

На правах рукописи

Борисова Анастасия Борисовна

Молекулярно-генетическая диагностика и клинические особенности заболеваний, вызываемых представителями рода *Bordetella*

03.02.03 – микробиология

14.01.09 – инфекционные болезни

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Москва – 2021

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ

Афанасьев Станислав Степанович

кандидат медицинских наук

Петрова Марина Семеновна

Официальные оппоненты:

Кафтырева Лидия Алексеевна – доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория кишечных инфекций, заведующая

Усенко Денис Валериевич – доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, клинический отдел инфекционной патологии, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2021 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

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

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Несмотря на достаточный охват профилактическими прививками, в странах с высоким уровнем охвата иммунизацией регистрируется рост заболеваемости коклюшем (Chiu T.F. et al., 2000; Mattoo S. et al., 2005; Waters V. et al., 2009; Cherry J.D. et al., 2012; Qin X., 2015; Breakwell L. et al., 2016). В РФ в 2018–2019 гг. отмечался рост заболеваемости коклюшем в 2,6 раза по сравнению с 2017 годом; показатели заболеваемости составили 7,1 и 9,8 на 100 тыс. населения соответственно (<https://www.rosпотреbnadzor.ru/>). В настоящее время сохраняется высокая заболеваемость детей в возрасте до 1 года и старших возрастных групп, регистрируются очаги инфекции в детских учреждениях, преимущественно в школьных учебных учреждениях (Государственный доклад, 2020; <https://www.rosпотреbnadzor.ru/>). Отмечается большое число «нераспознанных» типичных легких и атипичных стертых труднодиагностируемых форм (Йозефович О.В. и др., 2012; Петрова М.С. др., 2012; Попова О.П. и др., 2014, 2019; Бабаченко И.В. и др., 2019). Кроме того, в последние годы участилась регистрация случаев заболеваний коклюшем среди взрослого населения (Rendi-Wagner P. et al., 2010; Misegades L.K. et al., 2012; Lee S.Y. et al., 2014; Попова О.П. и др., 2014; Koh M.T. et al., 2016; Михеева И.В. и др., 2018) и случаи бактерионосительства среди практически здоровых людей (Mattoo S. et al., 2005; Waters V. et al., 2009; Нестерова Ю.В. и др., 2019), что еще раз подтверждает факт широкой циркуляции *Bordetella pertussis*.

Сложившуюся эпидемиологическую ситуацию по коклюшу зарубежные исследователи объясняют большим количеством отказов родителей от вакцинации среди детей в возрасте до 1 года, необоснованными медицинскими отводами, накоплением неиммунных лиц в старших возрастных группах детского населения, утратой специфического иммунитета у взрослых, внедрением в широкую практику ПЦР-исследований, генотипической изменчивостью возбудителя, а также появлением других бордетелл, которые могут вызвать коклюшеподобные заболевания, против которых иммунитет не вырабатывается (Guthrie J.L. et al., 2010; Mooi F.R. et al., 2011; Njamkepo E. et al., 2011; Bottero D. et al., 2012; Kamiya H. et al., 2012; Miranda C. et al., 2012; Van den Bossche D. et al., 2013; Dinu S. et al., 2014; Pittet L.F. et al., 2014, 2016; Katfy K. et al., 2017; Lotfi M.N. et al., 2017; Mir-Cros A. et al., 2017; Fong W. et al., 2018).

По литературным данным за последние 10 лет пристальное внимание ученых обращено к *Bordetella holmesii*. Впервые коклюшеподобное заболевание (pertussis-like disease), вызванное этим возбудителем, зарегистрировано в 1995 г. в США (Yih W.K. et al., 1999). Начиная с 2000 г., на территориях практически всех континентов были зарегистрированы случаи коклюшеподобного заболевания, этиологическим агентом которых была *B.holmesii* (Mooi F.R. et al., 2011; Njamkepo E. et al., 2011; Kamiya H. et al., 2012; Rodgers L. et al., 2013; Katfy K. et al., 2017; Mir-Cros A. et al., 2017). Учитывая широкую циркуляцию *B.holmesii*, зарубежные исследователи полагают, что подъем заболеваемости в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками может быть обусловлен и циркуляцией этого возбудителя (Guthrie J.L. et al., 2010; Mooi F.R. et al., 2011; Njamkepo E. et al., 2011; Bottero D. et al., 2012; Miranda C. et al., 2012; Van den Bossche D. et al., 2013; Dinu S. et al., 2014; Pittet L.F. et al., 2014, 2016; Fong W. et al., 2018). В РФ в настоящее время отсутствуют данные о распространенности *B.holmesii*.

Степень разработанности темы исследования

В РФ накоплен значительный и обширный опыт в изучении клинического течения коклюшной инфекции, в том числе у детей и взрослых, в очагах инфекции, при различных формах тяжести, в зависимости от биологических (патогенных) свойств возбудителя и в сочетании с микст-инфекцией (Петрова М.С. и др., 1978; 2012; Тимченко В.Н. и др., 2003; Бабаченко И.В. и др., 2007, 2019; Таточенко В.К., 2014; Попова О.П. и др., 2014, 2019). До настоящего времени в РФ не было работ, посвященных заболеванию, возбудителем которого явилась *B.holmesii*, в том числе в сравнении с клиникой коклюша, вызванного *B.pertussis*.

Для генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний исследователями предложено несколько вариантов амплификационных технологий, позволяющих идентифицировать разных представителей рода *Bordetella* и основанных на детекции разных комбинаций фрагментов нуклеотидных последовательностей - IS481, IS1001, *hIS1001*, IS1002, *ptxA* (*ptxS1*) и *recA* (Glare E.M. et. al., 1990; Van der Zee A. et. al., 1993; Kusters K. et. al., 2002; Templeton K.E. et. al., 2003; Xu Y. et. al., 2010; Roorda L. et.al., 2011; Tatti K.M. et.al., 2011; Valero-Rello A. et. al., 2019).

В России на протяжении последних 15 лет ведутся активные разработки молекулярно-генетических методик для идентификации возбудителей коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами (Каратаев Г.И. и др., 2008, 2016; Борисова О.Ю. и др., 2009, 2010; Медкова А.Ю. и др., 2010, 2013; Прадед М.Н. и др., 2013; Мاستиленко А.В. и др., 2014; Пименова А.С. и др., 2017; Елькина М.А. и др., 2018). Сотрудниками ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ разработана тест-система на основе ПЦР-РВ, позволяющая выявлять IS481 и IS1002 в опероне вирулентности *bvgAS* в клинических образцах *B.pertussis* (Каратаев Г.И. и др., 2008, 2016; Медкова А.Ю. и др., 2010, 2013). Коллективом сотрудников ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского была разработана методика изотермической амплификации, позволяющая выявлять ДНК *B.pertussis* (Борисова О.Ю. и др., 2009, 2010; патенты на изобретение РФ №2346987 от 10.02.2009 г., №2542396 от 20.02.2015 г.). Сотрудниками ФБУН ЦНИИЭ разработан и зарегистрирован набор реагентов «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза методом ПЦР, который используется в практическом здравоохранении и обладает высокой степенью чувствительности и специфичности (Прадед М.Н. и др., 2013; Елькина М.А. и др., 2018). Однако, все перечисленные методики генодиагностики позволяют выявлять ДНК *B.pertussis*, и только зарегистрированная тест-система еще *Bordetella parapertussis* и *Bordetella bronchiseptica*, но не идентифицируют ДНК *B.holmesii*.

Поэтому, с учетом появления большого количества сведений о циркуляции *B.holmesii* и вызванных ее коклюшеподобных заболеваниях в различных странах мира, назрела необходимость оптимизации генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в нашей стране с целью расширения возможностей обследования больных с подозрением на коклюш и выявления клинических особенностей течения заболевания, вызванного *B.holmesii*.

Цель исследования – разработка методики генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в том числе с выделением *B.holmesii*, и характеристика особенностей клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii*, по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*.

Задачи исследования:

1. Проанализировать эффективность применения ПЦР-диагностики с помощью зарегистрированной ПЦР-РВ-тест-системы в лабораторной диагностике коклюша в России, в том числе у госпитализированных больных.
2. Разработать методику генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации ДНК трех бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii* в биологическом материале; изучить ее диагностические характеристики.
3. Провести апробацию разработанной методики генодиагностики и оценить ее диагностическую эффективность при обследовании госпитализированных больных с подозрением на коклюш.
4. Провести скрининг и оценить выявление *B.holmesii* у больных, госпитализированных в стационар с подозрением на коклюш.
5. Охарактеризовать клиническую картину заболевания, вызванного *B.holmesii*.
6. Выявить клинические дифференциально-диагностические критерии заболевания,

вызванного *B.holmesii*, по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*.

Научная новизна

Впервые разработана методика генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР-РВ, основанная на идентификации фрагментов трех инсерционных элементов - IS481, hIS1001, IS1001 и фрагмента гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина, которая позволяет выявлять и дифференцировать ДНК трех бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii* в биологическом материале (патент на изобретение РФ № 2702240 от 12.10.2018 г.).

Аналитическая чувствительность разработанной методики генодиагностики при идентификации ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* составила 5×10^1 ГЭ / мл, аналитическая специфичность на коллекции типовых и свежeweыделенных штаммов – 100 %.

Впервые на территории РФ зарегистрирована циркуляция *B.holmesii*, как возбудителя заболевания, который может встречаться в виде моно- и ко-инфекции с *B.pertussis* и *B.parapertussis*.

Впервые подробно описана клиническая картина заболевания, вызванного *B.holmesii*, которое носит коклюшеподобный характер и основной формой является типичная легкая форма ($90,0 \pm 6,7$ %), среднетяжелые зарегистрированы только в случаях сочетанного течения с коклюшем. При среднетяжелых формах заболевания была зарегистрирована ко-инфекция *B.holmesii* + *B.pertussis*, что приводило к утяжелению клинической картины. У пациентов регистрировались явления дыхательной недостаточности, учащались приступы кашля, и у детей раннего возраста наблюдались нарушения нутритивного статуса.

Выявление заболевания, вызванного *B.holmesii*, у госпитализированных пациентов, обследованных с подозрением на коклюш, составило 2,3 %, ко-инфекция, вызванная *B.pertussis* + *B.holmesii*, встречается в 0,8 % случаев и ко-инфекция, вызванная *B.parapertussis* + *B.holmesii*, – в 0,1 % случаев.

Установлены дифференциально-диагностические критерии заболевания, вызванного *B.holmesii*, в сравнении с коклюшем, вызванным *B.pertussis* (подана заявка на изобретение № 2020142641 от 23.12.2020 г.).

Теоретическая и практическая значимость

Проведенный мониторинг с помощью разработанной методики генодиагностики показал, что *B.holmesii* является возбудителем коклюшеподобного заболевания, что подтверждает повсеместную циркуляцию этого микроорганизма в мире и в дальнейшем позволит оценить его эпидемиологическую значимость в развитии коклюшной инфекции на территории РФ.

Обоснована необходимость использования генодиагностики при обследовании больных с подозрением на коклюш, которая будет способствовать расширению возможности идентификации разных представителей рода *Bordetella*, являющимися актуальными на сегодняшний день возбудителями.

Установлено, что разработанная методика генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР-РВ обладает 98,8 % чувствительностью, 99,2 % специфичностью и 99,0 % индексом точности. Применение разработанной методики расширит возможности диагностики с целью повышения эффективности лабораторного подтверждения диагноза у больных с подозрением на коклюш, в том числе при легких и атипичных формах клинического течения, контактных лиц в очагах инфекции, а также у длительно кашляющих для раннего выявления больных и установления причин длительного кашля у разных возрастных групп населения, а также может использоваться при мониторинге возбудителей в рамках эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией на территории РФ.

Показано, что, заболевание, вызванное *B.holmesii*, в большинстве случаев сложно диагностируется, оперируя только клинической картиной. Для окончательного диагноза необходимо проведение лабораторного исследования с выявлением ДНК возбудителя.

В рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори,

краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора: подготовлены методические указания «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами» с учетом возможности выявления *B.holmesii* в бактериологической и молекулярно-генетической диагностике; результаты исследований по оценке эффективности ПЦР-диагностики на территории РФ послужили основой аналитической справки «Состояние лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в 2013 - 2017 гг.» и были представлены на Проблемной комиссии Ученого Совета Роспотребнадзора «Профилактика инфекций, управляемых средствами вакцинопрофилактики» (26.12.2019 г.); использованы в лекционном курсе при проведении региональных семинаров по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша (Ханты-Мансийск, 2019 г.; Владивосток, 2019 г.) (акт внедрения от 01.12.2020 г.). Результаты работы использованы в учебно-образовательном процессе кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» МЗ РФ (акт внедрения от 19.11.2020 г.).

Методология и методы исследования

Методология работы спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Предметом исследования является разработка методики генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР-РВ для идентификации возбудителей коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в том числе с выделением *B.holmesii*, и характеристика клинической картины заболевания, вызванного этим возбудителем. В работе использованы молекулярно-генетические, бактериологические, клинические, биоинформатические, аналитические и статистические методы исследований. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 32 от 10.08.2017 г.).

Штаммы микроорганизмов

В работе использованы 14 типовых коллекционных штаммов микроорганизмов из коллекций патогенных микроорганизмов - «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, American Type Culture Collection и Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; 87 диких штаммов микроорганизмов, а также ДНК диких штаммов микроорганизмов рода *Bordetella*, выделенных из клинического материала от больных с подозрением на коклюш, присланных в Референс-центр в соответствии с письмом Роспотребнадзора от 19.06.2012 г. № 01/6830-12-32 «Об организации исследований культур возбудителей дифтерии и коклюша» и Приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации»; ДНК 54 диких штаммов микроорганизмов других родов из рабочей коллекции лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Образцы биологического материала

В исследование включено 895 клинических образцов, полученных от больных с подозрением на коклюш, госпитализированных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ») и Бюджетного учреждения здравоохранения Воронежской области «Областная детская клиническая больница № 2» («БУЗ ВО ОДКБ № 2»). Забор и транспортировку биологического материала проводили согласно МР 3.1.2.0072–13 «Диагностика коклюша и паракоклюша».

Пациенты

Исследование проведено на базе ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» в период с 2017–2020 гг. Было проведено клиническое наблюдение 290 пациентов, поступивших с подозрением на коклюш.

Аналитические данные

Анкеты-опросники были разработаны в Референс-центре по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН

МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и разосланы в клинико-диагностические лаборатории ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ 85 субъектов РФ, осуществляющих исследования по выявлению возбудителя коклюша методом ПЦР.

Микробиологические методы исследования

Культивирование штаммов *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica* и *B.holmesii* проводили согласно МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша». Исследуемый материал засеивали на чашки Петри с плотной питательной средой Бордетелагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и инкубировали при + 37 °С 48 - 72 часа. Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Биохимические свойства штаммов оценивали путем определения их способности продуцировать ферменты оксидазу, тирозиназу, уреазу, а также редуцировать нитраты в нитриты и ассимилировать цитраты.

Культивирование типовых штаммов *C.diphtheriae* и других коринебактерий проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Посев исследуемого материала осуществляли на кровяно-теллуритовый агар (КТА) на основе 2 % агара (ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва) и 0,02 % теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и затем инкубировали при + 37 °С 24 - 48 часов.

Культивирование типовых штаммов *S.pyogenes* и *S.aureus* осуществляли на кровяном агаре (КА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва) с последующей инкубацией при + 37 °С 24 часа.

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение хромосомной ДНК проводили методом кипячения из 24-часовых культур коринебактерий, *S.pyogenes* и *S.aureus*, культивированных на 10 % КА; из 24-часовых культур *B.bronchiseptica*, 48-часовых культур *B.parapertussis* и 72-часовых культур *B.pertussis* и *B.holmesii*, культивированных на Бордетелагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва).

Выделение ДНК из клинического материала осуществляли с использованием набора «РИБО—преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы выделенной ДНК хранили при - 34 °С.

ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации для выявления и дифференциации специфических фрагментов генома возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в клиническом материале осуществляли с использованием набора «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Амплификацию проводили с помощью прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия).

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50х ТАЕ-буфере («Thermo Fisher Scientific», США). В качестве маркера молекулярных весов использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США). Электрофорез проводили при напряжении 160 V в течение 60 мин. Продукты амплификации визуализировали с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

Полногеномное секвенирование. Очистку ПЦР-продуктов и их секвенирование проводили в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия) (<http://evrogen.ru/>).

Клинические методы исследования

Все клинические и инструментальные исследования выполнялись на базе ФБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» согласно «Протоколу лечения больных коклюшем», и включали: сведения анамнеза (возраст, пол, анамнез беременности и родов, развитие ребенка до настоящего времени, преморбидные состояния, наличие хронических заболеваний, вакцинальный статус), эпидемиологический анамнез, время возникновения первых симптомов и их дальнейшая

динамика, проводившееся лечение в амбулаторных условиях, данные объективного осмотра пациентов, результаты лабораторных и инструментальных методов обследования.

Биоинформатические и статистические методы исследования

Подбор олигонуклеотидных праймеров проводили с помощью BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Результаты секвенирования обрабатывали с использованием Geneious 11.1.1 для дальнейшего сопоставления с опубликованными нуклеотидными последовательностями в базе данных EMBL / GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ SPSS 11.5. Количественные признаки представлены в виде среднего арифметического значения, стандартного отклонения и стандартной ошибки среднего. Для оценки статистической значимости различий качественных признаков в группах сравнения был определен показатель p , достоверными различия считали при p 0,01–0,001. Статистическую обработку бинарных данных проводили по методу Wilson по стандартным формулам и с помощью он-лайн калькуляторов <https://www.msmanuals.com/medicalcalculators/LikelihoodRNDData-ru.htm> и <https://wpcalc.com/diagnosticheskij-test-na-voipriimchivost-k-zabolevaniyam/>.

Личное участие автора в получении результатов

Автором разработан дизайн научного исследования, проведен сбор и аналитический обзор данных литературы, выполнен весь объем молекулярно-генетических и клинических исследований. Подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-РВ в формате мультиплекс проведен совместно с с.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.б.н. Ю.Н. Урбан; конструирование праймеров для идентификации *B.holmesii* - совместно с н.с. лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.м.н. А.В. Чаплиным; апробацию разработанной методики с помощью бактериологических и молекулярно-генетических исследований - совместно с сотрудниками лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, с.н.с., к.м.н. Н.Т. Гадуа и с.н.с., к.м.н. А.С. Пименовой. Автор провел статистическую обработку и анализ полученных данных, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. За период 2013–2017 гг. в РФ установлена положительная динамика внедрения ПЦР-диагностики с помощью зарегистрированной тест-системы при обследовании пациентов с подозрением на коклюш; эффективность лабораторного подтверждения диагноза коклюша у госпитализированных больных составила 82,3 %.
2. Разработана методика генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР-РВ, позволяющая выявлять и дифференцировать ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* в биологическом материале.
3. Охарактеризована клиническая картина заболевания, вызванного *B.holmesii*, и выявлены дифференциально – диагностические критерии по сравнению с клиникой коклюша, вызванного *B.pertussis*.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечивается благодаря значительному объему проведенных исследований (изучено 895 образцов биологического материала), выбору четких критериев включения в исследование и адекватных методов статистической обработки данных. Работа проведена с помощью современных бактериологических, молекулярно-генетических и клинических методов исследований, обладающих высокой

чувствительностью и специфичностью, с использованием программного обеспечения для проведения биоинформатического и статистического анализа данных.

Работа выполнена в соответствии с отраслевой научно-исследовательской программой «Проблемно ориентированные научные исследования в отрасли эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями на 2016 - 2020 гг.» в рамках НИР ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского: «Изучение роли микробиоценозов ротоглотки и крови при дифтерии, коклюше и других инфекционно-воспалительных заболеваниях» (Рег. № АААА-А16-116021550311-2) и «Коклюшеподобное заболевание, вызванное *Bordetella holmesii* (диагностика и клинические особенности)» (Рег. № АААА-А20-120011790135-4), и деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии при проведении микробиологического и молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя коклюша, циркулирующих на территории России.

Диссертация апробирована на заседании секции Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Эпидемиология, микробиология, клиника инфекционных заболеваний» (протокол № 1 от 18 февраля 2021 г.).

Материалы диссертационной работы доложены и представлены на 5 научных конференциях: X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2018); Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика» (Москва, 2018); Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2018); XI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2019); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения» (Нижний Новгород, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых изданиях, 2 – в материалах конференций, 1 патент на изобретение РФ. Подана заявка на изобретение.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертационной работы изложены на 166 страницах машинописного текста и иллюстрированы 33 таблицами, 32 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 219 источников, из которых 43 – отечественных, 176 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ эффективности применения ПЦР-диагностики у больных с подозрением на коклюш

Нами проведен анализ материалов, присланных из клинико-диагностических лабораторий ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ Роспотребнадзора 85 субъектов РФ, осуществляющих ПЦР-исследования с помощью зарегистрированной ПЦР тест-системы «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва).

За период 2013–2017 гг. в РФ установлена положительная динамика внедрения ПЦР-диагностики. Так, в 2013 г. ПЦР-диагностика коклюша проводилась только в 33 (38,8 %) субъектах РФ и к 2017 г. их число увеличилось до 64 (75,3 %). На территориях 21 (24,7 %) субъекта РФ этот вид исследования не применялся. За данный период отмечалось увеличение числа проведенных анализов в 1,8 раза (Рисунок 1).

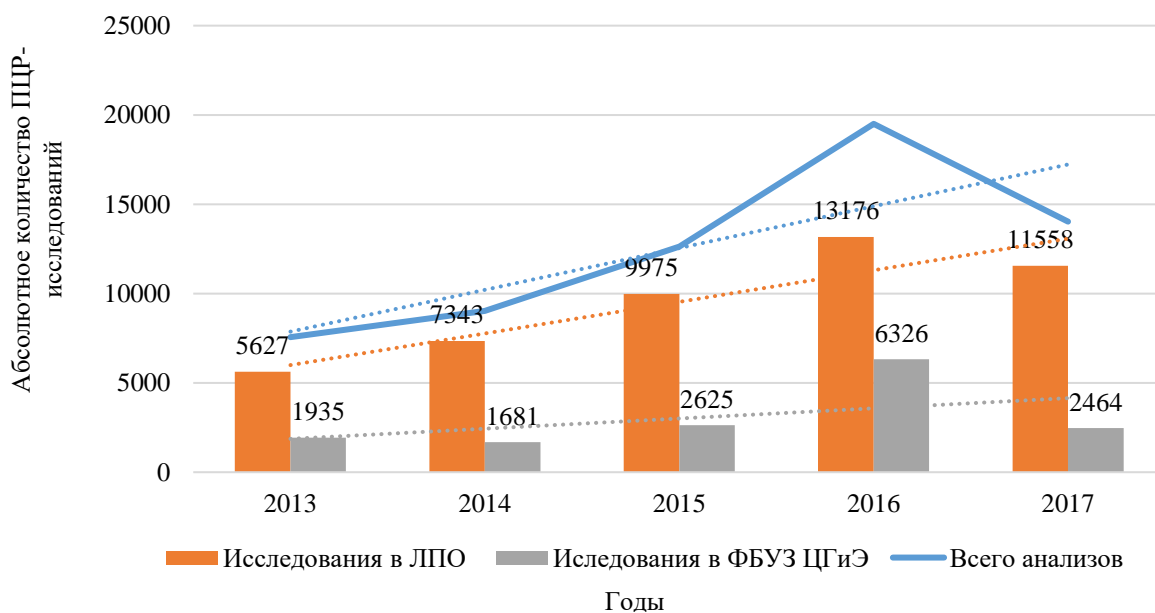


Рисунок 1 - Динамика количества ПЦР-исследований, проведенных на территории РФ за 2013–2017 гг.

С диагностической целью обнаружено 11781 (98,9 %) положительных проб, из которых ДНК *B.pertussis* (94,4 %) *B.parapertussis* (2,7 %), *B.bronchiseptica* (0,2 %) и *Bordetella spp.* (2,7 %). Анализ динамики выделения ДНК представителей рода *Bordetella* показал, что выделение ДНК *B.pertussis* несколько снижается – с 98,2 % до 91,1 %, в то время как отмечается тенденция увеличения выделения ДНК *B.parapertussis* – с 0,9 % до 4,2 % и рост числа образцов с выделением ДНК *Bordetella spp.* - с 0,7 % до 4,2 %.

С целью оценки эффективности применения метода ПЦР с помощью зарегистрированной тест-системы проведен анализ историй болезни 270 пациентов (от 0 до 17 лет), госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» в период 2017 - 2019 гг. Пациенты были разделены на две группы – испытуемая (220 пациентов с диагнозом коклюш) и контрольная (50 пациентов с ОРВИ). При обследовании 220 детей с диагнозом коклюш у 181 (82,3 ± 2,6 %) пациента клинический диагноз был подтвержден выявлением ДНК *B.pertussis* и у 39 (17,7 ± 2,6 %) пациентов был установлен клинический диагноз коклюша при отрицательном результате ПЦР-диагностики. У больных контрольной группы получены отрицательные результаты.

Разработка ускоренной методики генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени

Нами разработана методика генодиагностики, позволяющая выявлять ДНК возбудителя коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii* непосредственно в биологическом материале. В качестве мишеней были выбраны фрагменты трех инсерционных элементов - IS481 (для *B.pertussis* и *B.holmesii*), hIS1001 (для *B.holmesii*), IS1001 (для *B.parapertussis*) и фрагмент гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина, (для *B.pertussis*) (Таблица 1). Три группы праймеров hIS1001F / hIS1001R, IS481F / IS481R, IS1001F / IS1001R и зонды hIS1001P, IS481P, IS1001P были объединены в единую мультипраймерную смесь. Для одной мишени (*ptxA*) была разработана моноплексная ПЦР-РВ, позволяющая дифференцировать ДНК *B.pertussis* и ДНК *B.holmesii* или выявлять ко-инфекцию с выделением этих двух возбудителей.

Таблица 1 – Праймеры, используемые в исследовании

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Ориентация праймера	Примечание
<i>hIS1001F</i>	GATCCGTGCCAATCGGTAAGTT	прямой праймер	оригинальный
<i>hIS1001R</i>	CAAGGGCTGGTTGGCCTGGAGCAAC	обратный праймер	оригинальный
<i>hIS1001P</i>	(6-FAM)- TGAGCAAGGGCTGGTTGGCCTG-(BHQ-1)	флуоресцентный зонд	(Fong W. et. al., 2018)
<i>IS481F</i>	GCCGGATGAACACCCATAAGCATG	прямой праймер	оригинальный
<i>IS481R</i>	GGGCGATCAATTGCTGGACCAT	обратный праймер	оригинальный
<i>IS481P</i>	(Cy5)-ATGAACACCCATAAGCATGCCCG-(BHQ-2)	флуоресцентный зонд	(Fong W. et. al., 2018); подобран флуоресцентный краситель
<i>IS1001F</i>	AATTGCTGCAAGCCAACCA	прямой праймер	оригинальный
<i>IS1001R</i>	CCAGAGCCGTTTGAGTTCGTCAC	обратный праймер	оригинальный
<i>IS1001P</i>	(HEX)-ACATAGACCGTCAGCAG-(BHQ-1)	флуоресцентный зонд	(Lotfi M.N. et. al., 2017); подобран флуоресцентный краситель
<i>ptxA-F1</i>	AACGACAATGTGCTCGACCA	прямой праймер	оригинальный
<i>ptxA-R1</i>	GAGACGAAAGCGCTGTTGCT	обратный праймер	оригинальный
<i>ptxA-P1</i>	(6-FAM)- CTGACCGGACGTTCCCTGCCAGG-(BHQ-1)	флуоресцентный зонд	(Pittet L.F. et. al., 2014); подобран флуоресцентный краситель

Проведение ПЦР-исследования включало: 1 - взятие биологического материала, 2 - пробоподготовка образца, 3 – выделение ДНК, 4 – приготовление первой реакционной смеси, 5 – проведение первой амплификации, 6 – анализ и интерпретация результатов, 7 – приготовление второй реакционной смеси, 8 – проведение второй амплификации (подтверждающей), 9 – анализ и интерпретация результатов.

Смесь 1: реакционный буфер для ПЦР-ПВ - qPCRmix-HS («Евроген», Москва), 25 mM MgCl₂ («Thermo Scientific™», США), H₂O DEPC («Евроген», Москва), три пары праймеров *hIS1001F* / *hIS1001R*, *IS481F* / *IS481R* и *IS1001F* / *IS1001R* и зонды *hIS1001P*, *IS481P* и *IS1001P*. Конечная концентрации праймеров - по 300 nM и зондов – по 100 nM. Первую амплификацию проводили с помощью Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия) при: 95°C – 10 мин – 1 цикл, 95 °C – 15 сек, 60 °C – 60 сек, 50 циклов. Интерпретацию результатов проводили путем оценки по кривым накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов (Таблица 2): по FAM / Green идентифицируется специфический фрагмент ДНК *B.holmesii* - *hIS1001* (Рисунок 2А), HEX / Yellow - фрагмент ДНК *B.parapertussis* - *IS1001* (Рисунок 2Б), Cy5/Red - фрагмент ДНК *B.pertussis* - *IS481* (Рисунок 2В). При высокой концентрации ДНК-матрицы *B.holmesii* на уровне $\geq 5 \times 10^4$ КОЕ/мл возможно получение положительного сигнала по каналу Cy5/Red в связи с тем, что мишень *IS481* может встречаться в единичных копиях в геномах этого вида бордетелл (Loeffelhol M.J. et. al., 2000; Reischl U. et.al., 2001; Parkhill J. et. al., 2003; Templeton K.E. et. al., 2003).

Смесь 2: реакционный буфер для ПЦР-ПВ - qPCRmix-HS («Евроген», Москва), 25 mM MgCl₂ («Thermo Scientific™», США), H₂O, DEPC («Евроген», Москва), одна пара праймеров *ptxA-F1* / *ptxA-R1* и зонд *ptxA-P1* (Таблица 1). Вторую амплификацию проводили при тех же условиях. При наличии положительного сигнала по каналу FAM / Green образцы идентифицируются как образцы, содержащие ДНК *B.pertussis* (Таблица 2, Рисунок 2Г).

Таблица 2 - Интерпретация результатов, полученных с помощью разработанной методики

Микроорганизмы	Триплексная ПЦР-РВ			Моноплексная ПЦР-РВ
	IS481	IS1001	hIS1001	<i>ptxA</i>
<i>B.pertussis</i>	+	-	-	+
<i>B.parapertussis</i>	-	+	-	-
<i>B.holmesii</i>	*+ / -	-	+	-
<i>B.pertussis</i> + <i>B.holmesii</i>	+	-	+	+
<i>B.parapertussis</i> + <i>B.holmesii</i>	+	+	+	-

Примечание: + положительный результат, - отрицательный результат

*при концентрации $\geq 5 \times 10^4$ КОЕ/мл

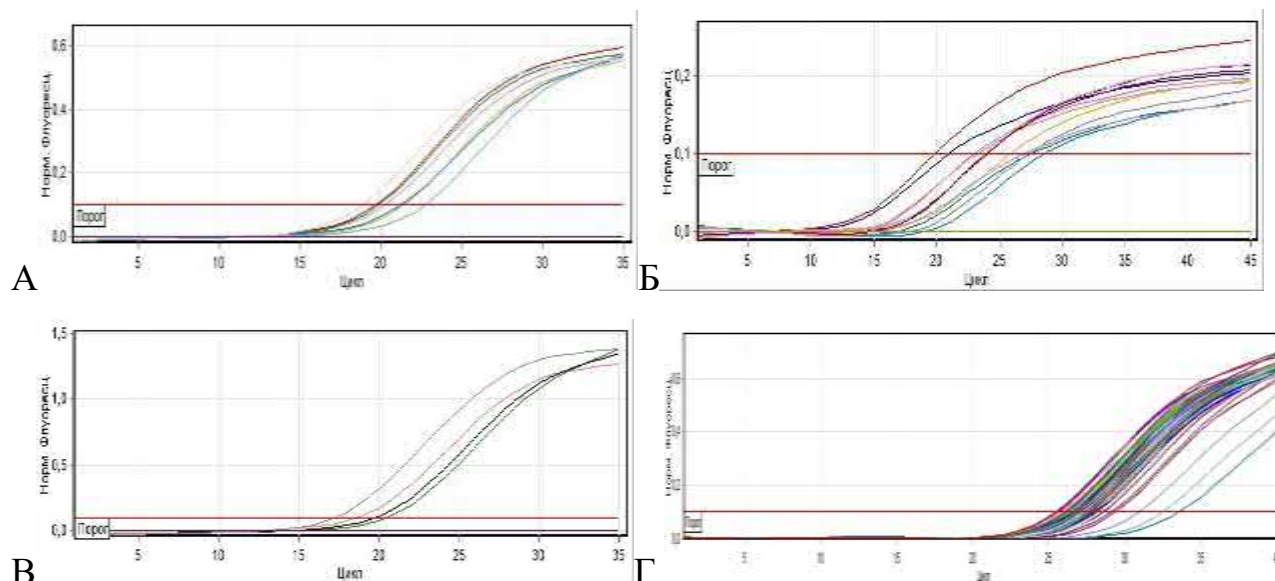


Рисунок 2 – Кривые амплификации по каналам в триплексной ПЦР-РВ: FAM / Green (А), Cy5 / Red (Б), HEX / Yellow (В), и моноплексной ПЦР-РВ - FAM / Green (Г).

На способ и набор для генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний получен патент на изобретение РФ № 2702240 от 12.10.2018 г.

Оценка аналитической надежности разработанной методики

С целью оценки аналитической чувствительности готовили по три линейки последовательных разведений бактериальных культур трех типовых штаммов - *B.pertussis* № 143, *B.parapertussis* № 386 и *B.holmesii* DSM 13416: $5 \times 10^9 - 10^1$ м.к. в 1 мл. Далее из 100 мкл каждого разведения суспензии выделяли ДНК. Для определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной взвеси, из каждого разведения производили высеv 100 мкл на Бордетелагар и инкубировали при 37°C. Через 72 и 96 часов подсчитывали число выросших колоний (КОЕ/мл). Выделение ДНК из исследуемого материала осуществляли с помощью коммерческих наборов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва), «АмплиПрайм® ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва), «Проба-ГС-плюс» (ООО «ДНК-технология», Россия), «РИБО—преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Каждое разведение исследовано в трех повторах. Было установлено, что при использовании «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® ДНК-сорб-В» аналитическая чувствительность составила 5×10^2 ГЭ / мл и 5×10^3 ГЭ / мл соответственно, а при использовании «Проба-ГС-плюс» и «РИБО—преп» - 5×10^1 ГЭ / мл. Для подтверждения определенного уровня чувствительности было проведено 10 серий экспериментов с изучением точки разведения на уровне чувствительности. Во всех сериях экспериментов получены положительные результаты.

Оценку аналитической специфичности проводили с использованием типовых

штаммов микроорганизмов различных родов, свежевыделенных штаммов рода *Bordetella* и ДНК штаммов микроорганизмов других родов. Для выявления перекрестного реагирования использовали матрицы не ниже 10^9 ГЭ/мл. Показано, что во всех образцах матриц, содержащих ДНК типовых штаммов *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii* и свежевыделенных штаммов *B.pertussis* и *B.parapertussis*, регистрировали положительные сигналы; во всех образцах ДНК типового штамма *B.bronchiseptica* и других микроорганизмов, колонизирующих ротоглотку, положительных сигналов не обнаружено. Следовательно, разработанная методика обладает 100 % аналитической специфичностью. **Сходимость методики**, которую определяли на 30 пробах контрольных образцов, каждая из которых тестировалась в трех повторах (90 проб), показала, что ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* была идентифицирована в 100 % случаев. Оценка **воспроизводимости методики** показала, что в результате проведенных экспериментов получены идентичные результаты.

Оценка диагностических характеристик разработанной методики

Основной концепцией разработанной методики является ее применимость для выявления ДНК *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*. Учитывая, что аналоговой зарегистрированной методики в РФ нет, то для оценки диагностических критериев использовали зарегистрированную тест-систему «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» и сравнение проводили по идентификации ДНК *B.pertussis* и *B.parapertussis*. Изучено 845 проб биологического материала от больных с подозрением на коклюш, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ», а также при обследовании больных с подозрением на коклюш, присланные из Управления Роспотребнадзора по Воронежской области и ФБУЗ ЦГиЭ в Воронежской области, в 2017 - 2020 гг.

После единого взятия биологического материала аликвота образца отбиралась для изучения в зарегистрированной тест-системе и разработанной методике. Для определения диагностических характеристик необходимо было исключить лабораторную ошибку постановок, поэтому в дискордантных результатах проводилось повторное тестирование. В случае получения отличий в результатах проводили третье исследование, и окончательный результат принимался равным результату двух повторов из трех.

Полученные результаты показали, что при сравнении двух методик общий конкорданс составил 96,4 %, дискордантными были 3,6 % образцов.

Оценка валидности разработанной методики

В исследование было включено 845 клинических образцов от пациентов, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» и «БУЗ ВО ОДКБ» в 2017 - 2020 гг. (Таблица 3). Изучение клинических образцов от пациентов было проведено с помощью зарегистрированной тест-системы и разработанной методики.

Таблица 3 – Результаты исследования биологического материала, полученного при обследовании больных с подозрением на коклюш

Варианты ПЦР-РВ	n	Результат исследования						
		ДНК <i>B.pertussis</i>	ДНК <i>B.parapertussis</i>	ДНК <i>B.holmesii</i>	ДНК <i>B.pertussis</i> + ДНК <i>B.holmesii</i>	ДНК <i>B.parapertussis</i> + ДНК <i>B.holmesii</i>	Отрицательный	Сомнительный
«АмплиСенс® <i>Bordetella</i> multi-FL»	845	433 (51,2±1,7 %)	10 (1,2±0,4 %)	-*	-*	-*	391 (46,3±1,7 %)	11 (1,3±0,4 %)
Разработанная методика	845	419 (49,6±1,7 %)	4 (0,5±0,2 %)	12 (1,4±0,4%)	7 (0,8±0,3%)	1 (0,1±0,1%)	397 (47,0±1,7 %)	5 (0,6±0,3 %)

Примечание: * - не включено в тест-систему

При сопоставлении результатов, в 7 образцах, которые ранее были идентифицированы как содержащие ДНК *B.pertussis*, с помощью разработанной методики была обнаружена ДНК двух микроорганизмов - *B.pertussis* и *B.holmesii*. Из 12 положительных образцов на ДНК *B.holmesii*, идентифицированных с помощью разработанной методики, 9 образцов ранее были отрицательными в тест-системе, в 2-х образцах был получен сомнительный результат и 1 образец был ранее идентифицирован как содержащий ДНК *B.parapertussis*. Среди 10 образцов, которые в тест-системе были идентифицированы, как содержащие ДНК *B.parapertussis*, в 4-х случаях результат подтвердился, в 4-х образцах получен отрицательный результат, в 1-ом образце была обнаружена ДНК *B.holmesii* и в 1-ом образце обнаружена ДНК двух микроорганизмов - *B.parapertussis* и *B.holmesii*.

Оценка валидности разработанной методики показала, что чувствительность составила 98,8 %, специфичность – 99,2 %, прогностическая ценность положительного результата – 99,3 %, прогностическая ценность отрицательного результата – 98,7 %, индекс точности (диагностическая эффективность) – 99,0 %, отношение правдоподобия положительного результата – 123,5 и отношение правдоподобия отрицательного результата – 0,01.

Таким образом, распространенность заболевания, вызванного *B.holmesii*, у госпитализированных пациентов, обследованных с подозрением на коклюш, составила 2,3 %, ко-инфекция, вызванная *B.pertussis* + *B.holmesii*, встречалась в 0,8 % случаев и ко-инфекция, вызванная *B.parapertussis* + *B.holmesii*, – в 0,1 % случаев.

Оценка достоверности идентификации ДНК *B.holmesii*

Оценка достоверности выявления ДНК *B.holmesii*, которые были идентифицированы с помощью разработанной методики, проведена с помощью трех методик – изотермической амплификации (LAMP), согласно (Otsuka N. et. al., 2012), экспериментальной серии «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (ООО «ДНК-Технология», Россия) (Рисунок 3А, Б) и секвенирования фрагментов ДНК.

Во всех клинических образцах, содержащих ДНК *B.holmesii*, согласно разработанной методике, в изотермической амплификации и «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (ООО «ДНК-Технология», Россия) получены положительные результаты (Рисунок 3).

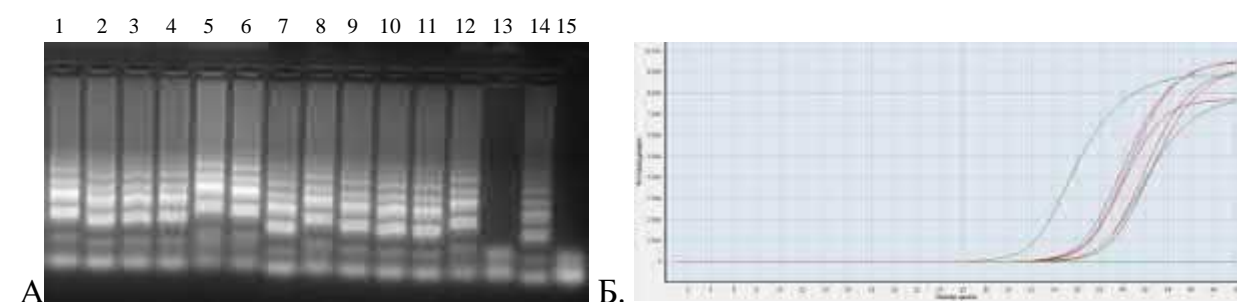


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации клинических образцов (А); кривые амплификации в экспериментальной серии «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (Б)

Примечание: 1 - 12 – клинические образцы, содержащие ДНК *B.holmesii*; 13 – отрицательный образец; 14 – положительный контроль (ДНК типового штамма *B.holmesii* DSM 13416) 15 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Для проведения прямого секвенирования ДНК клинических образцов нами была предварительно разработана nested-ПЦР с двумя парами праймеров, которые были предварительно сконструированы (Рисунок 4).



Рисунок 4 - Расположение праймеров *B.holm* F / *B.holm* R и *B.holm*F2 / *B.holm*R2

Первый раунд проводили с помощью праймеров *B.holm* F / *B.holm* R: *Bholm* F: 5'-GACCGCAAGACGATCGAGAG-3' и *Bholm*R2: 5'-ACCGATCCATAGCACCTGAC-3' (552 п.н.); второй раунд с праймерами *Bholm*F2 / *Bholm*R2: *Bholm*F2: 5'-GTCACGATTTACCTGAAGCC-3' и *Bholm*R2: 5'-ACCGATCCATAGCACCTGAC-3' (468 п.н.) (Рисунок 5).

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

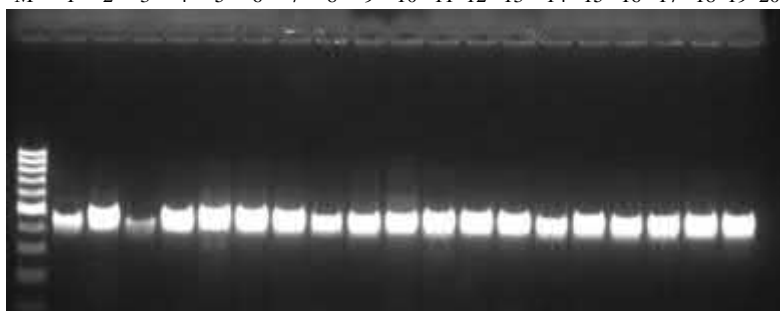


Рисунок 5 - Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами *B.holm* F2 / *B.holm* R2 (второй раунд)

Примечание: М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1 - 18 – ДНК клинических образцов, содержащих ДНК *B.holmesii*; 19 – положительный контроль (ДНК типового штамма *B.holmesii* DSM 13416) 20 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

В результате nested-ПЦР были наработаны ампликоны, которые затем исследовались с помощью секвенирования. При сопоставлении с опубликованными геномными последовательностями в NCBI Refseq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) все выявленные фрагменты ДНК соответствовали геному штамма *B.holmesii* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP007494.1>).

Клиническая характеристика заболевания, вызванного *B.holmesii*, в сопоставлении с клиникой коклюша, вызванного *B.pertussis*

Сравнительная оценка симптоматики и клинических форм обоих заболеваний проведена с использованием общепринятой классификации коклюша по распределению инфекционных болезней по типу, тяжести и течению (Грачева Н.М. и др., 2009). Критериями тяжести, используемыми в работе, были следующие: длительность продромального периода, частота приступов кашля, цианоз лица во время кашля и сроки его появления, расстройства ритма дыхания, апноэ, частота рвоты, связанной с кашлем, нарушение аппетита и снижение нутритивного статуса (у детей раннего возраста), выраженность геморрагического синдрома, сохранение дыхательной недостаточности между приступами кашля, а также наличие энцефалических расстройств.

Клиническая характеристика заболевания, вызванного *B.holmesii*

Изучение клинической симптоматики заболевания, вызванного *B.holmesii*, проведено у 18 детей в возрасте от 1 месяца до 18 лет и 2-х взрослых, госпитализированных в ИКБ № 1 ДЗ г. Москвы и БУЗ ВО ОДКБ № 2. Распределение больных по возрасту представлено на рисунке 6.

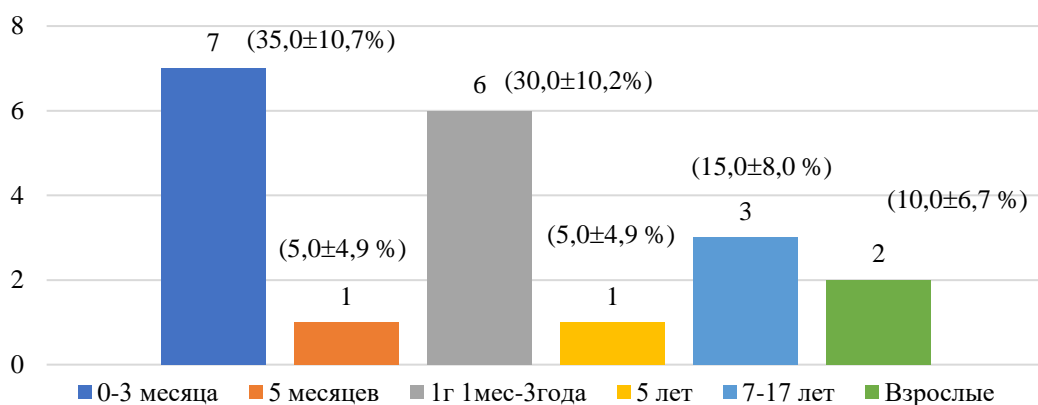


Рисунок 6 - Распределение пациентов по возрастным группам

Пациенты поступали в стационар с диагнозами: коклюш (1 – 5,0 ± 4,9 %), подозрение на коклюш (8 – 40,0 ± 10,9 %), острая респираторная вирусная инфекция (9 – 45,0 ± 11,1 %), пневмония (2 – 10,0 ± 6,7 %). У 15 из 20 больных заражение произошло в семье, а у 5 – контакт не выяснен. Трое детей (3-х лет, 14 и 15 лет) были привиты от коклюша согласно национальному календарю.

Диагноз заболевания, вызванного *B.holmesii*, устанавливался на основании обнаружении ДНК *B.holmesii* с помощью разработанной методики. ДНК *B.holmesii* идентифицирована у 20 пациентов, из них у 7 пациентов – в сочетании с *B.pertussis* и у 1-го пациента – с *B.parapertussis*. В подавляющем большинстве случаев заболевание протекало в легкой форме – у 18 (90,0 ± 6,7 %) больных и лишь у 2-х (10,0 ± 6,7 %) пациентов констатирована среднетяжелая форма.

Характеристика легкой формы заболевания, вызванного *B.holmesii*

Легкую форму заболевания регистрировали у большинства (18 (90,0 ± 6,7 %)) пациентов. Из них 6 детей были в возрасте 3 - 6 месяцев, 6 – 1 - 3 года, 1 – 5 лет, 3 – от 7 до 17 лет и 2 – взрослые.

Продромальный период - длительность колебалась от 3-х до 11 дней, и в среднем составила 8,94 ± 0,69 дней. У всех пациентов наблюдали покашливание или непродуктивный кашель, катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей обнаружены у 6 больных, субфебрильная температура наблюдалась у 5 больных.

Спазматический период характеризовался появлением приступообразного кашля (Таблица 4).

Таблица 4 - Характеристика спазматического периода при легкой форме заболевания, вызванного *B.holmesii*

Клинические симптомы	n	% ± m
Число приступов кашля:		
• до 5 в сутки	8	44,4±11,7
• 6–10 в сутки	9	50,0±11,7
• 11–15 в сутки	1	5,5±5,3
Репризы	2	11,1±7,4
Рвота	6	33,3±11,1
Гиперемия лица при кашле	16	88,9±7,4
Нарушение самочувствия, снижение аппетита	3	16,7±8,8
Диарейный синдром	6	33,3±11,1
Вздутие легочной ткани	14	77,8±9,3
Данные аускультации (дыхание):		
• пуэрильное	8	44,4±11,7
• везикулярное	4	22,2±9,8
• жесткое	6	33,3±11,1

Продолжение таблицы 4

Данные рентгенографии органов грудной клетки:		
• Обогащение бронхо-сосудистого рисунка в нижнемедиальных зонах	4	22,2±9,8
• Перибронхиальные и периваскулярные изменения в нижнемедиальных зонах	3	16,7±8,8
• Патологических изменений не выявлено	3	16,7±8,8
Число лейкоцитов в периферической крови:		
5–10 x 10 ⁹ /л	10	55,5±11,7
11–15 x 10 ⁹ /л	2	11,1±7,4
16–20 x 10 ⁹ /л	3	16,7±8,8
>20 x 10 ⁹ /л	3	16,7±8,8
Лимфоцитоз	10	55,5±11,7

Таким образом, при легкой форме заболевания, вызванного *B.holmesii*, приступы кашля у пациентов были единичными, не затяжными и не вызывали утомления, провоцировались эмоциональным напряжением и болевой реакцией. У больных с легкой формой мы не наблюдали проявлений дыхательной недостаточности и выраженных нарушений самочувствия, и вне приступов кашля состояние детей не нарушалось.

Характеристика среднетяжелой формы заболевания, вызванного *B.holmesii*

Среднетяжелая форма наблюдалась у 2-х больных в возрасте 1 месяца, переносящих ко-инфекцию, вызванную двумя бордетеллами - *B.holmesii* и *B.pertussis*. Течение среднетяжелой формы приводим на примере истории болезни одного ребенка.

Мальчик О., в возрасте 1 месяца жизни, был направлен на госпитализацию с диагнозом: коклюш? Ребенок от II беременности, протекавшей на фоне железодефицитной анемии II степени. Роды самостоятельные, на 40-й неделе гестации. Вес при рождении – 4000 г, длина 54 см. Оценка по шкале Апгар 8/9 баллов. В семье у старшего брата с середины мая мы наблюдали затяжной кашель. Из анамнеза известно, что во второй декаде июня впервые появился кашель при нормальной температуре тела и при отсутствии катаральных явлений со стороны верхних дыхательных путей. Кашель усиливался и на 4 день болезни приобрел приступообразный характер с отделением прозрачной мокроты. Число приступов было 10 в сутки. Ребенку амбулаторно была начата антибактериальная и муколитическая терапия. Через 2 дня от начала терапии приступы кашля стали сопровождаться кратковременными задержками дыхания, цианозом носогубного треугольника, оканчивались срыгиванием и рвотой, в связи с чем на 7-й день болезни ребенок был направлен на госпитализацию.

При поступлении состояние расценено как среднетяжелое. Число приступов кашля достигало 20 в сутки, приступы сопровождалось цианозом лица, репризами, кратковременными задержками дыхания, наблюдалась рвота после приступов кашля. Отмечалось разжижение стула. У ребенка наблюдалось снижение аппетита и убыль массы тела. Физикальные изменения в легких ограничивались умеренно выраженным вздутием легких. Аускультация выявила пуэрильное дыхание, хрипы не выслушивались. По данным рентгенографии органов грудной клетки отмечалось усиление бронхо – сосудистого рисунка в нижнемедиальной зоне правого легкого. На 7 день болезни методом ПЦР-РВ выделены ДНК *B.holmesii* и *B.pertussis*. В анализе крови на 8 день болезни лейкоцитоз достигал 23,7 x 10⁹ г/л, лимфоцитоз составил 68 %. Ребенок получал: азитромицин, гидрокортизон по схеме в убывающих дозировках в течение 7 дней, фенобарбитал-бромизовал-кофеин бензоат натрия-папаверина гидрохлорид-кальция глюконат в составе комбинированного препарата в дозе 2,5 мг x 2 раза/день, амброксол в возрастной дозировке и кислородную терапию. В дальнейшем заболевание протекало с положительной динамикой и к 14 дню болезни число приступов не превышало 8 в сутки. В анализах крови лейкоцитоз снизился до 15 x 10⁹ г/л, лимфоцитоз составлял 66 %. Ребенок активно начал набирать вес, улучшился аппетит. С 20 дня болезни число приступов кашля не превышало 2-х в сутки, цианоза носогубного треугольника и задержек дыхания не наблюдалось. Ребенок был выписан со значительным улучшением под

амбулаторное наблюдение.

Таким образом, течение ко-инфекции, вызванной *B.holmesii* и *B.pertussis*, не отличалось по своей клинической характеристике от коклюша. Самочувствие детей ухудшалось в большей степени, чем при легкой форме, число приступов кашля достигало 20 в сутки, приступы сопровождались цианозом носогубного треугольника, задержками дыхания, наблюдалось снижение аппетита, вялость. Отягощенными факторами развития среднетяжелой формы при заболевании, вызванном *B.holmesii*, являются ранний возраст (в нашем наблюдении период новорожденности). Исходя из этого, фактором, способствующим утяжелению течения заболевания, является ко-инфекция, а именно *B.holmesii* + *B.pertussis*, что проявляется среднетяжелым течением заболевания.

Клиническая характеристика коклюша, вызванного *B.pertussis*

Для разработки дифференциально – диагностических критериев с заболеванием, вызванным *B.holmesii*, в анализ взята группа сравнения - 54 ребенка в возрасте от 1 месяца до 17 лет, переносящих коклюш, госпитализированных в ГБУЗ ИКБ № 1 ДЗМ. Клинический диагноз был подтвержден обнаружением ДНК *B.pertussis*. Преобладала среднетяжелая форма ($57,4 \pm 6,7 \%$), тяжелая форма наблюдалась у 3-х детей в возрасте 1 – 3-х месяцев, легкая форма диагностирована в $37,0 \pm 6,6 \%$ случаев, атипичная форма не регистрировалась.

Характеристика легкой формы коклюша

Из 54 обследованных детей 20 ($37,0 \pm 6,6 \%$) переносили коклюш в легкой форме. Из них 2 ребенка были в возрасте от 0 до 3 мес., 4 – 4 - 6 мес., 7 – 7 – 12 мес., 4 – 1 – 3 г., 2 – 4 – 6 лет, 1 ребенок – 7 – 17 лет.

Продромальный период - длительность колебалась от 5 до 11 дней, и в среднем составила $7,9 \pm 0,61$ дней. У всех детей присутствовал кашель. Температура поднималась до субфебрильных цифр у 5 ($25,0 \pm 9,7 \%$) детей. Катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей и нарушение самочувствия были отмечены у 2-х ($10,0 \pm 6,7 \%$) детей.

Спазматический период характеризовался появлением приступообразного кашля с отделением прозрачной вязкой мокроты (Таблица 5).

Таблица 5 - Характеристика спазматического периода при легкой форме коклюша

Клинические симптомы	n	% ± m
Число приступов кашля:		
• до 5 в сутки	2	10,0±6,7
• 6–10 в сутки	6	30,0±10,2
• 11–15 в сутки	12	60,0±10,9
Репризы	11	55,0±11,1
Рвота	14	70,0±10,2
Гиперемия лица при кашле	20	100,0
Нарушение самочувствия, снижение аппетита	8	40,0±10,9
Диарейный синдром	7	35,0±10,7
Вздутие легочной ткани	20	100,0
Данные аускультации (дыхание):		
• пузрильное	9	45,0±11,1
• везикулярное	2	10,0±6,7
• жесткое	9	45,0±11,1
Данные рентгенографии органов грудной клетки:		
• Обогащение бронхо-сосудистого рисунка в нижнемедиальных зонах	8	40,0±10,9
• Перибронхиальные и периваскулярные изменения в нижнемедиальных зонах	6	30,0±10,2
• Патологических изменений не выявлено	3	15,0±7,8

Продолжение таблицы 5

Число лейкоцитов в периферической крови:		
5 -10 x 10 ⁹ /л	6	30,0±10,2
11–15 x 10 ⁹ /л	7	35,0±10,7
16–20 x 10 ⁹ /л	2	10,0±6,7
>20 x 10 ⁹ /л	5	25,0±9,7
Лимфоцитоз	13	65,0±10,7

Можно отметить, что при легкой форме коклюша пациенты легко переносили приступы кашля, число приступов не превышало 15 в сутки. Недостаточности внешнего дыхания зафиксировано не было. Самочувствие нарушалось в незначительной степени.

Характеристика среднетяжелой формы коклюша

Среднетяжелая форма имела место у 31 (57,4 ± 6,7 %) ребенка. Из них 7 детей были в возрасте от 0 до 3-х мес., 9 – 4 - 6 мес., 6 – 7 – 12 мес., 8 – 1 – 3 г., 1 ребенок – 7 лет.

Продромальный период - продолжительность колебалась от 4 до 12 дней, и в среднем составила 6,9 ± 0,41 дней. Основным синдромом был непродуктивный кашель, который редко сопровождался повышением температуры тела (25,8 ± 7,8 %) и катаральными явлениями (19,3 ± 7,1 %). Самочувствие было нарушено у 8 (25,8 ± 7,8 %) пациентов.

Спазматический период. Число приступов кашля достигало 25 в сутки. Приступы кашля были затяжными, сопровождалась багровением или цианозом лица (3,2 ± 3,2 % и 29,0 ± 8,1 % соответственно) (Таблица 6).

Таблица 6 – Характеристика спазматического периода при среднетяжелой форме коклюша

Клинические симптомы	n	% ± m
Число приступов кашля:		
• 10-14 в сутки	6	19,3±7,1
• 15-20 в сутки	15	48,4±9,0
• 21-25 в сутки	10	32,2±8,4
Репризы	29	93,5 ± 4,4
Рвота	22	71,0±8,1
Гиперемия лица при кашле	21	67,7±8,4
Багровение лица при кашле	1	3,2±3,2
Цианоз лица при кашле	9	29,0±8,1
Нарушение самочувствия, снижение аппетита	27	87,1±6,0
Диарейный синдром	11	35,5±8,6
Вздутие легочной ткани	31	100,0
Данные аускультации (дыхание):		
• пуэрильное	15	48,4±9,0
• жесткое	16	51,6±9,0
Данные рентгенографии органов грудной клетки:		
• Обогащение бронхо-сосудистого рисунка в нижнемедиальных зонах	10	32,2±8,4
• Перибронхиальные и периваскулярные изменения в нижнемедиальных зонах	3	9,7±5,3
• Патологических изменений не выявлено	3	9,7±5,3
Число лейкоцитов в периферической крови:		
5 -10 x 10 ⁹ /л	4	12,9±6,0
11–15 x 10 ⁹ /л	6	19,3±7,1
16–20 x 10 ⁹ /л	4	12,9±6,0
>20 x 10 ⁹ /л	17	54,8±8,9
Лимфоцитоз	26	83,9±6,6

Таким образом, при среднетяжелой форме по сравнению с легкой формой наблюдалось утяжеление клинической картины: продромальный период был короче, увеличивалось количество приступов кашля за сутки (до 25), отмечались цианоз лица при кашле и явления дыхательной недостаточности. Изменения периферической крови были выявлены у большинства пациентов. Чаще наблюдалось негладкое течение болезни и затягивание выздоровления.

Характеристика тяжелой формы коклюша

Мы наблюдали тяжелое течение коклюша у 3-х детей, все дети были в возрасте до 3 мес. Преморбидный фон ни у одного ребенка отягощен не был. Источником инфекции во всех случаях был член семьи с длительным кашлем.

Продромальный период был коротким – от 3-х до 5 дней, в среднем длился $4,3 \pm 0,82$ дня. Заболевание начиналось с непродуктивного кашля, который за короткий промежуток времени усиливался и становился приступообразным. Катаральных явлений со стороны верхних дыхательных путей, субфебрильной температуры, нарушения самочувствия ни у одного ребенка мы не наблюдали.

Спазматический период. Приступы кашля в этом периоде были затяжными, частыми (>25 раз в сутки), с цианозом лица (3 детей), с задержками дыхания и апноэ (3 детей), оканчивались срыгиваниями и рвотой (2 детей). Явления дыхательной недостаточности сохранялись и в межприступный период. Значительно нарушалось общее состояние и поведение детей. Дети были вялыми, сонливыми, отказывались от вскармливания. Наблюдалась потеря массы тела. В легких перкуторно выявлялось умеренное вздутие легочной ткани. Аускультативно в легких выслушивалось пуэрильное (2 детей) и жесткое дыхание (1 ребенок). У 1-го ребенка, по данным проведенной рентгенографии органов грудной клетки, обнаружено усиление бронхо - сосудистого рисунка с умеренными перибронхиальными изменениями, которые сгущались в нижнемедиальном углу, интенсивнее справа. Лейкоцитоз с лимфоцитозом был диагностирован у 1-го ребенка, лимфоцитоз без увеличения числа лейкоцитов мы обнаружили у 2-х детей. У 1-го ребенка в связи с присоединением РС-вирусной инфекции наблюдалось появление бронхиолита (экспираторная одышка с вовлечением вспомогательной мускулатуры, одышка до 60 в минуту, с последующим нарастанием дыхательной недостаточности, выслушивались влажные мелкопузырчатые хрипы). Сочетанное течение коклюша и острой респираторной вирусной инфекции диагностировано у 1-го ребенка.

Таким образом, тяжелая форма коклюша была обусловлена коротким продромальным периодом (до 5 дней), частыми затяжными приступами кашля (>25 раз в сутки), наличием задержек дыхания и апноэ, явлениями дыхательной недостаточности, нарушением общего состояния и медленным восстановлением нутритивного статуса.

Сравнительная характеристика течения легкой формы заболевания, вызванного *B.holmesii*, и коклюша, вызванного *B.pertussis*

Для сопоставления клиники заболевания, вызванного *B.holmesii*, и коклюша в анализ взята легкая форма, наиболее часто встречающаяся при заболевании, возбудителем которого была *B.holmesii*.

Исследование проведено у 38 больных: I группу составили 18 больных заболеванием, возбудителем которого была *B.holmesii*, II группу – 20 больных коклюшем.

Продромальный период. У всех пациентов наблюдался непродуктивный кашель, у ряда больных регистрировались катар верхних дыхательных путей и температурная реакция, которая не превышала субфебрильных цифр. Самочувствие больных нарушалось только у 2-х больных коклюшем. Обращало на себя внимание разница в длительности продромального периода – при коклюше он был короче ($p < 0,001$) (Таблица 7).

Таблица 7 - Симптомы продромального периода в обеих группах больных

Симптомы	I-я группа Число больных		II-я группа Число больных		p
	abs.	% ± m	abs.	% ± m	
Непродуктивный кашель	18	100,0	20	100,0	—
Субфебрильная температура	5	29,4±11,0	5	25,0±9,7	—
Катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей	6	35,2±11,6	2	10,0±6,7	—
Длительность продромального периода	8,9	±0,69	7,9	±0,61	<0,001

Спазматический период. Симптоматика при заболевании, возбудителем которого была *B.holmesii*, и коклюше была идентичной и соответствовала типичной легкой форме. Однако тяжесть клинических проявлений была различной (Таблица 8).

Таблица 8 - Сравнительная характеристика симптоматики спазматического периода в I и II группах больных

Клинические симптомы	I-я группа		II-я группа		p
	n	% ± m	n	% ± m	
Число приступов кашля:					
• до 5 в сутки	8	44,4±11,7	2	10,0±6,7	<0,001
• 6-10 в сутки	9	50,0±11,7	6	30,0±10,2	—
• 11-15 в сутки	1	5,5±5,3	12	60,0±10,9	<0,001
Репризы	2	11,1±7,4	11	55,0±11,1	<0,001
Рвота	6	33,3±11,1	14	70,0±10,2	<0,001
Гиперемия лица при кашле	16	88,9±7,4	20	100,0	—
Нарушение самочувствия, снижение аппетита	3	16,7±8,8	8	40,0±10,9	<0,05
Диарейный синдром	6	33,3±11,1	7	35,0±10,7	—
Вздутие легочной ткани	14	77,8±9,3	20	100,0	—
Данные аускультации (дыхание):					
• пузрильное	8	44,4±11,7	9	45,0±11,1	—
• везикулярное	4	22,2±9,8	2	10,0±6,7	—
• жесткое	6	33,3±11,1	9	45,0±11,1	—
Данные рентгенографии органов грудной клетки:					
• Обогащение бронхо-сосудистого рисунка в нижнемедиальных зонах	4	22,2±9,8	8	40,0±10,9	—
• Перибронхиальные и периваскулярные изменения в нижнемедиальных зонах	3	16,7±8,8	6	30,0±10,2	—
• Патологических изменений не выявлено	3	16,7±8,8	3	15,0±7,8	—
Число лейкоцитов в периферической крови:					
5 -10 x 10 ⁹ /л	10	55,5±11,7	6	30,0±10,2	<0,001
11-15 x 10 ⁹ /л	2	11,1±7,4	7	35,0±10,7	—
16-20 x 10 ⁹ /л	3	16,7±8,8	2	10,0±6,7	—
>20 x 10 ⁹ /л	3	16,7±8,8	5	25,0±9,7	—
Лимфоцитоз	10	55,5±11,7	13	65,0±10,7	—

Таким образом, симптоматика легкой формы заболевания, возбудителем которого явилась *B.holmesii*, по сравнению с типичным коклюшем была менее выражена. Заболевание протекало легче, регистрируемых приступов в течение суток было меньше. Приступы кашля были короткими, не затяжными, переносились пациентами легче, нежели чем при коклюше, сильного утомления приступы кашля не вызывали. Пациенты не отмечали значительного ухудшения общего состояния, аппетит и сон не нарушались.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что за период 2013 – 2017 гг. количество проведенных ПЦР-исследований с помощью зарегистрированной тест-системы на коклюш увеличилось в 1,8 раза практически во всех федеральных округах РФ; выделение ДНК *B.pertussis* снизилось с 98,2 % до 91,1 %, в то время как отмечается тенденция увеличения выделения ДНК *B.parapertussis* и ДНК *Bordetella spp.* – с 0,9 % до 4,2 % и с 0,7 % до 4,2 % соответственно.
2. Разработана методика генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР-РВ с идентификацией фрагментов IS481, hIS1001, IS1001 и гена *ptxA* для выявления и дифференциации ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* в биологическом материале. Разработанная методика генодиагностики обладает 98,8 % чувствительностью, 99,2 % специфичностью и 99,0 % диагностической эффективностью.
3. Проведенный скрининг показал, что частота выявления заболевания, вызванного *B.holmesii*, у госпитализированных пациентов, обследованных с подозрением на коклюш, составила 2,3 %, ко-инфекция, вызванная *B.pertussis* + *B.holmesii*, встречается в 0,8 % случаев и ко-инфекция, вызванная *B.parapertussis* + *B.holmesii*, – в 0,1 % случаев.
4. Анализ клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii*, подтвердил его коклюшеподобный характер - отмечается цикличность течения, постепенное нарастание кашля, появление приступообразного кашля на фоне нормальной температуры и слабых катаральных явлений. Легкие формы при заболевании, вызванном *B.holmesii*, регистрировались чаще, чем при коклюше ($90,0 \pm 6,7$ % против $37,0 \pm 6,6$ %).
5. Сравнительный анализ клинической симптоматики показал более легкое течение заболевания, вызванного *B.holmesii*, по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*. Приступы кашля хоть и характеризовались типичными проявлениями, такими как напряжение лица при кашле, отделение прозрачной вязкой мокроты, наличие репризов и рвоты, однако частота указанных симптомов, по сравнению с коклюшем, была существенно меньше.
6. При среднетяжелых формах заболевания была зарегистрирована ко-инфекция *B.holmesii* + *B.pertussis*, что приводило к утяжелению клинической картины. У пациентов регистрировались явления дыхательной недостаточности, учащались приступы кашля, и у детей раннего возраста наблюдались нарушения нутритивного статуса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Применение генодиагностики с идентификацией различных видов рода *Bordetella* будет способствовать раннему выявлению больных и установлению причин длительного кашля у разных возрастных групп населения.

Необходимо более углубленно и детально изучать клиническую картину пациентов, поступающих с подозрением на коклюш. Лечащим врачам надлежит быть более настороженными в отношении коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, так как в большом проценте случаев эти заболевания могут протекать в легкой форме, а при лабораторном обследовании может быть получен отрицательный результат.

Несмотря на высокий уровень используемой генодиагностики, отдельной важной составляющей проведения любого исследования является качество взятия биологического материала, которое существенно влияет на результат лабораторного подтверждения клинического диагноза. Поэтому в настоящее время необходимо усилить контроль за правильностью взятия и транспортировки биологического материала, ответственность за которое целиком и полностью лежит на медицинском персонале лечебно-профилактических организаций.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейшие исследования необходимо направить на изучение распространенности разных представителей рода *Bordetella*, в том числе *B.holmesii*, у больных с подозрением на коклюш, контактных лиц в очагах инфекции и длительно кашляющих для оценки распространенности этого возбудителя и его эпидемиологической значимости в развитии коклюшной инфекции на территории России.

2. Теоретический и практический интерес представляют дальнейшие исследования по изучению биологических свойств и патогенного потенциала *B.holmesii* - возбудителя коклюшеподобного заболевания, а также как возможного возбудителя инфекции кровотока.
3. Обоснована целесообразность изучения протективного потенциала вакцинных препаратов против возбудителей коклюшеподобных заболеваний.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Петрова, М.С. Выявление *Bordetella holmesii* у пациентов, госпитализированных с подозрением на коклюш / М.С. Петрова, А.Б. Борисова, С.С. Афанасьев, О.В. Шамшева, О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, А.С. Пименова, Е.В. Власов, С.В. Бунин // Материалы Всероссийского ежегодного конгресса «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика», 11 – 12 октября 2018 г., Санкт-Петербург. – Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10, № 4, Приложение 1. - С. 116-117.
2. Петрова, М.С. Особенности течения коклюшеподобного заболевания, вызванного *Bordetella holmesii* / М.С. Петрова, А.Б. Борисова, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, О.В. Шамшева, Ю.Н. Урбан, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, А.В.Алешкин, М.С. Афанасьев, Е.В. Власов, С.В. Бунин // Вопросы практической педиатрии. – 2018. – Т. 13, № 6. – С. 50-57.
3. Гадуа, Н.Т. Выявление *Bordetella holmesii* среди больных, госпитализированных в стационар с подозрением на коклюш или коклюшеподобные заболевания / Н.Т. Гадуа, А.Б. Борисова, А.С. Пименова, О.Ю. Борисова, М.С. Петрова, О.В. Шамшева, С.С. Афанасьев, Л.И. Кафарская, Е.В. Власов, М.С. Афанасьев, А.В. Алешкин, С.В. Бунин, В.А. Алешкин // Журнал Инфектологии. – 2019. – Т. 11, № 2. – С. 45-52.
4. Петрова, М.С. Особенности клинической картины коклюшеподобного заболевания, вызванного *Bordetella holmesii*, у госпитализированных больных / М.С. Петрова, А.Б. Борисова, Ю.Н. Урбан, Н.Т. Гадуа, А.С. Пименова, С.С. Афанасьев, О.В. Шамшева, О.Ю. Борисова, Е.В. Власов, С.В. Бунин // Материалы XI Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием, 1 – 3 апреля 2019 г., г. Москва. – Москва, 2019. – С. 159.
5. Борисова, А.Б. Разработка методики генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний на основе ПЦР в реальном времени в мультиплексном формате / А.Б. Борисова, Ю.Н. Урбан, Н.Т. Гадуа, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, М.С. Афанасьев, М.С. Петрова, С.С. Афанасьев, С.В. Сметанина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 9. – С. 567 – 573.
6. Петрова, М.С. Особенности клиники и диагностики коклюша у взрослых / М.С. Петрова, А.Б. Борисова, Т.А. Скирда, С.В. Сметанина, М.В. Базарова, О.Ю. Борисова, М.С. Афанасьев, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин // Инфекционные болезни. – 2020. – Т. 18, № 3. – С. 104-110.
7. Пименова, А.С. Применение метода ПЦР для видовой идентификации возбудителя коклюша в Российской Федерации / А.С. Пименова, А.Б. Борисова, Н.Т. Гадуа, О.Ю. Борисова, С.С. Афанасьев, М.С. Петрова, М.С. Афанасьев, А.Ю. Миронов, В.А. Алешкин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66, № 1. – С. 52-58.

Патенты

8. Патент 2702240 Российская Федерация, МПК G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/6876 (2018.01), C12Q 1/689 (2018.01). Способ и набор для генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний / Борисова О.Ю., Урбан Ю.Н., Борисова А.Б., Гадуа Н.Т., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Караулов А.В., Петрова М.С., Пименова А.С., Афанасьев М.С., Чешева В.В. заявитель и патентообладатель: ФБУН МНИИЭМ им.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ	— Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ФБУН ЦНИИЭ	— Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора	— Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ	— Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ГБУЗ ИКБ № 1 ДЗМ	— Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы
БУЗ ВО ОДКБ № 2	— Бюджетное учреждение здравоохранения Воронежской области «Областная детская клиническая больница № 2»
ЛПО	— Лечебно – профилактическое учреждение
ФБУЗ ЦГиЭ	— Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения Центр гигиены и эпидемиологии
ОРВИ	— Острая респираторная вирусная инфекция
ГЭ	— геном-эквивалент
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
КА	— кровяной агар
ККРС	— кровь крупного рогатого скота
КОЕ	— колониеобразующая единица
КТА	— кровяно-теллуритовый агар
м.к.	— микробная клетка
МР, МУ, МУК	— методические рекомендации, методические указания
п.н.	— пара нуклеотидов
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	— ПЦР в режиме реального времени
СКРС	— сыворотка крупного рогатого скота
СП	— санитарно-эпидемиологические правила
EMBL/GenBank	— European molecular biology laboratory, база данных генотипов
IS	— инсерционная последовательность
LAMP	— loop-mediated isothermal amplification, петлеобразующая изотермическая амплификация
NCBI	— National Center for Biotechnology Information, национальный центр биотехнологической информации