

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ

Афанасьев Станислав Степанович

к.м.н.

Петрова Марина Семеновна

Москва – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	7
Цель исследования.....	8
Задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость.....	10
Методология и методы исследования.....	12
Штаммы микроорганизмов.....	12
Образцы клинического материала.....	14
Пациенты.....	15
Аналитические данные.....	16
Микробиологические методы исследования.....	16
Молекулярно-генетические методы исследования.....	18
Клинические методы исследования.....	20
Биоинформационные и статистические методы исследования.....	21
Личное участие автора в получении результатов.....	22
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	22
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	23
Объем и структура диссертации.....	24
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	25
1.1. Микробиологические особенности представителей рода <i>Bordetella</i>	25
1.1.1. История открытия бордетелл	25
1.1.2. Культурально – морфологическая характеристика <i>Bordetella</i> <i>holmesii</i> и других клинически значимых представителей рода <i>Bordetella</i>	27

1.1.3. Генетические особенности представителей рода <i>Bordetella</i> , в том числе <i>B.holmesii</i>	30
1.1.4. Сравнительный анализ особенностей биологических свойств <i>B.holmesii</i> и <i>Bordetella pertussis</i>	32
1.2. Распространенность случаев коклюшеподобного заболевания, возбудителем которого является <i>B.holmesii</i>	35
1.3. Состояние генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний.....	40
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53
ГЛАВА 2. Анализ эффективности применения ПЦР-диагностики у больных с подозрением на коклюш	53
2.1 Оценка применения ПЦР-диагностики на территории Российской Федерации	53
2.2. Анализ применения ПЦР-диагностики для обследования госпитализированных больных	61
ГЛАВА 3. Совершенствование генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами	66
3.1. Разработка ускоренной методики генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени	66
3.2 Оценка аналитической надежности разработанной методики.....	74
3.2.1. Оценка аналитической чувствительности разработанной методики.....	74
3.2.2. Оценка аналитической специфичности разработанной методики.....	80
3.2.3. Оценка сходимости и воспроизводимости разработанной методики.....	81
3.3 Оценка диагностических характеристик разработанной методики....	82
3.4. Оценка валидности разработанной методики.....	85

3.5 Оценка достоверности идентификации ДНК <i>B.holmesii</i>	90
ГЛАВА 4. Клиническая характеристика заболевания, вызванного <i>B.holmesii</i> , в сопоставлении с клиникой коклюша, вызванного <i>B.pertussis</i> .	96
4.1. Клиническая характеристика заболевания, вызванного <i>B.holmesii</i>	97
4.1.1. Характеристика легкой формы заболевания, вызванного <i>B.holmesii</i>	99
4.1.2. Характеристика среднетяжелой формы заболевания, вызванного <i>B.holmesii</i>	104
4.2 Клиническая характеристика коклюша, вызванного <i>B.pertussis</i>	107
4.2.1. Характеристика легкой формы коклюша.....	108
4.2.2. Характеристика среднетяжелой формы коклюша.....	111
4.2.3. Характеристика тяжелой формы коклюша.....	115
4.3 Сравнительная характеристика течения легкой формы заболевания, вызванного <i>B.holmesii</i> , и коклюша, вызванного <i>B.pertussis</i>	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
ВЫВОДЫ.....	131
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	133
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	134
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	135
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Введение массовой иммунизации против коклюшной инфекции в 1950 – 1960-х гг. повлияло на течение эпидемического процесса, биологические свойства возбудителя, облегчило течение болезни и снизило летальность [2, 7, 13, 22, 24, 28, 32, 38, 39, 41, 43].

Однако, несмотря на достаточный охват профилактическими прививками, в странах с высоким уровнем охвата иммунизацией регистрируется рост заболеваемости коклюшем [52, 62, 63, 64, 65, 77, 147, 168, 208]. 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 [40]. В настоящее время сохраняется высокая заболеваемость детей в возрасте до 1 года и детей старших возрастных групп, регистрируются очаги инфекции в детских учреждениях, преимущественно в школьных учебных учреждениях [9, 40]. Отмечается большое число «нераспознанных» типичных легких и атипичных стертых труднодиагностируемых форм [2, 13, 23, 30, 33, 34, 39]. Кроме того, в последние годы участилась регистрация случаев заболеваний коклюшем среди взрослого населения [22, 24, 34, 79, 97, 108, 112, 121, 123, 130, 131, 152, 171, 179, 209, 213, 216] и случаи бактерионосительства среди практически здоровых людей [101, 121, 147, 208], 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 и, следовательно, запаздыванием начала прививок, 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, также появлением других бордетелл, которые могут вызвать коклюшеподобные заболевания,

против которых иммунитет не вырабатывается [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 164, 195].

Следовательно, в дальнейшем для успешной борьбы с коклюшной инфекцией необходимо поддержание высокого охвата профилактическими прививками населения, совершенствование вакцинного препарата и схем иммунизации, и развитие и модернизация генодиагностики этой инфекции, с учетом выявления ДНК разных видов бордетелл.

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 [218]. Начиная с 2000 г., на территориях практически всех континентов были зарегистрированы случаи коклюшеподобного заболевания, этиологическим агентом которых была *B.holmesii* [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 145, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 164]. По данным исследования, проведенного во Франции, у 20,0 % взрослых и подростков коклюшеподобное заболевание вызвано инфицированием *B.holmesii* [158]. В 2010 г. на территории США было зарегистрировано наибольшее число заболевших - у трети обследованных взрослых и детей от 11 до 18 лет выделена *B.holmesii* [174]. В Испании обнаружено 4,1 % респираторных образцов, которые были положительными на *B.holmesii*, у пациентов с лабораторно подтвержденным коклюшем в течение 2013 - 2016 гг. [150]. В зарубежной литературе описаны исследования, подтверждающие высокий риск передачи *B.holmesii* от человека к человеку: в Марроко этот возбудитель был выделен у младенцев и их матерей в семейных очагах [118], в Японии – у детей, посещающих одно образовательное учреждение [117]. Однако, в некоторых странах, например, Нидерландах, ранее не сообщалось о случаях выделения *B.holmesii*, но в последних работах также зарегистрирована циркуляция этого возбудителя [153]. На основании этих данных, зарубежные исследователи полагают, что подъем заболеваемости в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками может быть обусловлен и циркуляцией *B.holmesii* [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 150, 151, 153,

158, 162, 163, 164, 195]. В РФ в настоящее время отсутствуют данные о распространенности *B.holmesii*.

Степень разработанности темы исследования

Накоплен значительный и обширный опыт в изучении клинического течения коклюшной инфекции в РФ, 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 [2, 28, 30, 33, 34, 35]. 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*.

По данным зарубежных исследований респираторная инфекция, связанная с *B.holmesii*, часто ошибочно идентифицируется как коклюш [91, 103, 117, 144, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 174]. В зарубежной литературе клиническая картина данного заболевания описывается разрозненно, но в целом представляется похожей на течение коклюша [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 145, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 164].

Для генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний исследователями предложено несколько вариантов амплификационных технологий, позволяющих идентифицировать несколько представителей рода *Bordetella* и основанных на детекции разных комбинаций фрагментов нуклеотидных последовательностей - IS481, IS1001, hIS1001, IS1002, *ptxA* (*ptxSI*) и *recA* [99, 103, 125, 145, 174, 175, 188, 190, 193, 197, 217]. Однако имеются как достоинства, так и ограничения в использовании различных ДНК-мишеней, что препятствует созданию единого методологического подхода в ПЦР-диагностике.

В России на протяжении последних 15 лет ведутся активные разработки молекулярно-генетических методик для идентификации возбудителей коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами [5, 6, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 31, 36, 42]. 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* [14, 15, 20, 21]. Коллективом сотрудников ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского была разработана методика изотермической амплификации, позволяющая выявлять ДНК *B.pertussis* [5, 6, 27]. 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 [12, 36]. 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 свежевыделенных 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.

Штаммы микроорганизмов

В работе использованы типовые коллекционные и дикие штаммы микроорганизмов, а также ДНК диких штаммов микроорганизмов (Таблица 1, 2, 3).

Таблица 1 – Типовые коллекционные штаммы микроорганизмов, использованные в исследовании

№	Вид микроорганизма и номер штамма	Коллекция
1.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> № 665	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора
2.	<i>Corynebacterium ulcerans</i> № 675	
3.	<i>Corynebacterium xerosis</i> № 1911	
4.	<i>Bordetella pertussis</i> № 143	
5.	<i>Bordetella parapertussis</i> № 386	
6.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> № 9	
7.	<i>Streptococcus pyogenes</i> Dick I	
8.	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW 8	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ
9.	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> «Соколов»	
10.	<i>Corynebacterium minutissimum</i> ATCC 23348	American Type Culture Collection
11.	<i>Corynebacterium jeikeium</i> ATCC 43734	
12.	<i>Bordetella holmesii</i> ATCC 51541	
13.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ATCC 25923	
14.	<i>Bordetella holmesii</i> DSM 13416	Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

Таблица 2 – Штаммы микроорганизмов рода *Bordetella*, выделенные из биологического материала от больных с подозрением на коклюш

№	Вид микроорганизма	Количество выделенных штаммов	Показания к обследованию
1.	<i>Bordetella pertussis</i>	50	С диагностической целью
2.	<i>Bordetella parapertussis</i>	37	
3.	ИТОГО	87	

Примечание: * Штаммы микроорганизмов поступили из бактериологических лабораторий лечебно-профилактических организаций (ЛПО) и Федеральных бюджетных учреждений здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии» (ФБУЗ ЦГиЭ) в субъектах РФ в период с 2017 г. по 2019 г. 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»»

Таблица 3 – ДНК диких штаммов микроорганизмов других родов, использованные в исследовании

№	Вид микроорганизма	Коллекция
1.	<i>Corynebacterium accolens</i>	Рабочая коллекция лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
2.	<i>Corynebacterium afermentas subsp. lipophilum</i>	
3.	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	
4.	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	
5.	<i>Corynebacterium coyleae</i>	
6.	<i>Corynebacterium diphtheriae gravis Tox⁺</i>	
7.	<i>Corynebacterium diphtheriae gravis Tox⁻</i>	
8.	<i>Corynebacterium diphtheriae mitis Tox⁻</i>	
9.	<i>Corynebacterium durum</i>	
10.	<i>Corynebacterium flavescens</i>	
11.	<i>Corynebacterium imitans</i>	
12.	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	
13.	<i>Corynebacterium massiliense</i>	
14.	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	
15.	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	
16.	<i>Corynebacterium paurometabolum</i>	
17.	<i>Corynebacterium propinquum</i>	
18.	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	
19.	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
20.	<i>Corynebacterium simulans</i>	
21.	<i>Corynebacterium striatum</i>	
22.	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	

Продолжение таблицы 3

№	Вид микроорганизма	Коллекция
23.	<i>Corynebacterium ulcerans</i> Tox ^r	Рабочая коллекция лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
23.	<i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	
25.	<i>Corynebacterium xerosis</i>	
26.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
27.	<i>Streptococcus anginosus</i>	
28.	<i>Streptococcus epidermidis</i>	
29.	<i>Streptococcus haemolyticus</i>	
30.	<i>Streptococcus mitis</i>	
31.	<i>Streptococcus oligofermentans</i>	
32.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
33.	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	
34.	<i>Streptococcus salivarius</i>	
35.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
36.	<i>Staphylococcus aureus</i>	
37.	<i>Staphylococcus caprae</i>	
38.	<i>Staphylococcus hominis</i>	
39.	<i>Bordetella pertussis</i>	
40.	<i>Bordetella parapertussis</i>	
41.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	
42.	<i>Candida albicans</i>	
43.	<i>Candida glabrata</i>	
44.	<i>Neisseria meningitidis</i>	
45.	<i>Neisseria mucosa</i>	
46.	<i>Neisseria subflava</i>	
47.	<i>Rothia dentocariosa</i>	
48.	<i>Rothia mucilaginosa</i>	
49.	<i>Actinomyces oral</i>	
50.	<i>Bacillus cereus</i>	
51.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	
52.	<i>Haemophilus influenzae</i>	
53.	<i>Micrococcus luteus</i>	
54.	<i>Moraxella atlantae</i>	

Образцы биологического материалаБиологический материал, полученный при обследовании больных

Количество клинических образцов, полученных при обследовании больных, представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Количество клинических образцов

№	Клинические образцы, полученные от групп больных	Количество образцов	Учреждение
1.	Больные с подозрением на коклюш	845	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»); Бюджетное учреждение здравоохранения Воронежской области «Областная детская клиническая больница № 2» («БУЗ ВО ОДКБ № 2»)
2.	Больные с ОРВИ (контрольная группа)	50	ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»
	ВСЕГО	895	

Биологический материал брали с задней стенки ротоглотки с помощью двух стерильных одноразовых тампонов (СОРАН, Италия). Рабочие части тампонов помещали в одну пробирку типа эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора, отламывая концы. Биологический материал транспортировали согласно МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша» [11].

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 (Таблица 5).

Таблица 5 – Количество больных с подозрением на коклюш, включенные в исследование

№	Обследуемый контингент	Количество больных	Учреждение
1.	Больные с подозрением на коклюш	240	ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»
2.	Больные с ОРВИ (контрольная группа)	50	
	ВСЕГО	290	

Объем проведенных исследований представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Объем проведенных исследований

Вид исследования			Количество исследований
Бактериологические исследования			160
Молекулярно-генетические исследования	Методика ПЦР	ПЦР в режиме реального времени	3305
		ПЦР в классическом формате	150
	Секвенирование ПЦР-фрагментов и биоинформатический анализ		20
	Метод изотермической амплификации (LAMP)		50
Общеклинические методы диагностики			290

Аналитические данные

Данные анкет-опросников были собраны в период с июля по сентябрь 2018 г. 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 и идентификация *V.pertussis*, *V.parapertussis*, *V.bronchiseptica* и *V.holmesii*

Культивирование штаммов *V.pertussis*, *V.parapertussis*, *V.bronchiseptica* и *V.holmesii* проводили в соответствии с методическими рекомендациями МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша» [11].

Исследуемый материал заседали на чашки Петри с плотной питательной средой Бордетеллагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и инкубировали 48 - 72 часа при + 37 °С. Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам.

Культурально-морфологические свойства выросших колоний оценивали с помощью стереоскопического микроскопа SteREO Discovery V12 (объектив PlanApo S 1,0 × FWD 60 mm; окуляр PI 10 x 23 Br foc (Carl Zeiss, Германия)).

Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Окрашенные мазки просматривали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 × 23 Br foc (Carl Zeiss, Германия)).

Идентификацию по биохимическим свойствам проводили с помощью следующих тестов: способность продуцировать ферменты оксидазу, тирозиназу, уреазу, редуцировать нитраты и утилизировать цитраты. Оксидазную активность у выделенных культур определяли с помощью коммерческих полосок «MIKROLATEST® OXItest» (Erba Lachema, Чехия) в соответствии с инструкцией производителя. Тирозиназную активность оценивали путем посева штаммов на скошенную поверхность ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с 0,1 % тирозина (AppliChem GmbH, Германия). Способность продуцировать уреазу и редуцировать нитраты изучали на лабораторно подготовленных средах, согласно [11]. С целью определения способности утилизировать цитраты испытуемую культуру засеивали на скошенную поверхность цитратного агара Симмонса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Культивирование типовых штаммов

Культивирование типовых штаммов *C.diphtheriae* и других коринебактерий проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» [17]. Посев штаммов производили на кровяно-теллуритовый агар (КТА) на основе 2 % агара (ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск)) с добавлением 7 % крови крупного рогатого скота (ККРС) (ООО «ЛейТран», Москва) и 0,02 % теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), и инкубировали 24 - 48 часов при + 37 °С с последующим пересевом на кровяной агар (КА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва) и инкубацией в течение 24 часов при + 37 °С.

Типовые штаммы *S.pyogenes* и *S.aureus* культивировали на КА на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва) и инкубацией в течение 24 часов при + 37 °С.

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение хромосомной ДНК

Выделение хромосомной ДНК проводили методом кипячения [19] 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 Бордетелагара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва).

В 150 мкл деионизованной, обработанной диэтилпирикарбонатом воде без РНКаз суспензировали полную микробиологическую петлю (1 мкл) культуры. Далее суспензию инкубировали при 95 °С в течение 20 мин. и центрифугировали в течение 5 мин. при 9 600 г. Хранение образцов выделенной ДНК осуществляли при - 34 °С.

Оценку аналитической чувствительности разработанной методики генодиагностики проводили в модельных экспериментах. Выделение ДНК из 48-часовых культур *B.parapertussis* и 72-часовых культур *B.pertussis* и *B.holmesii* проводили с использованием четырех коммерческих наборов для экстракции ДНК - «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) в соответствии с инструкциями производителей. Образцы выделенной ДНК хранили при - 34 °С.

Выделение ДНК из клинических образцов

Пробирки типа эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора и тампонами встряхивали на вортексе в течение 5 мин., и далее центрифугировали в течение 5 сек. при 5 000 г. Затем пинцетом аккуратно вынимали тампоны

(пинцет предварительно прожигали), закрывали пробирки и центрифугировали в течение 5 мин. при 6 700 g. Наконечником с аэрозольным барьером удаляли супернатант, оставляя полученный осадок и 100 мкл надосадочной жидкости, из чего выделяли ДНК.

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

Метод ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

Выявление и дифференциацию специфических фрагментов генома возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в клиническом материале от больных с подозрением на коклюш проводили методом ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» / «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию осуществляли с помощью прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия). Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия).

Детекция продуктов амплификации с помощью горизонтального электрофореза

Полученные ампликоны смешивали с 6 x DNA Loading Dye («Thermo Fisher Scientific», США) и 10 000 x SYBR Green I (Lumiprobe GmbH, Германия), помещали в лунки 1,5 % агарозного геля (Lonza, США). Электрофорез проводили в 50 x TAE-буфере («Thermo Fisher Scientific», США) в камере SUB-CELL® GT (Bio-Rad Laboratories, США) при 160 V в течение 60 мин. В качестве маркера молекулярных весов использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США). 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 ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» согласно МР «Коклюш (клиника, диагностика, лечение)» [10, 11]. Клинические методы исследования 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.

В работе использованы общеклинические лабораторные методы исследования (согласно «Протоколу лечения больных коклюшем»): клинический анализ крови на аппаратах Coulter LH-750-36, Coulter LH-500-36, Pentra 80 (Horiba)-32 с определением уровня гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов и расчетом лейкоцитарной формулы, тромбоцитов, СОЭ. Гематологические показатели у пациентов оценивали в соответствии с референсными значениями, утвержденными для каждого определенного возраста. При наличии показаний и для исключения воспалительных изменений в легких пациентам проводилось рентгенологическое обследование органов грудной клетки. При подозрении на сопутствующие вирусные инфекции были использованы соответствующие методы исследования: исследование мазка из носоглотки при помощи реакции иммунофлюоресценции (РИФ) для идентификации респираторных вирусов, исследование мазка из носо- и ротоглотки методом ПЦР и сывороток крови методом ИФА для обнаружения цитомегаловирусной инфекции.

Биоинформатические и статистические методы исследования

Подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров для методики мультиплексной ПЦР-РВ и nested-ПЦР, вычисление их температуры отжига, а также предварительную проверку их специфичности осуществляли с помощью компьютерной программы BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты секвенирования обрабатывали с использованием программы Geneious 11.1.1 и сопоставляли с опубликованными нуклеотидными последовательностями в базе данных EMBL / GenBank на сайте Национального центра биотехнологической информации США, NCBI (<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 биномиальных данных: чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата, индекс точности (диагностическая эффективность), отношение правдоподобия положительного результата и отношение правдоподобия отрицательного результата, 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/diagnosticheskiy-test-na-voopriimchivost-k-zabolevaniyam/>.

Для определения аналитической надежности диагностического теста были вычислены: аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, сходимость и воспроизводимость результатов [8].

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 была 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).

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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Микробиологические особенности представителей рода *Bordetella*

1.1.1. История открытия бордетелл

Возбудитель коклюша относится к роду *Bordetella* (семейство *Alcaligenaceae*, порядок *Burkholderiales*, класс *Betaproteobacteria*). В настоящее время известны следующие виды бордетелл: *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica*, *B.avium*, *B.hinzii*, *B.holmesii*, *B.trematum* и *B.petrii* [95, 120, 202, 203, 206, 212].

История открытия и изучения бордетелл началась с исследования классического представителя этого рода, который является возбудителем коклюша у человека, - *Bordetella pertussis*. Исследования по выделению *B.pertussis* проводились Jules Bordet и Octave Gengou с 1900 года и увенчались успехом в 1906 году (J. Bordet and O. Gengou, “Le Microbe de la Coqueluche”, *Annales de l’Institut Pasteur*, 1906) [47]. Коклюш – это острое антропонозное заболевание с воздушно – капельным механизмом передачи, наиболее характерным признаком которого является приступообразный спазматический кашель [47, 67, 127].

B.parapertussis - открыта в 1937 г. и 1938 г. независимо друг от друга W. Bradford - B. Slavin и G. Eldering - P. Kendrick соответственно [51, 83, 84]. Является возбудителем коклюшеподобного заболевания у людей - паракоклюша, которое похоже на коклюш по клинической картине, но протекает в легкой форме, осложнения развиваются редко. Для паракоклюша, в отличие от коклюша, не характерен лимфоцитоз в анализах периферической крови.

B.bronchiseptica была выделена N. Ferry и J. McGowan в 1911 г. при обследовании собак, заболевших чумой [87, 88, 89, 90, 149]. Параллельно с этим, другими исследователями, было доказано, что *B.bronchiseptica* является возбудителем заболевания верхних дыхательных путей (бордетеллеза) у млекопитающих [100, 172, 192]. Некоторыми исследователями описано около 100 случаев инфицирования людей – наблюдалось поражение респираторного

тракта в виде ОРВИ с приступами сухого кашля, усиливающегося перед сном [54, 172, 176]. В тоже время *B.bronchiseptica* может вызывать развитие эндокардитов, менингитов и раневой инфекции [214].

Bordetella avium (1984 г.) вызывает развитие ринотрахеита у домашних птиц; в тоже время по литературным данным была выделена от пожилых пациентов с отягощенным анамнезом, переносящих пневмонию [94, 120, 183].

Bordetella hinzii (1995 г.) колонизирует дыхательные пути домашней птицы, также описано несколько случаев выделения этого возбудителя от иммунокомпрометированных пациентов, в том числе при летальной септицемии [70, 119].

B.holmesii впервые идентифицирована в 1983 г. в лаборатории Центра по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC). Изначально считалась возбудителем септицемии и эндокардита чаще у иммунокомпрометированных лиц (пациенты, перенесшие спленэктомию, больные серповидноклеточной анемией) [212]. В период с 1995 г. по 1998 гг. *B.holmesii* была определена как возбудитель коклюшеподобного заболевания [148, 218].

Bordetella trematum (1996 г.) является возбудителем раневых и ушных инфекций у людей [203].

Bordetella petrii (2001 г.) была выделена из окружающей среды и по результатам немногочисленных исследований может относиться к анаэробной флоре [206, 207].

Помимо этих видов к роду *Bordetella* также относятся - *Bordetella ansorpii* (2005 г.), *Bordetella bronchialis* (2015 г.), *Bordetella flabilis* (2015 г.), *Bordetella sputigena* (2015 г.), этиопатогенетическая роль которых остается пока еще малоизученной.

1.1.2. Культурально – морфологическая характеристика *Bordetella holmesii* и других клинически значимых представителей рода *Bordetella*

Микроорганизмы рода *Bordetella* - мелкие грамотрицательные неспорообразующие палочки размером 0,2 - 0,5 x 0,5 - 2,0 мкм, имеющие нежную капсулу, располагающиеся поодиночке, некоторые из которых обладают подвижностью (Рисунок 1) [61, 68, 109].

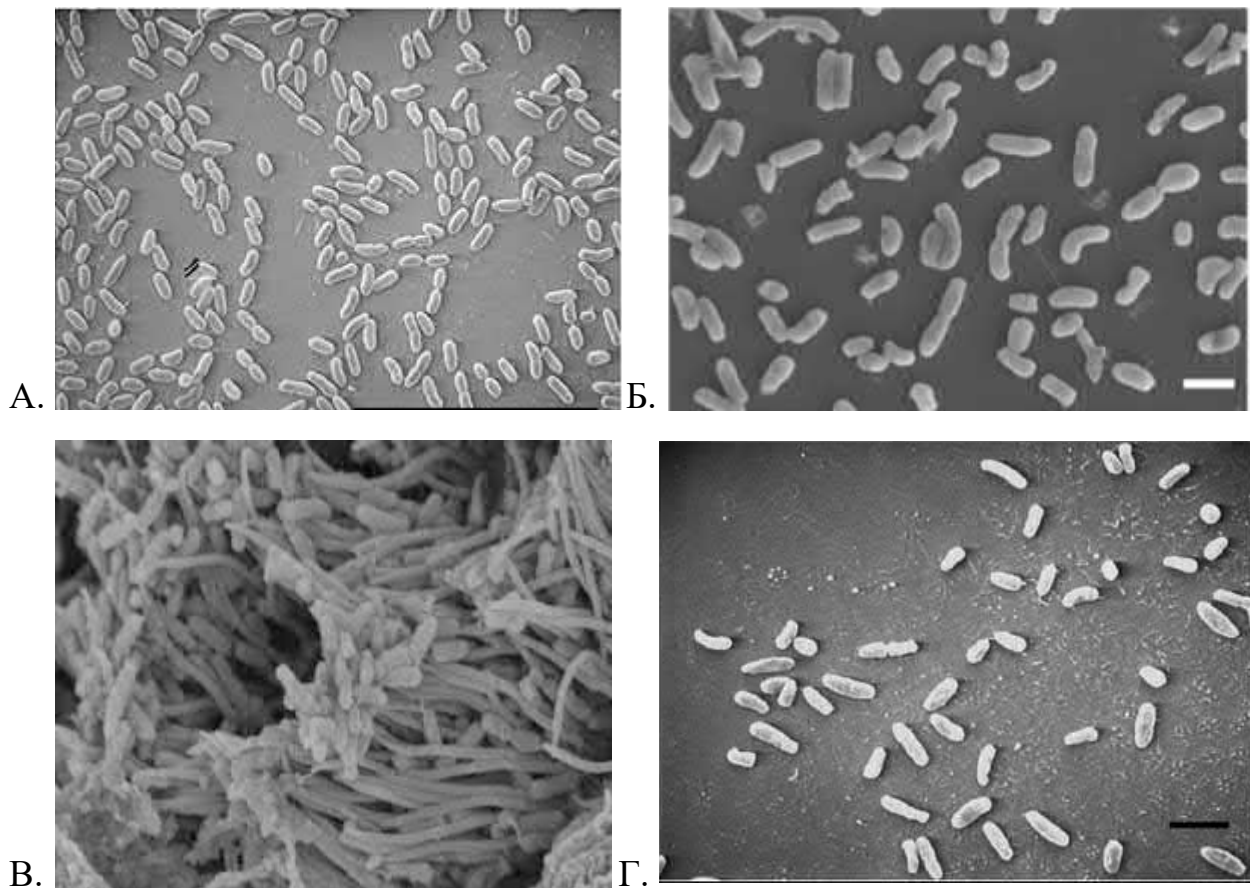


Рисунок 1 – Сканирующая электронная микроскопия *B. pertussis* (А), *B. holmesii* (Б), *B. parapertussis* (В), *B. bronchiseptica* (Г) [61, 68, 109].

Бордетеллы требовательны к условиям культивирования и относятся к медленно растущим микроорганизмам. Температура культивирования 36 ± 1 °С. Наиболее требовательны к питательным средам *B. pertussis* и *B. holmesii*. Бактерии *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*, в отличие от *B. pertussis* и *B. holmesii*, могут расти и на более простых питательных средах без добавления крови и угля. Представители рода *Bordetella* неоднородны по культурально-

морфологическим свойствам. На Бордетелагаре бордетеллы растут в виде выпуклых, круглых, блестящих, гладких колоний, серовато-кремового или серовато-белого цвета, маслянистой консистенции, легко снимающиеся петлей (Рисунок 2).

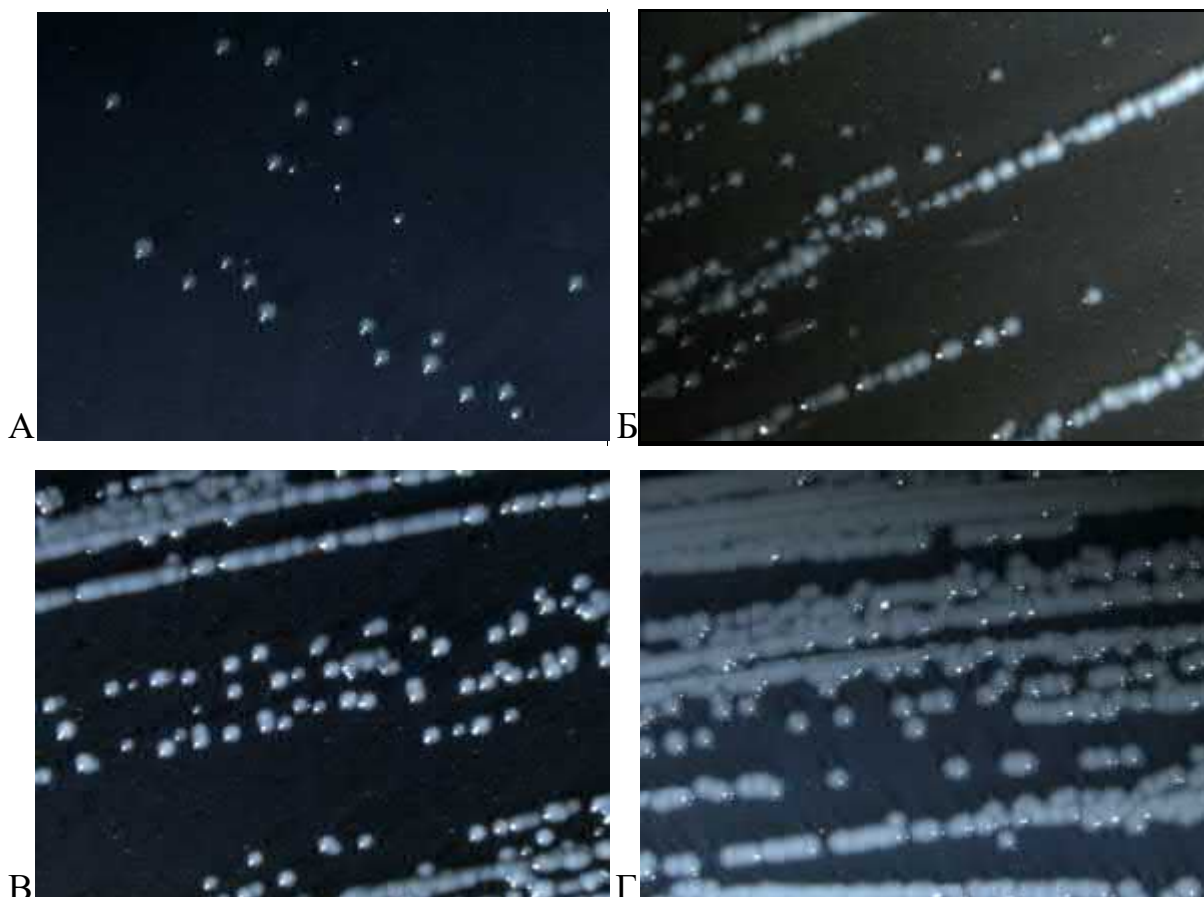


Рисунок 2 – Рост *B.pertussis* (А), *B.holmesii* (Б), *B.parapertussis* (В), *B.bronchiseptica* (Г) на Бордетелагаре (стереомикроскоп Stereo Discovery. V12, Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений - 8x - 100x)


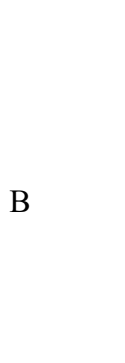





При просмотре в стереоскопическом микроскопе можно увидеть узкий луч света («хвостик»), отходящий от центра колонии. Сроки формирования колоний представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Сроки формирования колоний представителей рода *Bordetella*

Характеристика колоний	Вид микроорганизма		
	<i>B.pertussis</i> / <i>B.holmesii</i>	<i>B.parapertussis</i>	<i>B.bronchiseptica</i>
Сроки образования колоний	48-72 часа	24-48 часа	18-24 часа
Размер колоний	0,5-2 мм	0,6-4 мм	1-4 мм

Биохимические свойства бордетелл, которые определяются в практической работе, представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Биохимические свойства клинически значимых микроорганизмов рода *Bordetella*

Микроорганизмы	Рост на кровяном агаре	Рост на МПА	Подвижность	Оксидаза	Тирозиназа	Восстановление нитратов	Утилизация цитратов	Уреаза
<i>B.pertussis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B.parapertussis</i>	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>B.bronchiseptica</i>	+	+	+	+	-	+	+	+* (через 4 часа)
<i>B.holmesii</i>	+ (48 часов)	-	-	-	+	-	-	-
Г	<p>Б</p>  <p>А</p>	<p>В</p> 	 <p>К- В А,Б,Г</p>	<p>-</p>  <p>К- Б,Г А,В</p>	 <p>К- В А,Б,Г</p>	 <p>К- В А,Б,Г</p>	 <p>К- Б,В А,Г</p>	

Примечание: штаммы *B.pertussis* (А); *B.parapertussis* (Б); *B.bronchiseptica* (В); *B.holmesii* (Г); К- (отрицательный контроль) .

1.1.3. Генетические особенности представителей рода *Bordetella*, в том числе *B. holmesii*

Анализ филогенетических взаимоотношений клинически значимых бордетелл, на основании данных мультилокусного энзим-электрофореза, полиморфизма инсерционных последовательностей (IS) и полногеномного секвенирования, показал тесную генетическую связь представителей рода *Bordetella* с факультативным анаэробом *B. petrii*, как предполагаемого экологического предшественника патогенных бордетелл (Рисунок 3) [139].

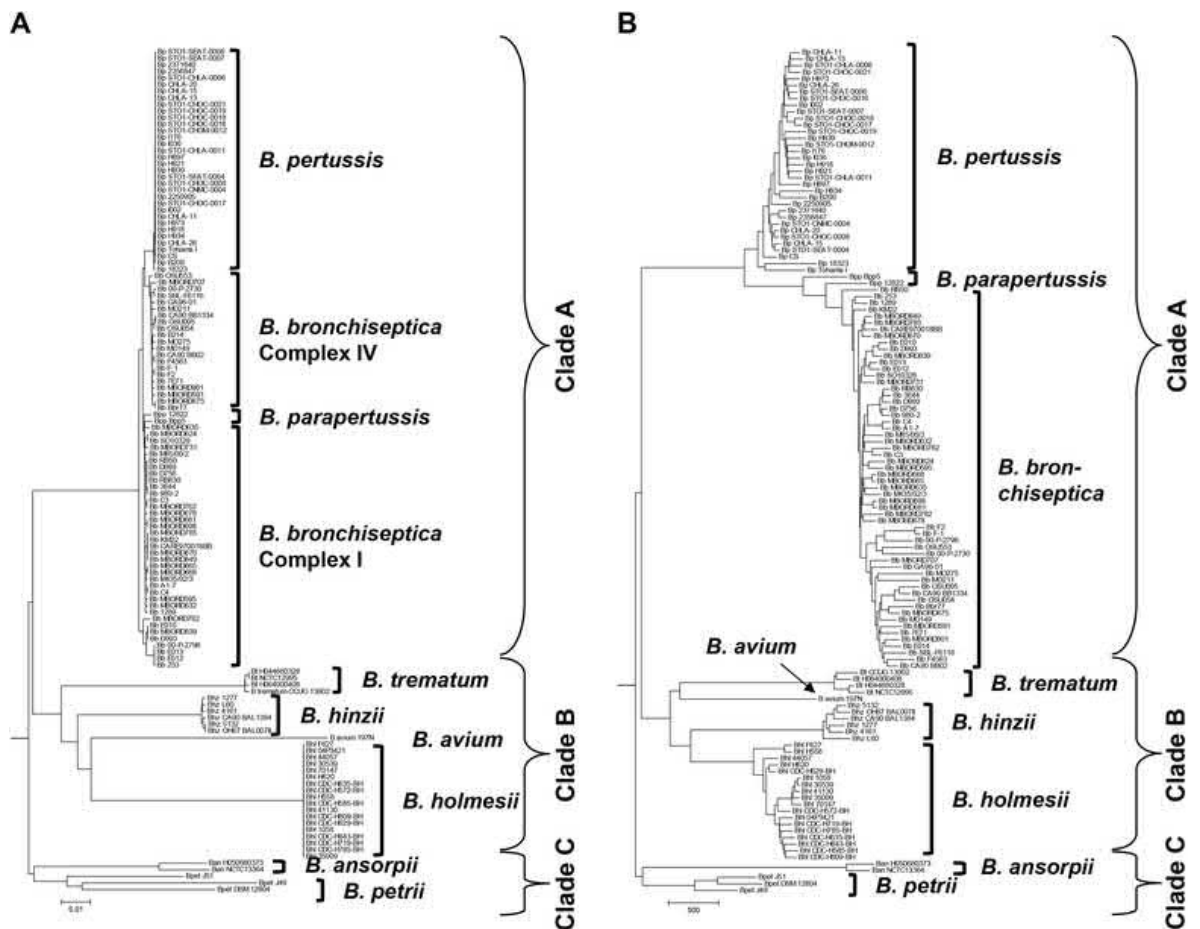


Рисунок 3 - Филогенетические взаимоотношения между девятью видами рода *Bordetella*

Примечание: А – выравнивание последовательности по всему геному; В - наличие или отсутствие генов в 128 геномах девяти видов рода *Bordetella* [139].

Согласно проведенному исследованию [139] род *Bordetella* подразделяется на три клада. Клад С, образованный *B. petrii* и *B. ansorpii*, располагается ближе всего к корню дерева всех видов *Bordetella* и, таким образом, вероятно, был

первоочередным в ходе эволюции рода (Рисунок 3). Впоследствии предки остальных видов разделились на два дополнительных клада. Клад В состоял из *B.holmesii*, *B.hinzii*, *B.avium* и *B.trematum*, а клад А - *B.bronchiseptica*, *B.pertussis* и *B.parapertussis*. Геномы последних бордетелл генетически похожи, со средним межвидовым разнообразием $\pi = 0,00382$ (диапазон: $\pi = 0,00317-0,00431$), что отражает относительно недавнюю эволюцию *B.pertussis* и *B.parapertussis* из *B.bronchiseptica* - как предка [81, 163]. Напротив, несмотря на формирование отдельной клады, геномы видов *B.holmesii*, *B.hinzii*, *B.avium* и *B.trematum* не были так тесно связаны друг с другом со значениями в диапазоне от $\pi = 0,08349$ между *B.holmesii* и *B.hinzii* до $\pi = 0,11107$ между *B.trematum* и *B.avium*.

У большинства видов *Bordetella* было показано, что разнообразие внутривидовой последовательности очень ограничено [73, 95, 161, 199]. Внутривидовое разнообразие было крайне низким у *B.pertussis* ($\pi = 0,00004$) и *B.holmesii* ($\pi = 0,00002$), что позволяет предположить, что произошла быстрая клональная экспансия этих видов. Напротив, разнообразие штаммов *B.bronchiseptica* ($\pi = 0,00289$) было сравнимо со средним межвидовым разнообразием бордетелл ($\pi = 0,00382$), и разнообразие последовательностей *B.ansorpii* ($\pi = 0,02119$) и *B.petrii* ($\pi = 0,07534$) было как минимум на один порядок больше.

Хотя *Bordetella spp.* генетически похожи друг на друга, они отличаются наличием или отсутствием последовательностей вставок (IS) и количеством их копий [210, 211].

Например, IS481 присутствует в большом количестве копий у *B.pertussis* (50 – 249 копий), но также имеется в геномах *B.holmesii* и *B.bronchiseptica* 8 – 10 и <5 копий соответственно, но не встречается в геноме *B.parapertussis* [161, 169, 170, 191, 210, 211]. Более высокое количество копий указывает на то, что IS481 присутствует у *B.pertussis* в течение более длительного периода, чем у *B.holmesii* [170], и, по мнению авторов, влияет на эволюцию этого вида [210, 211]. Некоторые авторы свидетельствуют о том, что IS481 возможно был унаследован от их общего предка посредством горизонтального переноса этого

элемента [191]. У *B.parapertussis* и некоторых штаммов *B.bronchiseptica* имеется вставка IS1001, которая отсутствует у *B.pertussis* и *B.holmesii* [197]. Геном *B.holmesii* содержит от 3 до 5 копий IS1001 - подобных элементов, названных hIS1001, который отсутствует у других бордетелл [44, 170, 188, 190]. Следовательно, наличие IS-элементов и последующая пролиферация числа копий генерируют области гомологии в геномах, которые обеспечивают субстраты для гомологичной рекомбинационной перестройки [129] и способствуют их видообразованию [80, 139, 161].

1.1.4. Сравнительный анализ особенностей биологических свойств

B.holmesii и *Bordetella pertussis*

Учитывая актуальность коклюшеподобных заболеваний, вызванных *B.holmesii*, интересным представлялось проанализировать данные литературы о биологических особенностях этого микроорганизма и *B.pertussis*.

Размер генома *B.pertussis* составляет приблизительно 4,1 Мб с содержанием G + C – 67,7 % [50], размер генома *B.holmesii* - 3,6 Мб с содержанием G + C – 63,0 % [104]. Анализ генов домашнего хозяйства показал, что *B.holmesii*, возможно, приобрели ген 16S рРНК и остров утилизации железа из *B.pertussis* [71, 80, 191]. Последовательности 16S рРНК *B.pertussis* и *B.holmesii* оказались идентичными между собой на 99,5 % (Рисунок 4) [71].

На основании анализа полных геномов исследователями было выдвинуто предположение, что *B.holmesii* мог стать патогенным для человека в результате горизонтального переноса генетического материала как из *B.pertussis*, так и других бактерий [80]. Действительно, Diavatoroulos et al. идентифицировал в геноме *B.holmesii* область размером 66 т.п.н., высоко консервативную между *B.pertussis* и *B.holmesii*, содержащую гены патогенности, необходимые для «запуска» патогенеза заболевания, которая, вероятно, была перенесена из одного микроорганизма в другой [80]. Другая группа исследователей обнаружила от 24 до 114 уникальных генов в геноме девяти секвенированных штаммов *B.holmesii*. Один из этих штаммов имел ген,

кодирующий остаточный белок, характерный для *Escherichia coli* [104]. Также было показано сильное сходство между *B.holmesii* и *B.avium* по профилю клеточных жирных кислот [80, 104, 165, 187].

Следовательно, все эти гипотетические переносы могли способствовать появлению *B.holmesii*, как человеческого патогена. Интересно, что штаммы *B.holmesii*, выделенные от пациентов с инвазивными или респираторными инфекциями, имеют идентичные профили гель-электрофореза, что позволяет предположить, что один и тот же штамм может вызывать оба типа инфекций [49].

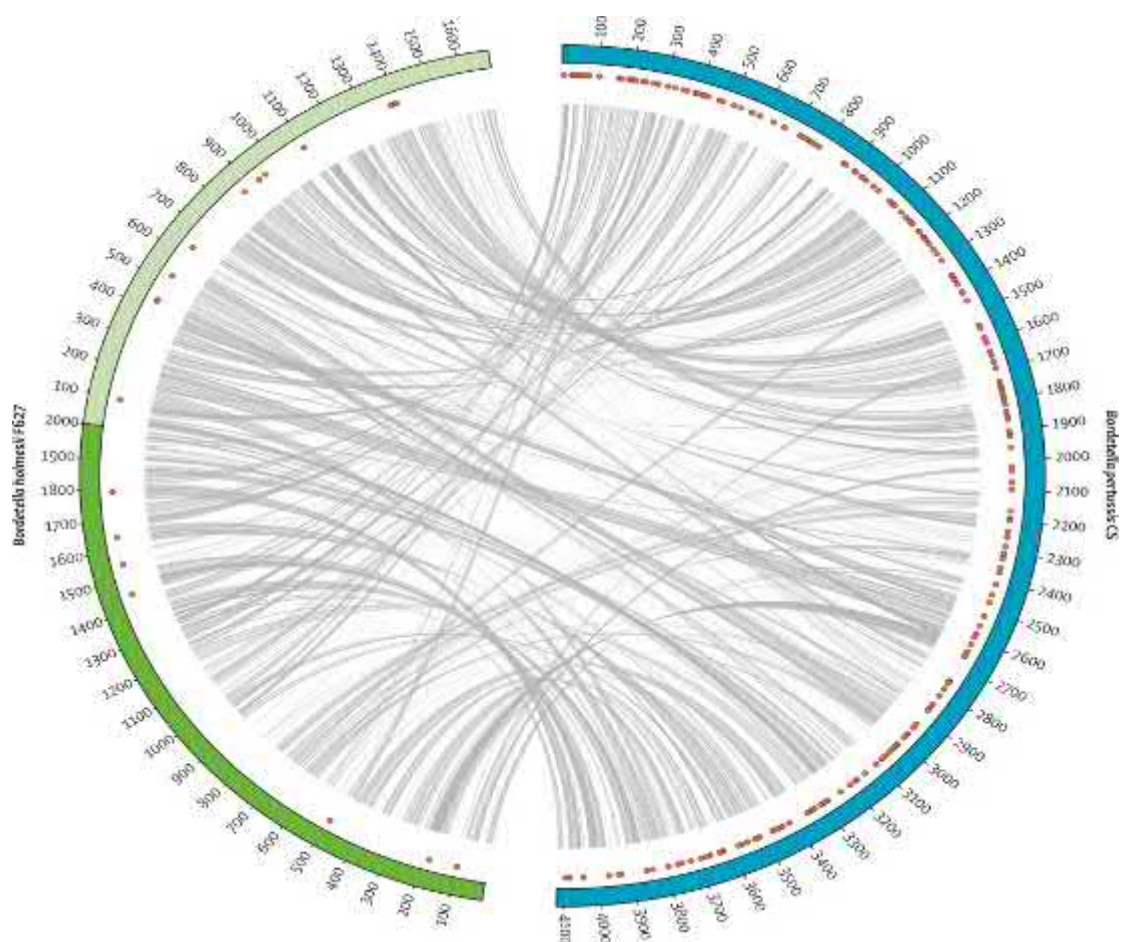


Рисунок 4 - Сравнение карт генома *B.pertussis* (GenBank CP002695.1) и *B.holmesii* (GenBank AOEW00000000.1) [162, 163].

Примечание: геном *B.holmesii* показан в форме двух отдельных контигов (разные оттенки зеленого); серые линии указывают на сходство последовательностей между двумя геномами; красными точками показаны положения IS481, который имеется в 19 случаев у штамма *B.holmesii* F627 и в 227 случаев у штамма *B.pertussis* CS.

B.pertussis и большинство других видов *Bordetella* продуцируют биологически активные компоненты, которые регулируются двухкомпонентной системой *bvgAS* (основной регулятор экспрессии генов вирулентности). Gerlach G. и соавт. подробно изучили систему *bvgAS* новых видов *Bordetella* и показали, что, несмотря на то, что имеются сходства, система *B.holmesii* значительно отличается от *B.pertussis*, но некоторые цитоплазматические сигнальные домены гистидинкиназы *bvgS* функционально взаимозаменяемы между *B.pertussis* и *B.holmesii* [96, 110]. Что касается классических факторов патогенности, *B.holmesii* продуцирует белок, тесно связанный с филаментозным гемагглютинином (ФНА), который является необходимым адгезином для колонизации других патогенных видов *Bordetella* [138].

B.holmesii также продуцирует липополисахариды, важнейшие компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий, но их экспрессия отличается от экспрессии, обнаруженной у других видов *Bordetella*. Эти липополисахариды, вероятно, играют роль в инвазивности, обеспечивая более высокий инвазивный потенциал [194]. Различия в экспрессии липополисахаридов между *B.pertussis* и *B.holmesii* могут объяснить наблюдаемое клиническое различие с *B.pertussis*, которая в основном поражает эпителий дыхательных путей, и *B.holmesii*, способной вызвать еще и бактериемию [194]. Следует отметить, что не было обнаружено различий между геномами штаммов *B.holmesii*, которые вызывают респираторные или не респираторные инфекции [49, 187].

B.holmesii не продуцирует коклюшный токсин, один из ключевых факторов патогенности *B.pertussis* [49, 95, 187]. Кроме того, в геноме *B.holmesii* отсутствует большинство других факторов патогенности, связанных с патогенностью видов *Bordetella* (например, аденилатциклазный токсин, системы секреции *Bordetella* типа II и III, пертактин и фимбрии) [49, 165, 187]. Вместе с тем, геном *B.holmesii* имеет геномный остров, кодирующий несколько факторов патогенности, таких как сидерофор, способный удалять свободное железо из внеклеточной среды, и несколько эффлюксных насосов, определяющих устойчивость к антибиотикам. Наличие таких факторов патогенности может

усилить колонизацию дыхательных путей хозяина за счет увеличения устойчивости к дефензинам хозяина и другим эндогенным антимикробным пептидам [80].

Было обнаружено, что приблизительно 400 генов в геноме *B.holmesii* являются уникальными и никогда ранее не идентифицировались у других видов *Bordetella*. Многие из этих генов определяют патогенный потенциал микроорганизма, например, участвуют в транспорте и детоксикации органических соединений или антибиотиков, и возможно, что они также были приобретены путем горизонтального переноса генов. Пока остается неизвестным, имеет ли *B.holmesii* капсулу. Если это так, то ее присутствие могло бы в какой-то степени объяснить, почему у пациентов с аспленией повышен риск развития бактериемии *B.holmesii* [104].

1.2. Распространенность случаев коклюшеподобного заболевания, возбудителем которого является *B.holmesii*

В 1983 г., когда впервые была выделена и изучена *B.holmesii*, она относилась к возбудителям эндокардита и септицемии у иммунокомпрометированных пациентов (больные с аспленией или серповидноклеточной анемией) [157, 185, 212]. Изначально считалось, что *B.holmesii* не являлась первичным возбудителем септицемии, но в результате многочисленных исследований этот микроорганизм был единственным выделенным из образцов крови больных септицемией. Клиническое течение бактериемии было неспецифично: наблюдалась лихорадка, рвота, озноб и головная боль. По данным многих авторов септицемия, вызванная *B.holmesii*, хорошо поддавалась лечению антибактериальными препаратами, что приводило к выздоровлению [180, 186].

Эндокардит на нативных и искусственных клапанах, возбудителем которого была *B.holmesii*, был зарегистрирован у 9 пациентов. Течение эндокардита варьировало от подострого эндокардита до септического шока с острой почечной недостаточностью [56, 113, 185].

Кроме того, по данным клинических исследований [162, 163] *B.holmesii* может быть возбудителем пневмонии, перикардита, менингита, артрита, целлюлита и дисцита. В большинстве случаев эти заболевания наблюдались у пациентов с иммунодефицитными состояниями, такими как: аспления, сахарный диабет, терминальная почечная недостаточность, СПИД, бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, системная красная волчанка и в случаях трансплантации органов. Интересным является то, что у многих пациентов с заболеваниями не респираторного тракта наблюдалось поражение верхних дыхательных путей.

Благоприятным является тот факт, что ни в одном из исследований, посвященных *B.holmesii*, не было описано смертельных исходов [162, 163, 180, 186]. В статье о клиническом случае у мужчины с целлюлитом и пневмонией описано, что через месяц после проведенного лечения и выздоровления в назофарингеальных смывах была обнаружена *B.holmesii*, причем каких-либо симптомов заболевания не наблюдалось, что может свидетельствовать о возможном бактерионосительстве [156]. Но в связи с тем, что больше исследований на вероятное бактерионосительство не проводилось, говорить об этом не представляется возможным.

Начиная с 1995 г., *B.holmesii* стала ассоциироваться не только с эндокардитом и септициемией у иммунокомпрометированных пациентов, но и с коклюшеподобным заболеванием. Так, в период с 1995 г. по 1998 г. в Массачусетсе (США) было выявлено 34 случая коклюшеподобного заболевания, возбудителем которого была *B.holmesii* [218]. У всех пациентов она была обнаружена с помощью метода ПЦР в назофарингеальных смывах. Клиническая картина данного заболевания была похожа на коклюш (у всех пациентов наблюдался кашель), но в отличие от него при коклюшеподобном заболевании только у 61,0 % больных наблюдался характерный приступообразный кашель, у 26,0 % - приступы кашля оканчивались рвотой и у 9,0 % - наблюдались репризы. Также было отмечено, что заболевание протекало легче, чем коклюш, и по длительности всего заболевания не превышало 80 дней. Это исследование

послужило началом для дальнейшего изучения и выявления новых случаев коклюшеподобного заболевания, возбудителем которого может быть *B.holmesii*.

В период с 2005 г. по 2009 г. на территории Массачусетса (США) выявлен 41 случай коклюшеподобного заболевания, этиологическим агентом которого была *B.holmesii* [219]. В 2010 году в штате Огайо, США было зарегистрировано наибольшее число заболевших - у трети обследованных взрослых и детей от 11 до 18 лет выделена *B.holmesii* [174].

Случаи коклюшеподобного заболевания, возбудителем которого была *B.holmesii*, за последние 10 лет были выявлены на территории Австралии, Северной и Южной Америки, Азии, Африки и Европы [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 145, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 164].

Коклюшеподобное заболевание, вызванное *B.holmesii*, зарегистрировано у 20 % взрослых и подростков, проживающих во Франции [158]. В течение 2013 - 2016 гг. в Испании обнаружено 4,1 % образцов из носоглотки, которые были положительными на *B.holmesii*, у пациентов с лабораторно подтвержденным коклюшем. Необходимо отметить, что количество положительных случаев заражения *B.holmesii* увеличилось с 3,9 % в 2015 году до 8,8 % в 2016 году. В проведенном исследовании было отмечено, что коклюшеподобное заболевание регистрировалось у детей от 4-х лет, и единственным симптомом у больных был сухой кашель [150].

На территории Марроко с 2013 – по 2015 гг. зарегистрированы случаи выделения *B.holmesii* из назофарингеальных смывов у младенцев и их матерей в семейных очагах. Среди 96 зарегистрированных случаев – 35 (36,5 %) были вызваны ко-инфекцией *B.holmesii* и *B.pertussis*. У обследованных матерей не отмечалось никаких симптомов коклюшеподобного заболевания. Это исследование послужило основанием того, что инфицированию *B.holmesii* подвержены не только дети, но и взрослые, независимо от возраста [118].

В Японии – коклюшеподобное заболевание, вызванное *B.holmesii*, выявлено в одном образовательном учреждении у детей и учителя [117], что говорит о высоком риске передачи возбудителя от человека к человеку. По

сравнению с коклюшем заболевание протекало легче: только у 1 школьника длительность кашля превышала 14 дней, во всех остальных случаях кашель продолжался не более 8 дней и не носил приступообразного характера.

В Нидерландах в ранее опубликованных работах *B.holmesii* не была идентифицирована, однако по последним данным также зарегистрирована циркуляция этого возбудителя [153]. Было зарегистрировано 3 случая коклюшеподобного заболевания в течение 3-х месяцев (с июня по август), что может говорить о сезонности коклюшеподобного заболевания. В других странах данных о сезонности коклюшеподобного заболевания нет.

В Чили при обследовании 177 больных с подозрением на коклюш было обнаружено, что 20,3 % из них переносят коклюшеподобное заболевание, вызванное *B.holmesii*. Заболевание было зарегистрировано во всех возрастных группах, в том числе и у младенцев [151].

В Румынии в исследовании, проведенном в течение 1 года, в 22,0 % случаев выявлено инфицирование *B.holmesii* (был обследован 51 больной) [81]. В некоторых странах, например Финляндии, Дании и Швейцарии, к настоящему времени нет опубликованных работ о регистрации пациентов с коклюшеподобным заболеванием, вызванным *B.holmesii* [44, 164].

По опубликованным данным [145, 162, 163] инфекция, вызванная *B.holmesii*, часто ошибочно идентифицируется как коклюш с идентификацией *B.pertussis*. Анализ качества работы 24 Европейских лабораторий в 2013 году показал, что только одна лаборатория правильно определила *B.holmesii* [74]. Вместе с тем, учитывая, что данных о смертельных случаях заболевания *B.holmesii* не зарегистрировано, инвазивные инфекции, вызванные этим возбудителем, вызывают существенную патологию у ранее здоровых людей [117, 153, 162, 163]. На основании этих данных, зарубежные исследователи свидетельствуют о том, что на фоне высокого уровня охвата профилактическими прививками, подъем заболеваемости может быть обусловлен циркуляцией *B.holmesii*, в связи с тем, что вакцинация против коклюша не защищает организм от инфекции, вызванной этим микроорганизмом [162, 163, 219].

Подтверждающим это заявление является исследование [219], проведенное на модели мышей, в котором установлено, что иммунизация цельноклеточной (wP) и бесклеточной (aP) коклюшными вакцинами не обеспечивала защиты от *B.holmesii*.

Клиническая картина коклюшеподобного заболевания похожа на течение коклюша, но в тоже время имеет ряд своих черт [81, 117, 118, 150, 158]. В течении заболевания, как и при коклюше, выделяют четыре периода: инкубационный, катаральный, период спазматического кашля и период разрешения. У большинства обследованных больных с коклюшеподобным заболеванием наблюдался кашель, но только примерно в 60,0 % случаев кашель носил приступообразный характер, в 40,0 % - кашель был обычным. Рвота после приступов кашля, по данным разных исследователей, встречалась в 30,0 – 50,0 % случаев; репризы наблюдались в 10,0 – 20,0 % случаев [81, 117, 118, 150, 158, 162], в то время как при коклюше они считаются одним из характерных симптомов. Некоторые авторы говорят о том, что при коклюшеподобном заболевании не отмечали задержек дыхания, даже у детей до 1 года [81, 118]. Лимфоцитоза с лейкоцитозом, являющимися отличительными чертами коклюша, ни у одного больного с коклюшеподобным заболеванием зафиксировано не было. Длительность всего заболевания была короче, и не превышала 80 дней. Осложнений и смертельных исходов коклюшеподобного заболевания ни в одном из проведенных исследований не зарегистрировано, в то время как при коклюше смертность, особенно детей до года, до настоящего времени остается высокой [81, 117, 118, 150, 151, 153, 158]. В целом все авторы указывают на то, что хоть и заболевание носит коклюшеподобный характер, но протекает легче, не вызывает сильного утомления больного, явлений дыхательной недостаточности и осложнений со стороны дыхательной, сосудистой и центральной нервной систем. Возможной причиной более легкого течения коклюшеподобного заболевания является отсутствие коклюшного токсина у *B.holmesii*, ведь именно от этого фактора патогенности зависит степень тяжести коклюша и, как следствие, развитие дыхательных и дисциркуляторных

расстройств, угнетение сосудистых центров, нарушение крово- и лимфообращения [162, 163].

В некоторых исследованиях было доложено о случаях ко-инфекции *B.holmesii* и *B.pertussis*, вероятность которой может варьировать в пределах от 0,1 %, по данным исследований, проведенных в Бельгии [145], до 36,5 % - в Марокко [118]. Клиническая картина ко-инфекции не отличалась от течения коклюша. У большинства пациентов наблюдался приступообразный кашель, оканчивающийся рвотой, и репризы, у детей до 1 года в 34,3 % случаев был зафиксирован цианоз лица и в 6,2 % случаев – апноэ. Следовательно, при заболевании, вызванном *B.holmesii*, классические симптомы коклюша наблюдались только в 50,0 % случаев, и не развивались явления дыхательной недостаточности, в то время как ко-инфекция *B.holmesii* и *B.pertussis* протекала тяжелее, что может свидетельствовать о высоком патогенном потенциале *B.pertussis* в связи с наличием у этого микроорганизма коклюшного токсина [81, 118].

1.3. Состояние генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний

До 1980-х годов прошлого века бактериологический и серологический методы исследования были единственными методами лабораторной диагностики коклюша. Бактериологическое исследование является «золотым стандартом» диагностики до настоящего времени. Однако его применение ограничивается первыми 2 - 3 неделями от начала заболевания, когда имеется спазматический кашель [98], и, кроме того, имеет низкую чувствительность и длительную продолжительность проведения [102, 106, 128, 143]. Серологическая диагностика коклюша с определением уровня специфических противокклюшных антител применяется начиная с 3-й недели заболевания [11, 37]. До появления метода иммуноферментного анализа серологическая диагностика осуществлялась с помощью РА, РНГА, РПГА [1, 28, 35]. Поэтому

ранняя и точная диагностика коклюша имеет решающее значение для своевременного и эффективного лечения, особенно для детей раннего возраста.

С конца 1980-х годов интенсивно разрабатываются молекулярно-генетические методики для диагностики коклюша - полимеразная цепная реакция (ПЦР), nested-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени [45, 86, 92, 122, 128, 135, 140, 154, 167, 170, 178, 188, 190, 198]. Разработанные диагностические ПЦР-РВ тест-системы за счет одновременной амплификации нескольких ДНК-матриц, позволяют выявлять и дифференцировать разных представителей рода *Bordetella* [18, 36, 42, 66, 103, 116, 124, 125, 145, 182, 188, 190]. Так, в качестве мишеней было предложено использовать - фрагменты промоторной области коклюшного токсина [105, 111, 144, 146, 173, 177], гена порина [105, 132, 133], гена аденилатциклазы [82] и инсерционных элементов [46, 99, 103, 142, 169, 170, 172, 175, 178, 187, 188, 190, 195, 196, 197]. Чувствительность ПЦР для идентификации ДНК бордетелл, по данным разных авторов, варьирует в пределах 73,0 % - 100 % [85, 126, 137]. Анализ эффективности ПЦР-диагностики, по данным литературных источников, показал, что использование различных мишеней имеет как ряд достоинств, так и недостатков. Применение в качестве мишени промоторной области гена коклюшного токсина позволяет с высокой специфичностью идентифицировать *B.pertussis*, но в тоже время обладает сниженной чувствительностью [105, 173]. Нуклеотидные последовательности *prn*, *VP283*, *VP485* и *ptxS1* также были предложены в качестве мишеней в ПЦР, однако в некоторых случаях была установлена перекрестная реактивность при идентификации разных *Bordetella spp.* [166, 200, 205]. Использование нуклеотидной последовательности гена порина, в качестве мишени в ПЦР, было описано как специфическое для *B.pertussis*, но для подтверждения этого авторы признают необходимость более широких исследований [105]. Инсерционная последовательность *IS481* – основная в ПЦР-диагностике коклюша, так как имеет широко признанную высокую чувствительность [46, 99, 170, 175, 188, 190]. Эта последовательность присутствует в геноме *B.pertussis* в высоком числе копий (50 – 249 копий) [210, 211]. Однако, может встречаться и у других

представителей рода *Bordetella*, в том числе у *B.holmesii* в количестве 8 - 10 копий [141, 161, 170, 190], в единичном числе копий у *B. bronchiseptica* в образцах от животных и реже у *B.bronchiseptica* в образцах от человека [169, 191, 210]. Также было установлено, что IS1001 присутствует не только в *B.parapertussis*, но и была идентифицирована в некоторых штаммах *B.bronchiseptica* [188, 197]. Для *B.holmesii* характерным является hIS1001, который гомологичен IS1001, но с некоторыми различиями в последовательности [44, 164, 170, 188, 190]. IS1002 присутствует в *B.pertussis*, *B.parapertussis*, и в некоторых штаммах *B.bronchiseptica* [144, 145, 210, 211]. Последовательность *recA* является характерной для *B.holmesii*, вместе с тем, она присутствует и в других *Bordetella spp.*, но с определенным полиморфизмом, а также обнаружена в некоторых штаммах *Burkholderia spp.* [103, 116, 145]. На основании этого, исследователи свидетельствуют, что нуклеотидные последовательности IS481, IS1001, hIS1001, IS1002, *ptxA* (*ptxS1*) и *recA* могут быть использованы для дифференциации *Bordetella spp.* при диагностике респираторных заболеваний [91, 92, 99, 103, 116, 125, 135, 144, 145, 164, 170, 174, 175, 188, 190, 193, 197, 217].

Так, U. Reischl с соавторами [170] применили моноплексную ПЦР-РВ с праймерами на IS481 ДНК *B.pertussis* и ДНК *B.holmesii* и показали, что такой вариант методики имеет существенные ограничения, так как дает ложноположительные результаты для образцов, содержащих ДНК этих двух микроорганизмов.

К. Templeton с соавторами [190] в течение 2001 г. провели исследование 57 проб биологического материала от больных с подозрением на коклюш с помощью ПЦР-РВ, где мишенями были IS481 и IS1001. Чувствительность используемой методики на контрольных образцах составила от 1 до 10 КОЕ / мл для *B.pertussis*, 10 КОЕ / мл для *B.parapertussis* и 10 КОЕ / мл для *B.holmesii*. Из 57 изученных образцов, в 39,0 % образцах идентифицирована ДНК *B.pertussis*, в то время как ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* в изученных образцах не обнаружены. Однако в этом варианте ПЦР-РВ IS481 идентифицируется

в *B.pertussis* и *B.holmesii*, а IS1001 - в *B.parapertussis* и *B.holmesii*. В связи с этим, корректно дифференцировать эти виды бордетелл с помощью предложенной методики ПЦР-РВ представляет определенные трудности.

J. Guthrie с соавторами [103] разработали методику дуплексной ПЦР-РВ для выявления ДНК *B.pertussis* и ДНК *B.holmesii* на основе идентификации IS481 и VNrecA. Специфичность разработанной методики оценивали путем проведения симплексных ПЦР-РВ с отдельными праймерами. Валидация дуплексной ПЦР-РВ IS481 / VNrecA показала 100 % соответствие с симплексными вариантами. Кроме того, в работе использовали другой дуплексный вариант ПЦР-РВ IS481 / IS1001 с возможностью выявления и ДНК *B.parapertussis*. В период 2007 – 2008 гг. было проанализировано 10254 проб биологического материала от больных. Из них 17,3 % были *Bordetella* – положительными; 16,7 % образцов содержали ДНК *B.pertussis*, 0,4 % - ДНК *B.parapertussis*, 0,1 % - вместе ДНК *B.pertussis* и ДНК *B.parapertussis*, 0,1 % - ДНК *B.holmesii*. Для подтверждения специфичности мишени recA и исключения ко-инфекции все положительные по VNrecA образцы одновременно тестировались с праймерами на целевой фрагмент VP3385, являющийся специфичным для *B.pertussis*. В результате чего не было обнаружено VNrecA-положительных среди VP3385-положительных проб. В целом, проведенное исследование подтвердило факт циркуляции *B.holmesii* на территории Канады и связь с коклюшеподобными симптомами у пациентов.

K. Tatti и соавт. [188] свое исследование посвятили разработке триплексной ПЦР-РВ для обнаружения ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* по наличию следующих фрагментов IS481, pIS1001 и hIS100, и комбинации ее с моноплексной ПЦР-РВ на выявление фрагмента *ptxS1* гена. Они исследовали 141 штамм *B.pertussis*, 93 штамма *B.parapertussis*, 78 штаммов *B.holmesii*, 73 штамма *B.bronchiseptica* (выделенные от человека), 13 - *B.bronchiseptica* (выделенные от животных) и по одному штамму *B.avium*, *B.hinzii*, *B.petrii* и *B.trematum*. В результате изучения было показано, что 141 штамм *B.pertussis* был положительным по наличию специфических фрагментов

IS481 и *ptxS1*, 93 штамма *B.parapertussis* были положительными по наличию специфических фрагментов *ptxS1* и *pIS1001*, 78 штаммов *B.holmesii* положительные по наличию специфических фрагментов IS481 и *hIS1001*, 72 штамма *B.bronchiseptica*, выделенные от человека, были отрицательными по IS481 (но 1 штамм был положительным по IS481 и *ptxS1*, и отрицательным по *pIS1001*). Среди 13 штаммов *B.bronchiseptica*, выделенных от животных, 6 были отрицательным по IS481, а 7 – положительными, в то же время 12 из них были положительными по *ptxS1*. Штаммы *B.avium*, *B.hinzii*, *B.petrii* и *B.trematum* были отрицательными для всех специфических фрагментов.

В работе Н. Pittet с соавторами [164] был проведен скрининг 196 клинических образцов, собранных в период 2009 - 2012 гг., с помощью постановки триплексной ПЦР-РВ с идентификацией IS481, IS1001 и *hIS1001*, и последующей подтверждающей наличие ДНК *B.pertussis* в моноплексной ПЦР-РВ с идентификацией *ptxA*. Чувствительность обнаружения ДНК *B.pertussis* и ДНК *B.holmesii* на контрольных образцах составила 7 – 8 м.к. / образец. В результате исследования в 188 (97,0 %) образцах идентифицирована ДНК *B.pertussis*, в 5 (3,0 %) образцах - ДНК *B.parapertussis*, *B.holmesii* идентифицировано не было. Учитывая локальные вспышки коклюшеподобного заболевания, вызванного *B.holmesii*, на территории Швейцарии и близость территории Франции, где регистрируется широкая циркуляция этого возбудителя [158], авторы объясняют отсутствие положительных на *B.holmesii* образцов ограниченным количеством изученных проб и свидетельствуют о необходимости расширенного мониторинга на территории страны.

L. Rodgers и соавт. [174] провели анализ образцов от пациентов с коклюшем и коклюшеподобными заболеваниями, выявленными в 2010-2011 гг. в период самой крупной эпидемии в Штате Огайо (США). Изучение проводили с помощью триплексной ПЦР-РВ с праймерами на целевые фрагменты IS481, IS1001 и *hIS1001* для выявления ДНК четырех бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica* и *B.holmesii*, и последующей моноплексной ПЦР-РВ с праймерами на *ptxS1* для выявления ДНК *B.pertussis*, ДНК

B.parapertussis и ДНК *B.bronchiseptica*. Из 298 исследованных образцов в 48 (29,0 %) была обнаружена ДНК *B.holmesii*, в 112 (68,0 %) – ДНК *B.pertussis* и в 4-х (2,0 %) – ДНК обоих микроорганизмов - *B.holmesii* и *B.pertussis*. Положительными образцы считали в случае обнаружения специфического фрагмента: IS1001 для *B.holmesii*, *ptxA* для *B.pertussis*. Среди больных с коклюшеподобным заболеванием, 63,0 % детей были старше 11 лет, в то время как при коклюше 35,0 % детей были старшего возраста. У 88,0 % детей с коклюшеподобным заболеванием наблюдался приступообразный кашель длительностью более 14 дней, у 44,0 % детей - приступы кашля оканчивались рвотой, у 23,0 % детей - наблюдались репризы. По мнению авторов, ключевым моментом в настоящее время является усовершенствование генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний с целью более точной оценки распространенности *B.holmesii* среди населения и анализ ее роли в эпидемическом процессе.

В результате исследования, проведенного в Японии К. Kamachi и соавт. [116], была разработана квадриплексная ПЦР-РВ для выявления ДНК трех бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.holmesii* и ДНК *M.pneumoniae*. В качестве мишеней были подобраны специфические фрагменты - IS481 (для диагностики *B.pertussis* и *B.holmesii*), *recA* (*B.holmesii*), IS1001 (*B.parapertussis*) и *atpD* (*M.pneumoniae*). Из 355 проб биологического материала от больных коклюшем в 2013 – 2014 гг., в 94 (26,0 %) образцах была обнаружена ДНК *B.pertussis*, в 4-х (1,1 %) – ДНК *B.parapertussis* и в 2-х (0,6 %) – ДНК *M.pneumoniae*. Выявление ДНК *B.pertussis* варьировало от 16,0 % до 49,0 % случаев в зависимости от возраста обследуемых с наибольшим показателем (49,0 %) у детей в возрасте до 3 мес. и подростков (29,0 %). Ко-инфекции не обнаружено. ДНК *B.holmesii* ни в одном из образцов выявлено не было, что, по мнению авторов, вероятно было связано с меньшей чувствительностью ПЦР-РВ по специфическому фрагменту *recA*, нежели, чем по IS481. Вместе с тем, разработанная методика в целом обладала высокой аналитической чувствительностью по выявлению ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и

ДНК *M.pneumoniae* (порог чувствительности геномной ДНК 10 – 100 fg), но имела относительно низкую чувствительность по *recA* *B.holmesii* (порог чувствительности 1 pg ДНК, соответствующий значению C_T 35,6). Поэтому авторы не исключили возможность того, что у некоторых пациентов могла быть низкая нагрузка ДНК *B.holmesii* (значение $C_T > 35,6$) в клинических образцах.

В исследовании, проведенном Н. Martini и соавт. в Бельгии с 2013 по 2015 гг. [145], проанализировано 11919 образцов с помощью квадриплексной ПЦР-РВ. Для выявления ДНК *B.pertussis* были использованы специфические фрагменты IS481 и IS1002, для обнаружения ДНК *B.parapertussis* – IS1001 и IS1002, для ДНК *B.holmesii* - IS481 и *recA*. В результате исследования показано, что из 11919 образцов, 1189 (10,0 %) содержали ДНК *B.pertussis*, из них 872 (73,3 %) были положительными для фрагментов IS481 и IS1002, 317 образцов были положительными только для фрагмента IS481. В 151 образце (1,3 %) идентифицирована ДНК *B.parapertussis*, причем из них 112 образцов были положительными для обоих фрагментов (IS1001 и IS1002), 39 образцов – только для фрагмента IS1001. Только 15 (0,1 %) образцов содержали ДНК *B.holmesii*. По мнению авторов, причиной не всегда положительных сигналов для обоих специфических фрагментов для каждого возбудителя является то, что чувствительность методики ПЦР для *recA* / IS1002 в десятки раз ниже, чем чувствительность методики ПЦР для IS481 / IS1001. Это объясняется тем, что у данных микроорганизмов содержится малое количество копий генов *recA* и IS1002 в геномах. Чувствительность используемой методики варьировала в пределах от 145 до 242 КОЕ / мл для *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*. Интересным разделом этого исследования было установление высокой степени соответствия между значением C_t образца в ПЦР и вероятностью его восстановления в бактериальной культуре. Так, установлено, что *B.pertussis* можно было культивировать с высокой степенью вероятности при значениях $25 \leq C_t$. Для значений C_t от 25 до 30 этот показатель снижался до менее 50,0 %. На основании этого авторы рекомендуют культивировать образцы в случаях заинтересованности лабораторий в получении как можно большего количества

штаммов для исследований в области эпидемиологии, молекулярной биологии и изучения вирулентности. В случаях, когда $Ct \geq 30$, культивирование не рекомендуется, так как вероятность выделения культуры становится незначительной (менее 6,0 %).

М. Lotfi с соавторами [144] было изучено 435 проб биологического материала от больных коклюшем в Иране. Использование квадриплексной ПЦР-РВ с праймерами на целевые фрагменты IS481, IS1001, IS1002, *ptxP* и *hIS1001* позволило им первыми в этой стране обнаружить в 2-х образцах ДНК *B.holmesii*.

W. Fong и соавт. [91] провели изучение 802 проб биологического материала, полученных от больных с подозрением на коклюш в период 2008 – 2016 гг. в Австралии. В работе использовали ПЦР-РВ на последовательности IS481, *hIS1001* и *ptxA*. Согласно проведенному исследованию среди больных с коклюшеподобным заболеванием превалировала возрастная группа от 11 – 18 лет, а при коклюше преимущественно болели дети от 0 – 6 лет. Из изученных образцов, в 46 (6,5 - 16,8 % в зависимости от общего количества случаев) была обнаружена ДНК *B.holmesii*. В своей работе исследователи предположили, что во время эпидемии коклюша, которая продолжалась в течение 7 лет в Австралии, наряду с коклюшем, вызванным *B.pertussis*, циркулировала инфекция, вызванная *B.holmesii*, но изначально она была диагностирована как коклюш в связи с малой осведомленностью врачей и недостатками генодиагностики.

A. Valero-Rello и соавт. [193] проанализировали 566 образцов от больных, обследованных с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания в период 2016 – 2017 гг. в Барселоне (Испания). Анализ проведен с использованием триплексной ПЦР-РВ с идентификацией ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.holmesii* и ДНК *B.parapertussis*. В качестве мишеней для триплексной ПЦР-РВ были использованы последовательности IS481 (для *B.pertussis* и *B.holmesii*) и IS1001 (специфичный для *B.parapertussis*) и человеческая *rnaseP*. Далее при обнаружении фрагмента IS481 дополнительно ставили две моноплексные ПЦР-РВ, в которых в качестве мишеней использовали специфические фрагменты *ptxA* – для *B.pertussis* и *hIS1001* – для *B.holmesii*. Порог чувствительности выявления

составил 4,4 / 60,3, 13,9, 27,3 и 777,9 ГЭ / мл образца для IS481 (на *B. pertussis* / *B. holmesii*), pI1001, hIS1001, ptxA соответственно. Эффективность используемой методики ПЦР-РВ варьировала в пределах 86,0 – 96,9 %. В результате проведенного исследования 11,1 % образцов были идентифицированы как содержащие ДНК *B. pertussis*, 0,9 % - ДНК *B. holmesii* и 0,2 % - ДНК *B. parapertussis*. В исследовании также показано, что 62,2 % положительных образцов, содержащих ДНК *B. holmesii* и ДНК *B. parapertussis*, было зарегистрировано в период с мая по июль, что подтверждает сезонность коклюшеподобных заболеваний. Возрастной состав также отличался: коклюшеподобное заболевание, вызванное *B. holmesii*, регистрировалось у детей старше 4-х лет, коклюш – у детей всех возрастных групп.

В ряде исследований проведена оценка эффективности работы различных лабораторий по диагностике коклюша и коклюшеподобных заболеваний в Европе и США и показана положительная динамика ее совершенствования [55, 57, 74, 107, 154, 189]. Так, восемь лабораторий во Франции в 2006 - 2007 гг. [57] использовали ПЦР-РВ с праймерами на IS481, что дало возможность достигнуть чувствительность и специфичность на уровне 92,2 % - 94,3 %. В результате оценки диагностики коклюша, проведенной в 2010 году в 27 европейских странах, 74,0 % стран сообщили об использовании серологического метода, 67,0 % - ПЦР и 63,0 % - бактериологического метода [107]. В то время как ранее сообщалось, что только 7,0 % проводили серологическую диагностику, 54,0 % - ПЦР и 71,0 % - отдали предпочтение бактериологическому методу [189]. Наряду с этим, 41 лаборатория приняла участие во внешнем контроле качества ПЦР-диагностики и сообщили об идентификации ДНК *B. pertussis* в исследуемых образцах в 92,0 % случаев [189].

В 2011 г. в Европе было проведено исследование по оценке эффективности метода ПЦР с участием 24 национальных референс-лабораторий из 19 стран. Все лаборатории обнаружили ДНК *B. pertussis* в предоставленных образцах экстрагированной ДНК. В тоже время в 14 из 24 лабораторий (58,0 %) ошибочно идентифицирована ДНК *B. holmesii* как ДНК *B. pertussis*, потому что в качестве

мишени была использована последовательность *IS481*, что не позволяет отличить *B.holmesii* от *B.pertussis* [74].

Мониторинг лабораторий, проведенный в США в 2012 г., показал увеличение возможностей лабораторий в диагностике коклюша и коклюшеподобных заболеваний, по сравнению с ранее проведенным анализом [189]. Так, 96,0 % и 94,0 % лабораторий использовали специфический фрагмент *IS481* в качестве мишени при проведении ПЦР-РВ в одно- или мультиплексных анализах. Из них 72,0 % и 79,0 % лабораторий смогли дифференцировать *B.pertussis* и *B.holmesii*, 68,0 % и 72,0 % идентифицировали *B.parapertussis*. Из тех лабораторий, которые дифференцировали *B.pertussis* и *B.holmesii*, чувствительность составила 96,0 % и специфичность – 95,0 %.

В 2000 году впервые японскими учеными была предложена технология изотермической амплификации (LAMP) [159], обладающая высокой чувствительностью, специфичностью, амплификационной эффективностью, скоростью получения результатов (1 – 1,5 часа), доступностью, а также не требующая дорогостоящего оборудования. Данная технология оптимизирована для большинства возбудителей инфекционных заболеваний [78]. В 2006 году технология LAMP была впервые применена для идентификации ДНК *B.pertussis* и в дальнейшем методика оптимизирована для использования с клинического образца [114, 115, 155]. В 2012 году N. Otsuka с соавторами [160] апробировали LAMP для идентификации и ДНК *B.holmesii*.

Интересной является работа группы исследователей, которые провели валидацию LAMP и ПЦР на основе идентификации специфического фрагмента *IS481* в 213 клинических образцах [53]. В исследовании *B. pertussis* и *B.holmesii* были положительно идентифицированы как методом LAMP, так и методом ПЦР, в то время как *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* были идентифицированы только с помощью ПЦР. Анализ показал, что аналитическая чувствительность LAMP и ПЦР была сопоставима и позволяла обнаруживать целевой патоген при низкой концентрации 2 КОЕ / мл и 1 КОЕ / мл соответственно, и оказалась аналогичной ранее опубликованным значениям для

других IS481 - ПЦР-анализов [69]. Диагностическая чувствительность и специфичность анализа LAMP и ПЦР были сопоставимы и составили 96,5 % (95,0 % ДИ, 82,82–96,99) и 99,5 % (95,0 % ДИ, 96,99–99,90) соответственно; PPV и NPV - 96,5 % (95,0 % ДИ, 82,82–99,39) и 99,5 (95,0 % ДИ, 96,99–99,90) соответственно [53]. Аналитическая специфичность метода LAMP была адекватной, хотя тест не смог идентифицировать ДНК *B.holmesii*, также как и в IS481 - ПЦР был получен ложноположительный результат для ДНК *B.bronchiseptica*. Методика LAMP продемонстрировала высокую сходимость и воспроизводимость во всем диапазоне ожидаемых концентраций, в соответствии с критериями действующего руководства, что свидетельствует о надежности и согласованности анализа [53].

Существенным преимуществом LAMP для обнаружения *B.pertussis* в клинических образцах является получение результатов в максимально короткие сроки и, следовательно, сокращение времени обнаружения в 2,5 раза по сравнению с 2-х-часовым временем, которое обычно требуется для получения результатов в ПЦР. Кроме того, значимым преимуществом этой технологии является отсутствие необходимости наличия оборудования для проведения ПЦР. Все это свидетельствует о значительном потенциале для ранней быстрой диагностики *B.pertussis* и возможности интеграции его в диагностическую систему в месте оказания медицинской помощи и, особенно, для лабораторий, не оснащенных ПЦР-оборудованием. Однако, недостатком этого метода является то, что данная технология может идентифицировать только одного возбудителя в одном тесте, в то время как при поступлении больного с подозрением на коклюш или коклюшеподобные заболевания необходимо иметь диагностические тесты, способные идентифицировать максимально возможное количество возбудителей этих заболеваний одновременно.

В России исследователями также на протяжении последних 15 лет ведутся активные разработки диагностических молекулярно-генетических методик для идентификации возбудителей коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами [5, 6, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 31, 36, 42].

Коллективом авторов ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ была разработана ПЦР-РВ тест-система, которая позволяет выявлять IS481 и IS1002 в опероне вирулентности *bvgAS* в клинических образцах *B.pertussis* [14, 15, 20, 21]. Применение данной методики дает возможность диагностировать типичные и атипичные формы коклюша, а также бактерионосительство [25].

Коллективом сотрудников ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского также была предложена методика для ускоренной генодиагностики коклюшной инфекции, основанная на изотермической амплификации, которая позволяет выявлять ДНК *B.pertussis* [5, 6, 27].

В РФ зарегистрирован и применяется единственный набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в биологическом материале методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно - флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Данная тест-система обладает высокой степенью чувствительности и специфичности [12, 36].

Резюме. До настоящего времени коклюш остается одной из самых часто регистрируемых инфекций, особенно у детей раннего возраста. Несмотря на массовую иммунопрофилактику, заболеваемость коклюшем в последние годы продолжает расти. Это может быть связано как с недостаточной вакцинацией и генотипической изменчивостью *B.pertussis*, так и с усовершенствованием генодиагностики и с циркуляцией других бордетелл. Изучение инфекции, вызванной *B.holmesii*, стало возможным только после появления новых ПЦР тест-систем, позволяющих выявлять случаи коклюшеподобного заболевания, вызванного этим возбудителем, которые стали регистрироваться повсеместно. Однако, до настоящего времени отсутствует подробное и четкое описание клинической картины этой инфекции. Изучение биологических свойств *B.holmesii* началось только несколько лет назад и продолжается в настоящее время.

За рубежом разработано большое количество методик ПЦР-диагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний, основанных на различных

комбинациях идентифицируемых нуклеотидных последовательностей, позволяющих выявлять ДНК не только *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*, но и относительно новой *B.holmesii*. Установлены возможности и ограничения использования различных мишеней в ПЦР. Вместе с тем, к настоящему времени отсутствует единая унифицированная методика генодиагностики разных видов бордетелл при проведении обследований на коклюш. До настоящего времени в РФ не было работ, посвященных заболеванию, возбудителем которого явилась *B.holmesii*. В России все перечисленные методики генодиагностики выявляют в большинстве случаев ДНК *B.pertussis*, и с помощью зарегистрированной тест-системы еще *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*. В связи с этим, с целью расширения возможностей расшифровки этиологии заболевания в нашей стране и, учитывая повсеместное в мире распространение *B.holmesii*, представляется целесообразным разработать молекулярно-генетическую методику коклюша и коклюшеподобных заболеваний с выявлением и дифференциацией ДНК трех бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*, а также оценка распространенности и значимости этого микроорганизма в эпидемическом процессе коклюшной инфекции в РФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Анализ эффективности применения ПЦР-диагностики у больных с подозрением на коклюш

2.1. Оценка применения ПЦР-диагностики на территории Российской Федерации

Нами проведен анализ материалов, присланных из клиничко-диагностических лабораторий ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ 85 субъектов РФ, осуществляющих ПЦР-исследования по выявлению возбудителя коклюша (в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора).

В ходе выполненного анализа установлено, что на территории России в 2013 - 2017 гг. внедрение метода ПЦР для видовой идентификации возбудителя коклюша в практическую работу клиничко-диагностических лабораторий медицинских организаций (МО) различной ведомственной принадлежности осуществлялось постепенно. В 2013 г. ПЦР-диагностика коклюша проводилась только в 33 (38,8 %) субъектах РФ. К 2017 г. их число увеличилось до 64 (75,3 %). На территориях 21 (24,7 %) субъекта РФ данный вид исследования не применялся (Таблица 9).

Таблица 9 - Субъекты РФ, на территориях которых с 2013 по 2017 гг. для видовой идентификации возбудителя коклюша применялся метод ПЦР

ФО	Всего субъектов		Период внедрения ПЦР-исследований на коклюш				
	абс.	%	в 2013 г.	в 2014 г.	в 2015 г.	в 2016 г.	в 2017 г.
ЦФО	14	77,8	11	1	1	–	1
СЗФО	10	90,9	8	–	1	–	1
ЮФО	5	62,5	2	–	2	–	1
СКФО	3	42,9	1	1	–	1	–
ПФО	12	85,7	4	2	3	3	–
УФО	5	83,3	1	3	–	1	–

Продолжение таблицы 9

ФО	Всего субъектов		Период внедрения ПЦР-исследований на коклюш				
	абс.	%	в 2013 г.	в 2014 г.	в 2015 г.	в 2016 г.	в 2017 г.
СФО	9	75,0	3	2	1	1	2
ДФО	6	66,7	3	2	–	1	–
РФ	64	75,3	33	11	8	7	5

Всего за пятилетний период проведено 62740 ПЦР-исследований на коклюш и обследовано 50860 лиц. За период с 2013 г. по 2017 г. на территории РФ отмечалось увеличение числа проведенных анализов в 1,8 раза (Рисунок 5). При этом отмечается в 2 раза увеличение количества проведенных исследований в лабораториях ЛПО и в 1,3 раза – в ФБУЗ ЦГиЭ Роспотребнадзора. Следовательно, в России прослеживается общая тенденция к росту количества исследований по выявлению возбудителя коклюша методом ПЦР.

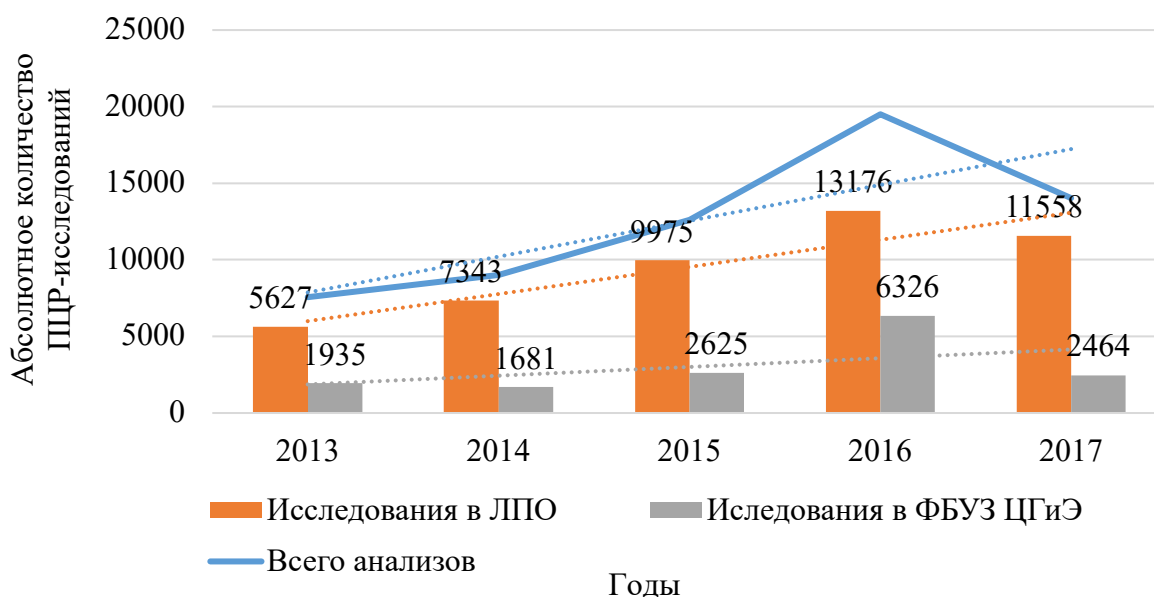


Рисунок 5 - Динамика количества ПЦР-исследований, проведенных на территории РФ за 2013 – 2017 гг.

Вместе с тем ПЦР-исследования на коклюш неравномерно проводились по территориям федеральных округов (ФО). Так, большинство (35,4 %) исследований проведено в Центральном, 17,7 % - в Приволжском, 14,5 % - в Южном, 9,6 % - в Северо-Западном и 7,8 % – в Уральском, 5,8 % - в Северо-

Кавказском, 5,4 % - в Сибирском и 3,8 % - в Дальневосточном федеральных округах (Рисунок 6).

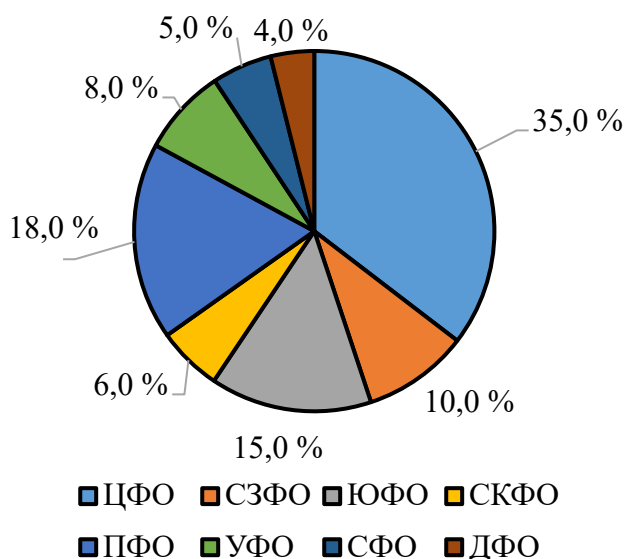


Рисунок 6 - Распределение ПЦР-исследований на коклюш по федеральным округам

Анализ динамики проведения ПЦР-диагностики по федеральным округам показал, что практически во всех федеральных округах отмечается рост числа проведенных ПЦР-исследований (Рисунок 7). Исключение составляет Уральский ФО, на территории которого в 2017 г. было зарегистрировано снижение числа исследований методом ПЦР в 1,4 раза. При этом в Сибирском и Дальневосточном ФО объем осуществляемых исследований в период с 2013 г. по 2017 г. вырос в 12,7 и в 27 раз соответственно (Рисунок 8).

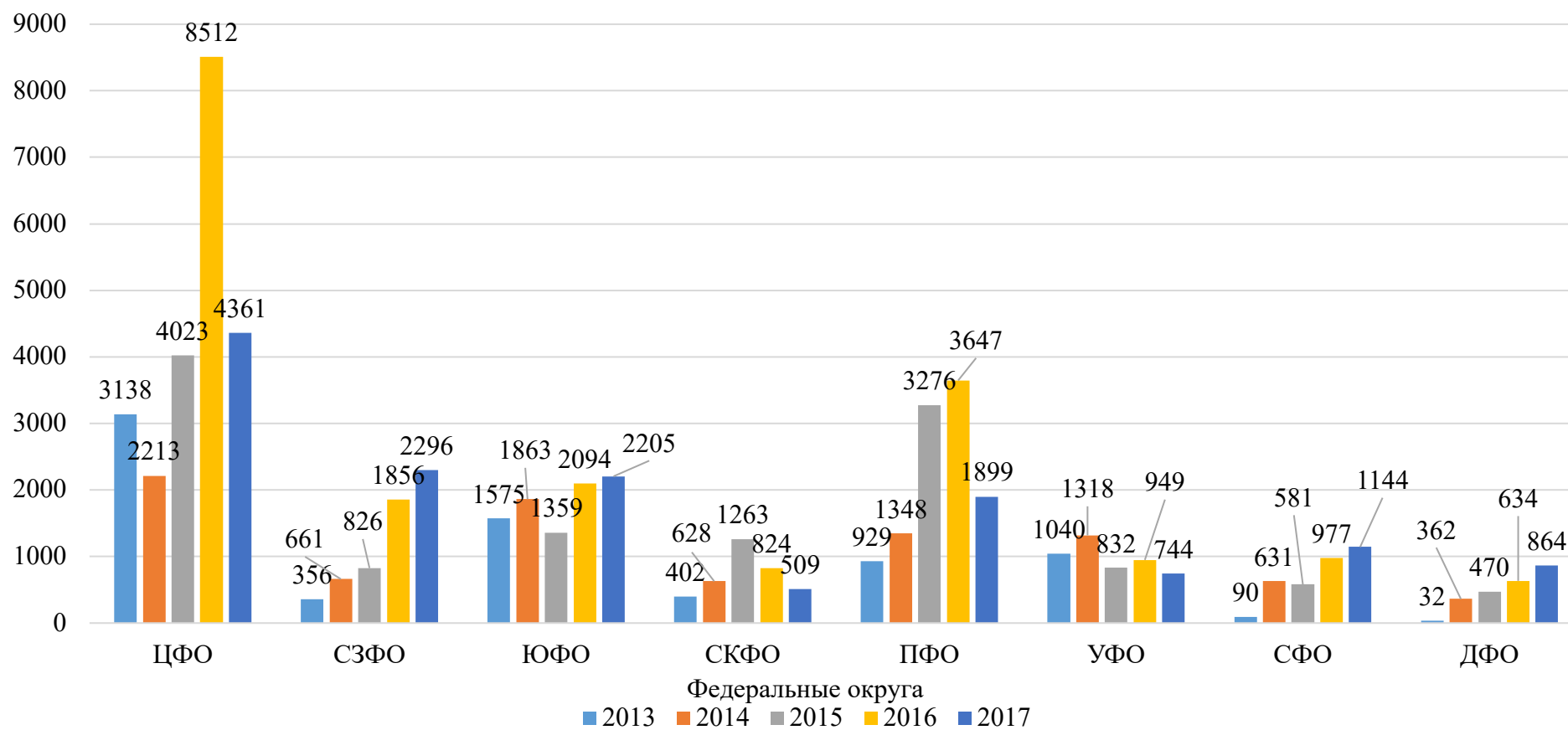


Рисунок 7 - Количество проведенных ПЦР-исследований на коклюш по федеральным округам за 2013 - 2017 гг.

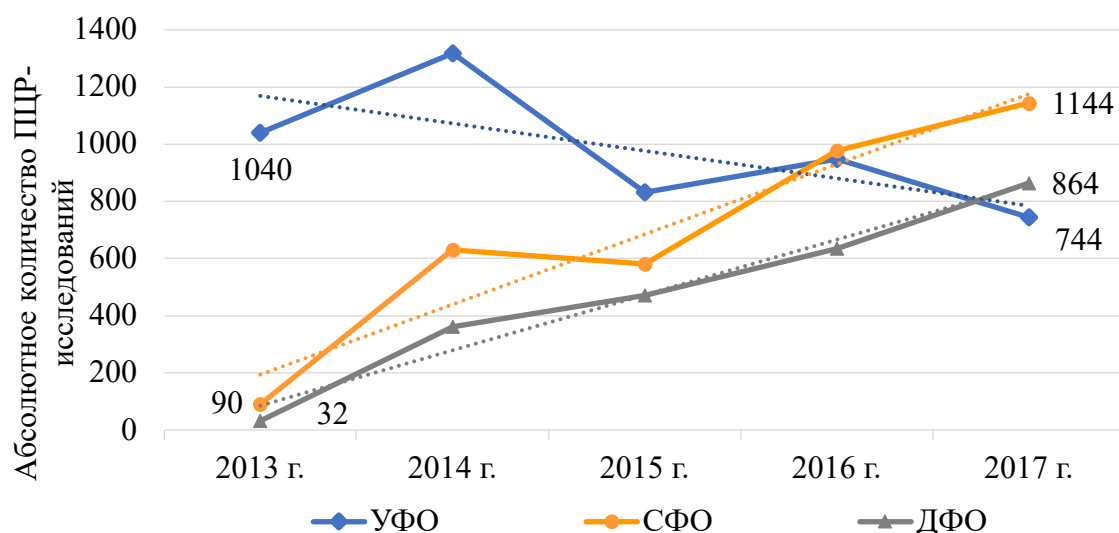


Рисунок 8 - Количество исследований по выявлению возбудителя коклюша методом ПЦР, выполненных в Уральском, Сибирском и Дальневосточном ФО в 2013 - 2017 гг.

Вместе с тем, отмечается неравномерность по количеству проведенных исследований внутри ФО. Так, ПЦР-исследования проводились на 77,8 % территориях в ЦФО, на 90,9 % территориях - в СЗФО, на 71,4 % территорий - в ЮФО, на 42,9 % территорий - в СКФО, на 85,7 % территориях - в ПФО, на 83,3 % территорий - в УФО, на 75,0 % территорий - в СФО и на 66,7 % территорий в ДВФО. Однако на 21 (24,7 %) территории страны ПЦР-исследования на коклюш не проводились.

Анализ материалов показал, что на 30 (41,7 %) территориях ПЦР-исследования проводились только в ЛПО, на 20 (27,8 %) территориях – в учреждениях Роспотребнадзора и на 22 (30,5 %) – в учреждениях двух ведомств (Таблица 10).

Таблица 10 - Количество проведенных ПЦР-исследований на коклюш в ЛПО и в учреждениях Роспотребнадзора

ФО	ПЦР-исследования на коклюш					
	на базе ЛПО		на базе ФБУЗ ЦГиЭ		на базе ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ЦФО	6	27,3	12	54,5	4	18,2
СЗФО	2	20	2	20	6	60
ЮФО	2	40	1	20	2	40
СКФО	1	33,3	2	66,7	—	—

Продолжение таблицы 10

ФО	ПЦР-исследования на коклюш					
	на базе ЛПО		на базе ФБУЗ ЦГиЭ		на базе ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ПФО	7	58,3	—	—	5	41,7
УФО	3	60	—	—	2	40
СФО	7	77,8	1	11,1	1	11,1
ДВФО	2	33,3	2	33,3	2	33,3
ВСЕГО	30	41,7	20	27,8	22	30,5

Согласно санитарно-эпидемиологическим правилам «Профилактика коклюша» СП 3.1.2.3162-14 [37] исследования при коклюше проводятся с диагностической целью и по эпидемиологическим показаниям. В анализируемый период с диагностической целью проведено 59790 (95,3 %) ПЦР-исследований, из которых 47377 (79,2 %) выполнено в лабораториях ЛПО. По эпидемиологическим показаниям проведено 2950 (4,7 %) ПЦР-анализов, из них 2648 (89,8 %) - в лабораториях ЦГиЭ. Следовательно, метод ПЦР чаще всего применяется именно при обследовании лиц с подозрением на коклюш для верификации клинического диагноза.

Анализ ПЦР-исследований, проведенных по федеральным округам показал (Таблица 11, Рисунок 9), что удельный вес ПЦР-исследований, проведенных с диагностической целью, колеблется в пределах 91,4 % - 99,3 %, в то время как по эпидпоказаниям только в 4-х федеральных округах (ЦФО, СЗФО, СКФО и ПФО) удельный вес таких исследований составил 6,2 %, 4,8 %, 3,8 % и 8,6 % соответственно, в УФО и СФО - 1,2 % и 2,2 % исследований соответственно, и в ЮФО и ДВФО - 0,7 % и 0,8 % соответственно.

Таблица 11 - Количество проведенных ПЦР-исследований с диагностической целью и по эпидемиологическим показаниям по федеральным округам

ФО	Количество исследований			
	с диагностической целью		по эпидпоказаниям	
	абс.	%	абс.	%
ЦФО	20880	93,8	1367	6,2
СЗФО	5718	95,2	286	4,8
ЮФО	9034	99,3	62	0,7

Продолжение таблицы 11

ФО	Количество исследований			
	с диагностической целью		по эпидпоказаниям	
	абс.	%	абс.	%
СКФО	3490	96,2	136	3,8
ПФО	10151	91,4	948	8,6
УФО	4825	98,8	58	1,2
СФО	3348	97,8	75	2,2
ДВФО	2344	99,2	18	0,8
ВСЕГО	59790	—	2950	—

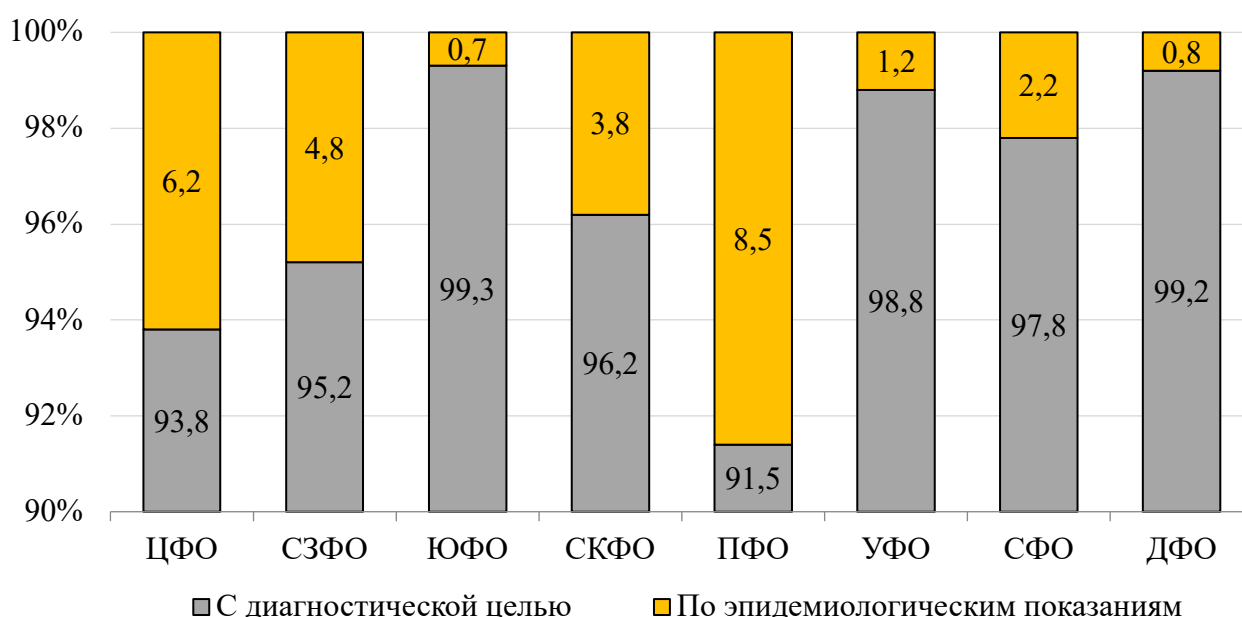


Рисунок 9 - Процентное соотношение числа ПЦР-анализов на коклюш, проведенных с диагностической целью и по эпидемиологическим показаниям в ФО в 2013 - 2017 гг.

Из них большинство (79,0 %) исследований с диагностической целью проведено в ЛПО и большинство (89,7 %) исследований по эпидпоказаниям - в учреждениях Роспотребнадзора. Наибольшее количество ПЦР-исследований по эпидпоказаниям проведено только на территории 1 субъекта РФ, входящего в состав Приволжского ФО, в котором в 2013 - 2017 гг. было проведено 948 анализов, что составило 32,1 % от общего по стране количества. Несмотря на это, в России наблюдается общая тенденция к росту числа ПЦР-исследований, осуществляемых не только с диагностической целью, но и по эпидемиологическим показаниям в лабораториях как ЛПО, так и ЦГиЭ (Рисунок 10).

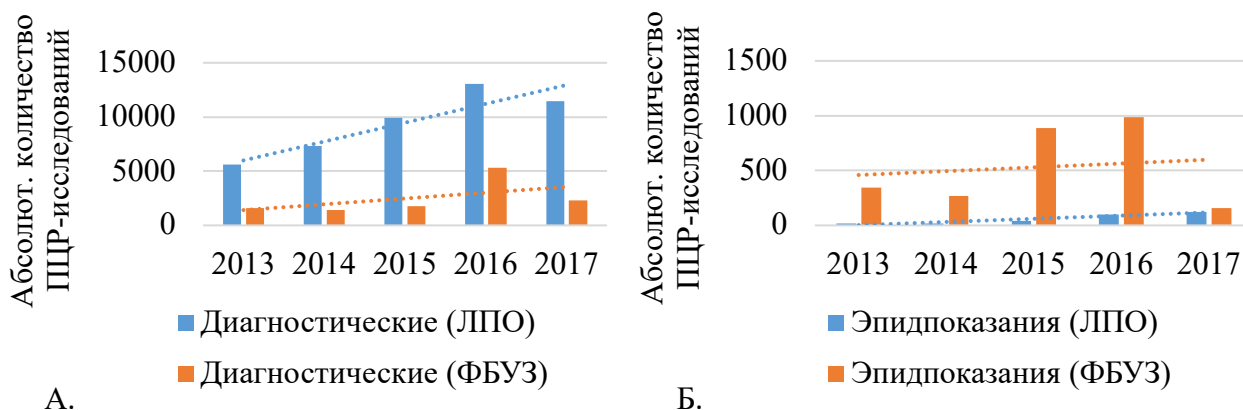


Рисунок 10 - Количество ПЦР-исследований, проведенных в ЛПО и ФБУЗ ЦГиЭ с диагностической целью (А) и по эпидемиологическим показаниям (Б) за 2013 - 2017 гг.

За пятилетний период было обнаружено 11911 (18,9 %) положительных образцов, из них в большинстве (94,4 %) случаев была выделена ДНК *B.pertussis* (Рисунок 11).

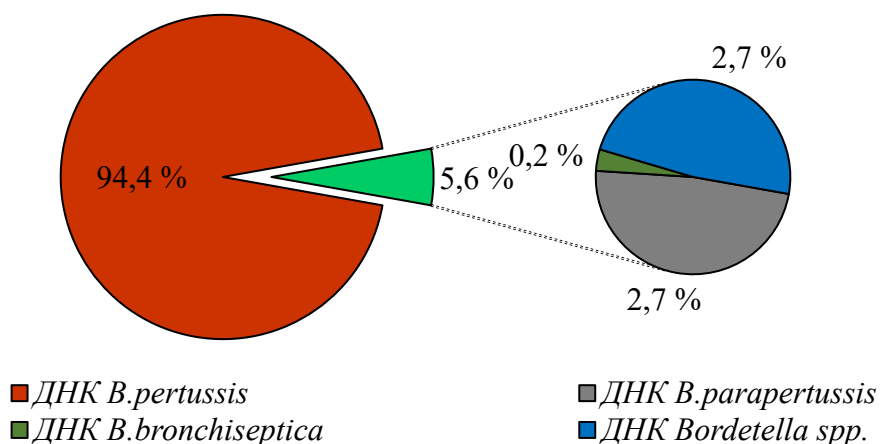


Рисунок 11- Частота выявления в клиническом материале больных ДНК возбудителей коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, на территории РФ в 2013 - 2017 гг.

За анализируемый период 11781 (98,9 %) положительных проб было обнаружено при обследовании с диагностической целью. Причем в этих образцах выделялась ДНК *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica* и *Bordetella spp.* При обследовании же контактных лиц в очагах коклюша выявлено всего 130 (1,1 %) положительных проб, в которых в 96,9 % случаев

была идентифицирована ДНК *B.pertussis* и в 3,1 % случаев – ДНК *B.parapertussis*.

Анализ динамики выделения ДНК представителей рода *Bordetella* показал (Таблица 12), 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 %.

Таблица 12 - Количество ДНК-положительных образцов, выявленных при обследовании лиц с подозрением на коклюш и контактных в очагах в 2013 - 2017 гг.

Год	Всего положительных образцов	Из них содержащие ДНК							
		<i>B.pertussis</i>		<i>B.parapertussis</i>		<i>B.bronchiseptica</i>		<i>Bordetella spp.</i>	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
2013	1 582	1 554	98,2	15	0,9	1	0,1	12	0,8
2014	2 104	2 019	96,0	37	1,7	2	0,1	46	2,2
2015	2 806	2 658	94,7	66	2,4	5	0,2	77	2,7
2016	3 372	3 148	93,3	116	3,4	9	0,3	99	3,0
2017	2 047	1 864	91,1	87	4,2	11	0,5	85	4,2

2.2. Анализ применения ПЦР-диагностики для обследования госпитализированных больных

Нами проанализировано 270 историй болезни пациентов от 0 до 17 лет, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» с января 2017 г. по декабрь 2019 г.

Клинический диагноз устанавливали в соответствии с принятыми протоколами ведения больных. Все пациенты были обследованы с диагностической целью. Обследование пациентов проведено с помощью зарегистрированной тест-системы «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва).

В соответствии с эпидемиологическим анамнезом, анамнезом заболевания, клинической картиной болезни и результатами лабораторного обследования

пациенты были разделены на две группы – испытываемая и контрольная. В контрольную группу вошли пациенты, переносящие острые респираторные вирусные инфекции. В испытываемую группу вошли 220 пациентов в возрасте от 26 дней до 17 лет, госпитализированных с диагнозом коклюш.

Возрастной состав пациентов: от 0 до 3 мес. – 48 (21,8 %) детей, от 4 до 6 мес. – 43 (19,5 %) ребенка, от 7 до 12 мес. – 52 (23,6 %) ребенка, от 1 года 1 мес. до 3-х лет – 55 (25,0 %) детей, от 4 до 6 лет – 11 (5,0 %) детей, от 7 до 17 лет – 11 (5,0 %) детей. Анализ историй болезни показал, что в большинстве (78,2 ± 3,1 %) случаев коклюш протекал в среднетяжелой форме, тяжелые формы регистрировали в 10,0 ± 6,4 % случаев, легкие – в 10,4 ± 2,0 % случаев и атипичные – в 1,4 ± 0,8 % случаев. Тяжелые формы регистрировались у детей до 1 года (Таблица 13).

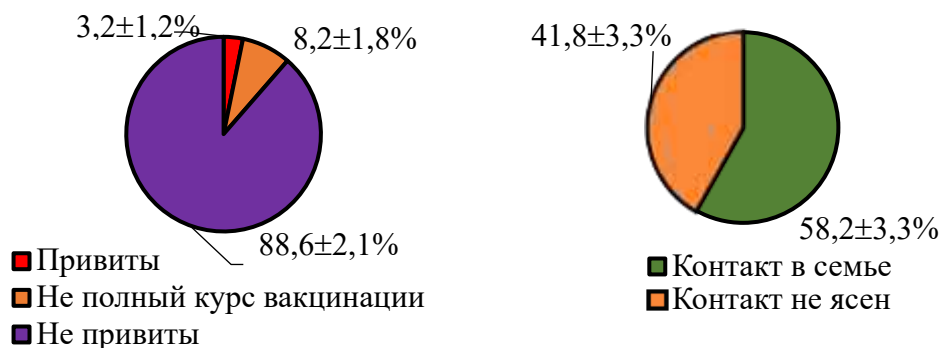
Таблица 13 – Распределение больных коклюшем по степени тяжести заболевания

Возрастная категория	Количество больных	Степень тяжести							
		Тяжелая форма		Среднетяжелая форма		Легкая форма		Атипичная форма	
		абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m
Дети в возрасте 0 – 3 мес.	48	18	37,5	26	54,2	2	4,2	2	4,2
Дети в возрасте 4 – 6 мес.	43	2	4,6	34	79,1	7	16,3	—	—
Дети в возрасте 7 – 12 мес.	52	2	3,8	46	88,5	4	7,7	—	—
Всего детей до 1 года	143	22	15,4±3,0	106	74,1±3,7	13	9,1±2,4	2	1,4±0,9

Продолжение таблицы 13

Возрастная категория	Количество больных	Степень тяжести							
		Тяжелая форма		Среднетяжелая форма		Легкая форма		Атипичная форма	
		абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m
Дети в возрасте 1 мес. – 3 года	55	—	—	48	85,4	6	10,9	1	1,8
Дети в возрасте 4 – 6 лет	11	—	—	8	72,7	3	27,3	—	—
Дети в возрасте 7 – 17 лет	11	—	—	10	90,9	1	9,1	—	—
Всего детей старше 1 года	77	—	—	66	85,7±4,3	10	13,0±3,8	1	1,3±1,3
ИТОГО	220	22	10,0±6,4	172	78,2±3,1	23	10,4±2,0	3	1,4±0,8

При изучении вакцинального статуса было выявлено, что 7 ($3,2 \pm 1,2$ %) детей были привиты от коклюша в соответствии с национальным календарем, 18 ($8,2 \pm 1,8$ %) детей - получили не полный курс вакцинации, 195 ($88,6 \pm 2,1$ %) детей - не были привиты от коклюша. Эпидемиологический анамнез был известен у 128 ($58,2 \pm 3,3$ %) детей и в 100 % случаев это был контакт в семье, у 92 ($41,8 \pm 3,3$ %) контакт не выяснен (Рисунок 12).



А.

Б.

Рисунок 12 – Вакцинальный статус (А) и эпидемиологический анамнез обследованных пациентов (Б)

У 50 ($22,7 \pm 2,8$ %) больных наблюдали осложненное течение коклюша. При этом у 48 ($96,0 \pm 2,7$ %) пациентов зарегистрированы осложнения со стороны бронхолегочной системы в связи с присоединением вторичной инфекции (бронхит, бронхиолит, пневмония), и лишь у 2-х ($4,0 \pm 2,8$ %) пациентов осложненное течение было обусловлено воздействием возбудителя коклюша (ателектаз, энцефалопатия).

При обследовании 220 детей с диагнозом коклюш у 181 ($82,3 \pm 2,6$ %) пациента клинический диагноз был подтвержден выявлением ДНК *B.pertussis* и у 39 ($17,7 \pm 2,6$ %) пациентов был установлен клинический диагноз коклюша при отрицательном результате ПЦР-диагностики.

Во вторую (контрольную) группу вошло 50 больных в возрасте от 0 до 17 лет, переносящих острую респираторную вирусную инфекцию. Возраст пациентов: от 0 до 3 мес. – 8 (16,0 %) детей, от 4 до 6 мес. – 7 (14,0 %) детей, от 7 до 12 мес. – 8 (16,0 %) детей, от 1 года 1 мес. до 3-х лет – 16 (32,0 %) детей, от 4 до 6 лет – 2 (4,0 %) ребенка, от 7 до 17 лет – 9 (18,0 %) детей. При обследовании пациентов с помощью зарегистрированной ПЦР тест-системы были получены отрицательные результаты.

Резюме: Проведенный анализ состояния ПЦР-диагностики продемонстрировал положительную динамику внедрения ПЦР-диагностики при обследовании пациентов с подозрением на коклюш. За пятилетний период количество проведенных исследований в целом по стране увеличилось в 1,8 раза и отмечается практически во всех федеральных округах. Показано, что в большинстве случаев ПЦР-исследования применяли с диагностической целью для верификации клинического диагноза, но вместе с тем, имеется положительная динамика использования этого метода и по эпидпоказаниям в очагах коклюшной инфекции. За анализируемый период в большинстве случаев была выделена ДНК *B.pertussis*. Однако, установлено, что при обследовании пациентов с диагностической целью, наравне с увеличением выделения ДНК *B.pertussis*, отмечается рост числа образцов с выделением ДНК *Bordetella spp.*,

на основании выявления последних невозможно поставить лабораторное подтверждение диагноза. Анализ историй болезни пациентов, госпитализированных в стационар, показал, что лабораторное подтверждение диагноза с помощью ПЦР-диагностики получено в 82,3 % случаев, однако в 17,7 % случаев клинический диагноз был поставлен без лабораторного подтверждения.

Следовательно, в настоящее время, с одной стороны, необходимо усилить контроль за правильностью взятия клинического материала для ПЦР-диагностики. С другой стороны, получение результатов данного анализа послужили основанием совершенствования ПЦР-диагностики в направлении расширения возможностей идентификации разных представителей рода *Bordetella*, являющихся актуальными на сегодняшний день возбудителями коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами.

Результаты проведенных исследований были использованы для подготовки аналитической справки «Состояние лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в 2013 - 2017 гг.» и проведения заседания Проблемной комиссии Ученого Совета Роспотребнадзора «Профилактика инфекций, управляемых средствами вакцинопрофилактики» (26.12.2019 г.).

ГЛАВА 3. Совершенствование генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами

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

В связи с появлением публикаций в зарубежной литературе, свидетельствующих о циркуляции среди населения штаммов *B.holmesii* [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 164, 195] ранее не идентифицируемой с помощью зарегистрированной тест-системы, нами разработана молекулярно-генетическая методика для выявления и дифференциации ДНК возбудителей 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 14).

Таблица 14– Праймеры, используемые в исследовании

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Ориентация праймера	Примечание
hIS1001F	GATCCGTGCCAATCGGTAAGTT	прямой праймер	оригинальный
hIS1001R	CAAGGGCTGGTTGGCCTGGAGC AAC	обратный праймер	оригинальный
hIS1001P	(6-FAM)- TGAGCAAGGGCTGGTTGGCCTG- (BHQ-1)	флуоресцентный зонд	[91]
IS481F	GCCGGATGAACACCCATAAGCA TG	прямой праймер	оригинальный
IS481R	GGGCGATCAATTGCTGGACCAT	обратный праймер	оригинальный
IS481P	(Cy5)- ATGAACACCCATAAGCATGCCC G-(BHQ-2)	флуоресцентный зонд	[91]; подобран флуоресцентный краситель
IS1001F	AATTGCTGCAAGCCAACCA	прямой праймер	оригинальный

Продолжение таблицы 14

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Ориентация праймера	Примечание
<i>IS1001R</i>	CCAGAGCCGTTTGAGTTCGTCAC	обратный праймер	оригинальный
<i>IS1001P</i>	(HEX)-ACATAGACCGTCAGCAG-(BHQ-1)	флуоресцентный зонд	[144]; 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	[164]; подобран флуоресцентный краситель

Конструирование специфических праймеров *hIS1001F* / *hIS1001R*, *IS481F* / *IS481R*, *IS1001F* / *IS1001R*, *ptxA-F1* / *ptxA-R1* осуществляли с помощью компьютерной программы BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референтных штаммов в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательности флуоресцентно меченных зондов *hIS1001P*, *IS481P*, *IS1001P* и *ptxA-P1* были взяты из опубликованных протоколов [91, 144, 164] и подобраны флуоресцентные красители. При конструировании праймеров и модификации зондов учитывали: степень гомологии с выбранными участками генов; отсутствие самокомплементарных участков внутри олигонуклеотидов и комплементарности друг другу с целью недопущения возникновения устойчивых вторичных структур (димеров); близость значений температуры отжига праймеров.

Три пары праймеров *hIS1001F* / *hIS1001R*, *IS481F* / *IS481R*, *IS1001F* / *IS1001R* и зонды *hIS1001P*, *IS481P*, *IS1001P* нами объединены в единую мультипраймерную смесь, при этом гибридационно-флуоресцентные зонды были мечены различными парами флуорофор-тушитель. Для *V.pertussis* использовалась пара Cy5 - BHQ-2, для *V.parapertussis* – пара HEX - BHQ-1 и для *V.holmesii* – пара 6 - FAM - BHQ-1. 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, в которой гибридизационно-флуоресцентный зонд был мечен 6 - FAM - BHQ-1.

Проведение ПЦР-исследования на коклюш и заболевания, обусловленные другими бордетеллами, включает несколько этапов: 1 - взятие биологического материала, 2 - пробоподготовка образца, 3 – выделение ДНК, 4 – приготовление первой реакционной смеси, 5 – проведение первой амплификации в режиме реального времени, 6 – анализ и интерпретация результатов, 7 – приготовление второй реакционной смеси, 8 – проведение второй амплификации в режиме реального времени (подтверждающей), 9 – анализ и интерпретация результатов.

1. Взятие биологического материала проводили по методике (раздел «Материалы и методы»).
2. Пробоподготовку образца проводили путем смыва биологического материала с тампона в физиологический раствор по методике (раздел «Материалы и методы»).
3. Выделение ДНК осуществляли с применением коммерческих наборов реагентов в соответствии с инструкцией производителя.
4. Далее готовили первую реакционную смесь:

Смесь 1: реакционный буфер для ПЦР-РВ - 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 концентрация праймеров - по 300 нМ и зондов – по 100 нМ. В реакционную смесь вносили 5 мкл ДНК клинического образца, общий объем 25 мкл.

5. Первую амплификацию проводили с помощью прибора 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.
6. Анализ полученных результатов после первой амплификации осуществляли с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene

Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия).

Анализ результатов проводили путем оценки по кривым накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов - FAM / Green, HEX / Yellow, Cy5 / Red. Пороговую линию (threshold) устанавливали на уровне 20 % от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации. Уровень линии threshold составил не более 0,01. Значение «Ct» определяли автоматически. В положительных образцах кривая флуоресценции пересекала линию threshold и имела вид экспоненциальной кривой. В отрицательных образцах флуоресценции не было, что отражалось прямой детекции на уровне или ниже линии threshold. По каналу FAM / Green идентифицируется специфический фрагмент ДНК *B.holmesii* - hIS1001, по каналу HEX / Yellow - фрагмент ДНК *B.parapertussis* - IS1001, по каналу Cy5 / Red - фрагмент ДНК *B.pertussis* - IS481. Если концентрация ДНК-матрицы *B.holmesii* была на уровне $\geq 5 \times 10^4$ КОЕ/мл, то возможен положительный сигнал по каналу Cy5 / Red (Ct - 35), так как мишень IS481 может встречаться в единичных копиях в геномах этого вида бордетелл [214]. Положительный сигнал по каналу Cy5 / Red регистрируется у контрольных образцов ДНК *B.pertussis* № 143 и ДНК *B.holmesii* DSM 13416, что свидетельствует о возможности наличия в испытуемом образце ДНК *B.pertussis* и / или ДНК *B.holmesii* (Таблица 15).

Таблица 15 – Интерпретация результатов по заданным каналам после первой амплификации

Канал флуорофора	FAM / Green	HEX / Yellow	Cy5 / Red
Идентифицируемая мишень	hIS1001	IS1001	IS481
Наличие сигнала	+	+	+
Результат	ДНК <i>B.holmesii</i>	ДНК <i>B.parapertussis</i>	ДНК <i>B.holmesii</i> (+ / -) ДНК <i>B.pertussis</i>

7. Приготовление второй реакционной смеси.

Смесь 2: 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 14). Конечная концентрация праймеров - по 300 нМ и зонда – по 100 нМ. В реакционную смесь вносили 5 мкл ДНК клинического образца, общий объем 25 мкл.

8. Вторую амплификацию проводили с помощью прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия) при тех же условиях.

9. Анализ результатов проводили путем оценки по кривым накопления флуоресцентного сигнала по каналу - FAM / Green.

При наличии положительного сигнала по каналу FAM / Green, также, как и у образца контрольного штамма *B.pertussis* № 143, испытываемые образцы идентифицируются как образцы, содержащие ДНК *B.pertussis* (Таблица 16).

Таблица 16 – Интерпретация результатов после второй амплификации

Канал для флуорофора	FAM / Green
Идентифицируемая мишень	<i>ptxA</i>
Наличие сигнала	+
Результат	ДНК <i>B.pertussis</i>

Для проведения реакций использовали следующие контрольные образцы: положительные контрольные образцы, содержащие ДНК выявляемых микроорганизмов, - ДНК *B.holmesii* DSM 13416, ДНК *B.parapertussis* № 386, ДНК *B.pertussis* № 143, отрицательный контрольный образец ДНК *B.bronchiseptica* № 9 (применялся для контроля отсутствия ложноположительных результатов, обусловленных возможной контаминацией реактивов), отрицательный контроль – чистый ТЕ-буфер. При наличии положительного результата в отрицательных контролях полученные результаты считались не пригодными для интерпретации. Общая интерпретация разработанной методики представлена в таблице 17.

Таблица 17 - Интерпретация результатов, полученных с помощью разработанной методики генодиагностики

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

Для возможности выявления ко-инфекции нами были разработаны алгоритмы применения разработанной методики, которые можно использовать при обследовании больных с подозрением на коклюш (Рисунки 13, 14).

Первый вариант интерпретации результатов – выделение ДНК *B.pertussis* или ДНК *B.pertussis* / ДНК *B.holmesii* (Рисунок 13). Сначала клинический образец ставят в триплексной ПЦР-РВ с использованием праймеров на фрагменты IS481 (*B.pertussis*), hIS1001 (*B.holmesii*) и IS1001 (*B.parapertussis*). На первом этапе интерпретируют результат по каналу Cy5 / Red на наличие фрагмента IS481. При отрицательном сигнале образцы считаются отрицательными для ДНК *B.pertussis*. При наличии Ct>40 результат считается сомнительным и рекомендуется повторная постановка. При положительном сигнале по этому каналу и Ct≤40 образцы считаются положительными на наличие ДНК *B.pertussis* или ДНК *B.pertussis* / ДНК *B.holmesii*. При положительном сигнале по каналу Cy5 / Red ставится моноплексная ПЦР-РВ для идентификации фрагмента *ptxA*, подтверждающая наличие в биологическом материале ДНК *B.pertussis*. При отрицательном сигнале по каналу FAM / Green на наличие фрагмента hIS1001 и положительном сигнале в моноплексной ПЦР-РВ для идентификации фрагмента *ptxA* выдается результат – обнаружена ДНК *B.pertussis*. При отрицательном результате в моноплексной ПЦР-РВ для идентификации фрагмента *ptxA* – результат невалидный. При положительном сигнале по каналу FAM / Green на наличие фрагмента hIS1001 и положительном сигнале в моноплексной ПЦР-РВ для идентификации фрагмента *ptxA* выдается

результат - обнаружены ДНК *B.pertussis* и ДНК *B.holmesii*, что свидетельствует о наличии ко-инфекции, вызванной эти двумя микроорганизмами.

Второй вариант интерпретации результатов – выделение ДНК *B.holmesii* (Рисунок 13). Образцы анализируют по каналу FAM / Green на наличие мишени hIS1001. При отсутствии сигнала образцы считаются отрицательными для *B.holmesii*. При наличии $Ct > 40$ результат считается сомнительным и рекомендуется повторная постановка. При $Ct \leq 40$ образцы считаются положительными и выдается результат - обнаружена ДНК *B.holmesii*. При высокой концентрации ДНК-матрицы *B. holmesii* на уровне $\geq 5 \times 10^4$ КОЕ/мл возможен положительный сигнал по каналу Cy5 / Red, так как мишень IS481 может встречаться в единичных копиях в геномах этого вида бордетелл [141, 161, 170, 190, 210, 211].

Третий вариант интерпретации результатов - выделение ДНК *B.parapertussis* или ДНК *B.parapertussis* / ДНК *B.holmesii* (Рисунок 14). На первом этапе интерпретируют результат по каналу HEX / Yellow на наличие фрагмента IS1001. При отсутствии сигнала образцы считаются отрицательными для ДНК *B.parapertussis*. При наличии $Ct > 40$ результат считается сомнительным и рекомендуется повторная постановка. При положительном сигнале по этому каналу и $Ct \leq 40$ образцы считаются положительными на наличие ДНК *B.parapertussis*. При положительном сигнале по каналу HEX / Yellow и положительном сигнале по каналу FAM / Green на наличие фрагмента hIS1001 выдается результат – обнаружены ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii*, что свидетельствует о наличии ко-инфекции, вызванной эти двумя микроорганизмами.

Таким образом, разработана методика ускоренной генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР-РВ для выявления и дифференциации ДНК трех бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii* в биологическом материале.

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

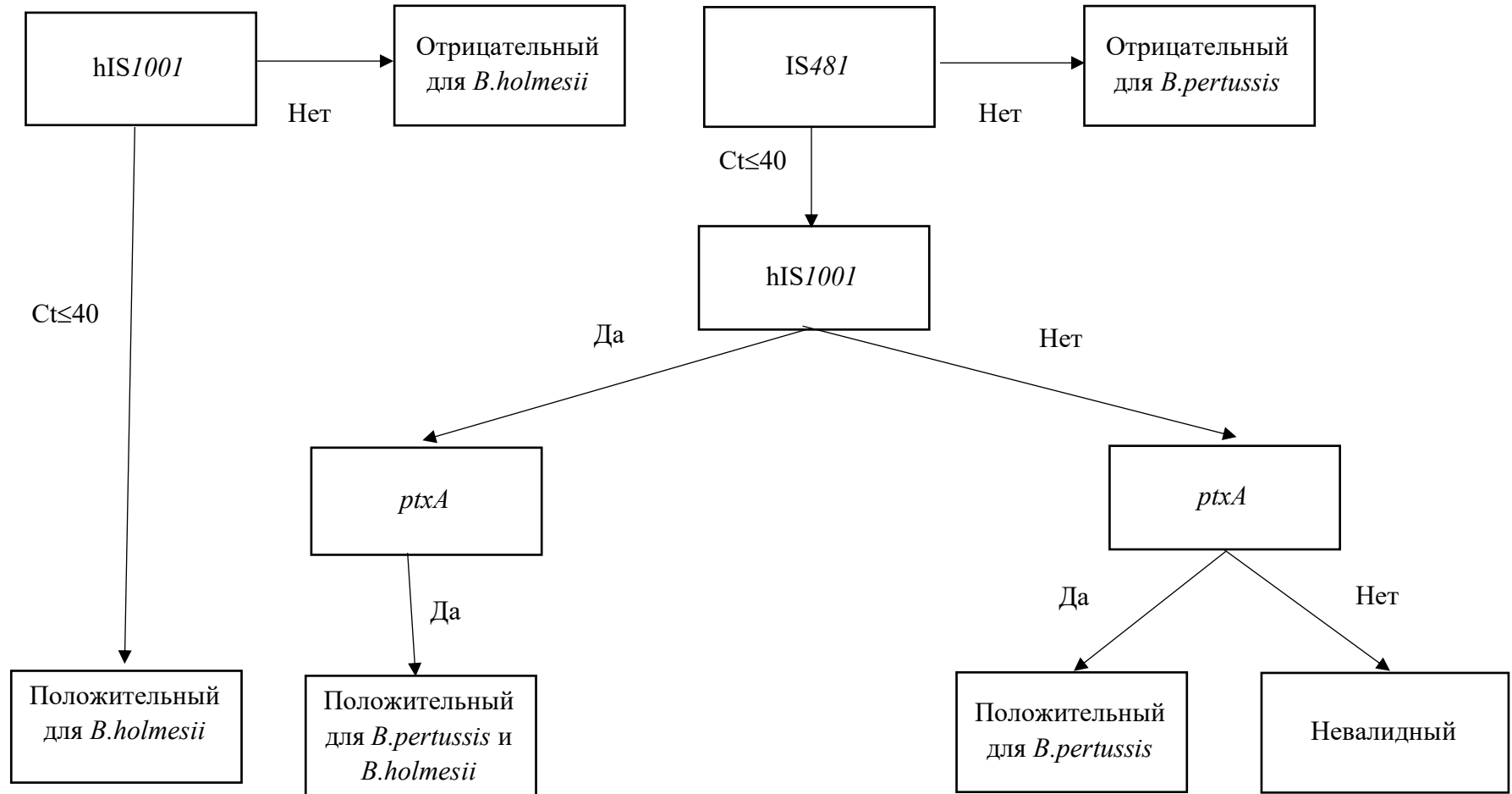


Рисунок 13 – Алгоритм применения разработанной методики с выделением *B.pertussis*, или *B.holmesii*, или *B.pertussis* / *B.holmesii*

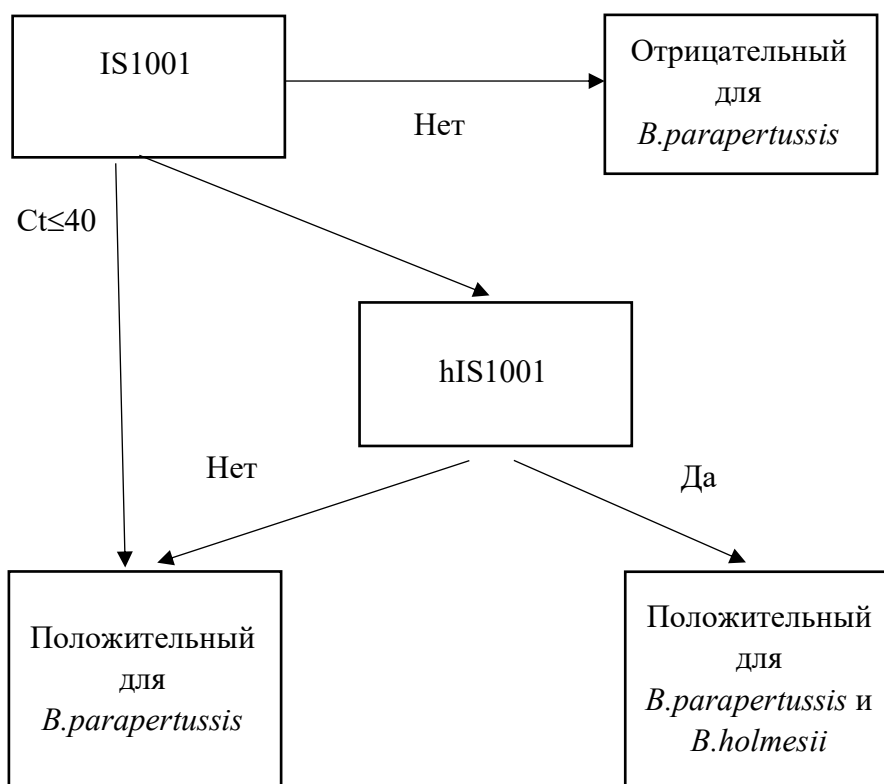


Рисунок 14 – Алгоритм применения разработанной методики с выделением *B.parapertussis* или *B.parapertussis* / *B.holmesii*

3.2. Оценка аналитической надежности разработанной методики

3.2.1. Оценка аналитической чувствительности разработанной методики

Для оценки аналитической чувствительности разработанной методики готовили по три линейки последовательных разведений бактериальных культур трех типовых штаммов - *B.pertussis* № 143, *B.parapertussis* № 386 и *B.holmesii* DSM 13416. Первое разведение готовили по оптическому отраслевому стандарту мутности в 5 ЕД (ОСО 42-28-86 П), что соответствует 5×10^9 м.к. в 1 мл. Далее делали десятикратные разведения до концентрации 5 м.к. в 1 мл (Таблица 18). Затем из 100 мкл каждого разведения бактериологических суспензий выделяли ДНК. Параллельно для определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной суспензии (КОЕ / мл), по 100 мкл из каждого разведения делали высеv на Бордетелагар и инкубировали 72 часа при 37 °С. Далее подсчитывали число выросших колоний (Таблица 18, Рисунок 15).

Таблица 18 – Порядок приготовления разведений бактериальных культур и учет числа выросших колоний

Разведение условное	Количество м.к. в 1 мл бактериальной суспензии	Число выросших колоний
<i>B.pertussis</i> № 143		
исходная	5×10^9	сплошной рост
– 1	5×10^8	сплошной рост
– 2	5×10^7	сплошной рост
– 3	5×10^6	сплошной рост
– 4	5×10^5	густой рост
– 5	5×10^4	множественный рост
– 6	5×10^3	$3,1 \times 10^1$
– 7	5×10^2	5
– 8	5×10^1	рост отсутствовал
– 9	5	рост отсутствовал
<i>B.parapertussis</i> № 386		
исходная	5×10^9	сплошной рост
– 1	5×10^8	сплошной рост
– 2	5×10^7	сплошной рост
– 3	5×10^6	сплошной рост
– 4	5×10^5	густой рост
– 5	5×10^4	множественный рост
– 6	5×10^3	$1,9 \times 10^1$
– 7	5×10^2	3
– 8	5×10^1	рост отсутствовал
– 9	5	рост отсутствовал
<i>B.holmesii</i> DSM 13416		
исходная	5×10^9	сплошной рост
– 1	5×10^8	сплошной рост
– 2	5×10^7	сплошной рост
– 3	5×10^6	густой рост
– 4	5×10^5	множественный рост
– 5	5×10^4	$2,5 \times 10^1$
– 6	5×10^3	7
– 7	5×10^2	2
– 8	5×10^1	рост отсутствовал
– 9	5	рост отсутствовал




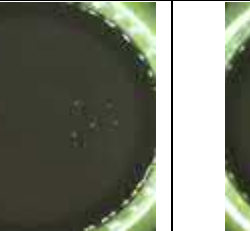



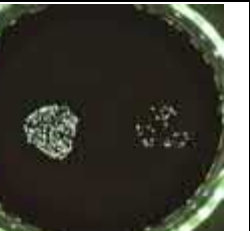
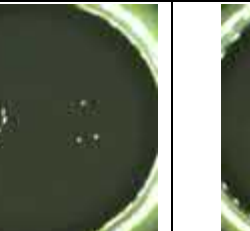

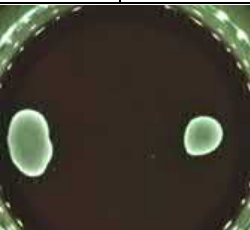


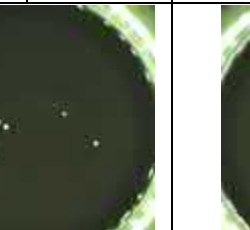

Разведения	Исходное	- 1	- 2	- 3	- 4	- 5	- 6	- 7	- 8	- 9
<i>B. pertussis</i> № 143										
	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост	Густой рост	Множественный рост	31 кол	5 кол	Роста нет	Роста нет
<i>B. parapertussis</i> № 386										
	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост	Густой рост	Множественный рост	19 кол	3 кол	Роста нет	Роста нет
<i>B. holmesii</i> DSM 13416										
	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост	Множественный рост	25 кол	7 кол	2 кол	Роста нет	Роста нет

Рисунок 15 – Результаты высева бактериальных культур *B. pertussis* № 143, *B. parapertussis* № 386 и *B. holmesii* DSM 13416 с целью оценки общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной суспензии

Выделение ДНК из исследуемых образцов осуществляли с помощью четырех 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) (Таблица 19). С целью определения аналитической чувствительности разработанной методики нами было исследовано каждое разведение в трех повторах.

Таблица 19 - Аналитическая чувствительность разработанной методики при использовании разных наборов для выделения ДНК

Вид м/о	Разведения культуры на этапе выделения	Значения порогового цикла (Сt)			
		ДНК-сорб-АМ	ДНК-сорб-В	Проба-ГС-плюс	РИБО-преп
<i>B.pertussis</i> № 143	5×10^9	14,61 ± 1,07	16,62 ± 1,10	17,77 ± 2,43	15,77 ± 1,56
	5×10^8	17,96 ± 0,29	20,85 ± 0,68	18,90 ± 1,16	17,93 ± 0,41
	5×10^7	20,50 ± 0,32	22,47 ± 1,20	18,64 ± 1,79	15,92 ± 0,82
	5×10^6	20,59 ± 0,81	28,48 ± 2,21	21,82 ± 1,90	21,15 ± 0,47
	5×10^5	23,93 ± 0,37	32,09 ± 2,30	23,48 ± 3,50	24,28 ± 0,77
	5×10^4	29,10 ± 0,45	35,67 ± 1,91	24,23 ± 0,54	25,05 ± 0,77
	5×10^3	33,22 ± 0,80	38,58 ± 0,90	28,42 ± 3,40	37,08 ± 3,44
	5×10^2	37,02 ± 3,37	32,09 ± 2,30	30,23 ± 3,61	34,38 ± 2,73
	5×10^1	—	—	49,08 ± 0	35,36 ± 2,53
	5	—	—	—	—
<i>B.parapertussis</i> № 386	5×10^9	12,34 ± 0,22	18,59 ± 2,27	20,59 ± 0	19,79 ± 0,56
	5×10^8	13,45 ± 0,56	21,53 ± 1,45	19,98 ± 0	21,08 ± 0,48
	5×10^7	16,43 ± 1,87	26,14 ± 2,51	22,88 ± 0,91	22,43 ± 0,46
	5×10^6	23,89 ± 0,50	30,09 ± 0,69	27,45 ± 2,05	25,34 ± 1,02
	5×10^5	29,06 ± 1,35	33,92 ± 1,65	31,16 ± 2,21	30,39 ± 0,87
	5×10^4	31,89 ± 1,51	38,44 ± 1,16	37,33 ± 12,22	35,01 ± 1,83
	5×10^3	35,95 ± 1,58	39,80 ± 0,11	38,04 ± 3,54	34,49 ± 5,07
	5×10^2	38,41 ± 1,41	—	33,78 ± 1,07	45,07 ± 3,20
	5×10^1	—	—	40,67 ± 0,32	40,45 ± 5,35
	5	—	—	—	—

Продолжение таблицы 19

Вид м/о	Разведения культуры на этапе выделения	Значения порогового цикла (Ct)			
		ДНК-сорб-АМ	ДНК-сорб-В	Проба-ГС-плюс	РИБО-преп
<i>B.holmesii</i> DSM 13416	5×10^9	6,04 ± 0,36/ 15,11 ± 3,30	6,41 ± 0,48/ 15,09 ± 3,46	7,12 ± 0,64/ 10,26 ± 3,07	4,91 ± 0,01/ 8,36 ± 4,04
	5×10^8	8,50 ± 0,33/ 18,33 ± 3,56	9,17 ± 0,74/ 17,34 ± 3,45	8,37 ± 1,24/ 11,29 ± 1,65	7,36 ± 0/ 11,11 ± 5,07
	5×10^7	12,0 ± 0,34/ 21,79 ± 3,41	13,12 ± 0,69/ 21,23 ± 3,39	11,42 ± 1,88/ 14,46 ± 1,07	11,10 ± 0,03/ 15,48 ± 5,85
	5×10^6	15,27 ± 0,31/ 27,57 ± 4,61	16,56 ± 0,82/ 29,49 ± 6,25	14,92 ± 1,80/ 17,82 ± 0,85	14,48 ± 0,15/ 19,00 ± 5,47
	5×10^5	18,56 ± 0,38/ 35,10 ± 6,06	20,47 ± 0,68/ 35,72 ± 8,90	18,82 ± 2,31/ 23,92 ± 2,56	17,62 ± 0,04/ 22,48 ± 6,33
	5×10^4	21,77 ± 0,37/ 33,20 ± 14,09	22,93 ± 0,87/ 24,88 ± 0,23	21,48 ± 1,93/ 28,02 ± 4,45	21,09 ± 0,01/ 34,20 ± 17,50
	5×10^3	25,14 ± 0,41/ 26,93 ± 0	26,45 ± 0,70/ 32,37 ± 4,32	26,16 ± 0,76/ 31,96 ± 3,83	24,05 ± 0,29/ 36,82 ± 16,48
	5×10^2	28,72 ± 0,50/ 32,32 ± 0	27,44 ± 0,79/ 37,31 ± 4,74	28,35 ± 1,01/ 34,37 ± 2,40	27,05 ± 0,13/ 28,42 ± 0
	5×10^1	35,76 ± 1,27/ —	29,92 ± 1,64/ —	32,56 ± 2,01/ —	32,31 ± 2,04/ 34,56 ± 0
	5	—/—	—/—	—/—	—/—

В результате проведенного исследования показано, что при использовании наборов реагентов для выделения «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва), «АмплиПрайм® ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) аналитическая чувствительность по трем мишеням составила 5×10^2 ГЭ / мл и 5×10^3 ГЭ / мл соответственно, а при использовании наборов «Проба-ГС-плюс» (ООО «ДНК-технология», Россия) и «РИБО—преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) - 5×10^1 ГЭ / мл. С целью подтверждения установленного уровня аналитической чувствительности было проведено 10 серий экспериментов с изучением точки разведения на уровне чувствительности. Во всех сериях экспериментов получены положительные результаты. На основании полученных результатов, для дальнейшей работы использовали набор «РИБО—преп» (ФБУН ЦНИИЭ

Роспотребнадзора, Москва).

В качестве примера результатов применения методики приводим полученные кривые амплификации по трем каналам для контрольных образцов в триплексной ПЦР-РВ (Рисунок 16, 17, 18) и моноплексной ПЦР-РВ (Рисунок 19).

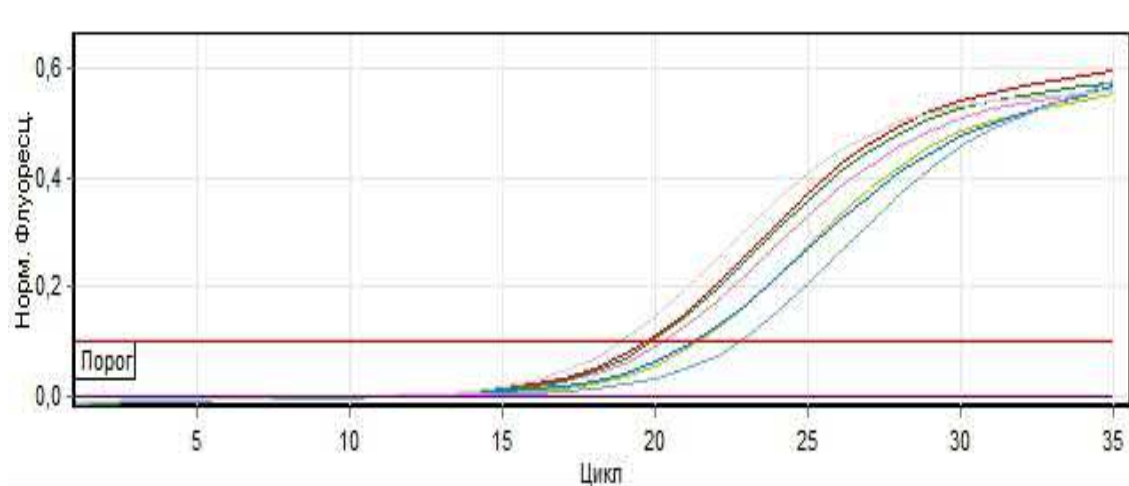


Рисунок 16 – Кривые амплификации по каналу FAM / Green для выявления ДНК *B.holmesii*

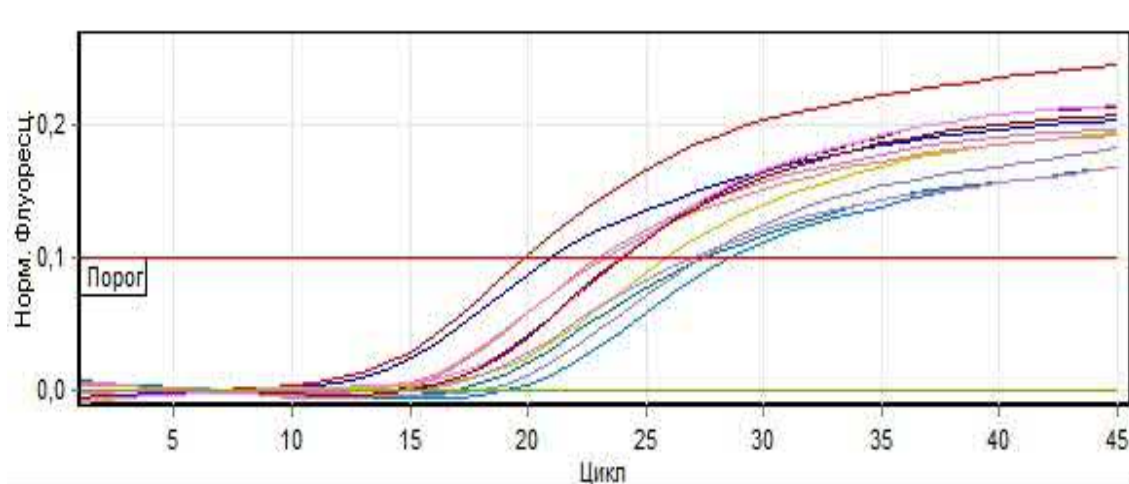


Рисунок 17 – Кривые амплификации по каналу Cy5 / Red для выявления ДНК *B.pertussis*

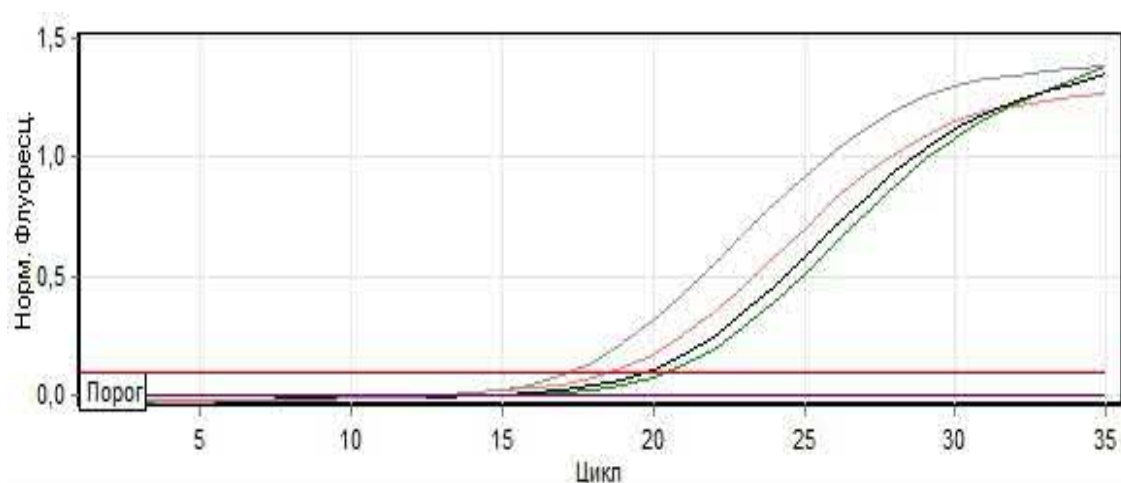


Рисунок 18 – Кривые амплификации по каналу HEX / Yellow для выявления ДНК *B.parapertussis*

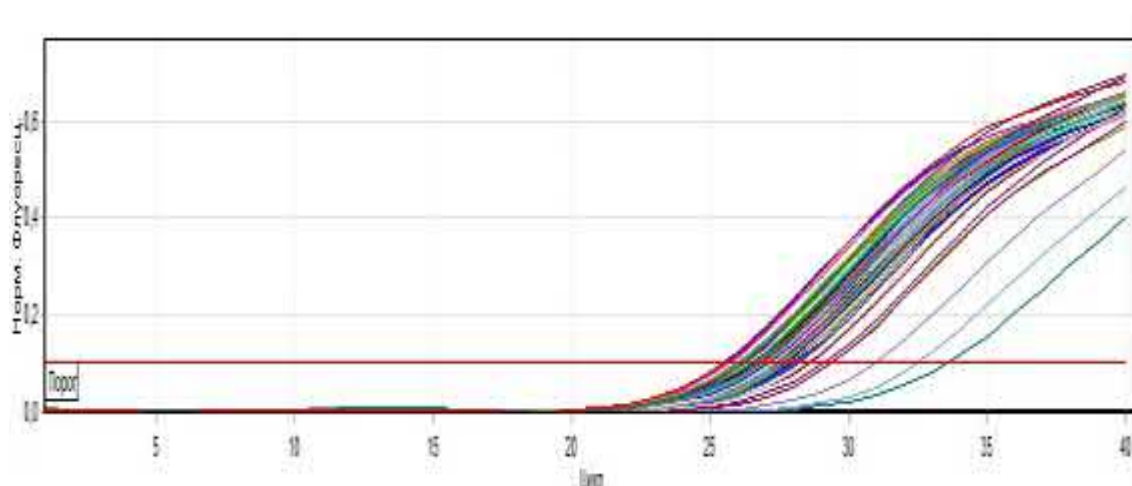


Рисунок 19 – Кривые амплификации в моноплексной ПЦР-РВ для идентификации *ptx-A* по каналу FAM / Green для выявления ДНК *B.pertussis*

3.2.2. Оценка аналитической специфичности разработанной методики

Оценку аналитической специфичности разработанной методики генодиагностики осуществляли с использованием типовых штаммов микроорганизмов, свежевыделенных штаммов представителей рода *Bordetella* и ДНК штаммов микроорганизмов других родов (Таблицы 1, 2, 3).

С целью выявления перекрестных реакций в работе использовали концентрированные образцы матриц не ниже 10^9 ГЭ/мл. Проведенные

исследования показали, что во всех образцах ДНК типовых штаммов *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*, свежевыделенных штаммов *B.pertussis* и *B.parapertussis*, были выявлены положительные сигналы (Таблица 20).

Таблица 20 - Проверка аналитической специфичности праймеров

Мишень	Значения порогового цикла (Ct)			
	<i>B.pertussis</i>	<i>B.parapertussis</i>	<i>B.holmesii</i>	<i>B.bronchiseptica</i>
IS481	14,85±0,62	—	26,81±1,51	—
IS1001	—	16,89 ± 0,87	—	—
hIS1001	—	—	5,13 ± 0,04	—
<i>ptxA</i>	12,72±0,61	—	—	—

В результате исследования перекрестных реакций - обнаружения кривых в ПЦР-РВ, свидетельствующих об амплификации посторонней мишени, во всех образцах ДНК типового штамма *B.bronchiseptica*, и во всех образцах ДНК различных микроорганизмов положительных сигналов не выявлено.

Таким образом, разработанная методика на образцах типовых и свежевыделенных штаммах обладает 100 % аналитической специфичностью.

3.2.3. Оценка сходимости и воспроизводимости разработанной методики

Аналитическую надежность диагностического теста определяли по частоте совпадения выявления ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* в многочисленных пробах однородного образца трех типовых штаммов бордетелл (*B.pertussis* № 143, *B.parapertussis* № 386 и *B.holmesii* DSM 13416) с оценкой сходимости и воспроизводимости метода согласно [8].

С этой целью выращивали 72-часовые штаммы *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii* на плотной питательной среде Бордетелагаре. Далее суспендировали по полной микробиологической петле каждого из трех штаммов в 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия (рН 7,0). Затем готовили по 10 одинаковых проб, содержащих по 100 мкл бактериальной суспензии. Далее все пробы были

протестированы в разработанной методике в трех повторах.

Сходимость методики оценивали на 30 пробах контрольных образцов, тестирование проводили в трех повторах. Эксперимент проведен в одной лаборатории, одним исследователем, с одной партией реактивов, на одном оборудовании в пределах короткого промежутка времени (пяти рабочих дней). В результате проведенных исследований ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* была идентифицирована в 100 % случаев.

Воспроизводимость методики оценивали при следующих условиях: использованы многочисленные пробы одного и того же образца, исследование проводили два специалиста, использованы разные партии реактивов в различные рабочие дни. В результате проведенных экспериментов получены идентичные результаты.

3.3. Оценка диагностических характеристик разработанной методики

В Российской Федерации зарегистрирована единственная тест-система ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в биологическом материале, которая уже более 10 лет эффективно используется при обследовании больных с подозрением на коклюш [12, 36].

Основной принцип разработанной методики - это применение ее для выявления и дифференциации ДНК трех видов бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*. Учитывая, что аналоговой зарегистрированной методики, которая позволяет идентифицировать ДНК этих микроорганизмов, в Российской Федерации нет, то для оценки диагностических критериев использовали зарегистрированную тест-систему «АмплиСенс® Bordetella multi-FL». Сравнительный анализ проводили по идентификации ДНК *B.pertussis* и ДНК *B.parapertussis* в разработанной методике и в зарегистрированной тест-

системе на сходимость результатов обоих тестов.

Исследование проведено на 845 пробах биологического материала, полученных при обследовании 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, с января 2017 года по февраль 2020 года.

После единого взятия биологического материала у пациента аликвота клинического образца отбиралась для изучения в зарегистрированной тест-системе и разработанной методике. С целью оценки диагностических характеристик необходимо было исключение лабораторной ошибки постановок. Для этого в дискордантных результатах проводили повторное тестирование двумя методиками. При получении различий в результатах между первым и вторым повторами осуществляли третье исследование. Окончательный результат считался равным результату двух повторов из трех (Таблица 21).

Таблица 21 - Результаты исследования биологического материала, полученного при обследовании больных с подозрением на коклюш, после первого раунда изучения

Варианты ПЦР-РВ	n	Результат исследования			
		ДНК <i>B.pertussis</i>	ДНК <i>B.parapertussis</i>	Отрицательный	Сомнительный
«АмплиСенс® Bordetella multi-FL»	845	428 (50,6±1,7%)	11 (1,3±0,4%)	391 (46,3±1,7%)	15 (1,8±0,4%)
Разработанная методика	845	416 (49,2±1,7%)	4 (0,5±0,2%)	400 (47,3±1,7%)	5 (0,6±0,3%)

После первичного исследования 845 проб в разработанной методике и зарегистрированной тест-системе (до изучения дискордантных образцов) ДНК *B.pertussis* была обнаружена в 428 пробах в коммерческой тест-системе и в 416 пробах в разработанной методике; ДНК *B.parapertussis* – в 11 пробах в коммерческой тест-системе и в 4-х пробах в разработанной методике;

отрицательный результат был в 391 пробе в коммерческой тест-системе и в 400 пробах в разработанной методике; сомнительный результат - в 15 пробах в коммерческой тест-системе и в 5 пробах – в разработанной.

Далее был поставлен второй раунд исследования (Таблица 22).

Таблица 22 - Результаты исследования биологического материала после второго раунда исследования

Варианты ПЦР-РВ	n	Результат исследования			
		ДНК <i>B.pertussis</i>	ДНК <i>B.parapertussis</i>	Отрицательный	Сомнительный
«АмплиСенс® Bordetella multi-FL»	845	428 (50,6±1,7%)	11 (1,3±0,4%)	391 (46,3±1,7%)	15 (1,8±0,4%)
Разработанная методика	845	417 (49,3±1,7%)	4 (0,5±0,2%)	399 (47,2±1,7%)	5 (0,6±0,3%)

При втором раунде исследования в одной пробе, которая ранее была отрицательной в разработанной методике, была обнаружена ДНК *B.pertussis*. Таким образом, в разработанной методике стало 417 образцов, содержащих ДНК *B.pertussis*, и 399 отрицательных образцов. Все остальные результаты остались неизменны. Затем был поставлен третий раунд исследования, и получены окончательные результаты (Таблица 23).

Таблица 23 - Результаты исследования биологического материала после третьего раунда (окончательный результат)

Варианты ПЦР-РВ	n	Результат исследования			
		ДНК <i>B.pertussis</i>	ДНК <i>B.parapertussis</i>	Отрицательный	Сомнительный
«АмплиСенс® Bordetella 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%)	397 (47,0±1,7%)	5 (0,6±0,3%)

После третьего раунда исследования в 4-х образцах, ранее идентифицированных как сомнительные в зарегистрированной тест-системе,

была обнаружена ДНК *B.pertussis*. В 1-ом образце, идентифицированном ранее как содержащем ДНК *B.parapertussis*, обнаружена ДНК *B.pertussis*. В разработанной методике в 2-х образцах, в которых ранее ДНК бордетелл обнаружена не была, была выявлена ДНК *B.pertussis*.

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

3.4. Оценка валидности разработанной методики

В исследование было включено 845 клинических образцов от пациентов, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» и «БУЗ ВО ОДКБ» в период с января 2017 года по февраль 2020 года.

Изучение клинических образцов от пациентов было проведено с помощью зарегистрированной тест-системы и разработанной методики.

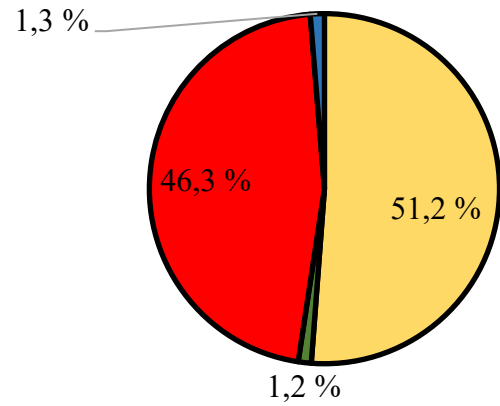
При сопоставлении результатов в 7 клинических образцах, ранее идентифицированных как содержащие ДНК *B.pertussis*, с помощью разработанной методики была обнаружена ДНК двух бордетелл - *B.pertussis* и *B.holmesii*.

С помощью разработанной методики нами идентифицировано 12 положительных образцов, содержащих ДНК *B.holmesii*. Из них с помощью зарегистрированной тест-системы 9 образцов ранее были отрицательными, 2 образца – сомнительные и 1 образец идентифицирован, как содержащий ДНК *B.parapertussis*.

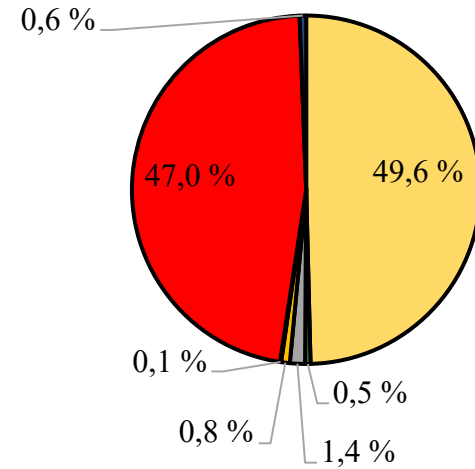
Среди 10 образцов, идентифицированных с помощью зарегистрированной тест-системы, как содержащие ДНК *B.parapertussis*, в 4-х образцах результат подтвердился, в 4-х - получен отрицательный результат, в 1-ом образце обнаружена ДНК *B.holmesii* и в 1-ом - ДНК двух бордетелл - *B.parapertussis* и *B.holmesii* (Таблица 24, Рисунок 20).

Таблица 24 – 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® Bordetella multi-FL»	845	433 (51,2±1,7%)	10 (1,2±0,4%)	Не включено в тест-систему	Не включено в тест-систему	Не включено в тест-систему	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%)



■ ДНК *B.pertussis* ■ ДНК *B.parapertussis*
■ Отрицательный ■ Сомнительный



■ ДНК *B.pertussis* ■ ДНК *B.parapertussis*
■ ДНК *B.holmesii* ■ ДНК *B.pertussis* + *B.holmesii*
■ ДНК *B.parapertussis* + *B.holmesii* ■ Отрицательный
■ Сомнительный

А.

Б.

Рисунок 20 – Эффективность выявления ДНК бордетелл с помощью коммерческой тест-системы (А) и разработанной методики (Б)

Для оценки валидности разработанной методики генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, были определены: чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата, индекс точности (диагностическая эффективность), отношение правдоподобия положительного результата и отношение правдоподобия отрицательного результата. Расчет показателей проводился по методу Wilson по стандартным формулам и с помощью он-лайн калькуляторов <https://www.msmanuals.com/medical-calculators/LikelihoodRNDData-ru.htm> и <https://wpcalc.com/diagnosticheskiy-test-na-voipriimchivost-k-zabolevaniyam/>.

Для расчета по стандартным формулам результаты анализа клинических образцов были разделены на группы:

- ИП – истинно-положительные (больные пациенты, выявленные с помощью теста);
- ЛП – ложно-положительные (здоровые пациенты с положительным результатом теста);
- ЛО – ложно-отрицательные (больные пациенты, не выявленные с помощью теста);
- ИО – истинно-отрицательные (здоровые пациенты с отрицательным результатом теста).

В соответствии с этими группами распределение пациентов в нашем исследовании представлено в таблице 25.

Таблица 25 - Распределение пациентов в зависимости от результатов обследования

Показатель	Количество образцов
ИП	440
ЛП	3
ЛО	5
ИО	397

В соответствии с вышеописанным распределением пациентов была рассчитана оценка валидности разработанной методики генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами (Таблица 26).

Таблица 26 - Оценка валидности разработанной методики генодиагностики

Критерий	Величина критерия	Характеристика и способ расчета
Чувствительность Sensitivity, Se	98,8 %	С какой вероятностью тест покажет положительный результат у пациента, имеющего признаки заболевания? $Se = \frac{ип}{ип+ло} \times 100 \%$
Специфичность Specificity, Sp	99,2 %	С какой вероятностью тест покажет отрицательный результат у пациента, не имеющего признаков заболевания? $Sp = \frac{ио}{ио+лп} \times 100 \%$
Прогностическая ценность положительного результата, ПЦ ⁺ Positive predictive value, PV ⁺	99,3 %	С какой вероятностью пациент с положительным результатом теста будет иметь признаки заболевания? $PV = \frac{ип}{ип+лп} \times 100 \%$
Прогностическая ценность отрицательного результата, ПЦ ⁻ Negative predictive value, PV ⁻	98,7 %	С какой вероятностью пациент с отрицательным результатом теста не будет иметь признаков заболевания? $PV = \frac{ио}{ио+ло} \times 100 \%$
Индекс точности, ИТ (диагностическая эффективность) Accuracy, Ac	99,0 %	Доля истинных (и положительных, и отрицательных) по отношению к общему числу полученных результатов $Ac = \frac{ио+ип}{ип+лп+ио+ло} \times 100 \%$

Продолжение таблицы 26

Критерий	Величина критерия	Характеристика и способ расчета
Отношение правдоподобия положительного результата, ОП ⁺ Likelihood ratio of a positive test, LR ⁺	123,5	Вероятность положительного результата теста для пациента с заболеванием по сравнению со здоровым человеком $LR = \frac{Sensitivity}{1-Specificity}$
Отношение правдоподобия отрицательного результата, ОП ⁻ Likelihood ratio of a negative test, LR ⁻	0,01	Вероятность отрицательного результата теста для пациента с заболеванием по сравнению со здоровым человеком $LR = \frac{1-Sensitivity}{Specificity}$

Таким образом, нами установлено, что разработанная методика генодиагностики обладает 98,8 % чувствительностью, 99,2 % специфичностью и 99,0 % диагностической эффективностью.

3.5. Оценка достоверности идентификации ДНК *B.holmesii*

Оценка достоверности выявления ДНК *B.holmesii*, которые были идентифицированы с помощью разработанной методики, проводили с помощью трех методик – изотермической амплификации (LAMP), экспериментальной серии «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и прямого секвенирования фрагментов ДНК.

Проведение изотермической амплификации (LAMP) проводили с помощью опубликованного протокола [160] с использованием праймеров:

ВН-F3: 5'- GCTCTCCCAGATCGAAAAGC - 3'

ВН-B3: 5'- TCGGCGATGACCTGCA - 3'

ВН-FIP 5'-CAGCGAACCGGTGGAAACGAATGCGCTACGGCGACAATG - 3'

ВН-BIP 5'-ATTGGGCGTGGGTGGTCTGCGTGTCAGCGTGGTCTTGC - 3'

ВН-LB: 5'-GTCGTAGAAATCTACGGCCCCG - 3'

Во всех клинических образцах, содержащих ДНК *B.holmesii*, согласно разработанной методике, в изотермической амплификации выявлены характерные специфические светящиеся профили, соответствующие профилю контрольного типового штамма *B.holmesii* DSM 13416 (Рисунок 21).

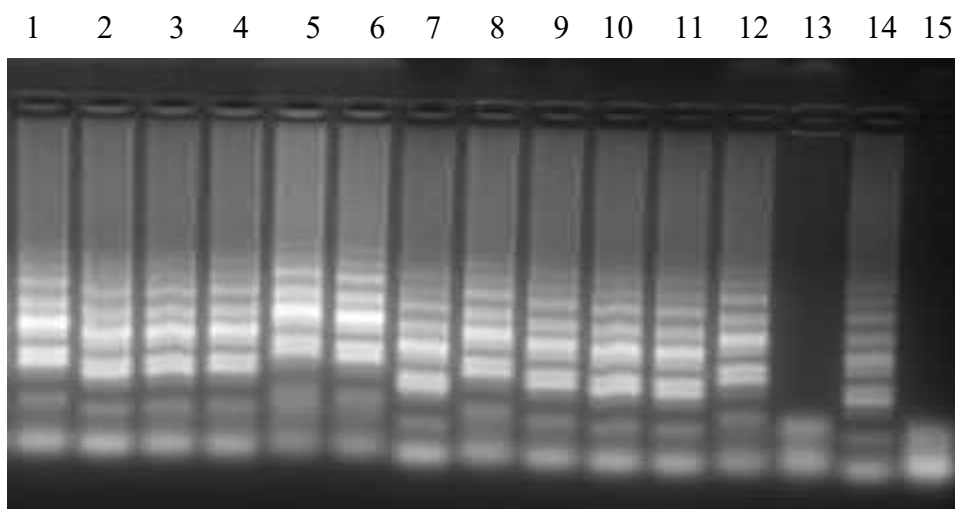


Рисунок 21 – Электрофореграмма продуктов изотермической амплификации: клинических образцов (пример)

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

Во всех клинических образцах, содержащих ДНК *B.holmesii*, согласно разработанной методике, в экспериментальной серии «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (ООО «ДНК-Технология», Россия) также наблюдали положительные результаты (Рисунок 22).

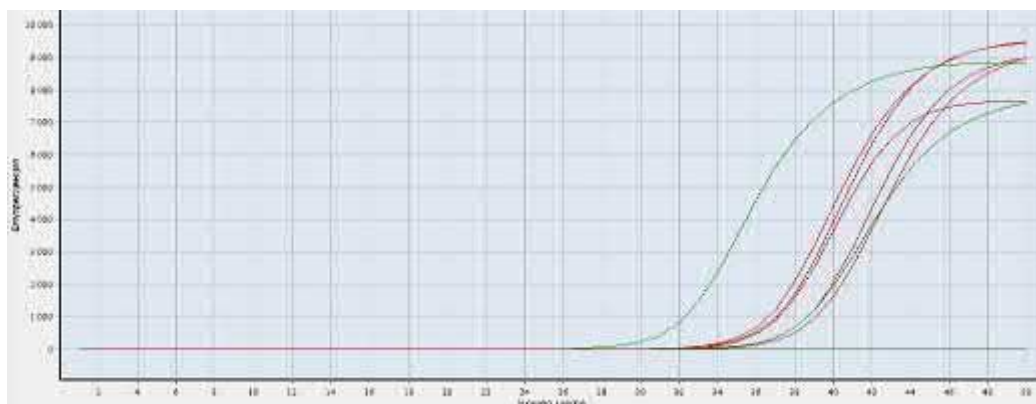


Рисунок 22 – Кривые амплификации в экспериментальной серии «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (ООО «ДНК-Технология», Россия) (пример)

Для проведения прямого секвенирования ДНК клинических образцов нами была предварительно разработана nested-ПЦР с двумя парами праймеров, которые были предварительно сконструированы (Рисунок 23) с помощью компьютерной программы BLAST на основании анализа нуклеотидных последовательностей референсных штаммов (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Рисунок 24, 25).

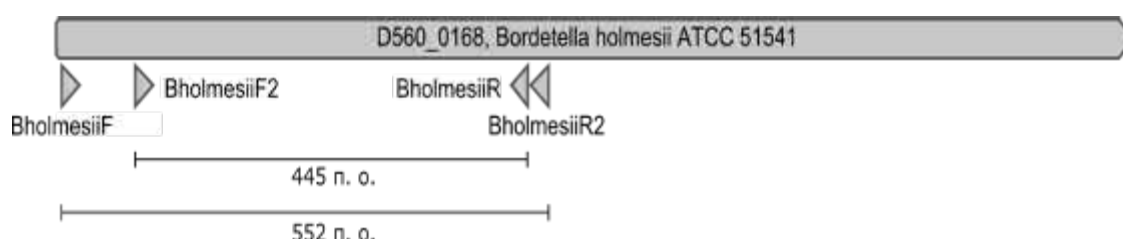


Рисунок 23 – Расположение праймеров *B.holm* F / *B.holm* R и *B.holm* F2 / *B.holm* R2

Первый раунд ПЦР проводили с помощью наружных праймеров *B.holm* F / *B.holm* R:

Bholm F: 5'-GACCGCAAGACGATCGAGAG-3'

*Bholm*R2: 5'-ACCGATCCATAGCACCTGAC-3' (ожидаемый размер продукта - 552 п.н.) (Рисунок 24).

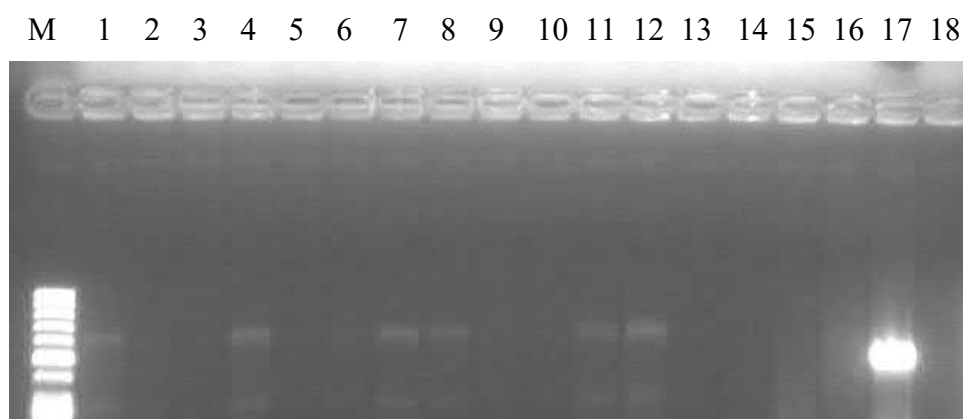


Рисунок 24 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами *B.holm* F / *B.holm* R (первый раунд)

Примечание: М – маркер молекулярных весов GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США); 1 - 16 – ДНК клинических образцов, содержащих ДНК *B.holmesii*; 17 – положительный контроль (ДНК штамма *B.holmesii* DSM 13416); 18 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Второй раунд nested-ПЦР проводили с праймерами *B.holm*F2 / *B.holm*R2:

*Bholm*F2: 5'-GTCACGATTTACCTGAAGCC-3'

*Bholm*R2: 5'-ACCGATCCATAGCACCTGAC-3' (ожидаемый размер

продукта - 468 п.н.) (Рисунок 25).

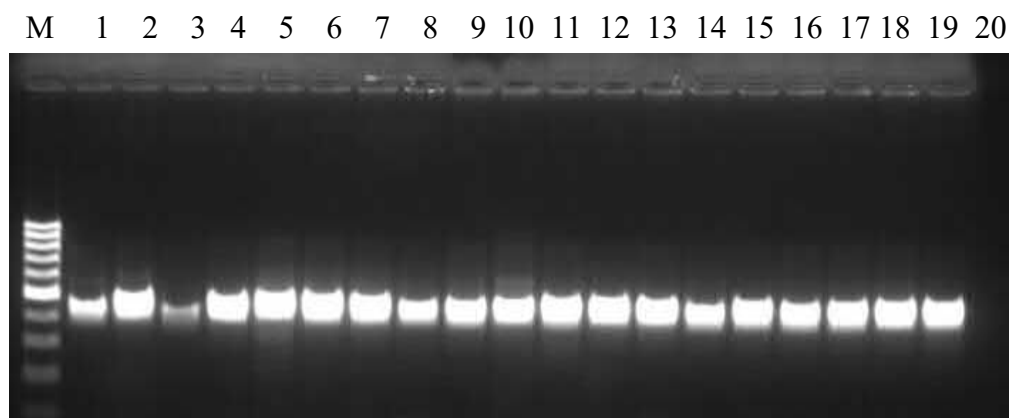


Рисунок 25 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами *B.holm* F2 / *B.holm* R2 (второй раунд)

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 штамма *B.holmesii* DSM 13416); 20 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

В результате nested-ПЦР были наработаны ампликоны, которые затем исследовались с помощью секвенирования. Полученные результаты секвенирования образцов сопоставляли с опубликованными геномными последовательностями, представленными в базе данных NCBI Refseq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) (Рисунок 26).

А.

```
GCGGCACCGATGTCGGCAGGTGCATGAGACGACCACGCGCCGGGTGCGGGTATCTGCCGCTAATGGCGCTGC
GAGTGACGCTGGTAGTGCCGCGTCGGCGGGTCTGGTGCGAGCAGTGCCGGTGGACCGCATCTGGAGAGGCTGA
GCTGGCTGGGCCGTTACCAGCGAGTGACCGACCGGCTGGCCGAGGCGGTCAGCCAGTTGCTTGAGTCCAGCA
ACATTCGGCCGTGGCGCGCTTCTTCCAACSTGGGTGGCACACGGTCAAGGCGCTGGACAAGGCCSTGCTGC
GACGGGCGATCCAAGAGCCGGACTGGAGCCAGATCCAACSTAGCGATGGACGAGTTCGCTCTACACAAGG
GCCATCGTTATGCCACGGTCGTTGTCAAATCCGATCC
```

Б.

```
GTCCATCGCTAGGTAGTGGATCTGGCTCCAGTCCGGCTCTGGATCGCCCGTCGCAGCAGGGCCTTGCCAG
CGCCTTGACCGTGTGCCAACCAGTTGGAAGAAGCGCGCCACGGCCAGAATGTTGCTGGACTCAAGCAACTG
GCTGACCGCCTCGGCCAGCCGGTCCGTCACSTCGCTGGTAACGGCCAGCCAGCTCAGCCTCTCCAGATGCGG
TCCACCGCACTGCTCGCACCAGACCCGCCGACGCGGCACTACCAGCGTCACTCGCAGCGCCATTAGCGGCAG
ATCCCGCACCCGGCGCGTGGTTCGTCTCATGCACCTGCCGACATCGGTTGCCGAGTGTCTGCAGTGCATCGT
TCGCGCTGAAGGCTTCAGGTAATCGTGAC
```

Образец № 6 с праймером *B.holm* F2 (А); с праймером *B.holm* R (Б)

А.

ACCGATGTCGGCAGGTGCATGAGACGACCACGCGCCGGGTGCGGGATCTGCCGCTAATGGCGCTGCGAGTGA
CGCTGGTAGTGCCGCGTTCGGCGGGTCTGGTGCAGAGTGCAGGTGGACCCGCATCTGGAGAGGGCTGAGCTGGC
TGGGCCGTTACCAGCGAGTGACCGACCGGCTGGCCGAGGCGGTTCAGCCAGTTGCTTGAGTCCAGCAACATTC
TGGCCGTGGCGCGCTTCTTCCAACCTGGGTTGGCACACGGTCAAGGCGCTGGACAAGGCCCTGCTGCGACGGG
CGATCCAAGAGCCGACTGGAGTCAGATCCACTACCTAGCGATGGACGAGTTCGCTCTACACAAGGGCCATC
GTTATGCCACGGTCGTTGTCAAATCCGATCC

Б.

GACTCGTCCATCGCTAGGTAGTGGATCTGACTCCAGTCCGGCTCTTGGATCGCCCGTTCGCAGCAGGGCCTTG
TCCAGCGCCTTGACCGTGTGCCAACCCAGTTGGAAGAAGCGCGCCACGGCCAGAATGTTGCTGGACTCAAGC
AACTGGCTGACCGCCTCGGCCAGCCGGTTCGGTCACTCGCTGGTAACGGCCCAGCCAGCTCAGCCTCTCCAGA
TGCGGTCCACCGCACTGCTCGCACCAGACCCGCCGACGCGGCACTACCAGCGTCACTCGCAGCGCCATTAGC
GGCAGATCCCGCACCCGGCGCGTGGTTCGTCTCATGCACCTGCCGACATCGGTTGCCGCGAGTCTCGCAGTGC
ATCGTTCGCGCTGAAGGCTTCAGGTAATAATCGTGACGA

Образец № 232 с праймером *B.holm* F2 (А); с праймером *B.holm* R (Б)

Рисунок 26 - Результаты секвенирования образцов *B.holmesii* (два образца)

Все выявленные фрагменты ДНК соответствовали геному штамма *B.holmesii* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP007494.1>).

Резюме: Впервые разработана методика мультиплексной ПЦР-РВ с идентификацией фрагментов нуклеотидных последовательностей трех инсерционных элементов - *IS481*, *hIS1001*, *IS1001* и фрагмента гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина, которая позволяет выявлять и дифференцировать ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* в биологическом материале. Разработан алгоритм интерпретации результатов с целью выявления как моноинфекции, так и возможности наличия ко-инфекции *B.pertussis* / *B.holmesii* и *B.parapertussis* / *B.holmesii*. Аналитическая чувствительность методики на типовых штаммах и с использованием четырех коммерческих наборов для выделения составила 5×10^1 ГЭ / мл, аналитическая специфичность на коллекции типовых и свежесеквенированных штаммов – 100 %, аналитическая надежность – 100 %. Оценка диагностических характеристик разработанной методики по сравнению с зарегистрированной тест-системой показала, что общий конкорданс составил 96,4 %, дискордантными были 3,6 % образцов. Установлено, что разработанная методика генодиагностики обладает 98,8 % чувствительностью, 99,2 % специфичностью и 99,0 % диагностической эффективностью.

Впервые установлено, что 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. Идентификация ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.holmesii* и ДНК *B.parapertussis* с помощью разработанной методики генодиагностики повышает эффективность лабораторного подтверждения диагноза коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, а также может применяться при мониторинге возбудителей в рамках эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией на территории РФ.

ГЛАВА 4. Клиническая характеристика заболевания, вызванного *B.holmesii*, в сопоставлении с клиникой коклюша, вызванного *B.pertussis*

Глава посвящена изучению клиники 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 [10]. Для типичных форм характерна последовательная смена периодов болезни (инкубационный, продромальный, спазматический и период разрешения) и наличие основного симптома – приступообразного кашля. В зависимости от тяжести типичные формы делятся на тяжелые, среднетяжелые и легкие формы. 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.

Осложнения могут быть обусловлены воздействием токсинов самого возбудителя коклюша или присоединением вторичной бактериальной или респираторной вирусной инфекций. Осложнениями, которые могут развиваться под действием токсинов возбудителя, являются: со стороны бронхолегочной системы - ателектаз легкого, сердечно-сосудистой системы – различные проявления геморрагического синдрома (петехиальные высыпания, субконъюнктивальные кровоизлияния, носовое кровотечение), нервной системы –энцефалопатия.

Бронхиты и пневмонии, являющиеся наиболее частыми осложнениями, возникают на фоне сочетанного течения коклюша и острых респираторных вирусных и вторичных инфекционных заболеваний.

Осложнений, описанных в литературе [1, 2, 3, 26, 28, 30, 35], обусловленных перенапряжением мышц дыхательной мускулатуры, мышц брюшной стенки и усилением моторики кишечника у наблюдаемых нами пациентов не было.

На течение коклюша, развитие осложнений и длительность выздоровления оказывало влияние присоединение сопутствующих острых респираторных вирусных, бактериальных и хронических инфекционных заболеваний, среди которых у детей раннего возраста особое место занимает цитомегаловирусная инфекция [28, 35].

4.1. 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 27.

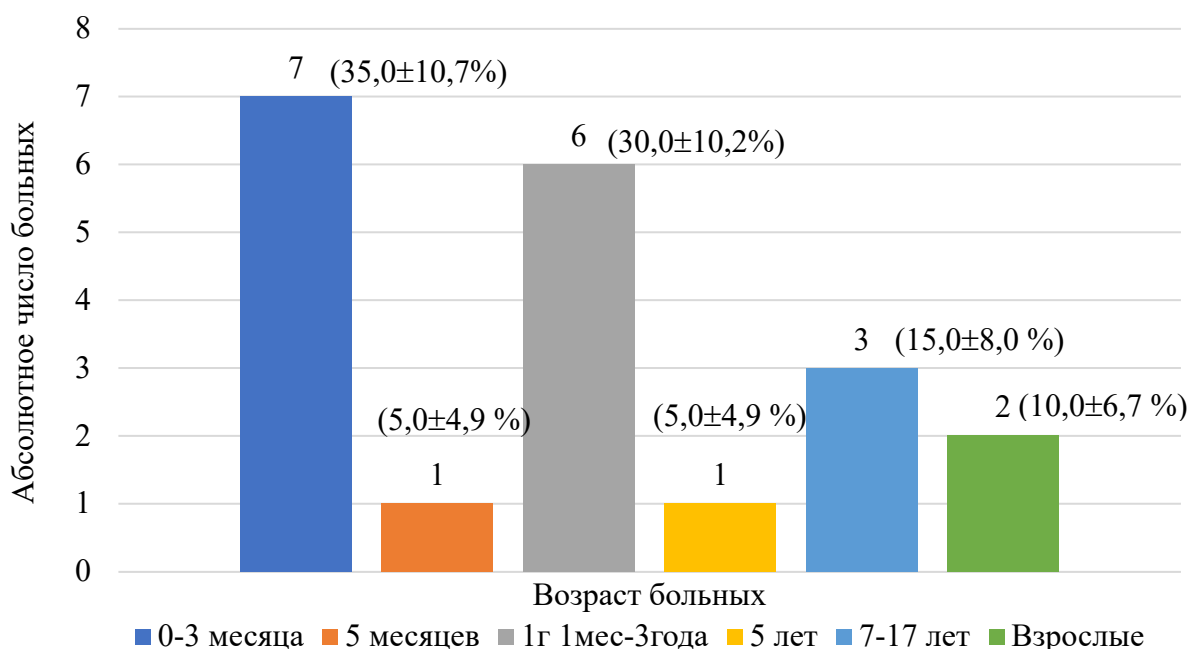


Рисунок 27 - Распределение пациентов по возрастным группам

Как видно из представленного рисунка большинство детей были в возрасте от 1 месяца до 3-х лет – 14 (70,0 ± 10,2 %), в том числе от 0 до 5 месяцев – 8 детей и от 1 г 1 мес до 3-х лет – 6 детей. В остальных возрастных группах заболевание,

возбудителем которого была *B.holmesii*, диагностировалось реже.

Направляющие диагнозы при поступлении в стационар: 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 %) (Рисунок 28).



Рисунок 28 - Диагнозы при поступлении в стационар

В половине случаев клиническая симптоматика вызывала у педиатров и инфекционистов подозрение на коклюш, у остальных больных, в том числе, у 2-х взрослых, была диагностирована ОРВИ.

Анализ эпидемической ситуации в семье показал, что 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. Остальные заболевшие прививки не получили либо в связи с отказом родителей, либо по медицинским противопоказаниям. У взрослых пациентов прививочный анамнез выяснить не удалось.

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*.

При использовании зарегистрированной тест-системы ни в одном случае

B.holmesii не была обнаружена, что привело к неправильной диагностике.

Подходы к оценке тяжести были идентичны коклюшной инфекции. Нами проанализирована тяжесть течения заболевания с учетом указанных параметров (Рисунок 29).



Рисунок 29 - Формы заболевания, вызванного *B.holmesii*

Как демонстрирует рисунок, 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. Несмотря на преобладание детей раннего возраста (70,0 ± 10,2 %), тяжелые формы болезни не зарегистрированы.

Во всех случаях заболевание носило циклический характер: наблюдалась последовательная смена периодов болезни: продромальный период постепенно переходил в период спазматического кашля и далее в период разрешения.

4.1.1. Характеристика легкой формы заболевания, вызванного *B.holmesii*

Как было указано 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

У обследуемых пациентов длительность продромального периода колебалась от 3-х до 11 дней, и в среднем составила $8,94 \pm 0,69$ дней. У всех пациентов мы наблюдали покашливание или непродуктивный кашель, катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей обнаружены у 6 больных, температурная реакция наблюдалась у 5 пациентов, и, как правило, не превышала субфебрильных показателей (Рисунок 30).

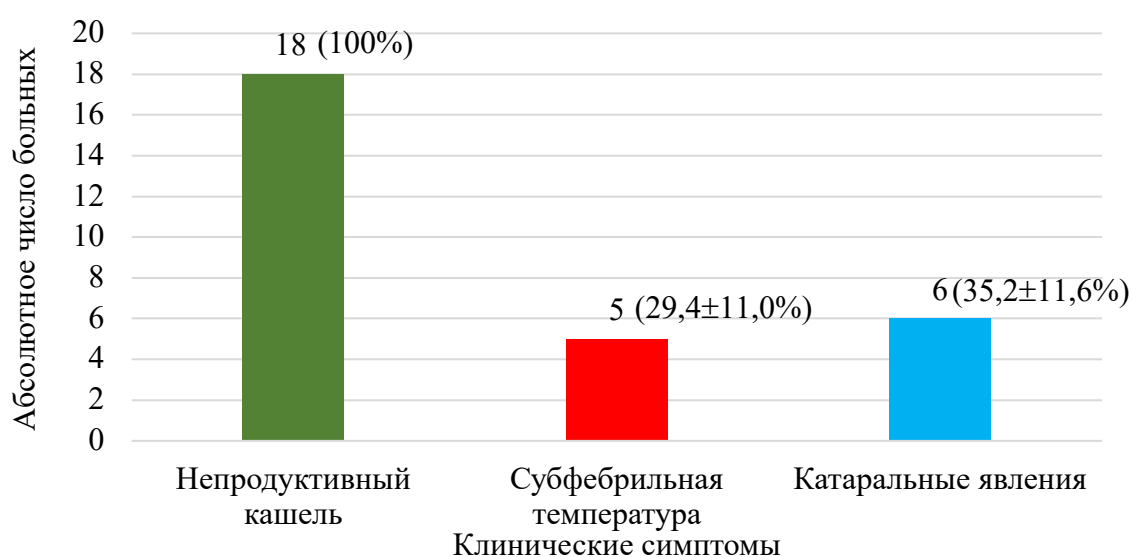


Рисунок 30 - Симптоматика продромального периода при легкой форме заболевания, вызванного *B.holmesii*

Особенностью течения продромального периода при заболевании, вызванном *B.holmesii*, является слабо выраженная симптоматика, которая проявлялась легким непродуктивным кашлем и скудным катаральным синдромом со стороны верхних дыхательных путей.

Спазматический период

Спазматический период характеризовался появлением приступообразного кашля. Симптомы спазматического периода при легкой форме заболевания, вызванного *B.holmesii*, представлены в таблице 27. У большинства пациентов ($94,4 \pm 11,7$ %) приступы кашля были либо единичными, либо не превышали 10 в сутки.

Таблица 27 - 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
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

Приступы кашля сопровождались напряжением лица (88,9 ± 7,4 %), репризами (11,1 ± 7,4 %), оканчивались рвотой (33,3 ± 11,1 %). Как и при коклюше, приступы кашля провоцировались болевой реакцией и эмоциональным напряжением. У 6 (33,3 ± 11,1 %) детей в возрасте до 1 года можно было наблюдать диарейный синдром, который ограничивался явлениями метеоризма и появлением разжиженного стула. У всех наблюдаемых пациентов мы не отмечаем явлений дыхательной недостаточности, геморрагического синдрома, неврологических расстройств, а также нарушений нутритивного

статуса, которые встречаются при коклюше в данной возрастной группе.

Физикальные изменения в легких ограничивались симптомами вздутия. При аускультации легких выслушивалось пуэрильное (везикулярное) или жесткое дыхание.

Рентгенография органов грудной клетки была проведена 10 пациентам. Из них у 3-х ($16,7 \pm 8,8$ %) больных патологических изменений на рентгенограммах не было выявлено. На рентгенограммах 4-х ($22,2 \pm 9,8$ %) больных, как и при коклюше, наряду с эмфиземой отмечали обогащение бронхо – сосудистого рисунка, преимущественно в нижнемедиальных отделах.

У 10 ($55,5 \pm 11,7$ %) пациентов увеличения количества лейкоцитов в анализах периферической крови выявлено не было. Лимфоцитоз (64 % – 77 %) наблюдали у 10 ($55,5 \pm 11,7$ %) больных.

Осложнения со стороны бронхо – легочной системы ограничивались бронхитом, который развивался в связи с присоединением вирусно – бактериальной инфекции.

В целом, сочетанное течение заболевания, вызванного *B.holmesii*, и ОРВИ диагностировано у 11 ($61,1 \pm 11,5$ %) пациентов.

Примером течения легкой формы заболевания, вызванного *B.holmesii*, служит история болезни ребенка К., в возрасте 2-х месяцев жизни. Ребенок из «двойни», от I беременности, протекавшей с плацентарной недостаточностью и задержкой внутриутробного развития. Роды на 39 неделе путем «кесарева сечения». Вес при рождении 2460 г, длина 47 см. Оценка по шкале Апгар 7/8 баллов. С рождения на искусственном вскармливании. Анализ эпидемиологической обстановки в семье выявил контакт со старшим братом 7 лет, у которого наблюдался затяжной кашель. Настоящий больной был направлен на госпитализацию на 14 день болезни с диагнозом: ОРВИ. Пневмония? Из анамнеза известно, что заболевание началось с непродуктивного кашля и затруднения носового дыхания на фоне субфебрильной температуры тела. Мальчик был осмотрен участковым врачом – педиатром, была проведена

антибактериальная (флемоксин солиутаб) и муколитическая терапия. Со слов мамы на 10-й день болезни были отмечены единичные эпизоды кашля, которые стали носить приступообразный характер.

При поступлении состояние ребенка расценено как удовлетворительное. Число приступов кашля не превышало 6 в сутки, единичные приступы сопровождались выталкиванием языка и гиперемией лица. Только один приступ кашля за все время нахождения в стационаре окончился рвотой. Нарушений самочувствия и снижения аппетита у ребенка замечено не было. Наблюдались легкие диспептические явления: разжижение стула и метеоризм.

Физикальные изменения в легких были представлены эмфиземой. При аускультации выслушивалось пуэрильное дыхание. По данным рентгенографии органов грудной клетки патологических изменений не выявлено. На 15 день болезни с помощью разработанной методики выделена ДНК *B.holmesii*. В общем анализе крови на 14-й болезни характерных изменений не обнаружено, на 19-й день болезни – зарегистрирован лимфоцитоз до 73 %. Ребенок получал антибактериальную терапию - азитромицин, 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. На 21 день болезни кашель перестал носить приступообразный характер. Длительность спазматического периода составила 11 дней. На 23 день болезни ребенок был выписан в удовлетворительном состоянии под амбулаторное наблюдение.

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

4.1.2. 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 историй болезни этих детей.

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. Выписан из роддома на 4-е сутки. Находился на грудном вскармливании. В семье у старшего брата с середины мая мы наблюдали затяжной кашель. Из анамнеза известно, что впервые кашель появился во второй декаде июня. Заболевание началось с кашля при нормальной температуре тела и при отсутствии катаральных явлений со стороны верхних дыхательных путей. В течение 3-х дней кашель носил малопродуктивный характер и не влиял на самочувствие и поведение ребенка.

Постепенно 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. Иногда 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 с помощью разработанной методики выделены ДНК *B.holmesii* и *B.pertussis*. В анализе крови на 8 день болезни лейкоцитоз достигал $23,7 \times 10^9$ г/л, лимфоцитоз составил 68 %. Ребенок получал этиотропную, патогенетическую и симптоматическую терапию: азитромицин, гидрокортизон по схеме в убывающих дозировках в течение 7 дней, фенobarбитал-бромизовалкофеин 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 15×10^9 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.

Другим примером ко-инфекции, вызванной *B.holmesii* и *B.pertussis*, служит история болезни ребенка С., 1 месяца жизни. Ребенок от I беременности, протекавшей без особенностей. Родился в срок, с весом 3400 г, длиной 52 см. Оценка по шкале Апгар 8/9 баллов. Находился на грудном вскармливании. Анализ эпидемиологической обстановки выявил у мамы заболевание, сопровождавшееся длительным кашлем. Ребенок поступил в отделение на 14 день болезни с направляющим диагнозом: коклюш? Со слов мамы известно, что заболевание началось с сухого кашля на фоне субфебрильной температуры тела, катаральных явлений замечено не было. Постепенно кашель усиливался и через

6 дней принял приступообразный характер с гиперемией лица, отделением прозрачной мокроты. Количество приступов не превышало 15 в сутки. В связи с нарастающим кашлем мальчик был направлен на госпитализацию.

При поступлении в стационар состояние ребенка расценено как среднетяжелое. Отмечался приступообразный кашель с гиперемией лица, срыгиванием и рвотой после приступов. Отмечалось выталкивание языка при кашле. Частота приступов достигала 17 в сутки. Между приступами кашля самочувствие ребенка не страдало.

Физикальное исследование легких выявило эмфизему. При аускультации дыхание было пуэрильным, хрипы не выслушивались. На рентгенограмме органов грудной клетки отмечалось вздутие легочных полей, сгущение легочного рисунка в нижнемедиальных отделах легких за счет периваскулярных и перибронхиальных изменений. На 14 день болезни с помощью разработанной методики выделены ДНК двух бордетелл - *B.holmesii* и *B.pertussis*. Гематологические изменения на 14 день болезни были представлены лейкоцитозом до $21,1 \times 10^9$ г/л, лимфоцитоз соответствовал 72 %. Проведено лечение: фенobarбитал-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 кислородная терапия. В последующие дни состояние ребенка стало улучшаться, и к 20 дню болезни число приступов кашля не превышало 8 - 10 в сутки. В общем анализе крови лейкоцитоз уменьшился до $14,8 \times 10^9$ г/л, лимфоцитоз вырос до 83 %. С 22 дня болезни кашель перестал носить приступообразный характер. Ребенок был выписан в удовлетворительном состоянии под наблюдение участкового врача педиатра.

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.

4.2. Клиническая характеристика коклюша, вызванного *B.pertussis*

Для разработки дифференциально – диагностических критериев с заболеванием, вызванным *B.holmesii*, в качестве сравнения нами предпринято изучение симптоматики коклюша в современных условиях.

Группу сравнения составили 54 ребенка, переносящих коклюш, госпитализированные в ГБУЗ ИКБ № 1 ДЗМ в возрасте от 1 месяца до 17 лет.

Клинический диагноз коклюша был подтвержден обнаружением ДНК *B.pertussis* методом ПЦР-РВ с использованием зарегистрированной тест-системы и разработанной методики.

Согласно принятой классификации и оценке тяжести, описанной в предшествующем разделе, коклюш протекал в типичных формах. Критерии тяжести коклюша: длительность продромального периода, число приступов кашля, нарушение самочувствия, наличие рвоты, нарушение ритма дыхания, гиперемия или цианоз лица, энцефалические расстройства, геморрагический синдром, явления дыхательной недостаточности. Преобладала среднетяжелая форма, которая составила $57,4 \pm 6,7$ %, 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 (Таблица 28).

Только 1 ребенок в возрасте 5 лет был полностью привит от коклюша по национальному календарю, остальные дети вакцинацию от коклюша не получили. У 48 ($88,9 \pm 4,3$ %) детей был обнаружен источник заболевания в семье, у 6 – выяснить контакт не удалось.

Таблица 28 – Распределение больных коклюшем по возрасту и тяжести заболевания

Возрастная категория	Количество больных	Степень тяжести							
		Тяжелая форма		Среднетяжелая форма		Легкая форма		Атипичная форма	
		абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m	абс.	% ± m
Дети в возрасте 0 - 3 мес.	12	3	—	7	—	2	—	—	—
Дети в возрасте 4 – 6 мес.	13	—	—	9	—	4	—	—	—
Дети в возрасте 7 – 12 мес.	13	—	—	6	—	7	—	—	—
Всего детей до 1 года	38	3	7,9±4,4	22	57,9±8,0	13	34,2±7,7	—	—
Дети в возрасте 1г1мес – 3 года	12	—	—	8	—	4	—	—	—
Дети в возрасте 4 – 6 лет	2	—	—	—	—	2	—	—	—
Дети в возрасте 7 – 17 лет	2	—	—	1	—	1	—	—	—
Всего детей старше 1 года	16	—	—	9	—	7	—	—	—
ИТОГО	54	3	5,5±3,1	31	57,4±6,7	20	37,0±6,6	—	—

4.2.1. Характеристика легкой формы коклюша

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

Продромальный период

Длительность продромального периода колебалась от 5 до 11 дней, и в

среднем составила $7,9 \pm 0,61$ дней. У всех детей в продромальном периоде болезни присутствовал кашель. Температура поднималась до субфебрильных цифр у 5 ($25,0 \pm 9,7$ %) детей. Нарушение самочувствия и катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей были отмечены у 2-х ($10,0 \pm 6,7$ %) детей (Рисунок 31).

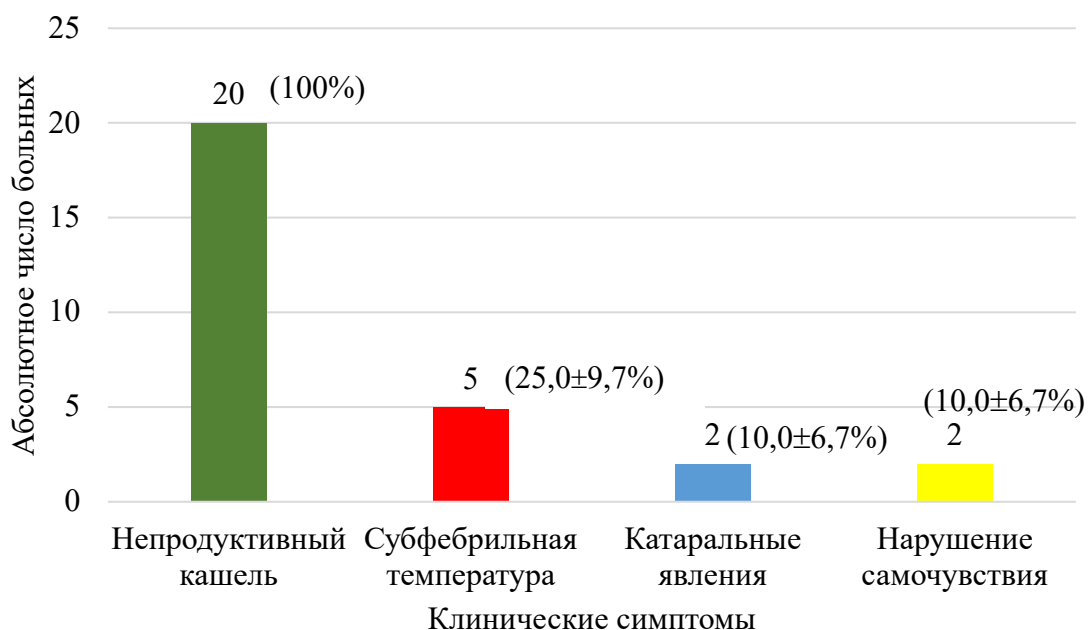


Рисунок 31 - Симптоматика продромального периода при легкой форме коклюша

Следовательно, у всех детей продромальный период при типичном легком коклюше характеризовался незначительным нарушением самочувствия, непродуктивным кашлем и слабой выраженностью катаральных явлений со стороны верхних дыхательных путей. Субфебрильная температура отмечена у $\frac{1}{4}$ заболевших.

Спазматический период

В спазматическом периоде появлялся приступообразный кашель с отделением прозрачной вязкой мокроты (Таблица 29).

Таблица 29- 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):		
• пуэрильное	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
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

Частота приступов кашля варьировала от 4 до 15 в сутки. Во всех случаях кашель сопровождался гиперемией лица. Репризы отмечались у 11 (55,0 ± 11,1 %) пациентов. У 14 (70,0 ± 10,2 %) детей приступы кашля оканчивались рвотой. Болевые ощущения, эмоциональное напряжение, кормление и физическая нагрузка провоцировали появление приступов кашля. На высоте спазматического периода у детей наблюдалась вялость, снижение аппетита. В межприступный период самочувствие не нарушалось. У всех наблюдавшихся детей проявлений геморрагического синдрома (кровоизлияния в склеры,

носовые кровотечения, петехиальные высыпания в верхней части туловища), неврологических расстройств отмечено не было.

При аускультации легких выслушивалось пуэрильное (везикулярное) или жесткое дыхание. Физикальные изменения в легких ограничивались вздутием легочной ткани.

Рентгенография органов грудной клетки была проведена 15 ($75,0 \pm 9,7$ %) детям: у 8 ($40,0 \pm 10,9$ %) пациентов наблюдалось усиление бронхо - сосудистого рисунка в нижнемедиальных зонах, перибронхиальные и периваскулярные изменения в нижнемедиальных зонах зафиксированы у 6 ($30,0 \pm 10,2$ %) детей, и только у 3-х ($15,0 \pm 7,8$ %) детей рентгенография органов грудной клетки не выявила каких-либо изменений.

У 16 ($80,0 \pm 8,9$ %) детей наблюдались характерные изменения со стороны периферической крови: лейкоцитоз с лимфоцитозом был выявлен у 7 ($35,0 \pm 10,7$ %) пациентов, максимальные уровни лейкоцитов достигали $27,5 \times 10^9/\text{л}$, у 6 ($30,0 \pm 10,2$ %) детей зафиксирован лимфоцитоз без лейкоцитоза, лейкоцитоз без изменений в соотношении форменных элементов крови был выявлен у 3-х ($15,0 \pm 7,8$ %) больных. У 4-х ($20,0 \pm 8,9$ %) детей характерных сдвигов в показателях периферической крови не наблюдалось.

Осложненное течение коклюша наблюдалось у 2-х ($10,0 \pm 6,7$ %) детей, переносящих бронхит с бронхообструктивным синдромом I степени.

Почти у половины больных ($45,0 \pm 11,1$ %) наблюдалось сочетанное течение коклюша и ОРВИ.

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

4.2.2. Характеристика среднетяжелой формы коклюша

Среднетяжелая форма имела место у 31 ($57,4 \pm 6,7$ %) ребенка. Из них 7

детей были в возрасте от 0 до 3-х месяцев, 9 – 4 - 6 месяцев, 6 – 7 – 12 месяцев, 8 – 1 – 3 года, 1 ребенок – 7 лет.

Продромальный период

Длительность продромального периода при среднетяжелой форме была короче, чем при легкой, колебалась от 4 до 12 дней, и в среднем составила $6,9 \pm 0,41$ дней. Основным синдромом в продромальном периоде был непродуктивный кашель, который редко сопровождался повышением температуры тела ($25,8 \pm 7,8$ %) и катаральными явлениями ($19,3 \pm 7,1$ %). Самочувствие было нарушено у 8 ($25,8 \pm 7,8$ %) пациентов (Рисунок 32).

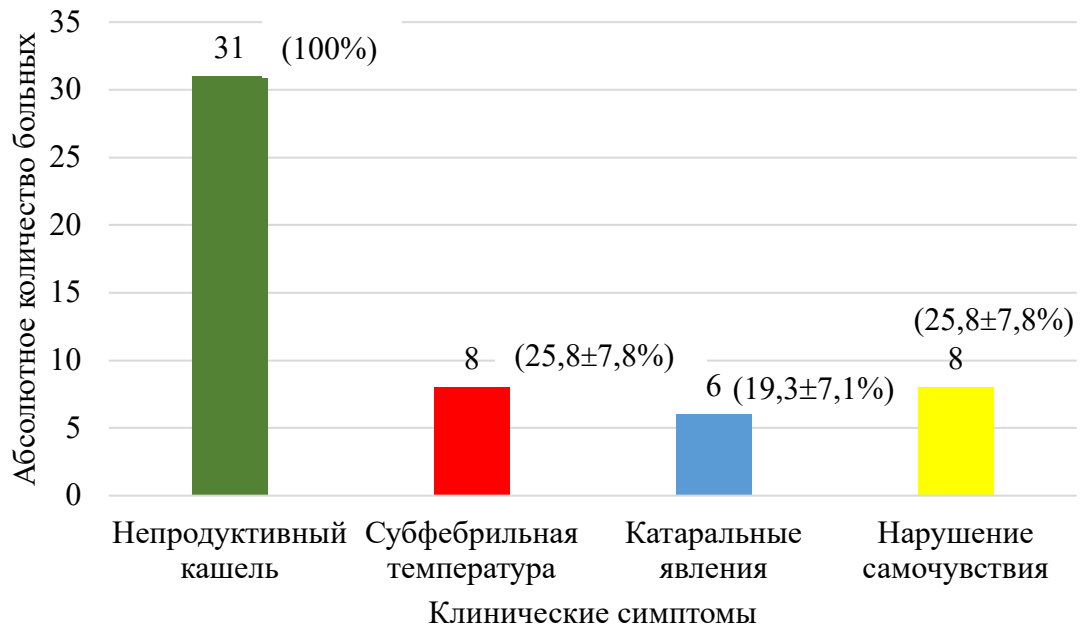


Рисунок 32 - Симптоматика продромального периода при среднетяжелой форме коклюша

Как мы видим, единственным отличием продромального периода при среднетяжёлой форме была его длительность. Все остальные проявления не отличались от течения этого периода при легкой форме коклюша.

Спазматический период

Спазматический период отличался частыми приступами кашля, число которых достигало 25 в сутки. Чаше, чем при легкой форме ($87,1 \pm 6,0$ %), наблюдалось нарушение самочувствия у детей вне приступов кашля и снижение

нутритивного статуса. У большинства детей ($71,0 \pm 8,1$ %) приступы кашля оканчивались рвотой. Репризы, которые до настоящего времени являются одним из основных характерных симптомов коклюша, наблюдались чаще, чем при легкой форме ($93,5 \pm 4,4$ % случаев). Приступы кашля, как правило, были затяжными, сопровождались багровением или цианозом лица ($3,2 \pm 3,2$ % и $29,0 \pm 8,1$ % соответственно) (Таблица 30).

Таблица 30 - 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

Перкуторные изменения в легких у всех детей (100 %) были представлены эмфиземой. Аускультативные изменения в легких либо отсутствовали, либо ограничивались жестким дыханием ($51,6 \pm 9,0$ %).

Рентгенологическое обследование органов грудной клетки проведено 14 ($45,2 \pm 8,9$ %) детям. Только у 3-х ($9,7 \pm 5,3$ %) пациентов на рентгенограммах не было выявлено патологических изменений. У 10 ($32,2 \pm 8,4$ %) зафиксировано обогащение бронхо – сосудистого рисунка в нижнемедиальных зонах, более интенсивное справа, у 3-х ($9,7 \pm 5,3$ %) детей – перибронхиальные и периваскулярные изменения в нижнемедиальных зонах.

Характерные для коклюша изменения со стороны периферической крови (лейкоцитоз за счет увеличения числа лимфоцитов) – обнаружены у 19 ($61,3 \pm 8,7$ %) больных, причем у 17 ($54,8 \pm 8,9$ %) детей лейкоцитоз был выше $20 \times 10^9/\text{л}$. У 7 ($22,6 \pm 7,5$ %) пациентов выявлен лимфоцитоз при нормальных показателях числа лейкоцитов, у 1-го ребенка зафиксирован изолированный лейкоцитоз без изменения соотношения форменных элементов крови. У 4-х ($12,9 \pm 6,0$ %) детей отклонений от нормы в анализах периферической крови не обнаружено.

Бронхолегочные осложнения зарегистрированы у 7 ($22,6 \pm 7,5$ %) детей: из них у 5 ($16,1 \pm 6,6$ %) – бронхит, у 1-го ($3,2 \pm 3,2$ %) – бронхобронхиолит и у 1-го ($3,2 \pm 3,2$ %) – пневмония.

Сочетанное течение коклюша и острой респираторной инфекции диагностировали у 14 ($45,2 \pm 8,9$ %) детей, у 1-го ребенка выявлено сочетание коклюша с герпетической инфекцией, у 1-го ребенка – с цитомегаловирусной инфекцией.

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.

4.2.3. Характеристика тяжелой формы коклюша

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

Продромальный период

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.

Следовательно, прогностическим неблагоприятным фактором развития тяжелой формы является укорочение длительности продромального периода, других существенных отличий от среднетяжелой и легкой форм коклюша нами не отмечено.

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 бронхолита (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.

Следовательно, 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.

4.3. 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, вызванным *B.holmesii*, II группу – 20 больных коклюшем (Таблица 31).

Таблица 31 - Возрастной состав обеих групп

Возраст	Заболевание, вызванное <i>B.holmesii</i> (I-я группа)		Коклюш (II-я группа)	
	abc.	% ± m	abc.	% ± m
0 - 3 месяца	5	—	2	—
4 - 6 месяцев	1	—	4	—
7 - 12 месяцев	—	—	7	—
Итого до 1 года	6	33,3±11,1	13	65,0±10,7

Продолжение таблицы 31

Возраст	Заболевание, вызванное <i>B.holmesii</i> (I-я группа)		Коклюш (II-я группа)	
	abc.	% ± m	abc.	% ± m
1 год 1 месяц - 3 года	6	—	4	—
4 - 6 лет	1	—	2	—
7 - 17 лет	3	—	1	—
Взрослые	2	—	—	—
Итого старше 1 года	12	66,7±11,1	7	35,0±10,7
Всего	18	—	20	—

Существенным отличием было увеличение частоты легкой формы среди детей в возрасте 0 – 3 месяцев в I группе по сравнению со II-й ($27,8 \pm 10,5$ % и $10,0 \pm 6,7$ % соответственно), что может свидетельствовать о более легком течении заболевания, вызванного *B.holmesii*, по сравнению с коклюшем, при котором легкая форма в данной возрастной группе встречается редко.

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 32).

Таблица 32 - Симптомы продромального периода в обеих группах больных

Симптомы	I-я группа		II-я группа		p
	abc.	% ± m	abc.	% ± 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 спазматического периода при заболевании, возбудителем которого была *B.holmesii*, и коклюше была идентичной и соответствовала типичной легкой форме. Однако тяжесть клинических проявлений была различной (Таблица 33).

Таблица 33 - 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):					
• пуэрильное	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	—

Так, при заболевании, вызванном *B.holmesii*, число приступов кашля в $94,4 \pm 11,7$ % случаев не превышало 10 в сутки, и только у 1-го больного количество приступов достигало 15 в сутки. Напротив, при коклюше в $60,0 \pm 10,9$ % случаев регистрировалось от 11 до 15 приступов за сутки.

Такой характерный симптом как репризы отмечались у 11 пациентов с коклюшем и только у 2-х пациентов с заболеванием, возбудителем которого была *B.holmesii*, ($55,0 \pm 11,1$ % и $11,1 \pm 7,4$ % случаев соответственно), ($p < 0,001$).

Приступы кашля оканчивались рвотой только у 6 ($33,3 \pm 11,1$ %) больных I-й группы, в то время как во II-й группе рвота после приступов отмечалась у 14 ($70,0 \pm 10,2$ %) пациентов, ($p < 0,001$).

Нарушение самочувствия и снижение аппетита регистрировалось в $16,7 \pm 8,8$ % случаев при заболевании, вызванном *B.holmesii*, тогда как при коклюше – в $40,0 \pm 10,9$ % случаев, ($p < 0,05$).

Как и при коклюше, при заболевании, возбудителем которого была *B.holmesii*, физикальные изменения в легких ограничивались эмфиземой. У большинства больных обеих групп дыхание было либо пуэрильным, либо везикулярным ($66,6 \pm 10,9$ % и $55,0 \pm 10,4$ % соответственно) и реже жестким, хрипы не выслушивались. Проявлений дыхательной недостаточности не отмечено.

При рентгенологическом обследовании органов дыхания у $40,0$ % больных обеих групп выявлялись на фоне обогащения бронхо – сосудистого рисунка перибронхиальные и периваскулярные изменения в нижнемедиальных зонах.

При анализе показателей периферической крови у $55,5 \pm 11,7$ % больных I группы и у $30,0 \pm 10,2$ % - II группы увеличения количества лейкоцитов зафиксировано не было, ($p < 0,001$).

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.

Резюме. 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. Несмотря на то, что симптоматика описанного заболевания схожа с коклюшем, она имеет ряд своих особенностей. Так, легкие формы при заболевании, вызванном *B.holmesii*, регистрировались чаще, чем при коклюше ($90,0 \pm 6,7$ % против $37,0 \pm 6,6$ %). Клинические проявления легких форм были менее выраженные, приступы кашля, хотя, и характеризовались типичными проявлениями, такими как напряжение лица, отделение прозрачной вязкой мокроты, наличие репризов и рвоты, не вызывали утомления больных. Физикальные изменения в легких были скудными. Редко наблюдалась тенденция к лейко – лимфоцитозу. В описанных нами среднетяжелых формах заболевания, вызванного *B.holmesii*, была зарегистрирована ко-инфекция *B.holmesii* + *B.pertussis*, что несомненно приводило к утяжелению клинической картины. У пациентов регистрировались явления дыхательной недостаточности, учащались приступы кашля, и у детей раннего возраста наблюдались нарушения нутритивного статуса. Следовательно, заболевание, вызванное *B.holmesii*, в большинстве случаев сложно диагностируется, оперируя только клинической картиной. Для окончательного диагноза необходимо проведение лабораторного исследования с выявлением ДНК возбудителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на более чем 300-летнюю историю с момента первого описания клинической картины и более чем 60-летнюю успешную массовую иммунизацию детского населения, коклюшная инфекция остается актуальным инфекционным заболеванием во всем мире [58, 59, 60, 72, 75, 76, 93, 134, 136, 181, 201, 204, 215]. Заболеваемость регистрируется не только среди детей, но и взрослых [22, 24, 34, 79, 97, 108, 112, 121, 123, 130, 131, 152, 171, 179, 209, 213, 216]. Высокую заболеваемость коклюшем зарубежные исследователи объясняют отказами от вакцинации, утратой иммунитета, внедрением генодиагностики, генотипической изменчивостью возбудителя [52, 62, 63, 64, 65, 77, 147, 168, 208], а также, что отмечается в последние 10 лет, появлением других бордетелл, в том числе *B.holmesii*, которые могут вызвать коклюшеподобные заболевания, против которых не формируется иммунитет коклюшными вакцинами [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 164, 195].

В России на фоне более 95,0 % охвата профилактическими прививками отмечается рост заболеваемости коклюшем, в том числе у детей до 1 года и старших возрастных групп [9, 40]. Регистрируются заболевания привитых детей и взрослых, среди которых широкое распространение получили труднодиагностируемые легкие и атипичные стертые формы болезни [2, 13, 23, 30, 33, 34, 39]. Следовательно, можно полагать, что в РФ сохраняются и общемировые тенденции развития эпидемического процесса коклюшной инфекции.

B.holmesii является интересным объектом изучения. Она была впервые описана только в 1983 г. как возбудитель эндокардита и септицемии [157, 185, 212], причем с клинической картиной от подострого эндокардита до септического шока с острой почечной недостаточностью [56, 113, 156, 185]. По мере изучения этого микроорганизма, была доказана его этиологическая роль в развитии пневмонии, перикардита, менингита, артрита, целлюлита и

дисцита [162, 163], что может говорить о возможностях этого микроорганизма вызывать полиорганные поражения. Интересным является и то, что у многих пациентов с заболеваниями не респираторного тракта, наблюдались симптомы со стороны верхних дыхательных путей, что дает возможность предположить, что наличие тяжелых заболеваний неинфекционной природы способствует, в какой-то мере, возможности реализации инфекционного процесса, вызванного подобными видами микроорганизмов. С другой стороны, благоприятным признаком является тот факт, что ни в одном из исследований, посвященных *B.holmesii*, не было описано смертельных исходов [162, 163, 180, 186].

Спустя практически десять лет, начиная с 1995 г., *B.holmesii* стала ассоциироваться не только с вышеописанными патологиями, но и с коклюшеподобным заболеванием [174, 218, 219]. Случаи коклюшеподобного заболевания, вызванного *B.holmesii*, за последние десять лет зарегистрированы на территории практически всех континентов [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 145, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 164]. В России до настоящего исследования отсутствовали данные о распространенности заболевания, вызванного *B.holmesii*.

Одним из важных аспектов проблемы коклюша является лабораторная диагностика. Большое распространение труднодиагностируемых форм болезни, какими являются легкие и атипичные стертые формы, ставят перед исследователями и практическими специалистами задачи по изысканию новых лабораторных методов диагностики и внедрение их в повседневную практику лабораторий.

Применение молекулярно-генетических методов показало свою несомненную эффективность в диагностике коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами. К настоящему времени разработано большое количество диагностических мультиплексных ПЦР-РВ тест-систем с идентификацией разных представителей рода *Bordetella* [18, 36, 42, 66, 103, 116, 124, 125, 145, 182, 188, 190]. В основу их разработки было предложено

использование самых разнообразных мишеней. Однако имеющиеся ограничения в использовании различных ДНК-мишеней до сих пор препятствуют созданию единого методологического подхода в ПЦР-диагностике.

Первые многоцентровые исследования по эффективности идентификации разных бордетелл были проведены в Европе только в 2011 году и показали высокую эффективность выявления ДНК *B.pertussis*, но 58,0 % лабораторий ошибочно идентифицировали ДНК *B.holmesii* как ДНК *B.pertussis*. Установленный факт способствовал усилению надзора за эффективностью выявления разных бордетелл в Европейском регионе [57, 74, 107, 154]. Аналогичный мониторинг был проведен и в США в 2012 г. и после усиления надзора уже к 2016 г. 72,0 % и 79,0 % лабораторий смогли дифференцировать *B.pertussis* и *B.holmesii* [189]. В России разработано несколько вариантов методик генодиагностики коклюша [5, 6, 12, 14, 15, 20, 21, 27, 36, 42]. Однако, все они позволяют выявлять ДНК *B.pertussis*, и только единственная зарегистрированная тест-система выявляет еще и ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.bronchiseptica*, но не идентифицируют ДНК *B.holmesii*. Кроме того, до настоящего времени не было проведено анализа качества внедрения и эффективности применения ПЦР-диагностики коклюша на территории РФ.

Поэтому, с учетом появления большого количества сведений о циркуляции *B.holmesii* и вызванных ее коклюшеподобных заболеваниях в различных странах мира, целью диссертационной работы была разработка методики генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в том числе с выделением *B.holmesii*, оценка выявления этого возбудителя и характеристика особенностей клинического течения заболевания по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*.

На первом этапе мы провели анализ анкетированных данных, полученных из лабораторий субъектов РФ, для оценки практической

значимости метода ПЦР в диагностике коклюшной инфекции в России, в том числе эффективности его применения при обследовании больных, госпитализированных с подозрением на коклюш, и установления перспектив совершенствования генодиагностики. Проведенный анализ состояния ПЦР-диагностики продемонстрировал положительную динамику ее внедрения при обследовании пациентов с подозрением на коклюш на территории практически всех субъектов страны. За анализируемый период в большинстве случаев была выделена ДНК *B.pertussis*, но в тоже время 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. Однако, наличие последнего факта не позволяет зафиксировать лабораторное подтверждение диагноза. Нами, на примере обследования пациентов в одном стационаре, являющимся профильным для госпитализации больных с подозрением на коклюш, проведен анализ эффективности применения ПЦР-диагностики. Установлено, что лабораторное подтверждение диагноза с помощью ПЦР-диагностики в практических условиях получено в 82,3 % случаев, однако в 17,7 % случаев клинический диагноз был установлен без лабораторного подтверждения. Данные отрицательные результаты, могут быть связаны как со сроками проведения обследования (более 4 недели от начала болезни), возможными нарушениями на этапе взятия и транспортировки клинического материала, так и наличием у этой группы пациентов заболеваний, обусловленных другими бордетеллами. Полученные данные коррелируют с данными мониторинговых исследований, опубликованных зарубежными учеными [92, 99, 103, 116, 135, 154, 174, 188]. Вместе с тем, полученные результаты послужили основанием для совершенствования генодиагностики в направлении расширения возможностей идентификации разных видов бордетелл.

С целью совершенствования генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, нами разработана методика генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР-РВ для выявления и

дифференциации ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* в биологическом материале. Исходя из данных литературы о спектре используемых ДНК-мишеней и предложенных ранее методиках [91, 92, 99, 103, 116, 125, 135, 144, 145, 164, 170, 174, 175, 188, 190, 193, 197, 217], в том числе и выявленных авторами ограничений, нами были выбраны следующие мишени - фрагменты трех инсерционных элементов - IS481 (для *B.pertussis* и *B.holmesii*), hIS1001 (специфичный для *B.holmesii*), IS1001 (специфичный для *B.parapertussis*) и фрагмент гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина, (специфичный для *B.pertussis*). Конструирование праймеров проводили с помощью программного обеспечения и соблюдением требований, необходимых для достижения высокой чувствительности и специфичности методики. Первый этап разработанной методики заключается в проведении мультиплексной ПЦР-РВ с праймерами hIS1001F / hIS1001R, IS481F / IS481R и IS1001F / IS1001R и зондами hIS1001P, IS481P и IS1001P с детекцией флуоресценции по трем каналам, позволяющей идентифицировать ДНК *B.holmesii*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.pertussis*. Вместе с тем последовательность IS481R имеется в высокой копииности в геноме *B.pertussis* и в единичных копиях в геноме *B.holmesii* [141, 161, 170, 210, 211]. Поэтому для подтверждения наличия в биологическом материале ДНК *B.pertussis* все образцы, в которых получен положительный сигнал по этой мишени, изучаются на втором этапе - в моноплексной ПЦР-РВ с праймерами на целевой фрагмент гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина. По данным зарубежной литературы [81, 118, 145], в некоторых исследованиях был зафиксирован факт возможности наличия ко-инфекции *B.holmesii* и *B.pertussis*. Поэтому введение на втором этапе методики проведения моноплексной ПЦР-РВ позволяет не только подтвердить выделение ДНК *B.pertussis*, но и установить еще и наличие ко-инфекции. Таким образом, используя двушаговый подход, предложены подробные алгоритмы интерпретации результатов для выявления феномена наличия не

только моноинфекции, но и ко-инфекции *B.holmesii* + *B.pertussis* и *B.holmesii* + *B.parapertussis*.

Оценку аналитической надежности разработанной методики осуществляли с использованием контрольных типовых штаммов, свежевыделенных штаммов бордетелл и коллекции ДНК микроорганизмов различных родов с определением аналитической чувствительности и специфичности. Проведенное исследование показало, что аналитическая чувствительность разработанной методики была оптимальной при использовании двух наборов «Проба-ГС-плюс» (ООО «ДНК-технология», Россия) и «РИБО—преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) и составила 5×10^1 ГЭ / мл; аналитическая специфичность, сходимость и воспроизводимость результатов – 100 %.

Далее была проведена апробация разработанной методики на клинических образцах. Учитывая отсутствие на территории РФ тест-системы, позволяющей идентифицировать *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*, оценку диагностических критериев возможно было провести только с использованием зарегистрированной тест-системы «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) по идентификации двух бордетелл - ДНК *B.pertussis* и ДНК *B.parapertussis*. Апробация проведена на 845 пробах биологического материала, полученных от больных с подозрением на коклюш, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ», а также на образцах, присланных из Управления Роспотребнадзора по Воронежской области и ФБУЗ ЦГиЭ в Воронежской области. Для исключения лабораторных ошибок постановок исследование проводилось в три этапа с изучением всех дискордантных образцов. Полученные результаты показали, что при сравнении двух методик общий конкорданс составил 96,4 %, дискордантными были 3,6 % образцов.

Далее нами проведена оценка ее валидности в соответствии с стандартной процедурой расчета всех необходимых показателей и

использованием программного обеспечения, которая показала, что разработанная методика генодиагностики обладает 98,8 % чувствительностью, 99,2 % специфичностью и 99,0 % диагностической эффективностью.

Кроме того, данное исследование позволило впервые провести скрининг и оценить выявляемость *B.holmesii* среди госпитализированных больных. Так, впервые установлено, что на территории РФ распространенность 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.

Для достоверности полученных результатов все положительные образцы, содержащие ДНК *B.holmesii*, были подтверждены в трех разных методах – с помощью изотермической амплификации [160], экспериментальной серии «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (ООО «ДНК-Технология», Россия), а также секвенирования. Учитывая малый объем исходной матрицы для осуществления секвенирования фрагментов ДНК, нами была разработана nested-ПЦР с двумя парами праймеров, которые были предварительно сконструированы. Полученные результаты секвенирования были сопоставлены с опубликованными геномными последовательностями и соответствовали геному штамма *B.holmesii* (<https://genomes.atcc.org/genomes/21914c98efc44cfa>).

Клиническая картина «классического» коклюша, вызванного *B.pertussis*, была подробно изучена несколькими поколениями инфекционистов в нашей стране [1, 2, 3, 4, 26, 28, 29, 35, 38]. Подробно описаны особенности клинической картины как у детей, так и взрослых [3, 4, 30, 33, 34]. Однако, учитывая отсутствие генодиагностики и возможность выявления *B.holmesii*, подробное описание клинической картины заболевания, вызванного этим

возбудителем, которое позволяло бы проводить дифференциальную диагностику с коклюшем, вызванным *B.pertussis*, до настоящего исследования не проводилось. Зарубежом, несмотря на большое количество работ, посвященных распространению *B.holmesii*, только в ряде работ представлена клиническая картина заболевания, вызванного этим возбудителем. Однако, не были описаны дифференциально - диагностические критерии этого заболевания по сравнению с коклюшем. В проведенном исследовании нами впервые представлен подробный разбор клинической картины этого заболевания, и описаны дифференциально-диагностические критерии в отличие от «классического» коклюша.

Анализ клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii*, подтвердил его коклюшеподобный характер. Отмечается цикличность течения, появление приступообразного кашля на фоне нормальной температуры тела, слабых катаральных явлений и скудных физикальных изменений в легких, аналогичная рентгенологическая картина органов дыхания и тенденция к лейко-лимфоцитозу. Показано, что основной формой тяжести коклюшеподобного заболевания является типичная легкая форма ($90,0 \pm 6,7 \%$). Среднетяжелая форма диагностирована только в случаях ко-инфекции с коклюшем.

Несмотря на то, что симптоматика описанного коклюшеподобного заболевания схожа с коклюшем, выраженность ее легче. 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.

Следовательно, заболевание, вызванное *B.holmesii*, в большинстве случаев сложно диагностируется, оперируя только клиникой. Для верификации необходимо проведение лабораторного исследования с выявлением ДНК этого возбудителя.

Проведенное исследование показало перспективность направления изучения разных видов бордетелл, являющихся возбудителями коклюшеподобных заболеваний в современный период.

Анализируемые данные литературы свидетельствуют о том, что в развитии этого направления в мире остается еще много не изученных вопросов. Биологические свойства и патогенный потенциал *B.holmesii* еще недостаточно изучены и, можно говорить, что находится еще в начальной стадии [162, 163]. Хотя уже в настоящее время зарубежные исследователи констатировали тот факт, что этот микроорганизм появился в процессе эволюции рода *Bordetella* и, несмотря на то, что имеет около 400 уникальных генов, значительную часть генов приобрел в процессе горизонтального переноса и, в большинстве случаев, от *B.pertussis*, с которым имеет сходимость 99,5 % по 16S рРНК [71, 80, 191]. Кроме того, было установлено, что в геноме *B.holmesii* имеется остров патогенности, идентичный *B.pertussis*, необходимый для «запуска» патогенеза заболевания, а также факторы, усиливающие колонизацию дыхательных путей [80]. На основании этого можно предположить, что не только генотипическая изменчивость *B.pertussis*, но и *B.holmesii* могли появиться в результате многолетнего селективного давления массовой иммунизации коклюшными вакцинами.

Кроме того, как первоначально было описано [157, 180, 185, 186, 212], *B.holmesii* способна циркулировать в крови, что в свою очередь, свидетельствует о ее расширенных адаптационных биологических свойствах и возможности вызывать инфекции кровотока.

Первые данные по возникновению генотипической изменчивости основных детерминант патогенности *B.pertussis* появились в середине 1990-х годов и в этот же период было первое описание *B.holmesii*, как возбудителя коклюшеподобного заболевания [218]. Ранее у исследователей не было возможностей широкой идентификации этого возбудителя вследствие недостаточности знаний о его генотипических особенностях, поэтому

повышенное внимание к нему появилось с развитием генодиагностики в последнее десятилетие и продолжает развиваться.

Еще одним интересным моментом, свидетельствующем о необходимости развивать это направление является то, что исследования, проведенные на модели мышей [219], показали неполноценность иммунного ответа, сформированного цельноклеточной (wP) и бесклеточной (aP) коклюшными вакцинами, против *B.holmesii*. Учитывая установленную повсеместную циркуляцию *B.holmesii* и вызываемые ей коклюшеподобные заболевания [48, 81, 91, 103, 117, 118, 144, 145, 150, 151, 153, 158, 162, 163, 164], а также еще недостаточный уровень диагностики и ее идентификации, в отличие от *B.pertussis*, можно предположить, что этот факт является причиной снижения эффективности вакцинации против коклюша и причиной заболеваемости привитых лиц, регистрации легких и стертых форм, но, с другой стороны, раскрывает перспективы создания вакцин нового поколения, способных создать полноценный противокклюшный иммунитет ко всем бордетеллам в популяции человека.

Таким образом, разработанная методика генодиагностики позволяет расширить возможности лабораторной диагностики с целью повышения эффективности лабораторного подтверждения диагноза у больных с подозрением на коклюш в нашей стране. Проведенный скрининг с помощью разработанной методики показал, что на территории РФ, также как и в других странах мира, *B.holmesii* является возбудителем коклюшеподобного заболевания и среди госпитализированных пациентов встречается в 2,3 % случаев, а также может встречаться в виде ко-инфекции с *B.pertussis* и *B.parapertussis*. Полученные результаты дополняют знания о повсеместной циркуляции микроорганизмов данного вида. Проведенное исследование является первым шагом в изучении *B.holmesii*, как возбудителя коклюшеподобного заболевания, на территории РФ и требует дальнейшего развития.

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 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
КТ	— коклюшный токсин
КТА	— кровяно-теллуритовый агар
м.к.	— микробная клетка
МР, МУ, МУК	— методические рекомендации, методические указания
п.н.	— пара нуклеотидов
РА	— реакция агглютинации
РНГА	— реакция непрямой гемагглютинации
РПГА	— реакция пассивной гемагглютинации
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	— ПЦР в режиме реального времени
РИФ	— реакция иммунофлюоресценции
СКРС	— сыворотка крупного рогатого скота
СП	— санитарно-эпидемиологические правила
ФГА	— филаментозный гемагглютинин
<i>16SrRNA</i>	— ген, кодирующий рибосомальную РНК
CDC	— Centers for Disease Control and Prevention, Центры по контролю и профилактике заболеваний
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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабаченко, И.В. Клинико-лабораторные особенности коклюшной инфекции у детей в современных условиях: дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.10, 03.00.07 / Бабаченко Ирина Викторовна. - СПб., 2007. - 332 с.
2. Бабаченко, И.В. Клинико-эпидемиологические аспекты коклюша у детей в условиях массовой вакцинопрофилактики / И.В. Бабаченко, Ю.В. Нестерова, Ю.Ю. Чернышова, В.В. Карасев, Л.М. Починяева, Е.Л. Калисникова // Журнал Инфектологии. – 2019. – Т. 11, № 2. – С. 88-96.
3. Бабаченко, И.В. Коклюш у детей / И.В. Бабаченко, С.М. Харит, Н.Н. Курова, Г.Я. Ценева. - М.: Комментарий, 2014. - 176 с.
4. Борисов, А.С. Коклюш и паракоклюш в современной практике участкового педиатра / А.С. Борисов, Е.С. Цуканова, О.В. Гурович, Е.В. Пухова, Н.А. Степанищева, Ю.В. Мешкова, Г.Г. Волосовец, В.С. Кузнецова, Е.А. Усачева // Вестник научных конференций. – 2017. – Т. 1-1, № 17. – С. 34-36.
5. Борисова, О. Ю. Молекулярно-генетические особенности структуры генов патогенности возбудителей коклюша и дифтерии; совершенствование лабораторной диагностики при этих инфекциях: дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.07 / Борисова Ольга Юрьевна. - М., 2009. - 293 с.
6. Борисова, О.Ю. Прямой ускоренный метод выявления возбудителя коклюша / О.Ю. Борисова, М.С. Петрова, Н.Т. Гадуа, В.Г. Скачкова, В.С. Савинкова, О.П. Попова, И.К. Мазурова, А.В. Алешкин // Клиническая лабораторная диагностика. - 2010. - № 5. - С. 53-55.
7. Брико, Н.И., Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней / Н.И. Брико, Г.Г. Онищенко, В.И. Покровский. – М.: ООО «Издательство Медицинское информационное агентство», 2019. – Т. 1 – С. 354-378.
8. ГОСТ Р 53022.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность). - Введ. 2010-01-01.- М.: Стандартинформ,

2009. - 31 с.
9. О состоянии санитарно - эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. – М.: Роспотребнадзор, 2020. – 299 с.
 10. Грачева, Н.М. Коклюш (клиника, диагностика, лечение): методические рекомендации / Н.М. Грачева, Н.А. Малышев, М.С. Петрова, О.П. Попова, О.Ю. Борисова, Е.И. Келли, Е.Н. Абрамова. - М.: Департамент здравоохранения города Москвы, 2009. - 26 с.
 11. Диагностика коклюша и паракоклюша: методические рекомендации МР 3.1.2.0072-13: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 24.05.2013. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. - 56 с.
 12. Елькина, М.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в диагностике и эпидемиологическом надзоре за коклюшем и дифтерией / М.А. Елькина, С.Б. Яцышина // Молекулярная диагностика 2018: сб. тр. Междунар. науч.-практ. конф. – Минск: ГП «СтройМедиаПроект», 2018. – С. 134-136.
 13. Йозефович, О.В. Распространенность коклюша у длительно кашляющих детей 6–17 лет, привитых в раннем возрасте АКДС-вакциной / О.В. Йозефович, С.М. Харит, С.П. Каплина, В.В. Гостев, С.В. Сидоренко, О.С. Калиногородская, А.С. Кветная, Е.В. Тимофеева, М.В. Окунева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. – Т. 5. – С. 56–59.
 14. Каратаев, Г.И. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis* / Г.И. Каратаев, Л.Н. Синяшина, А.Ю. Медкова, Е.Г. Семин, З.В. Шевцова, А.З. Матуа, И.Г. Конджария, А.А. Амичба, Д.Т. Кубрава, З.Я. Миквабиа // Генетика. - 2016. - Т. 52, № 4. - С. 422.
 15. Каратаев, Г.И. Мобильные генетические элементы *Bordetella pertussis* и их роль в регуляции генов вирулентности возбудителя коклюша: автореф. дис.

- ... д-ра биол. наук: 03.00.07, 03.00.15 / Каратаев Геннадий Иванович. - М., 2008. - 48 с.
- 16.Краснов, В.В. Коклюш у детей первого года жизни / В.В. Краснов, К.Ф. Ильянников, Л.Р. Павлович, М.В. Кузмичева // Детские инфекции. - 2018. - Т. 17, № 1. - С. 12-17.
- 17.Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания МУК 4.2.3065-13: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 14.07.2013. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. - 63 с.
- 18.Мастиленко, А.В. Разработка системы дифференциации *B.bronchiseptica* и *B.pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» / А.В. Мастиленко, Д.А. Васильев, О.Ю. Борисова, Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1(25). - С. 50-54.
- 19.Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ. под ред. А.А. Баева и К.Г. Скрябина. - М.: Мир, 1984. - 480 с.
- 20.Медкова, А.Ю. Инсерционная инактивация оперона вирулентности бактерий *Bordetella pertussis* в диагностике типичных и атипичных форм коклюша: дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03, 14.01.09 / Медкова Алиса Юрьевна. - М., 2013. - 105 с.
- 21.Медкова, А.Ю. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis* / А.Ю. Медкова, Ю.С. Аляпкина, Л.Н. Синяшина, И.П. Амелина, Я.И. Алексеев, Г.И. Каратаев, А.Г. Боковой // Детские инфекции. - 2010. - Т. 9, № 4. - С. 19-22.
- 22.Миндлина, А.Я. О необходимости совершенствования тактики иммунопрофилактики коклюша / А.Я Миндлина, Р.В. Полибин // Пульмонология. - 2016. - Т. 26, № 5. - С. 560-569.

23. Михеева, И.В. Современная эпидемиологическая и экономическая характеристика коклюша в Москве / И.В. Михеева, Н.Н. Фомкина, М.А. Михеева // Журнал Инфектологии. – 2019. – Т. 11, № 1. – С. 84-91.
24. Михеева, И.В. Целесообразность и перспективы вакцинопрофилактики коклюша без возрастных ограничений / И.В. Михеева, Т.С. Салтыкова, М.А. Михеева // Журнал Инфектологии. – 2018. – Т. 10, № 4. – С. 14-23.
25. Нестерова, Ю.В. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах / Ю.В. Нестерова, А.Ю. Медкова, И.В. Бабаченко, Е.Г. Семин, Е.Л. Калисникова, Л.Н. Синяшина, Г.И. Каратаев // Журнал Инфектологии. – 2019. – Т. 11, № 1. – С. 17-24.
26. Носов, С.Д. Учение о коклюше / под ред. С.Д. Носова, В.Д. Соболевой. – М.: Медгиз, 1962. – 278 с.
27. Патент 2346987 Российская Федерация, МПК С 12 Q 1/68, С 12 N 15/10. Способ и набор для ускоренной диагностики коклюша / О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, Н.Т. Гадуа, М.С. Петрова, О.П. Попова, А.В. Алешкин; заявитель и патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. - № 2007147797/13; заявл. 25.12.2007; опубл. 10.02.2009, Бюл. № 5. - 6 с.
28. Петрова М.С. Коклюш в 70-е годы по материалам очагов инфекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.09 / Петрова Марина Семеновна. - М., 1978. - 24 с.
29. Петрова, М.С. Коклюш и паракоклюш (профилактика, клиника, лечение): методические рекомендации / М.С. Петрова, О.П. Попова, Т.Н. Москалева. - М., 2000. - 25 с.
30. Петрова, М.С. Коклюш у детей раннего возраста / М.С. Петрова, О.П. Попова, О.Ю. Борисова, Е.Н. Абрамова, Р.В. Вартамян, Е.И. Келли // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – Т. 6. – С. 12-24.

31. Пименова, А.С. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции / А.С. Пименова, О.Ю. Борисова, О.В. Цвиркун, А.А. Басов, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Е.Е. Донских, А.П. Пикина, Л.И. Кафарская, М.С. Афанасьев, А.В. Караулов // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 162-170.
32. Покровский, В.И. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке / В.И. Покровский, Г.П. Онищенко, В.Л. Черкасский. - М.: Медицина, 2003. - 664 с.
33. Попова, О.П. Клинико–диагностические особенности коклюша у детей старшего возраста / О.П. Попова, Л.Н. Мазанкова, Т.А. Скирда, С.В. Бунин, Е.В. Власов // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 70-75.
34. Попова, О.П. Клинические особенности коклюша у взрослых / О.П. Попова, М.С. Петрова, О.Ю. Борисова, Т.А. Скирда, Н.М. Грачева, Н.А. Малышев // Терапевтический архив. - 2014. – Т. 86, № 11. – С. 78-81.
35. Попова, О.П. Коклюш у детей: клинико-иммунологические аспекты, диагностика и лечение: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.09 / Попова Ольга Петровна. - М., 2014. - 302 с.
36. Прадед, М.Н. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* / М.Н. Прадед, С.Б. Яцышина, Т.С. Селезнева, С.В. Малинина, Н.В. Бирюлева, Т.Е. Любимова, Н.С. Воробьева // Клиническая лабораторная диагностика. - 2013. - № 1. - С. 53-56.
37. Профилактика коклюша: санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2.3162-14: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 17.03.2014. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015. - 23 с.
38. Таточенко В.К. Коклюш – недоуправляемая инфекция / В.К. Таточенко // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 78-82.

- 39.Тимченко, В.Н. Клинико-эпидемиологическая эволюция коклюшной инфекции в Санкт-Петербурге с 1925 по 2001 годы. / В.Н. Тимченко, О.В. Парков, И.В. Бабаченко, Е.В. Тимофеева, В.А. Иванькович // Детские инфекции. – 2003. – № 1. – С. 24-26.
- 40.Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Статистические материалы [Электронный ресурс] // Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. - Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. – Режим доступа: <https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/>
41. Федосеенко, М.В. Коклюш возвращается? Усовершенствование борьбы с забытой детской инфекцией / М.В. Федосеенко, М.Г. Галицкая, М.И. Ивардава, А.Г. Гайворонская, Н.А. Маянский, В.В. Ботвиньева, Т.В. Родионова // Педиатрическая фармакология. – 2012. – Т. 9, № 2. – С. 28-36.
- 42.Феклисова, Л.В. Применение новой тест-системы для диагностики коклюшной инфекции / Л.В. Феклисова, Г.В. Спирина, Т.С. Шобухова, М.Ю. Кириллов, Е.В. Кабишева, В.М. Шебекова, Т.А. Митрофанова // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2000. - № 2. - С. 59-61.
- 43.Харит С.М. Специфическая профилактика коклюша: проблемы и перспективы / С.М. Харит, О.Л. Воронина, Е.А. Лакоткина, Т.В. Черняева // Вопросы современной педиатрии. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 71-77.
- 44.Antila, M. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis / M. Antila, Q. He, C. de Jong, I. Aarts, H. Verbakel, S. Bruisten, S. Keller, M. Haanpera. J. Makinen, E. Eorola, M.K. Viljanen, J. Mertsola, A. van der Zee // Journal of Medical Microbiology. – 2006. – Vol. 55, № 8. – P. 1043-1051.
- 45.Backman, A. Nested PCR optimized for detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal samples / A. Backman, B. Johansson, P. Olcen // Journal of Clinical Microbiology. - 1994. - Vol. 32, № 10. - P. 2544-2548.

46. Birkebaek, N.H. *Bordetella pertussis* diagnosed by polymerase chain reaction / N.H. Birkebaek, I. Heron, K. Skjodt // APMIS. - 1994. - Vol. 102, № 4. – P. 291 - 294.
47. Bordet, J. Le microbe de la coqueluche / J. Bordet, O. Gengou // Annales de l'Institut Pasteur. - 1906. – Vol. 20. – P. 48-68.
48. Bottero, D. Short report *Bordetella holmesii* in children suspected of pertussis / D. Bottero, M.M. Griffith, C. Lara, D. Flores, L. Pianciola, M.E. Gaillard, M. Mazzeo, M.I. Zamboni, M.J. Spoletti, E. Anchart, D. Ruggeri, C. Sorhouet, S. Fiori, M. Galas, M.L. Tondella, D.F. Hozbor // Epidemiology and Infection. – 2012. – Vol. 141, № 4. – P. 714-717.
49. Bouchez, V. *Bordetella holmesii*: comparison of two isolates from blood and respiratory sample / V. Bouchez, N. Guiso // Advances in Infectious Disease. – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 123-133.
50. Bowden, K.E. Genome structural diversity among 31 *Bordetella pertussis* isolates from two recent U.S. whooping cough statewide epidemics / K.E. Bowden, M.R. Weigand, Y. Peng, P.K. Cassidy, S. Sammons, K. Knipe, L.A. Rowe, V. Loparev, M. Sheth, K. Weening, M.L. Tondella, M.M. Williams // mSphere. – 2016. – Vol. 1, № 3. – e00036-16.
51. Bradford, W.L. An organism resembling *Hemophilus pertussis* with special reference to color changes produced by its growth upon certain media / W.L. Bradford, B. Slavin // American Journal of Public Health. – 1937. – Vol. 27, № 12. – P. 1277-1282.
52. Breakwell, L. Pertussis Vaccine Effectiveness in the Setting of Pertactin-Deficient Pertussis / L. Breakwell, P. Kelso, C. Finley, S. Schoenfeld, B. Goode, L.K. Misegades, S.W. Martin, A.M. Acosta // Pediatrics. – 2016. – Vol. 137, № 5. - e20153973.
53. Brotons, P. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of pertussis infection in nasopharyngeal samples / P. Brotons, H.D. de

- Paz, C. Esteva, I. Latorre, C. Muñoz-Almagro // Expert Review of Molecular Diagnostics. – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 125-130.
54. Brown, J.H. *Bacillus bronchisepticus* infection in a child with symptoms of pertussis / J.H. Brown // Bulletin of the Johns Hopkins Hospital. – 1926. – Vol. 38. – P. 147-153.
55. Burgos-Rivera, B. Evaluation of level of agreement in *Bordetella* species identification in three U.S. Laboratories during a Period of Increased Pertussis / B. Burgos-Rivera, A.D. Lee, K.E. Bowden, A.E. Faulkner, B.L. Seaton, B.D. Lembke, C.P. Cartwright, S.W. Martin, M.L. Tondella // Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – Vol. 53, № 6. – P. 1842- 1847.
56. Bush, L.M. *Bordetella holmesii* prosthetic valve endocarditis: a case report and review / L.M. Bush, M. Larry, E. Davidson, J. Daugherty // Infectious Diseases in Clinical Practice. – 2012. – Vol. 20, № 4. – P. 248-253.
57. Caro, V. Proficiency program for real-time PCR diagnosis of *Bordetella pertussis* infections in French hospital laboratories and at the French National Reference Center for Whooping Cough and other *Bordetelloses* / V. Caro, N. Guiso, C. Alberti, S. Liguori, C. Burucoa, G. Couetdic, F. Doucet-Populaire, A. Ferroni, S. Papin-Gibaud, F. Grattard, H. Reglier-Poupet, J. Raymond, C. Soler, S. Bouchet, S. Charreau, B. Couzon, I. Leymarie, N. Tavares, M. Choux, E. Bingen, S. Bonacorsi // Journal of Clinical Microbiology. - 2009. - Vol. 47, № 10. – P. 3197–3203.
58. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis [Электронный ресурс] // Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. - Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2015. - Chap. 10. - 12 p. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt10-pertussis.pdf>
59. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis Epidemic – California, 2014 [Электронный ресурс] // Morbidity and mortality weekly report (MMWR). - 2014. - Vol. 63, № 48. - P. 1129-1132. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6348.pdf>

60. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis (whooping cough) [Электронный ресурс] // Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. – CDC. – 2020. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/pertussis/countries/index.html>
61. Chambers, J.K. An outbreak of fatal *Bordetella bronchiseptica* bronchopneumonia in puppies / J.K. Chambers, I. Matsumoto, T. Shibahara, M. Haritani, H. Nakayama, K. Uchida // *Journal of Comparative Pathology*. – 2019. – Vol. 167. – P. 41-45.
62. Cherry, J.D. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives / J.D. Cherry, E. Grimprel, N. Guiso, U. Heininger, J. Mertsola // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2005. – Vol. 24, № 5. – P. 25–34.
63. Cherry, J.D. Epidemic pertussis in 2012—the resurgence of a vaccine-preventable disease / J.D. Cherry // *The New England Journal of Medicine*. – 2012. – Vol. 367, № 9. – P. 785–787.
64. Cherry, J.D. Historical review of pertussis and the classical vaccine / J.D. Cherry // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1996. – Vol. 174, № 3. – P. 259-263.
65. Chiu, T.F. Pertussis seroepidemiology in Taipei / T.F. Chiu, C.Y. Lee, P.I. Lee, C.Y. Lu, H.C. Lin, L.M. Huang // *Journal of the Formosan Medical Association*. – 2000. – Vol. 99, № 3. – P. 224–228.
66. Cloud, J.L. Description of a multiplex *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* LightCycler® PCR assay with inhibition control / J.L. Cloud, W.C. Hymas, A. Turlak, A. Croft, U. Reischl, J.A. Daly, K.C. Carroll // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2003. – Vol. 46, № 3. – P. 189–195.
67. Cone, T.C. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640 / T.C. Cone // *Pediatrics*. – 1970. – Vol. 46, № 4. – P. 522.
68. Conover, M.S. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin / M.S. Conover, G.P. Sloan, C.F. Love, N. Sukumar, R. Deora // *Journal of Molecular Microbiology*. – 2010. – Vol. 77, № 6. – P. 1439-1455.

69. Conyn van Spaendock, M.A. Control of whooping cough in the Netherlands: optimisation of the vaccination policy / M.A. Conyn van Spaendock, N.A. van Der Maas, F.R. Mooi // Bilthoven: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM): RIVM Letter Report; Netherlands, 2012. - 215121002.
70. Cookson, B.T. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, “*B. hinzii*.” / B.T. Cookson, P. Vandamme, L.C. Carlson, A.M. Larson, J.V. Sheffield, K. Kersters, D.H. Spach // Journal of Clinical Microbiology. - 1994. – Vol. 32, № 10. – P. 2569-2571.
71. Cross, R. Resemblance and divergence: the «new» members of the genus *Bordetella* / R. Cross, K. Keidel, K. Schmitt // Medical Microbiology and Immunology. – 2010. – Vol. 199, № 3. – P. 155-163.
72. Crowcroft, N.S. How best to estimate the global burden of pertussis? / N.S. Crowcroft, C. Stein, P. Duclos, M. Birmingham // The Lancet Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 3, № 7. – P. 413-418.
73. Cummings, C.A. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation / C.A. Cummings, M.M. Brinig, P.W. Lepp, S. van de Pas, D.A. Relman // Journal of Bacteriology. - 2004. – Vol. 186, № 5. – P. 1484-1492.
74. Dalby, T. Evaluation of PCR methods for the diagnosis of pertussis by the European surveillance network for vaccine-preventable diseases (EU-VAC.NET) / T. Dalby, N.K. Fry, K.A. Krogfelt, J.S. Jensen // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 32. – P. 1285–1289.
75. David, S. Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model / S. David, R. van Furth, F.R. Mooi // Vaccine. - 2004. Vol. 22, № 15-16. – P. 1892–1898.
76. De Greeff, S.C. Seroprevalence of pertussis in the Netherlands: evidence for increased circulation of *Bordetella pertussis* / S.C. de Greeff, H.E. de Melker, P.G. van Gageldonk, J.F. Schellekens, F.R. van der Klis, L. Mollema, F.R. Mooi, G.A.M. Berbers // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 12. - e14183.

77. De Melker, H.E. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data / H.E. de Melker, J.F. Schellekens, S.E. Neppelenbroek, F.R. Mooi, H.C. Rumke, M.A. Conyn-van Spaendonck // *Emerging Infectious Diseases*. – 2000. – Vol. 6, № 4. – P. 348–357.
78. De Paz, H.D. Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics / H.D. de Paz, P. Brotons, C. Muñoz-Almagro // *Expert Review of Molecular Diagnostic*. – 2014. – Vol. 14, № 7. – P. 827-843.
79. De Serres, G. Morbidity of pertussis in adolescents and adults / G. de Serres, R. Shadmani, B. Duval, N. Boulianne, P. Dery, M. Douville Fradet, L. Rochette, S.A. Halperin // *Journal of Infectious Diseases*. – 2000. – Vol. 182, № 1. – P. 174–179.
80. Diavatopoulos, D.A. Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* genomes / D.A. Diavatopoulos, C.A. Cummings, H.G.J. van der Heide, M. van Gent, S. Liew, D.A. Relman, F.R. Mooi // *Journal of Bacteriology*. - 2006. – Vol. 188, № 24. – P. 8385–8394.
81. Dinu, S. Whooping cough in South-East Romania: a 1-year study / S. Dinu, S. Guillot, C.S. Dragomirescu, D. Brun, S. Lazar, G. Vancea, B.M. Ionescu, M.F. Gherman, A.F.D. Bjerkestrand, V. Ungureanu, N. Guiso, M. Damian // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2014. – Vol. 78, № 3. – P. 302-306.
82. Douglas, E. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene / E. Douglas, J.G. Coote, R. Parton, W. McPheat // *Journal of Medical Microbiology*. - 1993. - Vol. 38, № 2. - P. 140-144.
83. Eldering, G. A group of cultures resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchiseptica* but identical with neither / G. Eldering, P. Kendrick // *Journal of Bacteriology*. – 1937. - Vol. 33. – P. 71.

84. Elderling, G. *Bacillus parapertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchiseptica* but identical with neither / G. Elderling, P. Kendrick // *Journal of Bacteriology*. - 1938. – Vol. 35, № 6. – P. 561-572.
85. Farrell, D.J. Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its application in diagnosis of Pertussis in Nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia / D.J. Farrell, G. Daggard, T.K.S. Mukkur // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1999. - Vol. 37, № 3. - P. 606-610.
86. Farrell, D.J. Rapid-cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis / D.J. Farrell, M. McKeon, M.J. Loeffelholz, C.J. Thompson, T.K. Mukkur // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2000. – Vol. 38, № 12. – P. 4499–4502.
87. Ferry, N.S. A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper / N.S. Ferry // *American Veterinary Review*. – 1910. – Vol. 37. – P. 499-504.
88. Ferry, N.S. *Bacillus bronchisepticus (bronchicanis)*: the cause of distemper in dogs and a similar disease in other animals / N.S. Ferry // *The Veterinary Journal*. - 1912. Vol. 68, № 7. – P. 376-391.
89. Ferry, N.S. Canine distemper / N.S. Ferry // *Proceedings of the Wisconsin Veterinary Medical Association*. - 1917. – P. 80-88.
90. Ferry, N.S. Etiology of canine distemper. / N.S. Ferry // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1911. – Vol. 8, № 4. – P. 399-420.
91. Fong, W. Detection and incidence of *Bordetella holmesii* in respiratory specimens from patients with pertussis-like symptoms in New South Wales, Australia / W. Fong, V. Timms, N. Holmes, V. Sintchenko // *Pathology*. – 2018. – Vol. 50, № 3. – P. 322-326.
92. Fry, N.K. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007 / N.K. Fry, J. Duncan, K. Wagner, O. Tzivra, N. Doshi, D.J. Litt, N. Crowcroft, E. Miller, R.C. George, T.G. Harrison // *Journal of Medical Microbiology*. - 2009. – Vol. 58, № 8. – P. 1023-1029.

93. Geier, D. The True Story of Pertussis Vaccination: A Sordid Legacy? / D. Geier, M. Geier // *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*. – 2002. – Vol. 57, № 3. – P. 249-284.
94. Gentry-Weeks, C.R. Dermonecrotic toxin and tracheal cytotoxin, putative virulence factors of *Bordetella avium* / C.R. Gentry-Weeks, B.T. Cookson, W.E. Goldman, R.B. Rimler, S.B. Porter, R. Curtiss III // *Infection and Immunity*. - 1988. – Vol. 56, № 7. – P. 1698-1707.
95. Gerlach, G. Evolutionary trends in the genus *Bordetella* / G. Gerlach, F. von Wintzingerode, B. Middendorf, R. Gross // *Microbes and Infection*. - 2001. - Vol. 3, № 1. - P. 61-72.
96. Gerlach, G. Functional characterization of the BvgAS two-component system of *Bordetella holmesii* / G. Gerlach, S. Janzen, D. Beier, R. Cross // *Journal of Microbiology*. – 2004. – Vol. 150, № 11. – P. 3715-3729.
97. Giammanco, A. Seroepidemiology of pertussis in Italy / A. Giammanco, A. Chiarini, T. Stroffolini, D. de Mattia, M. Chiramonte, M.E. Moschen, I. Mura, G. Rigo, S. Taormina, A. Sarzana, G. Mazza, B. Scarpa // *Reviews of Infectious Diseases*. – 1991. – Vol. 13, № 6. - P. 1216–1220.
98. Gilligan, P.H. Importance of culture in the laboratory diagnosis of *Bordetella pertussis* infections/ P.H. Gilligan, M.C. Fisher // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1984. -Vol. 20, №5. - P. 891–893.
99. Glare, E.M. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction / E.M. Glare, J.C Paton, R. Premier, A.J. Lawrence, L.T. Nisbet // *Journal of Clinical Microbiology*. -1990. - Vol.28, № 9. – P. 1982–1987.
100. Goodnow, R.A. Biology of *Bordetella bronchiseptica* / R.A. Goodnow // *Microbiological Reviews*. – 1980. – Vol. 44, № 4. – P. 722-738.
101. Granstrom, G. Effect of erythromycin treatment on antibody responses in pertussis / G. Granstrom, M. Granstrom // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. - 1994. – Vol. 26, № 4. – P. 453–457.

102. Grimprel, E.P. Comparison of polymerase chain reaction, culture and Western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infections / E.P. Grimprel, P. Begue, I. Anjak, F. Betsou, N. Guiso // Journal of Clinical Microbiology. - 1993. - Vol. 31, № 10. - P. 2745-2750.
103. Guthrie, J.L. A novel duplex real-time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in patients with pertussis-like symptoms in Ontario, Canada / J.L. Guthrie, A.V. Robertson, P. Tang, F. Jamieson, S.J. Drews // Journal of Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 48, № 4. – P. 1435–1437.
104. Harvill, E.T. Genome sequences of nine *Bordetella holmesii* strains isolated in the United States / E.T. Harvill, L.L. Goodfield, Y. Ivanov, W.E. Smallridge, J.A. Meyer, P.K. Cassidy, M.L. Tondella, L. Brinkac, R. Sanka, M. Kim, L. Losada // Genome Announcements. – 2014. – Vol. 2, № 3. – e00438-14.
105. Hasan, M.R. Evaluation of amplification targets for the specific detection of *Bordetella pertussis* using real-time polymerase chain reaction / M.R. Hasan, R. Tan, G.N. Al-Rawahi, E. Thomas, P. Tilley, J. Can // Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. – 2014. - Vol. 25, № 4. - P. 217–221.
106. He, Q. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis / Q. He, J. Mertsola, H. Soini, M. Skurnik, O. Ruuskanen, M.K. Viljanen // Journal of Clinical Microbiology. - 1993. - Vol. 31, № 3. - P. 642-645.
107. He, Q. High heterogeneity in methods used for the laboratory confirmation of pertussis diagnosis among European countries, 2010: integration of epidemiological and laboratory surveillance must include standardisation of methodologies and quality assurance / Q. He, A.M. Barkoff, J. Mertsola, S. Glismann, S. Bacci // Eurosurveillance. - 2012. – Vol. 17, № 32. – P. 20239.
108. He, Q. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population / Q. He, M.K. Viljanen, H. Arvilommi, B. Aittanen, J. Mertsola // JAMA. – 1998. – Vol. 280, № 7. – P. 635–637.

109. Hiramatsu, Y. BipA is associated with preventing autoagglutination and promoting biofilm formation in *Bordetella holmesii* / Y. Hiramatsu, M. Saito, N. Otsuka, E. Suzuki, M. Watanabe, K. Shibayama, K. Kamachi // Plos One. – 2016. – Vol. 11, № 7. – e0159999.
110. Horvat, A. Molecular characterization of the BvgA response regulator of *Bordetella holmesii* / A. Horvat, R. Cross // Microbiological Research. – 2009. – Vol. 164, № 3. – P. 243-252.
111. Houard, S. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the polymerase chain reaction / S. Houard, C. Hackel, A. Herzog, A. Bollen // Research in Microbiology. - 1989. - Vol. 140, № 7. - P. 477-487.
112. Hu, J.J. Survey of pertussis in patients with prolonged cough / J.J. Hu, C.Y. Lu, L.Y. Chang, C.H. Huang, C.C. Chou, F.Y. Huang, C.Y. Lee, L.M. Huang // Journal of Microbiology, Immunology, and Infection. – 2006. – Vol. 39, № 1. – P. 54–58.
113. Jonckheere, S. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bordetella holmesii*, an Acinetobacter look-alike / S. Jonckheere, T. de Baere, P. Schroevers, O. Soetens, A. de Bel, I. Surmont // Journal of Medical Microbiology. – 2012. – Vol. 61, № 6. – P. 874–877.
114. Kamachi, K. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection / K. Kamachi, H. Toyozumi-Ajisaka, K. Toda, S.C. Soeung, S. Sarath, Y. Nareth, Y. Horiuchi, K. Kojima, M. Takahashi, Y. Arakawa // Journal of Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44, № 5. – P. 1899-1902.
115. Kamachi, K. Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection / K. Kamachi, T. Moriuchi, Y. Hiramatsu, N. Otsuka, K. Shibayama // Journal of Microbiological Methods. – 2017. – Vol. 133. – P. 20-22.
116. Kamachi, K. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens

- / K. Kamachi, S. Yoshino, C. Katsukawa, N. Otsuka, Y. Hiramatsu, K. Shibayama // *New Microbes and New Infections*. - 2015. - Vol. 8. - P. 70-74.
117. Kamiya, H. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan / H. Kamiya, N. Otsuka, Y. Ando, F. Odaira, S. Yoshino, K. Kawano, H. Takahashi, T. Nishida, Y. Hidaka, H. Toyozumi-Ajisaka, K. Shibayama, K. Kamachi, T. Sunagava, K. Taniguchi, N. Okabe // *Emerging Infectious Diseases*. - 2012. - Vol. 18, № 7. - P. 1166-1169.
118. Katfy, K. Epidemiology of pertussis in Casablanca (Morocco): contribution of conventional and molecular diagnosis tools / K. Katfy, N. Guiso, I. Diawara, K. Zerouali, B. Slaoui, Z. Jouhadi, A. Zineddine, H. Belabbes, N. Elmdaghri // *BMC Infectious Diseases*. - 2017. - Vol. 17, № 1. - P. 348.
119. Kattar, M.M. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia / M.M. Kattar, J.F. Chavez, A.P. Limaye, S.L. Rassouljian-Barrett, S.L. Yarfitz, L.C. Carlson, Y. Houze, S. Swanzy, B.L. Wood, B.T. Cookson // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2000. - Vol. 38, № 2. - P. 789-794.
120. Kersters, K. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds / K. Kersters, K.H. Hinz, A. Hertle, P. Segers, A. Lievens, O. Siegmann, J. de Ley // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 1984. - Vol. 34, № 1. - P. 56-70.
121. Klement, E. An outbreak of pertussis among young Israeli soldiers / E. Klement, L. Uliel, I. Engel, T. Hasin, M. Yavzori, N. Orr, N. Davidovitz, N. Lahat, I. Srugo, E. Zangvil, D. Cohen // *Epidemiology and Infection*. - 2003. - Vol. 131, № 3. - P. 1049-1054.
122. Knorr, L. Evaluation of real-time PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection / L. Knorr, J.D. Fox, P.A. Tilley, J. Ahmed-Bentley // *BMC Infectious Diseases*. - 2006. - Vol. 6. - P. 62.
123. Koh, M.T. Under-recognized pertussis in adults from Asian countries: a cross-sectional seroprevalence study in Malaysia, Taiwan and Thailand / M.T. Koh, C.S.

- Liu, C.H. Chiu, W. Boonsawat, V. Watanaveeradej, N. Abdullah, X. Zhang, R. Devadiga, J. Chen // *Epidemiology and Infection*. – 2016. – Vol. 144, № 6. – P. 1192-1200.
124. Kolodkina, V. Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / V. Kolodkina, V. Martinov, A. Babenko // *Iran Journal of Microbiology*. - 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 140–148.
125. Kusters, K. Real-time LightCycler® PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / K. Kusters, U. Reischl, J. Schmetz, M. Riffelmann, C.H. Wirsing von Konig // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2002. – Vol. 40, № 5. – P. 1719-1722.
126. Lanotte, P. Evaluation of four commercial Real-Time PCR assays for detection of *Bordetella spp.* in nasopharyngeal aspirates / P. Lanotte, C. Plouzeau, C. Burucoa, C. Grelaud, S. Guillot, N. Guiso, F. Garnier // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2011. - Vol. 49, № 11. - P. 3943-3946.
127. Lapin, J.H. Whooping cough / J.H. Lapin. - Springfield, IL. – Charles C Thomas, 1943. – P. 238.
128. Lee, A.D. Clinical evaluation and validation of laboratory methods for the diagnosis of *Bordetella pertussis* infection: Culture, polymerase chain reaction (PCR) and anti-pertussis toxin IgG serology (IgG-PT) / A.D. Lee, P.K. Cassidy, L.C. Pawloski, K.M. Tatti, M.D. Martin, E.C. Briere, M.L. Tondella, S.W. Martin // *PLoS One*. - 2018. – Vol. 13, № 4. - e0195979.
129. Lee, H. Insertion sequence-caused large-scale rearrangements in the genome of *Escherichia coli* / H. Lee, T.G. Doak, E. Popodi, P.L. Foster, H. Tang // *Nucleic Acids Research*. - 2016. – Vol. 44, № 15. – P. 7109–7119.
130. Lee, S.Y. Immunoassay of pertussis according to ages / S.Y. Lee, U.Y. Choi, J.S. Kim, J.H. Ahn, J.H. Choi, S.H. Ma, J.S. Park, H.M. Kim, J.H. Kang // *Korean Journal of Pediatric Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 19, № 2. – P. 55–60.
131. Lee, S.Y. Pertussis seroprevalence in korean adolescents and adults using anti-pertussis toxin immunoglobulin G / S.Y. Lee, S.B. Han, E.Y. Bae, J.H. Kim, J.H.

- Kang, Y.J. Park, S.H. Ma // Journal of Korean Medical Science. – 2014. – Vol. 29, № 5. – P. 652-656.
132. Li, Z.M. Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of *Bordetella pertussis* / Z.M. Li, J.H. Hannah, S. Stibitz, N.Y. Nguyen, C.R. Manclark, M.J. Brennan // Molecular Microbiology. - 1991. - Vol. 5, № 7. - P. 1649-1656.
133. Li, Z.M. Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR / Z.M. Li, D.L. Jansen, T.M. Finn, S.A. Halperin, A. Kasina, S.P. O'Connor, T. Aoyama, C.R. Manclark, M.J. Brennan // Journal of Clinical Microbiology. - 1994. - Vol. 32, № 3. - P. 783-789.
134. Libster, R. Re-emergence of pertussis: what are the solutions? / R. Libster, K.M. Edwards // Expert Review of Vaccines. – 2012. – Vol. 11, № 11. – P. 1331–1346.
135. Lievano, F.A. Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of pertussis / F.A. Lievano, M.A. Reynolds, A.L. Waring, J. Ackelsberg, K.M. Bisgard, G.N. Sanden, D. Guris, A. Golaz, D.J. Bopp, R.J. Limberger, P.F. Smith // Journal of Clinical Microbiology. - 2002. – Vol. 40, № 8. – P. 2801–2805.
136. Lin, P.Y. *Bordetella pertussis* infection in northern Taiwan, 1997–2001 / P.Y. Lin, C.H. Chiu, Y.H. Wang, L.H. Su, J.H. Chia, Y.C. Huang, P.W. Chung, T.L. Wu, T.Y. Lin // Journal of Microbiology, Immunology, and Infection. – 2004. – Vol. 37, № 5. – P. 288–294.
137. Lind-Brandberg, L. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections / L. Lind-Brandberg, C. Welinder-Olsson, T. Lagergard, J. Taranger, B. Trollfors, G. Zackrisson // Journal of Clinical Microbiology. - 1998. - Vol. 36, № 3. - P. 679-683.
138. Link, S. Identification and regulation of expression of a gene encoding a filamentous hemagglutinin-related protein in *Bordetella holmesii* / S. Link, K. Schmitt, D. Beier, R. Gross // BMC Microbiology. – 2007. – Vol. 7. – P. 100.

139. Linz, B. Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species / B. Linz, Y.V. Ivanov, A. Preston, L. Brinkac, J. Parkhill, M. Kim, S.R. Harris, L.L. Goodfield, N.K. Fry, A.R. Gorringer, T.L. Nicholson, K.B. Register, L. Losada, E.T. Harvill // BMC Genomics. - 2016.- Vol. 17, № 1. – P. 767.
140. Liu, W. Survey and Rapid Detection of *Bordetella pertussis* in Clinical Samples Targeting the BP485 in China / W. Liu, X. Yinghua, D. Derong, L. Huan, Z. Xiangna, L. Lili, Z. Ying , W. Xiao, W. Xuesong, H. Simo, Z. Ming, H. Liuyu, Z. Shumin, Y. Jing // Front Public Health. -2015. - Vol. 3. – P. 39.
141. Loeffelhol, M.J. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay / M.J. Loeffelhol, C.J. Thompson, K.S. Long, M.J.R. Gilchrist // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – Vol.38, № 1. - P. 467.
142. Loeffelholz, M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests / M. Loeffelholz // Journal of Clinical Microbiology. - 2012. - Vol. 50, № 7. - P. 2186-2190.
143. Loeffelholz, M.J. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis* / M.J. Loeffelholz, C.J. Thompson, K.S. Long, M.J. Gilchrist // Journal of Clinical Microbiology. - 1999. – Vol. 37, № 9. – P. 2872-2876.
144. Lotfi, M.N. Molecular detection of *Bordetella holmesii* in two infants with pertussis-like syndrome: the first report from Iran / M.N. Lotfi, V.S. Nikbin, O. Nasiri, F. Badmasti, F. Shahcheraghi // PMC. – 2017. – Vol. 9, № 4. – P. 219-223.
145. Martini, H. Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four target real-time PCR / H. Martini, L. Detemmerman, O. Soetens, E. Yusuf, D. Piérard // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 4. - e0175587.
146. Mastrantonio, P. Polymerase chain reaction for the detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal aspirates / P. Mastrantonio, P. Stefanelli, M. Giuliano // Journal of Medical Microbiology. - 1996. - Vol. 44, № 4. - P. 261-266.

147. Mattoo, S. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies / S. Mattoo, J.D. Cherry // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2005. – Vol. 18, № 2. – P. 326-382.
148. Mazengia, E. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains / E. Mazengia, E.A. Silva, J.A. Peppe, R. Timperi, H. George // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2000. – Vol. 38, № 6. – P. 2330–2333.
149. McGowan, J.P. Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats, in which the animals affected presented the symptoms of the disease called “distemper / J.P. McGowan // *The Journal of Pathology and Bacteriology*. - 1911. – Vol. 15. – P. 372-430.
150. Mir-Cros, A. Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain / A. Mir-Cross, G. Codina, M.T. Martín-Gómez, A. Fàbrega, X. Martínez, M. Jané, D. Van Ezzo, T. Cornejo, C. Rodrigo, M. Campins, T. Pumarola, J.J. González-López // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 23, № 11. – P. 1856–1859.
151. Miranda, C. *Bordetella holmesii* in nasopharyngeal samples from Chilean patients with suspected *Bordetella pertussis* infection / C. Miranda, L. Porte, P. Garcia // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 50, № 4. – P. 1505.
152. Misegades, L.K. Association of childhood pertussis with receipt of 5 doses of pertussis vaccine by time since last vaccine dose, California, 2010 / L.K. Misegades, K. Winter, K. Harriman, J. Talarico, N.E. Messonnier, T.A. Clark, S.W. Martin // *JAMA*. – 2012. – Vol. 308, № 20. – P. 2126-2132.
153. Mooi, F.R. Characterization of *Bordetella holmesii* isolates from patients with pertussis-like illness in the Netherlands / F.R. Mooi, S. Bruisten, I. Linde, F. Reubsaet, K. Heuvelman, S. van der Lee, A.J. King // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2011. – Vol. 64, № 2. – P. 289-291.

154. Muyltermans, G. External quality assessment for molecular detection of *Bordetella pertussis* in European laboratories / G. Muyltermans, O. Soetens, M. Antoine, S. Bruisten, B. Vincart, F. Doucet-Populaire, N.K. Fry, P. Olcen, J.M. Scheftel, J.M. Senterre, A. van der Zee, M. Riffelmann, D. Pierard, S. Lauwers // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2005. – Vol. 43, № 1. – P. 30–35.
155. Nakamura, A. Neonatal pertussis presenting as acute bronchiolitis: direct detection of the *Bordetella pertussis* genome using loop-mediated isothermal amplification / A. Nakamura, T. Sakano, T. Nakayama, H. Shimoda, Y. Okada, R. Hanayama, K. Nomoto, T. Suto, Y. Kinoshita, T. Furue, H. Ono, T. Ohta // *European Journal of Pediatrics*. – 2009. – Vol. 168, № 3. – P. 347-349.
156. Nguyen, L.B. Recurrent *Bordetella holmesii* bacteremia and nasal carriage in a patient receiving rituximab / L.B. Nguen, L. Epelboin, J. Gabarre, M. Lecso, S. Guillot, F. Bricaire, E. Caumes, N. Guiso // *Emerging Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 19, № 10. – P. 1703-1705.
157. Njamkepo, E. *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates / E. Njamkepo, F. Delisle, I. Hagege, G. Gerbaud, N. Guiso // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2000. – Vol. 6, № 3. – P. 131-136.
158. Njamkepo, E. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis / E. Njamkepo, S. Bonacorsi, M. Debruyne, S.A. Gibaud, S. Guillot, N. Guiso // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. – Vol. 49, № 12. – P. 4347–4348.
159. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28, № 12. - E63.
160. Otsuka, N. Simple and specific detection of *Bordetella holmesii* by using a loop-mediated isothermal amplification assay / N. Otsuka, S. Yoshino, K. Kawano, H. Toyozumi-Ajisaka, K. Shibayama, K. Kamachi // *Microbiology and Immunology*. – 2012. – Vol. 56, № 7. – P. 486-489.

161. Parkhill, J. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* / J. Parkhill, M. Sebaihia, A. Preston, L.D. Murphy, N. Thomson, D.E. Harris, M.T. Holden, C.M. Churcher, S.D. Bentley, K.L. Mungall, A.M. Cerdeno-Tarraga, L. Temple, K. James, B. Harris, M.A. Quail, M. Achtman, R. Atkin, S. Baker, D. Basham, N. Bason, I. Cherevach, T. Chillingworth, M. Collins, A. Cronin, P. Davis, J. Doggett, T. Feltwell, A. Goble, N. Hamlin, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, H. Norberczak, S. O'Neil, D. Ormond, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Rutter, M. Sanders, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, L. Unwin, S. Whitehead, B.G. Barrell, D.J. Maskell // *Nature Genetics*. - 2003. – Vol. 35, № 1. – P. 32-40.
162. Pittet, L.F. *Bordetella holmesii*: an under-recognised *Bordetella* species / L.F. Pittet, S. Emonet, J. Schrenzel, C.A. Siegrist, K.M. Posfay-Barbe // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 14, № 5. – P. 510-519.
163. Pittet, L.F. *Bordetella holmesii*: Still Emerging and Elusive 20 years on / L.F. Pittet, K.M. Posfay-Barbe // *Microbiology Spectrum*. – 2016. – Vol. 4, № 2. – e110-0003-2015.
164. Pittet, L.F. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: differentiating *Bordetella pertussis* from *Bordetella holmesii* by polymerase chain reaction / L.F. Pittet, S. Emonet, P. François, E.J. Bonetti, J. Schrenzel, M. Hug, M. Altwegg, C.A. Siegrist, K.M. Posfay-Barbe // *PLoS One*. - 2014. – Vol. 9, № 2. – e88936.
165. Planet, P.J. *Bordetella holmesii*: initial genomic analysis an emerging opportunist / P.J. Planet, A. Narechania, S.R. Hymes, C. Gagliardo, R.S. Huard, S. Whittier, P. Della-Latta, A.J. Ratner // *Journal of Pathology and Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 67, № 2. – P. 132-135.
166. Probert, W.S. Identification and evaluation of new target sequences for specific detection of *Bordetella pertussis* by real-time PCR / W.S. Probert, J. Ely, K.

- Schrader, J. Atwell, A. Nossoff, S. Kwan // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2008. – Vol. 46 № 10. – P. 3228–3231.
167. Qin, X. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications / X. Qin, E. Galanakis, E.T. Martin, J.A. Englund // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2007. - Vol. 45, № 2. - P. 506-511.
168. Qin, X. Resurgence of Pertussis and its laboratory diagnosis / X. Qin // *Clinical Microbiology Newsletter*. - 2015. - Vol. 37, № 9. - P. 69-76.
169. Register, K.B. Prevalence and sequence variants of IS481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of *Bordetella pertussis* / K.B. Register, G.N. Sanden // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2006. – Vol. 44, № 12. – P. 4577–4583.
170. Reischl, U. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii* / U. Reischl, N. Lehn, G.N. Sanden, M.J. Loeffelholz // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2001. – Vol. 39, № 5. – P. 1963–1966.
171. Rendi-Wagner, P. The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* in Israel- estimate of incidence of infection / P. Rendi-Wagner, J. Tobias, L. Moerman, S. Goren, R. Bassal, M. Green, D. Cohen // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, № 19. – P. 3285–3290.
172. Rhea, L.J. The comparative pathology of the tracheal and bronchial lesions produced in man by *B.pertussis* (whooping-cough) and those produced in dogs by *B.bronchisepticus* (canine distemper) / L.J. Rhea // *The Journal of Medical Research*. - 1915. – Vol. 32, № 3. – P. 471-474.
173. Riffelmann, M. Pertussis PCRCG. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections / M. Riffelmann, C.H. Wirsing von Konig, V. Caro, N. Guiso // *Journal of Clinical Microbiology*. -2005. – Vol. 43, № 10. – P. 4925–4929.
174. Rodgers, L. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with co-circulating *Bordetella*

- holmesii* and *Bordetella pertussis* - Ohio, 2010–2011 / L. Rodgers, S.W. Martin, A. Cohn, J. Budd, M. Marcon, A. Terranella, S. Mandal, D. Salamon, A. Leber, M.L. Tondella, K. Tatti, K. Spicer, A. Emanuel, E. Koch, L. McGlone, L. Pawlowski, M. Lemaile-Williams, N. Tucker, R. Iyer, T.A. Clark, M. Diorio // *Clinical Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 56, № 3. – P. 322–331.
175. Roorda, L. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three insertion sequence elements / L. Roorda, J. Buitenwerf, J. Ossewaarde, A. van der Zee // *BMC Research Notes*. - 2011. – Vol. 4. – P. 11.
176. Sauer, L.W. Experimental whooping cough / L.W. Sauer, L. Hambrecht // *The American Journal of Diseases of Children*. - 1929. – Vol. 37. – P. 732- 744.
177. Schlapfer, G. Polymerase chain reaction identification of *Bordetella pertussis* infections in vaccinees and family members in a pertussis vaccine efficacy trial in Germany / G. Schlapfer, J.D. Cherry, U. Heininger, M. Ueberal, S. Schmitt-Grohe, S. Laussucq, M. Just, K. Stehr // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. - 1995. - Vol. 14, № 3. - P. 209-214.
178. Schlapfer, G. Use of the polymerase chain reaction to detect *Bordetella pertussis* in patients with mild or atypical symptoms of infection / G. Schlapfer, H.P. Senn, R. Berger, M. Just // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 1993. - Vol. 12, № 6. - P. 459-463.
179. Senzilet, L.D. Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents / L.D. Senzilet, S.A. Halperin, J.S. Spika, M. Alagaratnam, A. Morris, B. Smith // *Clinical Infectious Diseases*. – 2001. – Vol. 32, № 12. – P. 1691–1697.
180. Shepard, C.W. *Bordetella holmesii* bacteremia: A newly recognized clinical entity among asplenic patients / C.W. Shepard, M.I. Daneshvar, R.M. Kaiser, D.A. Ashford, D. Lonsway, J.B. Patel, R.E. Morey, J. G. Jordan, R.S. Weyant, M. Fisher // *Clinical Infectious Diseases*. - 2004. – Vol. 38, № 6. – P. 799–804.

181. Sizaire, V. Increase of pertussis incidence in 2010 to 2012 after 12 years of low circulation in Spain / V. Sizaire, M. Garrido-Esteba, J. Masa-Calles, M.V. Martinez de Aragon // *Eurosurveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* – 2014. Vol. 19, № 32. – P. 1-8.
182. Sloan, L.M. Multiplex LightCycler® PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens / L.M. Sloan, M.K. Hopkins, P.S. Mitchell, E.A. Vetter, J.E. Rosenblatt, W.S. Harmsen, F.R. Cockerill, R. Patel // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2002. – Vol. 40, № 1. – P. 96–100.
183. Spears, P.A. Unexpected similarities between *Bordetella avium* and other pathogenic *Bordetellae* / P.A. Spears, L.M. Temple, D.M. Miyamoto, D.J. Maskell, P.E. Orndorff // *Infection and Immunity.* - 2003. – Vol. 71, № 5. P. 2591-2597.
184. Stibitz, S. IS481 and IS1002 of *Bordetella pertussis* create a 6-base-pair duplication upon insertion at a consensus target site / S. Stibitz // *Journal of Bacteriology.* – 1998. – Vol.180, № 18. – P. 4963– 4966.
185. Tang, Y.W. *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicaemia, endocarditis and respiratory failure / Y.W. Tang, M.K. Hopkins, C.P. Kolbert, P.A. Hartley, P.J. Severance, D.H. Persing // *Clinical Infectious Diseases.* – 1998. – Vol. 26, № 2. – P. 389-392.
186. Tartof, S.Y. *Bordetella holmesii* bacteremia cases in the United States, April 2010–January 2011 / S.Y. Tartof, P. Gounder, D. Weiss, L. Lee, P.K. Cassidy, E.C. Briere // *Clinical Infectious Diseases.* – 2014. – Vol. 58, № 2. – P. 39–43.
187. Tatti, K.M. Draft genome sequences of *Bordetella holmesii* strains from blood (F627) and nasopharynx (H558) / K.M. Tatti, V.N. Loparev, S. Ranganathanakammal, S. Changayil, M. Frace, M.R. Weil, S. Sammons, D. Maccannel, L.W. Mayer, M.L. Tondella // *Genome Announcements.* – 2013. – Vol. 1, № 2. – e0005613.
188. Tatti, K.M. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens / K.M. Tatti, K.N. Sparks, K.O. Boney,

- M.L. Tondella // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. – Vol. 49, № 12. – P. 4059–4066.
189. Tatti, K.M. Qualitative assessment of pertussis diagnostics in United States laboratories / K.M. Tatti, S.W. Martin, K.O. Boney, K. Brown, T.A. Clark, M.L. Tondella // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. - 2013. – Vol. 32, № 9. – P. 942–945.
190. Templeton, K.E. Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis / K.E. Templeton, S.A. Scheltinga, A. van der Zee, B.M.W. Diederens, A.M. van Kruijssen, H. Goossens, E. Kuijper, E.C.J. Claas // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol. 41, № 9. – P. 4121-4126.
191. Tizolova, A. Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for the biological diagnosis of pertussis syndrome / A. Tizolova, N. Guiso, S. Guillot // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 2013. – Vol. 32, № 1. – P. 89–96.
192. Torrey, J.C. Studies in canine distemper / J.C. Torrey, A.H. Rahe // *The Journal of Medical Research*. - 1912. – Vol. 27, № 3. – P. 291-364.
193. Valero-Rello, A. Validation and implementation of diagnostic algorithm for DNA detection of *Bordetella pertussis*, *B.parapertussis*, and *B.holmesii* in a Pediatric Referral Hospital in Barcelona, Spain / A. Valero-Rello, D. Henares, L. Acosta, M. Jane, I. Jordan, P. Godoy, C. Munoz-Almagro // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2019. – Vol. 57, № 1. – e01231-18.
194. Van den Akker, W.M. Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation / W.M. van den Akker // *Journal of Microbiology*. – 1998. – Vol. 144, № 6. – P. 1527-1535.
195. Van den Bossche, D. Prevalence of *Bordetella holmesii* and *Bordetella bronchiseptica* in respiratory tract samples from Belgian patients with pertussis-like symptoms by sensitive culture method and mass spectrometry / D. van den Bossche,

- A. de Bel, D. de Smet, O. Heylen, E. Vekens, K. Vandoorslaer, O. Soetens, D. Pierard // *Acta Clinica Belgica*. – 2013. – Vol. 68, № 5. – P. 341–348.
196. Van der Zee, A. A clinical validation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* polymerase chain reaction: comparison with culture and serology using samples from patients with suspected whooping cough from a highly immunized population / A. van der Zee, C. Agterberg, M. Peeters, F. Mooi, J. Schellekens // *The Journal of Infectious Diseases*. - 1996. - Vol. 174, №1. - P. 89-96.
197. Van der Zee, A. Characterization of IS1001, an insertion sequence element of *Bordetella parapertussis* / A. van der Zee, C. Agterberg, M. van Agterveld, M. Peeters, F.R. Mooi // *Journal of Bacteriology*. - 1993. – Vol. 175, № 1. – P. 141–147.
198. Van der Zee, A. Laboratory diagnosis of *pertussis* / A. van der Zee, J.F.P. Schellekens, F.R. Mooi // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2015. Vol. 28, № 4. – P. 1005–1026.
199. Van der Zee, A. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp. phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences / A. van der Zee, F. Mooi, J. Van Embden, J. Musser // *Journal of Bacteriology*. - 1997. – Vol. 179, № 21. – P. 6609-6617.
200. Van der Zee, A. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / A. van der Zee, C. Agterberg, M. Peeters, J. Schellekens, F.R. Mooi // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1993. - Vol. 31, № 8. - P. 2134-2140.
201. Van Hoek, A.J. The burden of disease and health care use among pertussis cases in school aged children and adults in England and Wales: a patient survey / A.J. van Hoek, H. Campbell, N. Andrews, M. Vasconcelos, G. Amirthalingam, E. Miller // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 11. - e111807.
202. Vandamme, P. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans / P. Vandamme, J. Hommez, M. Vancanneyt, M. Monsieurs, B. Hoste, B. Cookson,

- C.H. Wirsing von Konig, K. Kersters, P.J. Blackall // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1995. - Vol. 45, № 1. - P. 37-45.
203. Vandamme, P. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983 / P. Vandamme, M. Heyndrickx, M. Vancanneyt, B. Hoste, P. de Vos, E. Falsen, K. Kersters, K.H. Hinz // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1996. - Vol. 46, № 4. - P. 849-858.
204. Versteegh, F.G. *Bordetella pertussis* and mixed infections / F.G. Versteegh, T.A. Mooi-Kokenberg, J.F. Schellekens, J.J. Roord // *Minerva Pediatrica*. – 2006. – Vol. 58, № 2. – P. 131-137.
205. Vincart, B. A specific real-time PCR assay for the detection of *Bordetella pertussis* / B. Vincart, R. de Mendonca, S. Rottiers, F. Vermeulen, M.J. Struelens, O. Denis // *Journal of Medical Microbiology*. – 2007. – Vol. 56, № 7. - P. 918–920.
206. Von Wintzingerode, F. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* / F. von Wintzingerode, A. Schattke, R.A. Siddiqui, U. Rosick, U.B. Gobel, R. Gross // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2001. - Vol. 51, № 4. - P. 1257-1265.
207. Von Wintzingerode, F. Phylogenetic relationships and virulence evolution in the genus *Bordetella* / F. von Wintzingerode, G. Gerlach, B. Schneider, R. Gross // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. - 2002. - Vol. 264, № 1. – P. 177-199.
208. Waters, V. Outbreak of atypical pertussis detected by polymerase chain reaction in immunized preschool-aged children / V. Waters, F. Jamieson, S.E. Richardson, M. Finkelstein, A. Wormsbecker, S.A. Halperin // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2009. – Vol. 28, № 7. – P. 582-587.
209. Weber, D.J. Healthcare worker with “pertussis”: Consequences of a false-positive polymerase chain reaction test result / D.J. Weber, M.B. Miller, R.H.

- Brooks, V.M. Brown, W.A. Rutala // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. – 2010. – Vol. 31, № 3. – P. 306–307.
210. Weigand, M.R. Conserved Patterns of Symmetric Inversion in the Genome Evolution of *Bordetella* Respiratory Pathogens / M.R. Weigand, Y. Peng, D. Batra, M. Burroughs, J.K. Davis, K. Knipe, V.N. Loparev, T. Johnson, P. Juieng, L.A. Rowe, M. Sheth, K. Tang, Y. Unoarumhi, M.M. Williams, M.L. Tondella // *mSystems*. – 2019. – Vol. 4, № 6. – e00702-19.
211. Weigand, M.R. Temporal patterns of *Bordetella pertussis* genome sequence and structural evolution. *Pertussis: epidemiology, immunology, and evolution* / M.R. Weigand, M.M. Williams, G. Otero; in ed. P. Rohai, S.V. Scarpino. - Oxford: Oxford University Press, 2018. - Chapter 9. – P. 144-166.
212. Weyant, R.S. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia / R.S. Weyant, D.G. Hollis, R.E. Weaver, M.F. Amin, A.G. Steigerwalt, S.P. O'Connor, A.M. Whitney, M.I. Daneshvar, C.W. Moss, D.J. Brenner // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1995. – Vol. 33, № 1. – P. 1-7.
213. Wilder-Smith, A. Seroepidemiology of pertussis in the adult population of Singapore / A. Wilder-Smith, S. Ng, A. Earnest // *Annals of the Academy of Medicine Singapore*. – 2006. – Vol. 35, № 11. – P. 780–782.
214. Woolfrey, B.F. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica* / B.F. Woolfrey, J.A. Moody // *Clinical Microbiology Reviews*. - 1991. – Vol. 4, № 3. – P. 243-255.
215. World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals. Pertussis [Электронный ресурс] // WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. - Geneva: World Health Organization, 2020. -
Режим доступа:
https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/
216. Wright, S.W. Pertussis infection in adults with persistent cough / S.W. Wright, K.M. Edwards, M.D. Decker, M.H. Zeldin // *JAMA*. – 1995. – Vol. 273, № 13. –

- P. 1044-1046.
217. Xu, Y. Triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / Y.Xu, Y. Xu, Q. Hou, R. Yang, S. Zhang // APMIS. -2010. – Vol.118, № 9. P.685–691.
218. Yih, W.K. *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms / W.K. Yih, E.A. Silva, J. Ida, N. Harrington, S.M. Lett, H. George // Emerging Infectious Diseases. – 1999. – Vol. 5, № 3. – P. 441–443.
219. Zhang, X. Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination / X. Zhang, L.S. Weyrich, J.S. Lavine, A.T. Karanikas, E.T. Harvill // Emerging Infectious Diseases. – 2012. – Vol. 18, № 11. – P. 1771–1779.