тесте 578 *C. diphtheriae* изучены в полимеразной цепной реакции с праймерами, описанными M. Pallen (1991), на наличие гена *tox*. Для установления мутации в гене *tox* все 51 НТТН штамм исследованы методом блокирования ПЦР ПНК. Секвенирование фрагмента гена *tox* осуществлялось с использованием праймеров Dipht1 5'TTGCTAGTGAAGCTTAGCTAG3', и Dipht2 5'GAATGGAATCTACATAACCAGG3'.

Амплификация промоторной области гена *tox* проводилась с использованием 2 пар праймеров: Toxpr_SSCP F (5'CCATGTAACCAATCTATCAA3') и Toxpr_SSCP R (5'ATTGACGCAAACAGTTTTTCT3'); Toxpr F (5'CGTTGCGTATCCAGTGGCTAC3') и Toxpr R (5'CATCATCAGCGCCTGCATG3').

Амплификация регулярного гена *dtxR* выполнялась с использованием праймеров, описанных H. Накао и соавт. (1997).

Адгезивная активность 100 токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, риботипов Sankt-Peterburg (32 штамма), Rossija (38 штаммов) и других (30 штаммов) изучалась в культуре клеток HEp-2 в соответствии с методикой, описанной J. Jadoun и соавт. (1998) и R. Hirata и соавт. (2000).

Трансформация *C. diphtheriae* проводилась в соответствии с методикой, описанной W. Leibl и соавт. (1989) для *Corynebacterium glutamicum*, D.L. Oram и соавт. (2002) для *C. diphtheriae* с некоторой модификацией электропорацией штамма *C. diphtheriae* EZ::TN(KAN-2)Tnp транспосомой. У 585 канамицин-резистентных трансформантов изучена адгезивная активность в культуре клеток HEp 2. Инвертированная ПЦР трансформантов выполнена с использованием праймеров KAN2FP 5'ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC3' и KAN2RP 5'GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG3'.

Полногеномное секвенирование 93 *C. diphtheriae* (53 *gravis*, 29 *mitis*, 11 *belfanti*, изолированных в Беларуси с 1996 по 2014 г., за исключением 1 штамма, изолированного в 1979 г.), а также 2 референс штаммов: CCUG 2706A редкого биотипа *intermedius*, ST143, изолированного в довакцинальный период

в 1932 г., и CCUG 5865 биотипа *belfanti*, ST106, изолированного в 1963 г., выполнено на платформе Illumina MiSeq. Сборка прочитанных нуклеотидных последовательностей ДНК осуществлялась с использованием CLC Genomic Workbench (Qiagen) (<http://www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench/>) или SPAdes 3.9.0. (Bankevich A. и соавт., 2012). Собранные геномы представлялись в GenBank для аннотации с помощью NCBI Prokariotic Genome Annotation Pipeline (Tatusova T. и соавт., 2013). Сравнительный анализ полного набора данных 117 геномов выполнен с использованием программы EDGAR (Blom J. и соавт., 2016). Ортологичные гены вирулентности, включая *sapA* (DIP2066), адгезин Sdr (DIP2093) и BigA-подобный адгезин (CDC7B_1983; DIP2014) исследованы в наборе данных с использованием программы EDGAR. Мультилокусный сиквенс-тип профиль получен из сиквенса генома, используя MLST 1.8 (Larsen M.V. и соавт., 2012). Нуклеотидные последовательности конкатенированного кор-генома были выравнены с использованием программы MUSCLE (Edgar R.C., 2004), плохо выравненные области удалены GBLOCKS (Talavera G. и соавт., 2007). Филогенетическое дерево максимального правдоподобия на основе выравненного кор-генома формировалось с использованием модели GTR+I+G4 в соответствии с байесовским информационным критерием с 100 000 SH-подобными приблизительными критериями отношения правдоподобия (SH-aLRT) и 100 000 сверхбыстрыми итерациями бутстрэпа с использованием IQ-Tree (Nguyen L.T. и соавт., 2015). Участки в кор-геноме, полученные в результате рекомбинации, идентифицированы с использованием Gubbins (Croucher N.J. и соавт., 2015) и замаскированы в выровненном кор-геноме с использованием программного скрипта maskrc-svg.py, предоставленного J. Kwong и T. Seemann (<https://github.com/kwongj/maskrc-svg>). Кор-геномы штаммов ST5 и ST8 анализировали с помощью tempEST версия 1.5 с датами образцов и критериями наилучшего соответствия для определения временного сигнала (Rambaut A. и соавт., 2016). Мутационный показатель из выровненных последовательностей рассчитывали, используя BEAST (Drummond A.J. и соавт., 2012).

Иммунологическая эффективность иммунизации против дифтерии оценивалась по накоплению антител в парных сыворотках, взятых накануне и через 30–45 дней после 1-го, 2-го и 3-го введения АДС-М анатоксина соответственно у 104, 44 и 26 привитых в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). Оценка противодифтерийного и противостолбнячного иммунитета в зависимости от кратности полученных доз вакцины проводилась у 731 привитого взрослого 18–60 лет, в том числе после 1-й дозы – у 290, после 2-й – у 383, после 3-й – у 58. На наличие противодифтерийных и противостолбнячных антител класса G в РПГА исследованы 3957 сывороток крови лиц 0–68 лет (1989–1994 гг.), 5518 сывороток лиц 0–79 лет (1996–2001 гг.), 826 сывороток

крови лиц 20–59 лет (2004 г.) и 785 сывороток лиц 1–76 лет (2017 г.) – с помощью иммуноферментного анализа. РПГА выполняли микрометодом с дифтерийным и столбнячным эритроцитарными диагностикумами производства «Микроанализ» (Москва), иммуноферментный анализ – с использованием тест-систем Virion/Serion (Германия). Уровень противодифтерийных и противостолбнячных антител оценивали в соответствии с международным стандартом: менее 0,01 МЕ/мл – ниже защитного уровня, 0,01–0,09 МЕ/мл – минимально защитный, от 0,1 МЕ/мл и до менее 1 МЕ/мл – защитный, от 1,0 МЕ/мл и более – высокозащитный.

Результаты исследований обработаны с использованием параметрических и непараметрических методов вариационной статистики с использованием компьютерных программ Statistica 6.0, Statgrafics, Epi Info 5.0, Excel 2002, биоинформатических программ BLAST, BioEdit, Clastal, MEGA.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фено- и генотипическая характеристика популяции *C. diphtheriae* в разные периоды эпидемического процесса (1996–2015 гг.). Противоэпидемические мероприятия, связанные главным образом с иммунопрофилактикой, начиная с 1957 г. позволили резко снизить заболеваемость и к концу 60-х гг. достичь практически полного контроля над заболеванием (рисунки 1 и 2).



Рисунок 1. – Динамика заболеваемости дифтерией в Беларуси в 1945–1981 гг.



Рисунок 2. – Динамика заболеваемости дифтерией в Беларуси в 1982–2018 гг.

На протяжении 14 лет, с 1970 по 1983 г., в стране ежегодно выявлялось не более 10 случаев дифтерии, за исключением 1974 г. (25 случаев). За этот период заболеваемость составила 0,047 на 100 000 населения. Начиная с 1984 г. отмечалось медленное нарастание заболеваемости: резкий подъем начался с 1992 г. (68 случаев) и достиг пика в 1995 г. (319 случаев). В целом в течение 6 лет подъема (1992–1997 гг.) зарегистрировано 1012 случаев дифтерии (из них 28 (2,8%) с летальным исходом), что почти в 3,5 раза выше, чем за 25-летний период (1967–1991), в течение которого зарегистрирован 291 случай. Заболеваемость за 1992–1997 гг. составила 1,64 на 100 000 населения и была в 7,8 раза выше, чем в 1984–1991 гг. и в 33 раза выше, чем в 1970–1983 гг.

За 20-летний период (1996–2015 гг.) молекулярного мониторинга возбудителя дифтерии из 4 биотипов выделены 3: *gravis*, *mitis* и *belfanti*. Из 4385 штаммов к биотипу *gravis* относились 2138 (48,7%), к биотипу *mitis* – 2069 (47,2%), к биотипу *belfanti* – 178 (4,1%) (таблица).

Таблица. – Частота выявления биотипов *C. diphtheriae* в Республике Беларусь (1996–2015 гг.)

Годы	Всего	Биотип, абс. (% (M±m))			P
		<i>gravis</i>	<i>mitis</i>	<i>belfanti</i>	
1996–1997	896	547 (61,1±2,0*)	338 (37,7±2,6)	11 (1,2±3,2)	<0,001
1998–2001	1512	857 (56,7±1,7*)	588 (38,9±2,0)	67 (4,4±2,5)	<0,001
2002–2010	1874	687 (36,7±1,8*)	1089 (58,1±1,4)	98 (5,2±2,2)	<0,001
2011–2015	103	47 (45,7±7,2)	54 (52,4±6,7)	2 (1,9±9,6)	>0,05
Итого	4385	2138 (48,7)	2069 (47,2)	178 (4,1)	–

Примечание –* Различия достоверны.

В годы подъема заболеваемости (1996–1997 гг.) и в начальный период снижения (1998–2001 гг.) в популяции патогена доминировали штаммы биотипа *gravis*: из всех изолированных штаммов его доля составила 61,1% и 56,7% соответственно, из изолированных у пациентов с дифтерией – 87,3% и 95,5% соответственно. В последующие 9 лет (2002–2010 гг.) в период низкой регистрации заболеваемости (менее 0,1 на 100 000 населения) доминирующее место в популяции циркулирующих штаммов занял биотип *mitis*: 58,1% против 36,7% биотипа *gravis* и 5,2% биотипа *belfanti*. Однако среди штаммов, изолированных у пациентов с дифтерией, по-прежнему доминирующее место занимал биотип *gravis*. В 51 из 65 случаев дифтерии (78,5%), зарегистрированных в этот период, изолирован биотип *gravis*. В 2011–2015 гг., при отсутствии регистрации случаев дифтерии, штаммы биотипов *gravis* и *mitis* выявлялись с одинаковой частотой. Среди 103 изолированных штаммов 45,7% изолятов относились к биотипу *gravis*, 52,4% – к биотипу *mitis*, 1,9% – к биотипу *belfanti*.

Анализ токсигенности штаммов в Elek-тесте показал, что по мере снижения заболеваемости населения наблюдалось снижение уровня циркуляции токсигенных штаммов в популяции *C. diphtheriae*. В годы высокой заболеваемости (1996–1997 гг.) доля токсигенных штаммов составляла 42,2% (378 из 896), в начальный период снижения заболеваемости (1998–2001 гг.) – 23,2% (350 из 1512), в период низкой регистрации случаев заболевания (2002–2010 гг.) – 7,8% (146 из 1874). Снижение доли токсигенных штаммов отмечалось среди биотипа *gravis*: с 63,1 до 18,2% и *mitis*: с 9,8 до 1,9% ($P < 0,001$). В период 1996–2015 гг. все 178 выявленных штаммов биотипа *belfanti* были нетоксигенными. В годы регистрации случаев дифтерии среди токсигенных штаммов доминировали штаммы биотипа *gravis* с колебаниями от 71,4 до 100,0%.

Генетическая структура популяции *C. diphtheriae* установлена на основе риботипирования 478 штаммов, включавших 313 токсигенных, 112 нетоксигенных, 53 НТТН штаммов. Идентифицирован 21 риботип *C. diphtheriae*, что свидетельствует о генетической гетерогенности популяции *C. diphtheriae*, циркулирующей в Республике Беларусь. В период высокой регистрации случаев дифтерии (1996–2001 гг.) среди 21 риботипа 2 являлись эпидемически значимыми, доминирующими, обусловившими подъем дифтерии в стране, их доля составляла 49,6%, в том числе риботипа Sankt-Peterburg – 20,1%, риботипа Rossija – 29,5%. Остальные 50,4% штаммов были представлены 19 риботипами, которые встречались с частотой от 16,7 до 0,3%. В период низкой регистрации случаев дифтерии (2002–2010 гг.) произошла элиминация из популяции 15 риботипов, редко встречавшихся в годы высокой заболеваемости. Риботипы Bangladesh Erlabrunn, Schwarzenberg, Minsk, GomeI, Ras-el-Ma, Thailand-5, Prahova, Dagestan, Gatchina, Close to Nan, Close to Pakistan, Close to Versailles, Neamt, Buzau, которые выявлялись с частотой от 0,3 до 0,9%, перестали изолироваться. Одновременно снизился уровень циркуляции одного из ведущих риботипов Sankt-Peterburg с 20,1 до 2,7%, что привело к относительному увеличению другого эпидемического риботипа Rossija с 29,5 до 66,4% ($P < 0,001$). Изучение токсигенности разных риботипов показало, что в период низкой регистрации случаев дифтерии (2002–2010 гг.) риботипы, характеризовавшиеся преобладанием токсигенных штаммов, остались по-прежнему токсигенными. Штаммы, относящиеся к Sankt-Peterburg (4), Otchakov (19), Lyon (4), изолированные в 2002–2010 гг., проявляли токсигенную активность, но доля «токсигенных» риботипов снизилась от 48,2 до 23,2%.

Таким образом, риботипирование, характеризующее популяцию *C. diphtheriae* на генетическом уровне, показало ее более высокую гетерогенность в сравнении с данными биотипирования, позволило выявить эпидемически значимые генотипы (риботипы Sankt-Peterburg и Rossija) среди

биотипа *gravis*, обусловившие подъем заболеваемости в стране, и проследить уровень и направление элиминации разных генотипов в условиях повышения популяционного иммунитета.

Выявление НТТН штаммов, их фено- и генотипический анализ. Среди нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* в Elek-тесте с помощью ПЦР обнаружены НТТН штаммы, имеющие в геноме неэкспрессирующийся «молчащий» ген дифтерийного токсина. Среди 578 нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* (111 *gravis*, 459 *mitis*, 8 *belfanti*), исследованных в ПЦР на наличие фрагмента А гена токсигенности, выявлен 51 НТТН штамм, что составило 8,8%. Частота выявления этих штаммов в период 1996–2002 гг. варьировала от 21,0 до 2,9%. Все выявленные НТТН штаммы относились к биотипу *mitis*, риботипу Moskva, большинство (52,2%) относилось к доминирующему среди токсигенных штаммов фаготипу VI ls5,34add или были лизорезистентными. НТТН штаммы не обладали токсинопродукцией в цитотоксическом тесте в культуре клеток VERO и Elek-тесте, изолировались во всех регионах страны и были выделены у пациентов с дифтерией (3 из 51, 5,9%), пациентов с тонзиллофарингитом (36 из 51, 70,6%), контактных лиц в очаге инфекции (5 из 51, 9,8%), и здоровых носителей (7 из 51, 13,7%). Механизм блокирования экспрессии гена *tox* у НТТН штаммов установлен при исследовании методом блокирования ПЦР ПНК. В гене *tox* всех штаммов выявлена делеция одного нуклеотида G в положении 52, приводящая к сдвигу открытой рамки считывания и образованию стоп-кодона в положении 112, и замена нуклеотида А на G в положении 60, не приводящая к замене аминокислот. Секвенирование фрагмента гена *tox* длиной 299 п.о. одного НТТН штамма (№ 1796) подтвердило характер мутации, выявленный методом блокирования ПЦР ПНК. Продуктом гена *tox* у НТТН штаммов с такой мутацией был пептид из 37 аминокислот вместо полноценной молекулы дифтерийного токсина из 560 аминокислотных остатков. Вероятность спонтанного восстановления структурной целостности гена *tox* с такой мутацией оценивается как крайне низкая.

Структура промоторной области гена *tox* и гена *dtxR* у эпидемических и неэпидемических штаммов *C. diphtheriae*. Изучена структура промоторной области гена *tox* и регуляторного гена *dtxR* с целью выявления точечных мутаций и установления ассоциации их с УТ. Фрагменты ДНК длиной 129 п.о., содержащие промоторную область гена *tox*, 81 штамма *C. diphtheriae* с разным УТ исследованы методом конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК. Выявлены только 2 изолята, отличавшихся по электрофоретическому профилю, что составило 2,5%. Из 81 анализируемого штамма *C. diphtheriae* 9 имели низкий УТ (40–80 VERO CD50/ml), 29 штаммов – средний УТ (160–320 VERO CD50/ml), 41 штамм – высокий УТ (640–2560 VERO

CD50/ml) и только 2 штамма – экстравысокий УТ (10 240–20 480 VERO CD50/ml), установленные в цитотоксическом тесте в культуре клеток VERO. Среди низко-, средне- и высокотоксигенных штаммов 70% составляли штаммы, относящиеся к эпидемическим риботипам Sankt-Peterburg и Rossija. Остальные 30% составляли штаммы, относящиеся к 8 редким неэпидемическим риботипам. Токсигенные штаммы, у которых выявлена мутация, относились к редкому риботипу Close to Nan и обладали повышенным УТ. Для подтверждения и анализа характера мутации в промоторной области гена *tox*, выявленной методом SSCP, были секвенированы фрагменты гена *tox* длиной 320 п.о. 9 штаммов, обладающих экстравысоким, высоким, средним и низким УТ. Сиквенс-анализ области между нуклеотидами –232 и +85 *tox*-оперона выявил замену нуклеотида Т на С в позициях –54, и –184. Мутация в позиции –184 находилась за пределами *tox*-промотора/оператора, а мутация в позиции –54 изменяла палиндром длиной 9 п.н. в *tox*-промоторе/операторе от АТААТТАGG у дикого бактериофага β на АСААТТАGG у штаммов риботипа Close to Nan, обладающих экстравысоким УТ. Таким образом, замена нуклеотида Т на С в позиции –54 обусловила экстравысокий УТ у 2 штаммов неэпидемического риботипа Close to Nan. Мутация отсутствовала у штаммов эпидемических риботипов Sankt-Peterburg (24 штамма) и Rossija (33 штамма), характеризовавшихся высоким, средним и низким УТ.

Получены данные сиквенса ДНК области между нуклеотидами –76 и +681 регуляторного гена *dtxR* 16 штаммов *C. diphtheriae*, обладающих разным УТ, включая штамм PW8. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена *dtxR* анализируемых штаммов с известной нуклеотидной последовательностью дикого штамма С7(-) выявило 19 нуклеотидных замен: 17 из них были локализованы в открытой рамке считывания (ORF) и 2 были на 5'-некодируемой области. В С-концевой части гена 3 из 14 выявленных нуклеотидных замен были значимыми и приводили к замене аминокислот (А 147 V; L 214 I; I 221 T). Среди анализируемых штаммов выявлено 3 варианта белка (1, 4, 5) при трансляции нуклеотидных последовательностей. Вариант белка 1 выявлен у 4 штаммов, в том числе у 2 – с экстравысоким УТ и у 2 – с высоким УТ, включая штамм PW8. Вариант белка 4 выявлен у 11 штаммов, в том числе у 7 – с высоким УТ, и у 4 – с низким УТ, включая штамм NCTC 13129. Штаммы с 4-м вариантом белка имели 2 аминокислотные замены (аланин → валин в положении 147 и лейцин → изолейцин в положении 214) и относились к эпидемическим риботипам Sankt-Peterburg и Rossija. У 1 штамма с низким УТ аминокислотная последовательность белка характеризовалась заменой только 1 аминокислоты изолейцин → треонин в положении 221 и относилась к 5-му варианту белка.

Таким образом, выявленные миссенс-мутации в С-концевом, третьем домене белка не сказываются на уровне токсинопродукции *C. diphtheriae*. Мутация в промоторной области гена *tox*, ассоциированная с экстравысоким УТ, выявлена только у неэпидемических штаммов, частота ее встречаемости была низкой. Преимущество обеспечило не повышение уровня токсинопродукции, а другие факторы вирулентности эпидемическим штаммам.

Адгезивная активность *C. diphtheriae* эпидемических и неэпидемических риботипов. Транспозонный мутагенез *C. diphtheriae*. Изучение адгезивной активности токсигенных штаммов, относящихся к риботипам Sankt-Peterburg (32 штамма), Rossija (38 штаммов) и другим риботипам (Lyon, Otchakov, Close to Nan, Schwarzenberg, Erlabrunn, Cluj, GomeI – 30 штаммов), показало вариабельность *C. diphtheriae* по уровню адгезии на клетках HEp-2 в пределах как одного, так и разных риботипов. Результаты продемонстрировали, что среди штаммов риботипа Sankt-Peterburg преобладали низкоадгезивные (показатель адгезии (ПА) 1–6%), доля которых составила 81,2% (26 из 32), остальные 18,8% (6 из 32) относились к среднеадгезивным (ПА 7–12%). Среди штаммов риботипа Rossija с одинаковой частотой встречались низкоадгезивные (34,2%), среднеадгезивные (36,8%) и высокоадгезивные (29,0%, ПА 13–40%). Среди высокоадгезивных штаммов 72,7% (8 из 11) имели ПА от 21 до 40%. Основная доля 86,7% (26 из 30) *C. diphtheriae*, относящихся к неэпидемическим риботипам, обладала низкой адгезивной активностью и только 13,3% (4 из 30) составляли штаммы со средним уровнем адгезии. Средний ПА в группе штаммов риботипа Rossija был достоверно выше среднего ПА в группе штаммов риботипа Sankt-Peterburg (11,4 против 4,1; $P < 0,0001$), который, в свою очередь, был выше среднего ПА в группе неэпидемических риботипов, но достоверно не различался (4,1 против 3,3; $P = 0,2$).

Электропорация штамма *C. diphtheriae* № 225 биотипа *gravis*, риботипа Sankt-Peterburg 1 мкл EZ::TnKan2 транспосомы, содержащей 20 нг ДНК транспозона, привела к получению $2,8 \times 10^3$ канамицин-резистентных трансформантов на 1 мкл транспосомы, или $1,4 \times 10^5$ канамицин-резистентных трансформантов на 1 мкг ДНК. Изучена адгезивная активность 585 из 2800 трансформантов. Выявлен 1 трансформант, у которого адгезивная активность неоднократно составляла 15,2% от уровня исходного штамма ($P = 0,0001$). Область ДНК, прерванная вставкой транспозона, была идентифицирована у мутанта в инвертированной ПЦР с последующим ее секвенированием. Секвенирование сайта встраивания транспозона у мутанта 225-1458 показало, что разорванный ген на 94% идентичен секретлируемому белку *C. diphtheriae* DIP1621 (GenBank, код доступа BX248358.1). В соответствии с глобальным анализом секретлируемых белков *C. diphtheriae*, белок DIP1621 идентифицирован

как инвазион-ассоциированная гидролаза, как и его гомолог Cg2401 у *C. glutamicum* (Hansmeir N. и соавт., 2006). В результате реаннотации генов, кодирующих белки штамма NCNC13129, проведенной V. D'Afonseca и соавт., показано, что белок DIP1621 принадлежит к семейству белков NlpC/P60 и вероятность участия в процессе адгезии равна 0,465 (D'Afonseca V. И соавт., 2012). Снижение адгезивной активности у полученного транспозонным мутагенезом мутанта *C. diphtheriae*, обусловленного вставкой транспозона в ген, кодирующий инвазион-ассоциированную гидролазу (DIP 1621), подтверждает мультифакторный механизм адгезии у *C. diphtheriae*.

Сравнительная геномика штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в Республике Беларусь в 1996–2014 гг. Проведено полногеномное секвенирование 93 репрезентативных изолятов, отобранных методом случайной выборки из коллекции 4385 *C. diphtheriae*, 26 из 93 штаммов выделены у пациентов с дифтерией, 46 – у пациентов с тонзиллофарингитом, 21 – у здоровых носителей.

Среди 93 штаммов биотипов *gravis*, *mitis*, *belfanti* токсигенными были 41 штамм, нетоксигенными – 47, НТТН штаммами – 5.

Геномы штаммов были секвенированы на приборе Illumina MiSeq, размер сборок варьировал от 2,3 до 2,6 Мб. Для сравнительного анализа проведено полногеномное секвенирование двух референс штаммов: штамма CCUG 2706А редкого биотипа *intermedius*, изолированного в довакцинальный период, и штамма CCUG 5865 биотипа *belfanti* сиквенс-типа ST106; в исследование включены общедоступные сиквенсы геномов 22 штаммов, полученных из GenBank. Пан-геном данного набора 117 секвенированных штаммов включал 4684 генов, кодирующих белковые последовательности, среди которых 1267 были консервативными кор-генами, 3417 – некор-генами. Среди некор-генов 832 гена являлись штаммоспецифическими. В результате филогенетического анализа, проведенного методом ML на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей кор-генома (1267 генов), выделены 2 филогенетические линии: линия 1 включала 116 штаммов, относящихся к 4 биотипам, линия 2 – 1 штамм CCUG 5865 биотипа *belfanti* (рисунок 3). Филогенетический анализ показал, что 93 клинических изолята *C. diphtheriae* в пределах линии 1 образовывали 7 групп, среди которых 3 группы были близкородственны одному из 24 референс штаммов, включенных в данное исследование. Большинство штаммов (76%) образовывали 2 группы, включающие 34 изолята (36,6%) и 37 изолятов (39,8%). Группа из 34 изолятов кластеризовалась со штаммом NCTC 13129 и относилась к ST8, риботипам Sankt-Peterburg и Rossija, большинство штаммов (31 из 34) были токсигенными.

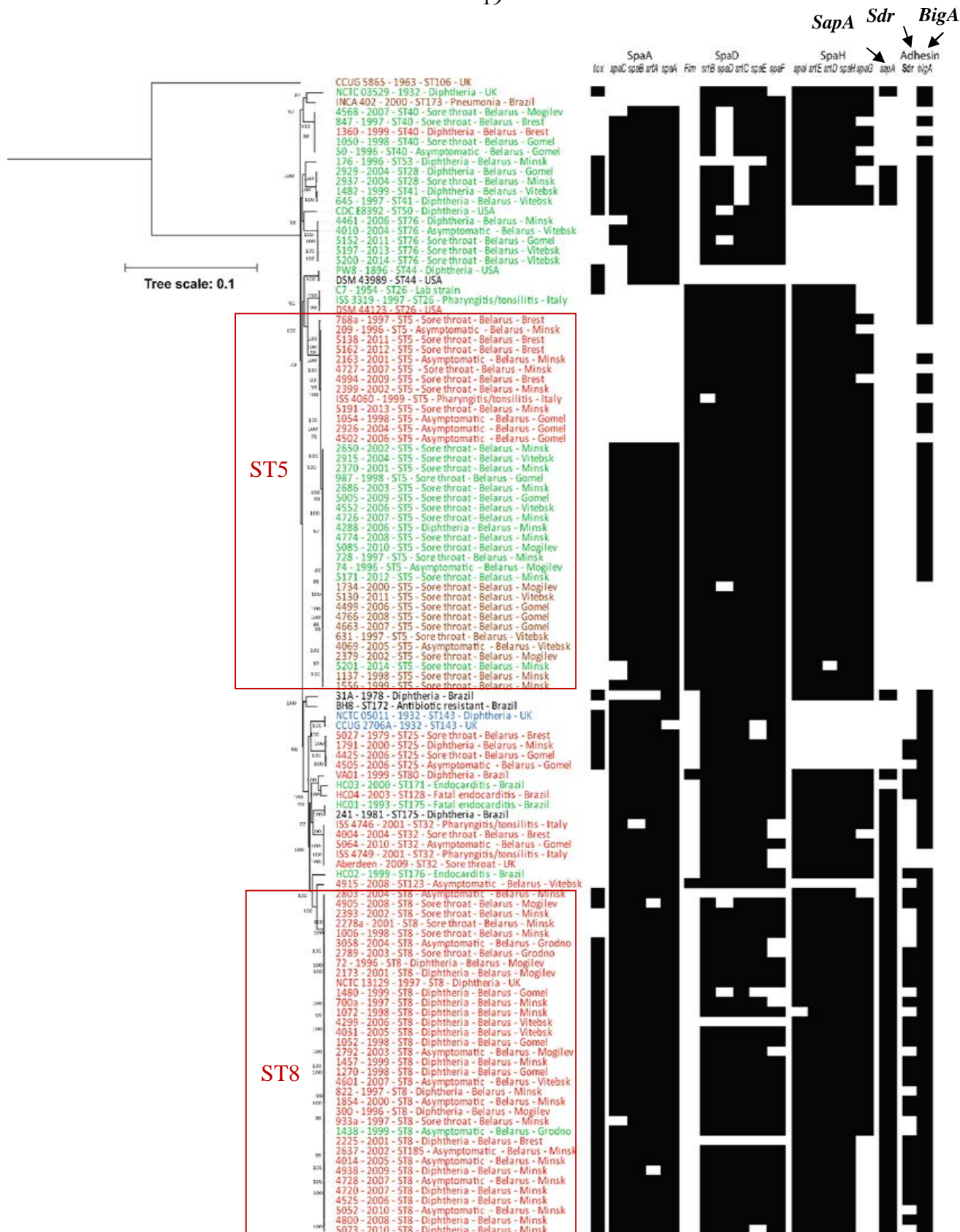


Рисунок 3. – Филогенетическое дерево максимального правдоподобия на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей кор-генома 117 штаммов

Примечание – Шкала показывает нуклеотидные замены на 1 нуклеотидный сайт. Изоляты биотипов *belfanti*, *gravis*, *intermedius* и *mitis* представлены коричневым, красным, синим и зеленым цветом соответственно. Наличие генов вирулентности отображено черным, белым цветом показано отсутствие генов.

Вторая большая группа из 37 нетоксигенных изолятов относилась к сиквенс-типу ST5, риботипу Cluj, определенному для 12 штаммов, и кластеризовалась со штаммом ISS4060 ST5, выделенным в Италии. 18 штаммов образовывали 4 небольшие группы, которые не были близки по кор-геному ни одному из референс штаммов *C. diphtheriae* в данном наборе и по отношению друг к другу. Два нетоксигенных штамма ST32 образовывали одну группу со штаммами ST32, выделенными в Италии и Великобритании. Два изолята *C. diphtheriae*, один токсигенный ST53 риботип Otchakov и один нетоксигенный ST123 не образовывали группы ни с одним из штаммов и были одиночными (singleton). Основные сиквенс- и риботипы *C. diphtheriae* ассоциированы с группированием на основе филогенетического анализа кор-генома и не согласовывались с данными биотипирования. Штаммы 3 биотипов *belfanti*, *gravis* и *mitis* образовывали большую группу в пределах линии 1, сиквенс-типа ST5 (37 изолятов, 39,8%), что свидетельствует о важности использования молекулярных методов типирования для изучения гетерогенности популяции *C. diphtheriae*.

Сравнительный анализ доминирующих клонов *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST8 и сиквенс-типа ST5. Биология популяции бактерий и их способность развиваться при избирательном давлении иммунологического пресса обуславливается балансом между рекомбинацией и мутацией (Bolt F. и соавт., 2010). Для понимания механизма клональной экспансии у *C. diphtheriae* проведен сравнительный анализ двух доминирующих клонов *C. diphtheriae* сиквенс-типов ST5 и ST8. В целом 94 033 единичные нуклеотидные замены (SNP) выявлены в выровненном конкатенированном кор-геноме (1226854 п.о.) 117 изолятов. Среди изолятов ST5 было 3577 SNP, среди изолятов ST8 – всего 426 SNP. С помощью алгоритма Gubbins в конкатенированном кор-геноме идентифицированы регионы, полученные в результате рекомбинации, и вычислены относительные частоты рекомбинации и точечных мутаций в клональной разнообразии *C. diphtheriae*. Регионы, полученные путем рекомбинации, были удалены из выровненного кор-генома, и в результате получены фрагменты ДНК длиной 806921 п.о. для штаммов сиквенс-типа ST5, содержащего 414 SNP и для штаммов сиквенс-типа ST8 фрагмент длиной 861883 п.о. с 263 SNP. В конкатенированном кор-геноме штаммов ST5 из 3577 единичных нуклеотидных замен 2783 (58 событий) получены за счет рекомбинаций, а 253 – за счет гомоплазий. В конкатенированном кор-геноме штаммов ST8 из 426 единичных нуклеотидных замен 44 (6 событий) получены за счет рекомбинаций, а 54 – гомоплазий. Корреляция между эволюционной дистанцией и датой изоляции штамма была меньше среди штаммов ST5 ($R^2=0,310$), чем среди ST8 ($R^2=0,501$) с мутационным показателем для кор-генома $5,6 \times 10^{-7}$ (95% максимальный интервал плотности $3,7-7,7 \times 10^{-7}$)

и $8,9 \times 10^{-7}$ (95% максимальный интервал плотности $5,6 \times 10^{-7} - 1,2 \times 10^{-6}$) замен на 1 штамм в год соответственно. Следовательно, точечные мутации у штаммов ST8 возникали чаще, чем у штаммов ST5.

Таким образом, относительная роль рекомбинации и мутаций в разнообразии штаммов варьирует между различными клонами. Рекомбинация является главной движущей силой в эволюции нетоксигенных штаммов ST5, а мутации играют важную роль в разнообразии токсигенного клона ST8, что указывает на потенциальное влияние вакциноиндуцированного иммунного ответа на динамику эволюции токсигенных штаммов.

Потенциал вирулентности *C. diphtheriae*. Проведен сравнительный анализ генов, кодирующих белки, участвующих в адгезии среди штаммов сиквенс-типов ST5 и ST8. Штаммы сиквенс-типа ST5 подгрупп ST5-A и ST5-C обладали только двумя кластерами генов пилей, SpaD и SpaH, тогда как кластер генов пилей SpaA присутствовал среди штаммов подгруппы ST5-B. Кластеры генов пилей расположены в геномных островках, штаммы подгруппы ST5-B, вероятно, приобрели кластер генов пилей SpaA в результате горизонтальной передачи генов от других штаммов *C. diphtheriae*. Кроме того, некоторые гены в кластерах генов пилей потеряли свою функцию из-за мутационных изменений; например, ген spaC в кластере генов пилей SpaA у штаммов 5201 и 1137. Ген, кодирующий BigA-подобный адгезин, имелся только у некоторых изолятов ST5 подгрупп ST5-A и ST5-B. Это свидетельствует о том, что рекомбинация, приобретение или потеря функций гена обуславливают функциональные вариации среди изолятов внутри одного клона. Большинство изолятов сиквенс-типа ST8 обладали всеми тремя кластерами генов пилей, за исключением 3 штаммов, у которых отсутствовал кластер генов пилей SpaD. Подобно штаммам сиквенс-типа ST5, некоторые гены в различных кластерах генов пилей были псевдогенами. Все изоляты ST8 обладали геном, кодирующим BigA-подобный адгезин (DIP2014), и дополнительным геном sapA (DIP2066), кодирующим поверхностный заякоренный фимбриальный белок, который отсутствовал у изолятов сиквенс-типа ST5. Большинство изолятов сиквенс-типа ST8 содержали ген (DIP2093), кодирующий адгезин семейства Sdr. Таким образом, число и организация в кластерах генов пилей, наличие или отсутствие гена sapA и генов, кодирующих другие адгезины, варьировали в пределах одного клона, а также между разными клонами штаммов. Штаммы сиквенс-типа ST8 обладали более высокой способностью адгезироваться и инвазировать клетки хозяина, в отличие от штаммов ST5, у которых отсутствовал ген sapA, Sdr-подобный адгезин и кластер генов пилей SpaA у штаммов подгруппы ST5-A и ST5-C.

Нуклеотидная последовательность гена токсигенности *C. diphtheriae*. Ключевой фактор вирулентности *C. diphtheriae* – ген *tox* – присутствовал

Все 25 штаммов сиквенс-типа ST8, включая 9 штаммов без риботипа, 5 штаммов риботипа Sankt-Peterburg и 11 штаммов риботипа Rossija, образовывали одну группу. Штаммы риботипа Lyon ST25 (№ 1791, № 4425, № 4505, № 5027) также образовывали одну группу. Штаммы риботипа Otchakov, относящиеся к трем разным ST, не кластеризовались вместе. 2 штамма сиквенс-типа ST41 (№ 1482, № 645) образовывали одну группу, тогда как 1 штамм сиквенс-типа ST28 (№ 2929) и 1 ST53 (№ 176) не образовывали группы ни с одним из штаммов.

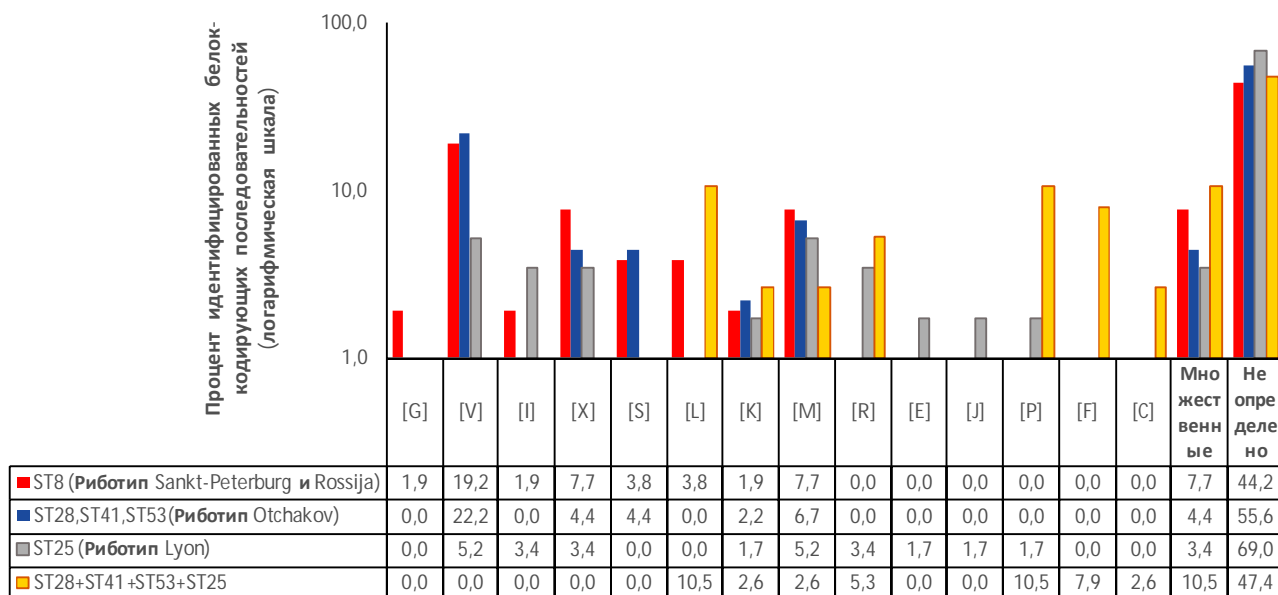
Сравнительный анализ 33 геномов, проведенный с использованием EDGAR, показал, что 52 гена присутствовали среди всех 25 эпидемических штаммов, которые отсутствовали среди неэпидемических штаммов, 45 генов были уникальными для штаммов риботипа Otchakov, 58 генов – уникальными для штаммов риботипа Lyon. Дополнительно в этом наборе штаммов 38 генов были специфичными для всех штаммов (риботип Otchakov и Lyon), которые отсутствовали среди эпидемических штаммов.

Проведено определение функциональной принадлежности белок-кодирующих последовательностей путем поиска в BLASTe в базе данных кластеров Orthologous Group (COG) V 1,0, в базе Conserved Domain Database CDD V 3,16, в базе UniProt. Некор-геномы эпидемических и неэпидемических штаммов различались по содержанию белок-кодирующих последовательностей по 12 категориям функциональной активности COG (рисунок 5).

Среди эпидемических штаммов выявлены белки категории COG G, связанные с транспортом и метаболизмом углеводов, которые отсутствовали среди неэпидемических штаммов. Эпидемические штаммы имели большее число белков категории COG X, связанных с подвижностью генов, и горизонтальной передачей генов, категории COG M, связанных с клеточной и внешней мембраной. Доля белков категории COG с множественными функциями была выше среди эпидемических штаммов. Выявленные различия в основном обусловлены белок-кодирующими последовательностями, содержащимися в геномных островках, поэтому потенциально могут быть вовлечены в вирулентность или другие фенотипические характеристики, обеспечившие преимущества эпидемическим штаммам.

Сравнительный анализ генов, кодирующих участвующие в адгезии белки, показал, что эпидемические штаммы имели большее число генов, чем неэпидемические (см. рисунок 4). У штаммов риботипа Lyon отсутствовали все гены кластера, кодирующие пили SpaH, ген *sapA* (DIP2066). У штаммов риботипа Otchakov отсутствовали гены, кодирующие минорные субъединицы SpaI, SpaG пилей SpaH, гены, кодирующие минорную субъединицу SpaE и ген *srtC* пилей SpaD, а также ген DIP2093. Эпидемические штаммы имели гены DIP2062, DIP0278, DIP1724, CDHC04_0148, кодирующие поверхностные

заякоренные белки, которые отсутствовали у неэпидемических штаммов, за исключением гена DIP0278, который был у некоторых штаммов риботипа Otchakov. Большое содержание генов, участвующих в адгезии у штаммов эпидемического клона, способствовало их более высокой способности прикрепляться и проникать внутрь клеток хозяина в сравнении со штаммами риботипов Lyon и Otchakov, что обусловило более высокую вирулентность и широкую циркуляцию в популяции.



Функциональные категории COGs (на оси абсцисс): G – транспорт и метаболизм углеводов; V – защитные механизмы; I – метаболизм липидов; X – *mobile*: профаг, транспозоны; S – функция неизвестна; L – ДНК-репликация, рекомбинация и репарация; K – транскрипция; M – клеточная мембрана, внешняя мембрана; R – общее предсказание функций; E – транспорт и метаболизм аминокислот; J – трансляция, рибосомная структура, биогенез; P – транспорт и метаболизм неорганических ионов; F – транспорт и метаболизм нуклеотидов; C – продукция и переработка энергии

Рисунок 5. – Распределение функциональных белковых категорий, установленных на основании сходства с базой данных кластеров ортологичных генов у эпидемических и неэпидемических клонов *C. diphtheriae*

Нуклеотидная последовательность регуляторного гена *dtxR*. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности регуляторного гена *dtxR* 93 секвенированных штаммов с нуклеотидной последовательностью гена нелизогенного нетоксигенного дикого штамма C7(-) показал, что в ORF выявлено 15 единичных нуклеотидных замен, 2 из которых в положениях 440 и 640 были несинонимичными, приводящими к замене аминокислоты в белке-репрессоре DtxR. Наибольшее число нуклеотидных замен (13 из 15), включая 2 миссенс-мутации, происходили в гене *dtxR* 35 штаммов эпидемического клона сиквенс-типа ST8 риботипов Sankt-Peterburg и Rossija, включая штамм NCTC 13129. В отличие от штаммов эпидемического клона токсигенные штаммы неэпидемических генотипов, как и нетоксигенные и НТТН штаммы, не

имели или имели 1–2 синонимичные нуклеотидные замены. Число и положение нуклеотидных замен варьировало в зависимости от клона штаммов. Только штаммы риботипов Sankt-Peterburg и Rossija имели 2 миссенс-мутации A 147 V и L 214 I в С-концевом, третьем домене белка, что обеспечивало им преимущества по сравнению с другими штаммами.

Серологический мониторинг противодифтерийного иммунитета, обоснование тактики иммунизации взрослых. Эпидемия дифтерии, возникшая в 90-е годы, показала высокую восприимчивость взрослых. Среди 745 случаев дифтерии, зарегистрированных в стране в 1992–1995 гг., доля заболевших старше 18 лет составила 66,8% (498 из 745), из них 52,4% (261 из 498) были 35 лет и старше. Проведенное в 1989–1994 гг. исследование сывороток крови 3957 человек 0–68 лет показало, что в целом иммунная прослойка к дифтерии составляла 79,6%, однако наблюдался провал в иммунитете у взрослых (54,2%). Среди лиц 18–34 лет доля серопозитивных была 73,2%, старше 35 лет – 31,2%. Антитела в защитных и высокозащитных титрах (0,1 МЕ/мл и выше) выявлены у 45,7% детей 0–14 лет, 63,3% подростков 15–17 лет и 21,3% взрослых 18–68 лет. Резкий дефицит взрослых с иммунитетом отмечался среди лиц 35–49 лет (26,8%). Эта когорта людей, родившихся с 1940 по 1954 г., не подверглась бустирующему эффекту в результате низкой циркуляции возбудителя в 70-е годы. Отсутствие ревакцинаций обусловило слабый их прививочный иммунитет.

Накопление противодифтерийных антител в парных сыворотках. Среди лиц 35–55 лет, ранее не привитых против дифтерии или не имевших данных об иммунизации, изучена иммунологическая эффективность вакцинации по накоплению антител в парных сыворотках. Одна доза вакцины оказалась достаточной для стимуляции иммунитета у всех лиц, имевших до вакцинации антитела даже в низких титрах, но не обеспечила формирование достаточного уровня защиты у 40,0% ранее серонегативных лиц. После 2-й дозы вакцины накопление антител наблюдалось у 8 из 9 лиц, не ответивших на 1-е введение вакцины, у 2 из них (22,6%) антитела оставались на весьма низком, условно защитном уровне (титр от 1 : 10 до 1 : 20 в РПГА). У 3 из 9 2-кратно привитых содержание антител по-прежнему оставалось низким. Обследование 26 взрослых, проведенное накануне и после 3-й вакцинации свидетельствовало о высокой эффективности третьей дозы вакцины: антитела в защитных титрах имелись у всех обследованных.

Оценка противодифтерийного иммунитета у взрослых в зависимости от кратности полученных доз вакцины. В целом после 1-кратной дозы вакцины взрослые моложе 35 лет были более защищенными, чем лица в возрасте 35–60 лет. В возрастной группе 18–34 года антитела в расчете на минимальный протективный уровень ($\geq 0,01$ МЕ/мл) имели 79,7% привитых, в расчете на

протективный уровень (титры $\geq 0,1$ МЕ/мл) – 63,8% привитых. Концентрация антител от 1,0 МЕ/мл и более, обеспечивающая эффективную и длительную защиту против инфекции, выявлена у 11,6% привитых. У взрослых 35–60 лет показатели защиты были достоверно ниже и составили 64,3%, 35,7% и 4,9%. После 3-кратной иммунизации антитела в титре $\geq 0,01$ МЕ/мл были в возрастной группе 18–34 года у 93,3%, в группе 35–60 лет – у 90,7% привитых. В то же время в расчете на протективный уровень антитела в этих возрастных группах были только у 66,7% и у 53,5% привитых, а доля высокозащищенных лиц составляла лишь 20% и 11,6% соответственно. Для населения моложе 35 лет 1-кратная иммунизация оказалась достаточной для формирования иммунной прослойки на уровне 79,7%, однако для возрастной когорты населения 35–60 лет недостаточно надежной защитой была и 2-кратная иммунизация. Только 63,3% лиц после получения 2 доз вакцины имели антитела в минимально защитных титрах. Для достижения полноценной защиты этой категории лиц необходима 3-кратная иммунизация. В то же время хотя 3-кратная вакцинация и обеспечивала защищенность на уровне 90,7%, доля лиц, имевших защитный уровень антител, и доля высокозащищенных лиц оставалась низкой и составляла 53,5% и 11,6% соответственно.

Серологические исследования, проведенные после кампаний массовой иммунизации. Исследование популяционного иммунитета, проведенное в 1999–2001 гг., с обследованием 5518 человек 0–79 лет показало результативность проведенной в 1996 г. кампании массовой иммунизации взрослых: иммунная прослойка в отношении дифтерии составила 92,0%. Высокие показатели иммунитета отмечались у детей (97,7%), взрослых 18–39 лет (95,7%), у лиц старше 40 лет зарегистрировано его снижение (82,4%). Наименьшие показатели (77,6%) отмечены в возрастной группе 45–54 года. Значительно увеличилась доля лиц, имеющих антитела в защитных и высокозащитных титрах. Антитела в концентрации 0,1 МЕ/мл и выше были у 88,2% детей, 92,3% подростков и 73,3% взрослых 18 лет и старше. С целью оценки противодифтерийного иммунитета в условиях продолжающейся регистрации единичных случаев дифтерии, преимущественно среди взрослых, в 2004 г. исследованы 826 сывороток крови взрослых, родившихся в 1945–1984 гг. (20–59 лет). Исследование показало, что противодифтерийные антитела в минимально защитных титрах и выше ($\geq 0,01$ МЕ/мл) были у 81,8% обследованных. Лица 18–39 лет оказались достоверно более защищенными против дифтерии, чем лица 40–59 лет: 94,0% лиц с иммунитетом против 69,7% лиц соответственно. Наименьшая доля серопозитивных лиц (61,5%) выявлена в подгруппе 50–59 лет. Защитный и высокозащитный уровень антител ($\geq 0,1$ МЕ/мл) к дифтерии имели в целом 54,9% взрослых, в возрасте 20–39 лет их доля составила 75,0%, в возрасте старше 40 лет – только 34,7%.

Популяционный иммунитет к дифтерии в Беларуси в 2017 г. Анализ противодифтерийного иммунитета показал, что доля иммунных против дифтерии лиц (антитела в титре 0,01 МЕ/мл и выше) составила 96,7% и колебалась в разных возрастных группах населения от 87,7 до 100%. Во всех возрастных группах показатели противодифтерийного иммунитета достигали, а в некоторых группах превышали 82–87%, необходимых для контроля дифтерийной инфекции (Мэй Р., Андерсон Р., 2004).

Таким образом, состояние и уровень популяционного антитоксического противодифтерийного иммунитета определяет защищенность от инфекции и, соответственно, регулирует интенсивность эпидемического процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Эпидемический процесс дифтерии (1996–2010 гг.) определялся фенотипическим разнообразием популяции возбудителя. Отмечалась циркуляция 3 биотипов *C. diphtheriae*, среди которых доминирующий биотип *gravis*, преобладавший в годы подъема заболеваемости (1996–1997 гг.) и в начальный период ее снижения (1998–2001 гг.) сменился биотипом *mitis*. В популяции обоих биотипов к 2010 г. наблюдалось снижение доли токсигенных штаммов: среди биотипа *gravis* с 65,8 до 15,4%, среди биотипа *mitis* – с 12,5 до 0,9%. Токсигенные штаммы биотипа *gravis* доминировали во все годы эпидемического процесса. Штаммы биотипа *belfanti* включали только нетоксигенные варианты, доля которых составляла от 1,2 до 5,2%. Генетическая структура популяции *C. diphtheriae* характеризовалась 21 риботипом. В период высокой регистрации случаев дифтерии (1996–2001 гг.) среди 21 риботипа 2 были доминирующими, эпидемически значимыми в развитии вспышки дифтерии в стране, их доля составляла 49,5%, в том числе риботипа Sankt-Peterburg – 20,1% и риботипа Rossija – 29,4%. Остальные 50,5% штаммов представлены 19 риботипами, встречающимися с частотой от 16,7 до 0,3%. Период снижения заболеваемости отмечен элиминацией редко встречающихся риботипов как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов [2, 4, 5, 7, 10–13, 21, 23, 24, 26–30, 35–46, 48, 51, 52, 55, 56, 58–60, 64–66].

2. В 1996–2002 гг. в гетерогенной популяции *C. diphtheriae* среди нетоксигенных штаммов выявлены нетоксигенные токснесущие, не проявляющие токсинопродукцию в цитотоксическом тесте в культуре клеток VERO и Elek-тесте. Все НТТН штаммы были однородны по фенотипу и относились к биотипу *mitis*, риботипу Moskva, выявлялись во всех регионах страны. Частота выделения НТТН штаммов в период 1996–2002 гг. варьировала от 21,0 до 2,9%. Молекулярный механизм отсутствия экспрессии

гена *tox* у всех выявленных НТТН штаммов заключался в делеции нуклеотида G в положении 52 гена *tox*, приводящем к сдвигу рамки считывания и экспрессии пептида из 37 аминокислот вместо полноценной молекулы дифтерийного токсина из 560 аминокислот. Вероятность спонтанного восстановления структурной целостности гена *tox* с такой мутацией крайне низка [21, 27, 30, 46, 48, 52, 63].

3. Изучение молекулярно-генетических механизмов токсинообразования показало, что 3 миссенс-мутации в структуре гена *dtxR* в позициях 440 (A 147 V), 640 (L 214 I), 662 (I 221 T) не ассоциировались с уровнем токсинопродукции. Штаммы эпидемических риботипов Sankt-Peterburg и Rossija с высоким, средним и низким уровнем токсинопродукции содержали 2 мутации A 147 V и L 214 I в С-концевой части белка DtxR. 1 мутация в С-концевой части белка DtxR I 221 T имела у штамма неэпидемического риботипа Lyon с низким УТ. Замена нуклеотида T на C, выявленная в промоторной области гена *tox*, расположенная в палиндроме длиной 9 п.н., который перекрывает –10 последовательность промотора и область оператора гена *tox*, обусловила повышенный уровень токсинопродукции у неэпидемических штаммов риботипа Close to Nan, встречалась редко. Выявлена высокая степень генетической стабильности гена *tox*. Всего 8 синонимичных замен обнаружено в генах *tox* всех секвенированных токсигенных штаммов при сравнении с геном *tox* вакцинного штамма PW8, что свидетельствует о сохранении иммуногенности токсина и эффективности вакцин для иммунизации населения. Иммунологическая эффективность дифтерийного токсоида связана и с тем, что среди 4 выявленных наиболее иммуногенных областей фрагмент рецептор-связывающего домена, непосредственно взаимодействующий с рецептором, отличается высокой степенью структурной устойчивости и низкой мутабельностью [8, 15, 16, 18, 20, 21, 33, 61].

4. Токсигенные штаммы эпидемических и неэпидемических риботипов *C. diphtheriae* различаются по уровню адгезивной активности в культуре клеток HEp-2 в пределах одного и разных риботипов и разделяются на низкоадгезивные (показатель адгезии 1–6%), среднеадгезивные (7–12%), высокоадгезивные (13–40%). Среди штаммов риботипа Sankt-Peterburg преобладали низкоадгезивные, а среди штаммов риботипа Rossija с одинаковой частотой встречались низко-, и средне- и высокоадгезивные штаммы. Среди высокоадгезивных штаммов риботипа Rossija 72,7% имели ПА 21–40%. Основная доля *C. diphtheriae* (86,7%), относящихся к неэпидемическим риботипам, обладала низкой адгезивной активностью. Средний показатель адгезии в группе штаммов эпидемических риботипов Rossija, Sankt-Peterburg был выше адгезивной активности штаммов неэпидемических риботипов и составил 8,1% против 3,3%. Снижение адгезивной активности полученного

транспозонным мутагенезом мутанта *C. diphtheriae* обусловлено вставкой транспозона в ген, кодирующий инвазион-ассоциированную гидролазу (DIP1621), что подтверждает мультифакторный механизм адгезии у *C. diphtheriae* [9, 17, 19, 31, 53, 54, 57].

5. Филогенетический анализ, проведенный методом максимального правдоподобия нуклеотидных последовательностей кор-генома (1267 генов) 117 штаммов, в том числе 93, изолированных в Республике Беларусь, 2 референс штаммов CCUG 2706А биотипа *intermedius*, изолированного в довакцинальный период, CCUG 5865 биотипа *belfanti*, сиквенс-типа ST106 и 22 штаммов, полученных из GenBank, показал наличие двух филогенетических линий; линия 1 включала 116 штаммов, относящихся к 4 биотипам *C. diphtheriae*, линия 2 – 1 штамм CCUG 5865 биотипа *belfanti*. Все 93 штамма 3 биотипов (*gravis*, *mitis*, *belfanti*), изолированных в стране, относились к линии 1. Основные сиквенс-типы и риботипы циркулирующих штаммов *C. diphtheriae* ассоциированы с их группированием на основе филогенетического анализа кор-генома и не согласовывались с данными биотипирования. Штаммы 3 биотипов, *gravis*, *mitis* и *belfanti*, образовывали большую группу в пределах линии 1, сиквенс-типа ST5 (37 изолятов, 39,8%), что свидетельствует о том, что биохимическая дифференциация *C. diphtheriae* на биотипы не подтверждается филогенетическим анализом и свидетельствует о важности использования молекулярных методов типирования для изучения гетерогенности популяции *C. diphtheriae* [7, 21].

6. Относительная роль рекомбинационной и мутационной изменчивости в разнообразии вида *C. diphtheriae* варьирует между различными клонами. В эволюции нетоксигенных штаммов сиквенс-типа ST5 главной движущей силой является рекомбинационная изменчивость. Мутации играют большую роль в генерации разнообразия и распространения токсигенного клона сиквенс-типа ST8, что указывает на потенциальное влияние вакциноиндуцированного иммунного ответа (иммунологического пресса) на эволюцию токсигенных вариантов бактерий. В конкатенированном кор-геноме штаммов ST5 обнаружено 3577 единичных нуклеотидных замен, из которых 2783 (58 событий) – за счет рекомбинаций, 253 – за счет гомоплазий. В конкатенированном кор-геноме штаммов ST8 выявлено 426 единичных нуклеотидных замен, в том числе за счет рекомбинаций – 44 (6 событий), гомоплазий – 54. Частота возникновения мутаций среди штаммов ST5 составила $5,6 \times 10^{-7}$ на штамм в год, среди штаммов ST8 – $8,9 \times 10^{-7}$ на штамм в год [21].

7. Геномный анализ показал, что потенциал вирулентности *C. diphtheriae*, обусловленный пиями SpaA, SpaD, SpaH и другими генами, кодирующими белки, участвующие в адгезии, варьирует как среди штаммов одного клона, так и среди штаммов разных клонов. Нетоксигенные штаммы сиквенс-типа ST5

подгрупп ST5-A и ST5-C обладали только двумя типами пилей, SpaD и SpaH, тогда как штаммы подгруппы ST5-B имели еще и пили типа SpaA, находящиеся в геномных островках и приобретенные в результате горизонтальной передачи генов. Вследствие мутационных изменений некоторые гены в кластерах генов пилей утратили свою функцию. Ген, кодирующий BigA-подобный адгезин, был только у некоторых изолятов ST5 подгрупп ST5-A и ST5-B. Токсигенные штаммы эпидемического клона сиквенс-типа ST8 обладали тремя типами пилей. Подобно штаммам сиквенс-типа ST5, некоторые гены в различных кластерах генов пилей были псевдогенами. Все изоляты ST8 обладали геном, кодирующим BigA-подобный адгезин (DIP2014), и геном *sapA* (DIP2066), кодирующим поверхностный заякоренный фимбриальный белок, который отсутствовал у изолятов сиквенс-типа ST5. Большинство изолятов сиквенс-типа ST8 содержали ген DIP2093, кодирующий адгезин семейства Sdr. Штаммы сиквенс-типа ST8 имеют более высокий потенциал адгезивной и инвазивной активности в отношении клеток эпителия хозяина, чем штаммы ST5 [21].

8. С помощью геномного анализа акцессорных генов (некор-геномов) токсигенных эпидемических штаммов ST8 риботипов Sankt-Peterburg, Rossija и неэпидемических штаммов ST25 риботипа Lyon, ST28, 41, 53 риботипа Otchakov установлены различия по содержанию белок-кодирующих последовательностей по 12 категориям функциональной активности COG. Эпидемические штаммы содержали белки категории (COG G), связанные с транспортом и метаболизмом углеводов, которые отсутствовали у неэпидемических штаммов. Эпидемические штаммы имели большее число белков категории COG X, связанных с мобильностью генов и их горизонтальной передачей, категории COG M, связанных с клеточной и внешней мембранами. Доля белков категории COG с множественными функциями среди эпидемических штаммов была выше.

Штаммы эпидемического клона ST8 содержали большее число генов, участвующих в адгезии, в сравнении со штаммами неэпидемических генотипов, у которых отсутствовали все гены кластера, кодирующие пили SpaH, ген *sapA* (DIP2066) (риботип Lyon), гены, кодирующие минорные субъединицы SpaI, SpaG пилей SpaH, гены, кодирующие минорную субъединицу SpaE и ген *srtC* пилей SpaD, ген DIP2093, кодирующий адгезин семейства Sdr (риботип Otchakov), что свидетельствует об их более высокой способности адгезировать и инвазировать клетки хозяина.

Штаммы эпидемического клона ST8 отличались по структуре регуляторного гена *dtxR* от штаммов неэпидемических генотипов. 2 несинонимичные мутации A 147 V и L 214 I в С-концевом, третьем домене белка-репрессора DtxR выявлены только у 34 штаммов ST8 из 93 секвенированных штаммов. Белок-репрессор DtxR является основным

железо-зависимым регулятором, который не только контролирует экспрессию гена *tox*, регулирует метаболизм железа, но и имеет другие регуляторные функции, обуславливая дифференцированную транскрипцию генов почти 15% генома, что не исключает участие этих мутаций в повышении фитнеса штаммов эпидемических генотипов [21, 59].

9. Состояние и уровень популяционного антитоксического противодифтерийного иммунитета определяет защищенность от инфекции и, соответственно, регулирует интенсивность эпидемического процесса. В период развития вспышки дифтерии 1995–1996 гг. иммунная прослойка составляла 79,6% с провалом среди взрослых до 54,2%. Вместе с тем в группе лиц 18–34 лет доля серопозитивных составила 73,2%, а старше 35 лет – только 31,2%. Проведенные исследования позволили обосновать необходимость введения 3-кратной иммунизации населения в возрасте 35–60 лет. Серологические мониторинговые исследования в 1998–2001 гг. (после проведения кампании массовой иммунизации) и в 2004 г. (в условиях продолжающейся регистрации единичных случаев дифтерии среди взрослых) свидетельствовали о недостаточной защищенности отдельных возрастных групп. Наименьшие показатели защиты отмечены в возрастных группах 45–54 года (77,6%) и 50–64 года (63,9%). Серологические исследования, проведенные в 2017 г., показали самый высокий (96,7%) уровень противодифтерийного иммунитета за последние 30 лет наблюдений. В отличие от предыдущих исследований, возрастных групп с долей серопозитивных детей менее 90% и взрослых менее 75% не выявлено. У серопозитивных лиц противодифтерийные антитела имелись в основном в защитных и высокозащитных титрах: у 93,7% лиц 1–14 лет, у 88,7% – 15–19 лет, у 78,4% – 20–76 лет [1, 3, 6, 10, 14, 22, 25, 32, 34, 35, 45, 47, 49, 50, 62].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Результаты диссертационного исследования использованы для совершенствования тактики иммунизации взрослых (проведение 3-кратной иммунизации населения 35–60 лет, проведение дополнительной кампании иммунизации взрослых в 2004 г.), совершенствования системы микробиологического мониторинга возбудителя дифтерии в Республике Беларусь, что нашло отражение в нормативно-правовых актах Министерства здравоохранения Республики Беларусь: Приказ № 57 от 05.04.1996 «О проведении кампании массовой иммунизации взрослого населения против дифтерии»; Приказ № 241 от 04.11.2004 «О проведении дополнительной иммунизации против дифтерии взрослого населения»; Приказ № 275 от 1 сент. 1999 г. «О дальнейшем совершенствовании календаря профилактических прививок и основных положениях об их организации и проведении» [62];

инструкция «Лабораторная диагностика дифтерии» (приложение 2) и инструкция «Эпидемиологический надзор за дифтерией» (приложение 1) к приказу № 42 от 09.02.2000 [63, 64].

2. Наличие в гетерогенной популяции *C. diphtheriae* НТТН штаммов требует анализа нетоксигенных штаммов на молекулярном уровне, выяснения генетических дефектов отсутствия токсинопродукции для оценки их эпидемиологической значимости. НТТН штаммы являются резервуаром сохранения гена *tox* в популяции *C. diphtheriae*, предоставляя теоретическую возможность возрождения экспрессии токсина или в результате спонтанной реверсии в токсигенные штаммы, или в результате гомологичной рекомбинации между разными коринефагами [63].

3. Поскольку биотипы *C. diphtheriae* не являются стабильными эпидемиологическими маркерами, так как не поддерживаются геномным многообразием и не имеет филогенетической поддержки, для эпидемиологического надзора и мониторинга *C. diphtheriae* необходимо использовать молекулярные методы генотипирования [21].

4. Ввиду того что вакцинация оказывает влияние на динамику эволюции, формирующую геномное разнообразие среди токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, не исключено, что в процессе адаптации возбудителя в будущем могут накапливаться несинонимичные нуклеотидные замены, которые могут привести к конформационным изменениям в структуре белка дифтерийного токсина и, соответственно, влиять на эффективность вакцины. Необходим мониторинг за накоплением мутаций в гене токсигенности *C. diphtheriae* [64].

5. В последнее десятилетие в Республике Беларусь дифтерия практически не регистрируется и естественного бустирования иммунитета не происходит, поддержание высокого уровня поствакцинального иммунитета играет чрезвычайную роль в контроле этой инфекции. Иммунизацию детей против дифтерии необходимо проводить параллельно с ревакцинациями взрослых [22].

6. Нуклеотидные последовательности промоторной области гена *tox*, гена *dtxR* *C. diphtheriae* депонированы в международную базу данных GenBank (режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, коды доступа: EU884424.1, FJ036975.1, FJ036976.1). Сиквенсы геномов 93 штаммов *C. diphtheriae* депонированы в международную базу данных DDBJ/EMBL/GenBank (National Center for Biotechnology Information, GenBank Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), коды доступа: LSVL00000000-LSYP00000000, LSZF00000000, LTAR00000000-LTAS00000000, MSIN00000000-MSIR00000000 и могут быть использованы для глобального и локального мониторинга генетических вариантов популяции *C. diphtheriae*, проведения многоплановых научных исследований, исследования молекулярно-генетических механизмов вирулентности и изменчивости [8, 21].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Оценка эффективности иммунизации взрослых против дифтерии / В. Л. Колодкина, Э. В. Фельдман, А. М. Дроница, Л. П. Титов, А. К. Кожемякин, Д. Ф. Захаренко // *Здравоохранение*. – 1998. – № 12. – С. 29–31.

2. Генотипическая и фенотипическая вариабельность изолятов *Corynebacterium diphtheriae*, циркулировавших на территории Республики Беларусь в 1996–1997 годах / А. М. Дроница, В. Л. Колодкина, Л. П. Титов, P. Grimont, C. Andronescu, V. Marin, A. Petric // *Медицинские новости*. – 1999. – № 1–2. – С. 58–61.

3. Иммунологическая эффективность одной, двух и трех прививок против дифтерии у взрослых / В. Л. Колодкина, Э. В. Фельдман, А. М. Дроница, Л. П. Титов, А. К. Кожемякин, Д. Ф. Захаренко // *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. – 1999. – № 4. – С. 34–38.

4. Genotypic and phenotypic characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated from patients in Belarus during the epidemic period / L. Titov, V. Kolodkina, A. Dronina, F. Grimont, P.A.D. Grimont, M. Collin, A. de Zoysa, C. Andronescu, A. Diaconescu, V. Marin, A. Efstratiou // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol. 41, No. 3. – P. 1285–1288.

5. Изменения в популяции *C. diphtheriae* на этапе снижения заболеваемости дифтерией в Беларуси / В. Л. Колодкина, Т. Н. Шарапа, Л. П. Титов, F. Grimont, P. A. Grimont, A. Efstratiou // *Здравоохранение*. – 2004. – № 10. – С. 18–20.

6. Противодифтерийный иммунитет у взрослого населения Беларуси / В. Л. Колодкина, Т. Н. Шарапа, О. Н. Дрожжина, Л. П. Титов // *Здравоохранение*. – 2006. – № 2. – С. 64–68.

7. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus [Electronic resource] / V. Kolodkina, L. Titov, T. Sharapa, F. Grimont, P. A. D. Grimont, A. Efstratiou // *BMC Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 6. – P. 129. doi:10.1186/1471-2334-6-129. – Mode of access : <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2334-6-129>. – Date of access : 13.04.2018.

8. Сайты точечных мутаций промоторной области *tox*-гена и гена регулятора *dtxR*, ассоциированные с уровнем токсинопродукции *Corynebacterium diphtheriae*, изолированных в Беларуси / В. Л. Колодкина, Л. П. Титов, Т. Н. Шарапа, О. Н. Дрожжина // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2007. – № 1. – С. 22–29.

9. Фенотипические особенности эпидемических и неэпидемических *C. diphtheriae*, изолированных в Беларуси / В. Л. Колодкина, О. Н. Дрожжина, Т. Н. Денисевич, Л. П. Титов // *Здравоохранение*. – 2007. – № 11. – С. 25–27.

10. Колодкина, В. Л. Антитоксический иммунитет и генотипическая характеристика возбудителя дифтерии при разных клинических формах / В. Л. Колодкина, Т. Н. Денисевич, Л. П. Титов // *Здравоохранение*. – 2008. – № 11. – С. 45–48.

11. Колодкина, В. Л. Иммунодот-тест для выявления дифтерийного токсина / В. Л. Колодкина, Т. Н. Денисевич, Л. П. Титов // *Здравоохранение*. – 2009. – № 12. – С. 10–13.

12. Приготовление иммунозолотого маркера и его использование в иммуно-дот анализе для выявления дифтерийного токсина / В. Л. Колодкина, Т. Н. Денисевич, Л. А. Дыкман, О. Н. Врублевская // *Медицинский журнал*. – 2009. – № 2. – С. 66–69.

13. Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus / I. Mokrousov, A. Vyazovaya, V. Kolodkina, E. Limeschenko, L. Titov, O. Narvskaya // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 28, No. 6. – P. 701–703. doi: 10.1007/s10096-008-0674-4.

14. Самойлович, Е. О. Роль вакцинопрофилактики в контроле и ликвидации инфекционных заболеваний / Е. О. Самойлович, М. А. Ермолович, В. Л. Колодкина // *Здравоохранение*. – 2010. – № 10. – С. 5–12.

15. Иммуногенные области дифтерийного токсина и уровень их мутабельности / В. В. Хрусталева, Е. В. Барковский, В. Л. Колодкина, Г. М. Игнатьев // *Здравоохранение*. – 2011. – № 11. – С. 43–48.

16. A method for estimation of immunogenic determinants mutability: case studies of HIV1 gp120 and diphtheria toxin [Electronic resource] / V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, A. E. Vasilevskaya, S. M. Skripko, V. L. Kolodkina, G. M. Ignatyev, P. A. Semizon // *J. Integrated OMICS*. – 2011. – Vol. 1, No. 2. – P. 236–252. DOI: 10.5584/jiomics.v1i2.64. – Mode of access : <http://www.jiomics.com/index.php/jio/article/view/64/63>. – Date of access : 14.04.2018.

17. Kolodkina, V. L. Identification of *Corynebacterium diphtheriae* gene involved in adherence to epithelial cells / V. L. Kolodkina, T. N. Denisevich, L. P. Titov // *Infect. Genet. Evol.* – 2011. – Vol. 11, No. 2. – P. 518–521.

18. Хрусталева, В. В. Вероятность воспроизведения вторичной структуры наиболее антигенных областей дифтерийного токсина в составе коротких пептидов / В. В. Хрусталева, Е. В. Барковский, В. Л. Колодкина // *Здравоохранение*. – 2012. – № 10. – С. 9–12.

19. Opposite nucleotide usage in different parts of the *Corynebacterium diphtheriae* spaC gene / V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, V. L. Kolodkina,

T. A. Khrustaleva // Int. J. Bioinform. Res. Appl. – 2015. – Vol. 11, No. 4. – P. 347–365.

20. Structural and antigenic features of the synthetic SF23 peptide corresponding to the receptor binding fragment of diphtheria toxin / T. A. Khrustaleva, V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, V. L. Kolodkina, A. A. Astapov // Mol. Immunol. – 2015. – Vol. 63, No. 2. – P. 235–244. doi:10.1016/j.molimm.2014.07.008.

21. Genomic analysis of endemic clones of toxigenic and non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Belarus during and after the major epidemic in 1990s [Electronic resource] / S. Grosse-Kock, V. Kolodkina, E. C. Schwalbe, J. Blom, A. Burkovski, P. A. Hoskisson, S. Brisse, D. Smith, I. C. Sutcliffe, L. Titov, V. Sangal // BMC Genomics. – 2017. – Vol. 18. – P. 873. DOI 10.1186/s12864-017-4276-3. – Mode of access : <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12864-017-4276-3>. – Date of access : 14.04.2018.

22. Популяционный иммунитет к дифтерии и столбняку в Республике Беларусь в условиях многолетней иммунизации / В. Л. Колодкина, Е. О. Самойлович, В. С. Мартынов, И. Н. Глинская, В. С. Высоцкая // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2018. – № 3. – С.19–26. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-19-26.

23. Genomic analyses reveal two distinct lineages of *Corynebacterium ulcerans* strains / R. Subedi, V. Kolodkina, I. C. Sutcliffe, L. Simpson-Louredo, R. Hirata, Jr., L. Titov, A. L. Mattos-Guaraldi, A. Burkovski, V. Sangal // New Microbe and New Infect. – 2018. – Vol. 25. – P. 7–13. doi.org/10.1016/j.nmni.2018.05.005.

Статьи в рецензируемых сборниках научных работ

24. Анализ динамики эпидемического процесса дифтерийной инфекции в Белоруссии / В. С. Борткевич, В. М. Коржунов, А. Г. Мороз, В. Г. Жуковский, В. Л. Колодкина, Д. Ф. Захаренко // Актуальные вопросы гигиены и эпидемиологии в Белоруссии : материалы VIII объедин. съезда гигиенистов, микробиологов, эпидемиологов и паразитологов, Пинск, 26–27 сент. 1991 г. : в 2 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белор. науч. о-во гигиенистов и санитар. врачей, Белор. науч. о-во микробиологов, эпидемиологов и паразитологов / редкол.: П.Г. Рытик [и др.]. – Минск, 1991. – Т. 2 : Эпидемиологический надзор за важнейшими инфекционными и паразитарными заболеваниями. – С. 15–17.

25. Гуморальный поствакцинальный иммунитет и антигенспецифическая пролиферативная активность лимфоцитов у детей, привитых живой коревой и АКДС вакцинами, на территории, загрязненной радионуклидами / Э. В. Фельдман, Л. А. Капустик, В. Л. Колодкина, М. К. Гущинская // Охрана материнства и детства в условиях воздействия последствий катастрофы на

Чернобыльской АЭС : материалы науч. исследований 1991–1995 гг. – Минск, 1996. – Ч. 2. – С. 169–174.

26. Особенности дифтерийной инфекции в Беларуси в 90-е годы / А. М. Дронина, В. Л. Колодкина, Л. П. Титов, Л. А. Мытько // Актуальные проблемы микробиологии: этиология, патогенез, терапия и диагностика : ст. и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., Минск, 26–27 мая 1997 г. – Минск : Минсктиппроект, 1998. – С. 70–77.

27. Эпидемиологическое типирование *Corynebacterium diphtheriae*, циркулирующих в Беларуси / В. Л. Колодкина, Л. П. Титов, А. М. Дронина, Л. А. Мытько // Достижения медицинской науки Беларуси : рец. науч.-практ. ежегодник. – Минск: БелЦНМИ, 1999. – Вып. 4. – С. 54.

28. Биологические свойства нетоксигенных изолятов *C. diphtheriae*, циркулирующих в Беларуси (1996–1997) / В. Л. Колодкина, А. М. Дронина, Л. П. Титов, Т. Н. Денисевич, Л. А. Мытько // Достижения медицинской науки Беларуси : рец. науч.-практ. ежегодник. – Минск : БелЦНМИ, 2000. – Вып. 5. – С. 108–109.

29. Колодкина, В. Л. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг дифтерии в Беларуси / В. Л. Колодкина, Т. Н. Шарапа // Достижения медицинской науки Беларуси : рец. науч.-практ. ежегодник. – Минск : ГУ РНМБ, 2003. – Вып. 8. – С. 54–55.

30. Распространенность токсигенных и нетоксигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в период снижения заболеваемости дифтерией в Беларуси / В. Л. Колодкина, Т. Н. Шарапа, Л. П. Титов, P. Grimont, A. Efstratiou // Достижения медицинской науки Беларуси : рец. науч.-практ. ежегодник. – Минск : ГУ РНМБ, 2004. – Вып. 9. – С. 70–71.

31. Транспозонный мутагенез штаммов *Corynebacterium diphtheria* / В. Л. Колодкина, Т. Н. Шарапа, О. Н. Дрожжина, Л. П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология и иммунология): материалы НИИЭМ по итогам выполнения ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии» 2001–2005 гг. – Минск, 2005. – С. 395–398.

32. Колодкина, В. Л. Антитоксический противодифтерийный иммунитет у больных разными формами дифтерии / В. Л. Колодкина, Т. Н. Шарапа, О. Н. Дрожжина // Актуальные проблемы гигиены и эпидемиологии : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию санитар.-эпидемиол. службы Респ. Беларусь. – Минск, 2006. – С. 408–410.

33. Строение олигомеров пептида SF23 [Электронный ресурс] / В. В. Хрусталёв, В. Л. Колодкина, Е. Ю. Кохановская, Т. А. Хрусталева // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

под ред. Л. П. Титова [и др.]. – Минск: ГУ РНМБ, 2016. – Вып. 9. – С. 214–218. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

Тезисы докладов в материалах научных конференций

34. Фельдман, Э. В. Иммунологическая эффективность вакцинации детей в условиях воздействия малых доз радиации / Э. В. Фельдман, Л. А. Капустик, В. Л. Колодкина // Материалы междунар. науч. конф., посвящ. 5-летию образов. Гомельск. гос. мед. ин-та, Гомель, 5–10 нояб. 1995 г. – Гомель, 1995. – С. 109–110.

35. Problems of T-cell immunity in children from regions contaminated with radionuclides after Chernobyl disaster / L. P. Titov, G. P. Kharitonik, I. E. Gurmanchuk, S. I. Ignatenko, V. L. Kolodkina // Annual Meeting of American College of Allergy, Asthma and Immunology, Boston, Nov. 8–13, 1996: abstr. book. – Boston, 1996. – P. 53.

36. Характеристика возбудителя дифтерии в Республике Беларусь в период эпидемического подъема заболеваемости / А. М. Дронина, Е. И. Зенько, Е. П. Счесленок, В. Л. Колодкина, Л. П. Титов, Э. В. Фельдман // Принципы и перспективы диагностики новых и вновь появляющихся инфекционных заболеваний: ст. и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., Смолевичи, 27–28 февр. 1997 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, БелНИИ эпидемиол. и микробиол., Респ. центр гигиены и эпидемиол.; ред. кол. : Л. П. Титов [и др.]. – Минск: БелНИИЭМ, 1997. – С. 108.

37. Biologic properties and susceptibility to antibiotics of *Corynebacterium diphtheriae*, isolated in Belarus / L. Titov, A. Dronina, V. Kolodkina, E. Zenko, E. Scheslenok, S. Gontarev // Abstr. of the 1997 Annual IDSA Meeting, San Francisco, California, Sept. 13–16, 1997 [Publ. in] Clin. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 25, No. 2. – P. 370.

38. Characteristics of *C. diphtheriae* isolates during the peak epidemic period in the Republic of Belarus / L. P. Titov, A. M. Dronina, E. I. Zenko, E. P. Scheslenok, V. L. Kolodkina, L. G. Zhuk, L. A. Mytko // Fourth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Bucharest, Romania, 25–27 June 1997: abstr. book. – Bucharest, 1997. – P. 30–31.

39. Characteristics of diphtheria pathogen in Belarus / L. Titov, A. Dronina, E. Zenko, E. Scheslenok, V. Kolodkina, E. Feldman // Abstr. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Lausanne, Switzerland, May 25–28, 1997 [Publ. in] Clin. Microbiol. Infect. – 1997. – Vol. 3, suppl. 2. – P. 139–140.

40. Дифтерия в Республике Беларусь / Л. П. Титов, А. М. Дронина, В. Л. Колодкина, Ф. А. Германович // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: тез. докл. II междунар. конф., Санкт-Петербург, 2–4 сент. 1998 г. / НИИ им. Пастера. – Санкт-Петербург, 1998. – С. 18.

41. Дрони́на, А. М. Токсинообразование коринебактерий дифтерии, циркулирующих в Республике Беларусь / А. М. Дрони́на, В. Л. Колодкина, Л. П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, микробиология, вирусология и иммунология): ст. и тез. докл. I итог. науч.-практ. конф., Минск, 8–9 апр. 1998 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, БелНИИ эпидемиол. и микробиол., Респ. центр гигиены и эпидемиол., Минск. гос. мед. ин-т.; ред. кол.: Л. П. Титов [и др.]. – Минск: БелНИИЭМ, 1998. – С. 489–490.

42. Dronina, A. M. *Corynebacterium diphtheriae* TPL and biotypes circulating within the epidemic decrease period in Belarus / A. M. Dronina, V. L. Kolodkina, L. P. Titov // 8th International Congress on Infectious Diseases, Boston, Massachusetts, USA, 15–18 May 1998: abstr. book / International Society for Infectious Diseases. – Boston, 1998. – P. 36–37, abstr. # 14.042.

43. Titov, L. P. Diphtheria in the Republic of Belarus in 1996–1997 / L. P. Titov, A. M. Dronina, V. L. Kolodkina // Fifth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Halkidiki, Greece, 24–27 June 1998: program. abstr. book. – Halkidiki, 1998. – P. 25–26.

44. Titov, L. P. Trends in the Activities of the Reference Centre on Diphtheria of the Health Ministry of the Republic of Belarus: activity report / L. P. Titov, V. L. Kolodkina, A. M. Dronina // Fifth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Halkidiki, Greece, 24–27 June 1998: program. abstr. book. – Halkidiki, 1998. – P. 20–21.

45. Противодифтерийный популяционный иммунитет после проведенной массовой и плановой иммунизации в Беларуси / В. Л. Колодкина, А. М. Дрони́на, Т. Н. Денисевич, Л. П. Титов // Актуальные вопросы иммунологии и аллергологии: материалы 4-го съезда Белорус. науч. о-ва иммунологов и аллергологов, Гомель, 15–16 июня 2000 г. – Мозырь: Белый ветер, 2000. – С. 171–173.

46. Biological properties of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolates circulating in Belarus (1996–1997) / L. Titov, V. Kolodkina, A. Dronina, P. Grimont, C. Andronescu // Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Brussels, Belgium, 21–24 June 2000: progr. abstr. book. – Brussels, 2000. – P. 59.

47. Противодифтерийный иммунитет у больных и привитых взрослых в Беларуси / В. Л. Колодкина, Т. Н. Денисевич, Л. А. Мытько, Л. П. Титов // Вакцины и иммунизация: тез. докл. 5-го междунар. форума по глобальной вакцинологии, Минск, 15–16 окт. 2001 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, НАН Беларуси, НИИ эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2001. – С. 28.

48. Molecular-biological monitoring of *Corynebacterium diphtheriae* circulation in Belarus / V. Kolodkina, L. Titov, A. Blizniuk, T. Denisevich, P. Grimont, S. Lai, A. Efstratiou // Seventh International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Vienna, Austria, 12–14 June 2002 : program. abstr. book. – Vienna, 2002. – P. 88–89.

49. Колодкина, В. Л. Антитоксический иммунитет к дифтерии в г. Минске / В. Л. Колодкина, Т. Н. Шарапа // Актуальные проблемы вакцинопрофилактики: материалы гор. науч.-практ. конф. / Минск. гор. ЦГЭ. – Минск, 2003. – С. 8–10.

50. Колодкина, В. Л. Противодифтерийный популяционный иммунитет и заболеваемость дифтерией в Беларуси / В. Л. Колодкина, Т. Н. Шарапа // Вакцины и иммунизация : тез. докл. 6-го междунар. форума по глобальной вакцинологии / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, НАН Беларуси, НИИ эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2003. – С. 41–42.

51. Дрожжина, О. Н. Изучение чувствительности *Corynebacterium diphtheriae* к антибактериальным препаратам / О. Н. Дрожжина, Т. Н. Шарапа, В. Л. Колодкина // Проблемы инфекционной патологии XXI века : материалы юбил. конф., посвящ. 80-летию НИИЭМ, Минск, 27–28 окт. 2004 г. / НИИ эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2004. – С. 263.

52. Kolodkina, V. L. Prevalence of non-toxigenic tox-gene bearing *Corynebacterium diphtheriae* strains in Belarus / V. L. Kolodkina, T. N. Sharapa, L. P. Titov // Eight International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Copenhagen, Denmark, 16–18 June 2004 : program. abstr. book. – Copenhagen, 2004. – P. 42.

53. Адгезивная и инвазивная активности у штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / О. Н. Дрожжина, Т. Н. Шарапа, В. Л. Колодкина, Л. П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология и иммунология) : материалы НИИЭМ по итогам выполнения ГНТП «Инфекция и медицинская биотехнология» 2001–2005 гг. / ред. : Л. П. Титов [и др.]. – Минск, 2005. – С. 399.

54. Генетическая характеристика лиганд-связывающего фрагмента гена адгезина штаммов *Corynebacterium diphtheriae* с разными уровнями адгезивной активности / О.Н. Дрожжина, В.Л. Колодкина, Т.Н. Денисевич, Л.П. Титов // Молекулярная диагностика инфекционных болезней : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 17–18 мая 2007 г. / ред. совет. : Л. П. Титов [и др.]. – Минск, 2007. – С. 124.

55. Колодкина, В. Л. Приготовление иммунозолотого маркера и его использование для выявления дифтерийного токсина / В. Л. Колодкина, Т. Н. Денисевич // Современные проблемы инфекционной патологии человека:

сб. науч. тр. / НИИ эпидемиологии и микробиологии ; гл. ред.: Л. П. Титов. – Минск : Белпринт, 2008. – Вып. 1. – С. 142–143.

56. Kolodkina, V. Diphtheria in Belarus / V. Kolodkina, T. Denisevich, L. Titov // Tenth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria and DIPNET, Larnaca, Cyprus, 5–7 Nov. 2008 : program. abstr. book. – Larnaca, 2008. – P. 36.

57. Kolodkina, V. Transformation of *Corynebacterium diphtheriae* with EZ::TN(KAN-2) Transposome / V. Kolodkina, T. Denisevich, L. Titov // Tenth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria and DIPNET, Larnaca, Cyprus, 5–7 Nov. 2008 : program. abstr. book. – Larnaca, 2008. – P. 65.

58. Current diphtheria status in Belarus / V. Kolodkina, T. Denisevich, L. Titov, N. Guiso // Eleventh International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, ELWGD Third Annual Meeting of Diphtheria Surveillance Network (DIPNET), Riga, Latvia, 7–9 Oct. 2009 : program. abstr. book. – Riga, 2009. – P. 39.

59. Колодкина, В. Л. Геномный анализ эпидемических и неэпидемических штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, изолированных в Республике Беларусь в 1996–2010 гг. / В. Л. Колодкина, V. Sangal, Л. П. Титов // Молекулярная диагностика – 2018 : сб. тр. междунар. науч.-практ. конф., Минск, 27–28 сент. 2018 г. / под ред. акад. РАН В. И. Покровского. – Минск : СтройМедиаПроект, 2018. – С. 129–130.

Патенты

60. Тест-система для выявления дифтерийного токсина в пробе : пат. ВУ 15675 / В. Л. Колодкина, Т. Н. Денисевич, Л. П. Титов. – Оpubл. 30.04.2012.

61. Способ определения направления мутационного давления в гене бактерии : пат. ВУ 17349 / В. В. Хрусталеv, Е. В. Барковский, В. Л. Колодкина, Л. П. Титов. – Оpubл. 30.08.2013.

Инструкции по применению

62. О дальнейшем совершенствовании календаря профилактических прививок и основных положениях об их организации и проведении : приказ М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 1 сент. 1999 г, № 275 / авт.-разраб. : Д. Ф. Захаренко, Н. С. Себут, Л. И. Мосина, А. К. Кожемякин, Л. И. Матуш, Г. Н. Чистенко, А. А. Астапов, Э. В. Фельдман, Е. О. Самойлович, В. Л. Колодкина, Л. А. Горбич, В. Ф. Жерносек, Л. М. Потакова, В. К. Пивненко. – Минск : М-во здравоохранения Респ. Беларусь, 1999. – 20 с.

63. Инструкция «Лабораторная диагностика дифтерии» : приложение 2 к приказу М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 9 февр. 2000 г., № 42 / авт.-разраб. : Ф. А. Германович, А. К. Кожемякин, В. С. Голуб, Ю. П. Цуриков, Н. С. Себут, Л. И. Мосина, В. Л. Колодкина, А. М. Дроина, М. И. Римжа,

Г. Н. Чистенко, А. А. Астапов, П. К. Зубрицкий. – Минск : М-во здравоохранения Респ. Беларусь, 2000. – С. 10–47.

64. Инструкция «Эпидемиологический надзор за дифтерией» : приложение 1 к приказу М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 9 февр. 2000 г., № 42 / авт.-разраб. : Ф. А. Германович, А. К. Кожемякин, В. С. Голуб, Ю. П. Цуриков, Н. С. Себут, Л. И. Мосина, В. Л. Колодкина, А. М. Дронина, М. И. Римжа, Г. Н. Чистенко, А. А. Астапов, П. К. Зубрицкий. – Минск : М-во здравоохранения Респ. Беларусь, 2000. – С. 3–9.

Другие научные издания

65. Эпидемиологический анализ заболеваемости населения дифтерией в Республике Беларусь за 1950–1990 гг. : информ.-аналит. материал для практич. Врачей / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, БелНИИЭМ ; авт.-разраб. : В. С. Борткевич, В. П. Филонов, А. Г. Мороз, В. М. Коржунов, В. Л. Колодкина. – Минск, 1992. – 62 с.

66. Rapid detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by LightCycler PCR / U. Reischl, E. Samoilovich, V. Kolodkina, N. Lehn, H.-J. Linde // In: Rapid Cycle Real-Time PCR – Methods and Applications: Microbiology and Food Analysis / eds. : U. Reischl, C. Wittwer, F. Cockerill. – Heidelberg: Springer Press, 2001. – P. 71-82.

РЭЗІЮМЭ

Калодкіна Валянціна Леанідаўна

Малекулярна-генетычная характарыстыка ўзбуджальніка дыфтэрыі і заканамернасці фарміравання пратэктывага супрацьдыфтэрыянага імунітэту

Ключавыя словы: дыфтэрыя, *Corynebacterium diphtheriae*, адгезія, таксінапрадукцыя, рыбатып, сіквенс-тып, мутацыя, пан-генам, кор-генам, філагенетычны аналіз, біяінфармацыйны аналіз, вакцынацыя, імунітэт.

Мэта працы: вызначыць біялагічныя і малекулярна-генетычныя маркеры эпідэмічных і неэпідэмічных варыянтаў *C. diphtheriae*, устанавіць механізмы рэгуляцыі адгезіі і таксінаўтварэння, ролю кор- і пан-генама, сіквенс-тыпаў і механізмаў зменлівасці ў распаўсюджанні і элімінацыі штамаў і ролю імуналагічнага прэса ў кантролі захворвання дыфтэрыяй.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя, сералагічныя, малекулярна-генетычныя, біяінфармацыйныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: атрыманы новыя даныя па фена- і генатыпічнай характарыстыцы *C. diphtheriae*, што цыркулявалі на тэрыторыі Беларусі ў 1996–2015 гг. Расшыфраваны малекулярны механізм адсутнасці экспрэсіі гена *tox* у НТТН штамаў. Устаноўлена наяўнасць у структуры гена *dtxR* трох місенс-мутацый, не асацыяваных з узроўнем таксінапрадукцыі і мутацыі ў прамотарнай вобласці гена *tox*, якая вызначае павышаны ўзровень таксінаўтварэння у *C. diphtheriae*. Выяўлена высокая ступень генетычнай стабільнасці гена *tox*. Устаноўлена наяўнасць двух філагенетычных ліній у *C. diphtheriae*. Даказана, што галоўнай рухаючай сілай у эвалюцыі нетаксігенных штамаў з'яўляецца рэкамбінацыя. Мутацыі граюць вялікую ролю ў забеспячэнні разнастайнасці таксігеннага клона. Вызначаны малекулярныя механізмы варыябельнасці *C. diphtheriae* па ўзроўні адгезійнай актыўнасці. Упершыню ўстаноўлена, што ген DIP1621, які кадуе інвазіён-асацыяваную гідралазу, удзельнічае ў працэсе адгезіі ў *C. diphtheriae*. Выяўлены адрозненні паміж штамамі эпідэмічнага і неэпідэмічных клонаў *C. diphtheriae*. Выяўлены заканамернасці фарміравання пратэктывага супрацьдыфтэрыянага папуляцыйнага імунітэту і яго роля ў рэгуляцыі кантролю інтэнсіўнасці эпідэмічнага працэсу, абгрунтавана і прапанавана тактыка 3-разовай імунізацыі дарослых, старэйшых за 35 гадоў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: для ўдасканалення маніторынгу *C. diphtheriae*, лабараторнай дыягностыкі дыфтэрыі, імунізацыі.

Галіна прымянення: мікрабіялогія, ахова здароўя.

РЕЗЮМЕ

Колодкина Валентина Леонидовна

Молекулярно-генетическая характеристика возбудителя дифтерии и закономерности формирования протективного противодифтерийного иммунитета

Ключевые слова: дифтерия, *Corynebacterium diphtheriae*, адгезия, токсинопродукция, риботип, сиквенс-тип, мутация, пан-геном, кор-геном, филогенетический анализ, биоинформационный анализ, вакцинация, иммунитет.

Цель работы: определить биологические и молекулярно-генетические маркеры эпидемических и неэпидемических вариантов *C. diphtheriae*, установить механизмы регуляции адгезии и токсинообразования, роль кор- и пан-генома, сиквенс-типов и механизмов изменчивости в распространении и элиминации штаммов и роль иммунологического пресса в контроле заболеваемости дифтерией.

Методы исследования: микробиологические, серологические, молекулярно-генетические, биоинформационные, статистические.

Полученные результаты и их новизна: получены новые данные по фено- и генотипической характеристике *C. diphtheriae*, циркулирующих на территории Беларуси в 1996–2015 гг. Расшифрован молекулярный механизм отсутствия экспрессии гена *tox* у НТТН штаммов. Установлено наличие в структуре гена *dtxR* трех миссенс-мутаций, не ассоциированных с уровнем токсинопродукции и мутации в промоторной области гена *tox*, определяющей повышенный уровень токсинопродукции у *C. diphtheriae*. Выявлена высокая степень генетической стабильности гена *tox*. Установлено наличие двух филогенетических линий у *C. diphtheriae*. Доказано, что главной движущей силой в эволюции нетоксигенных штаммов является рекомбинация. Мутации играют большую роль в обеспечении разнообразия токсигенного клона. Определены молекулярные механизмы вариабельности *C. diphtheriae* по уровню адгезивной активности. Впервые установлено, что ген DIP1621, кодирующий инвазион-ассоциированную гидролазу, участвует в процессе адгезии у *C. diphtheriae*. Выявлены различия между штаммами эпидемического и неэпидемических клонов *C. diphtheriae*. Выявлены закономерности формирования протективного противодифтерийного популяционного иммунитета и его роль в регуляции контроля интенсивности эпидемического процесса, обоснована и предложена тактика 3-кратной иммунизации взрослых старше 35 лет.

Рекомендации по использованию: для совершенствования мониторинга *C. diphtheriae*, лабораторной диагностики, иммунопрофилактики дифтерийной инфекции.

Область применения: микробиология, здравоохранение.

SUMMARY

Kolodkina Valentina Leonidovna

Molecular-genetic characteristics of causative agent of diphtheria and regularities of formation of protective anti-diphtheria immunity

Key words: diphtheria, *Corynebacterium diphtheriae*, adhesion, toxin production, ribotype, sequence type, mutation, pan-genome, core genome, phylogenetic analysis, bioinformatics analysis, vaccination, immunity.

Aim: to determine biological and molecular-genetic markers of *C. diphtheriae* epidemic and non-epidemic variants, to establish the mechanisms of regulation of adhesion and toxin production, the role of core genome and pan-genome, sequence types and mechanisms of variability in distribution and elimination of strains and the role of the immunological press in controlling the incidence of diphtheria.

Methods of research: microbiological, serological, molecular-genetic, bioinformatical, statistical.

Results and their novelty: new data on the pheno- and genotypic characteristics of *C. diphtheriae* circulating in the Republic of Belarus for the period 1996–2015 have been obtained. The molecular mechanism for the lack of expression of the *tox* gene in non-toxigenic *tox* gene bearing (NTTB) strains has been decrypted. The presence of three missense mutations in the structure of the *dtxR* gene has been established that are not associated with the level of toxin production and mutation in the promoter region of the *tox* gene, which determines the elevated level of toxin production in *C. diphtheriae*. A high degree of genetic stability of the *tox* gene has been identified. Based on core genome phylogeny the presence of two monophyletic lineages within *C. diphtheriae* have been established. It has been proved that the main driving force in the evolution of non-toxigenic strains is recombination. Point mutations play a significant role in the diversity of toxigenic clone. Molecular mechanisms of adhesive activity variability of *C. diphtheriae* have been determined. For the first time it was established that the DIP1621 gene, encoding an invasion-associated hydrolase, is involved in adhesion in *C. diphtheriae*. Differences between epidemic and non-epidemic clones of *C. diphtheriae* have been determined. The regularities of the formation of protective anti-diphtheria population immunity and its role in controlling the intensity of the epidemic process have been identified, the tactics of 3-fold immunization of adults over 35 years old have been proposed and justified.

Recommendations for use: for the improvement of *C. diphtheriae* monitoring, laboratory diagnosis of diphtheria and immunization against diphtheria.

Application area: microbiology, public health.

Подписано в печать 04.04.19. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Хероx office».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,91. Тираж 60 экз. Заказ 219.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.