

*На правах рукописи*

Андриевская Ирина Юрьевна

**Характеристика популяции *B. pertussis*, циркулирующей на территории Российской Федерации в 2018 – 2024 гг.**

1.5.11. – микробиология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2025

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Заславская Майя Исааковна** – доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины, профессор

**Макарова Марина Витальевна** – доктор биологических наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», отдел проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, главный научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

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

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Исследование возбудителя коклюша продолжает быть востребованным в связи с ростом заболеваемости, тяжелым течением инфекции у детей раннего возраста и отмечаемыми летальными исходами. В России в 2023 году зарегистрировано 52 727 случаев коклюша (показатель заболеваемости — 36,1 на 100 тыс. населения), что в 16,4 раза выше уровня заболеваемости в 2022 году (2,2 на 100 тыс. населения), и в 7,5 раз выше среднесноголетнего показателя (4,8 на 100 тыс. населения) (Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации», 2023, 2024). Вероятными причинами роста заболеваемости коклюшем называют: увеличение отказов родителей от вакцинации детей в возрасте до одного года; накопление неиммунных лиц среди детей старших возрастных групп; потеря специфического иммунитета среди взрослого населения; распространение *B. pertussis* бессимптомными носителями; генетические изменения возбудителя коклюша под действием избирательного давления вакцинации, которые стали регистрироваться с конца 1990-х годов (V.K. Fry, 2010; V. Bouchez et al., 2011; B.M. Althouse et al., 2015; О.Ю. Борисова, 2016; M.R. Weigand et al., 2019; V. Bouchez et al., 2021; J. Zhang et al., 2022; F. Mooi et al., 2023). Кроме того, в структуре популяции *B. pertussis* наблюдается рост резистентности к макролидам с высокой распространенностью в Китае, в то время как за пределами Азии устойчивые изоляты выявляются спорадически (K. Koide et al., 2022; C. Rodrigues et al., 2024). Также увеличение количества молекулярно-генетических исследований методом ПЦР способствовало выявлению большего количества случаев инфекции, включая те, которые протекают в легкой или стёртой форме, а также среди контактных лиц в очагах заболевания коклюшем (Информационно-методические письма Роспотребнадзора 2022; 2023; 2024).

С конца 1950-х годов для профилактики коклюша применяется цельноклеточный коклюшный компонент в составе вакцины АКДС. С 1990-х годов в мировую практику стали внедряться бесклеточные вакцины, содержащие очищенные коклюшные антигены, такие как коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин, пертактин и фимбрии второго и третьего типа, в разных комбинациях. Тем не менее, даже при массовой вакцинации не удается полностью остановить циркуляцию возбудителя коклюша, что подтверждается данными из разных стран. Ряд исследователей отмечает существование взаимосвязи между использованием бесклеточных вакцин и увеличением заболеваемости коклюшем (F. Mooi et al., 2014; A. Zomer et al., 2018).

Применение современных молекулярно-генетических методов значительно расширило возможности эпидемиологического надзора и мониторинга инфекционных заболеваний, в том числе и за коклюшем (Г.Я. Ценева и др., 2003; J. Geurtsen et al., 2009; A. Advani et al., 2011; V. Bouchez et al., 2011; N.H. Carbanetti, 2016; K. Katfy et al., 2017; T. Moriuchi et al., 2017; Y. Wakimoto et al., 2020). Однако, используемые в мире технологии для генотипирования *B. pertussis* применяются с чистой культуры выделенного возбудителя. Учитывая физиологические особенности *B. pertussis*, длительность и трудоемкость его культивирования, не всегда возможно проведение генотипирования штаммов и, следовательно, получение информации о генотипических свойствах возбудителя. Таким образом, актуальным становится оценка клонального состава циркулирующей популяции возбудителя коклюшной инфекции и разработка новых способов генотипирования *B. pertussis* непосредственно из клинического образца, полученного от больного, позволяющих получать информацию о генотипических свойствах возбудителя, исключая этап выделения чистой культуры.

### **Степень разработанности темы исследования**

Генотипирование циркулирующих на территории РФ штаммов *B. pertussis* проводится с 2000 года в рамках научных исследований и работы Референс-центра по мониторингу за коклюшем ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (И.К. Мазурова и др., 2008; О.Ю. Борисова и др., 2009, 2010, 2012, 2016; В.А. Алешкин и др., 2013; Г.А. Ивашинникова и др., 2012, 2013; Н.Т. Гадуа и др., 2012, 2015). Борисовой О.Ю. (2009) в ходе исследований была проведена характеристика структуры пяти ключевых генов патогенности у штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в период с 1948 по 2007 годы. К данным генам относятся *ptxA*, кодирующий S1 субъединицу коклюшного токсина, *prn*, кодирующий пертактин, *fim2* и *fim3*, которые обеспечивают синтез фимбриальных белков 2 и 3 типа, а также *tcfA*, отвечающий за продукцию фактора колонизации трахеи. Позднее, Н.Т. Гадуа (2012) были проанализированы семь генов, которые включали *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE*, *ptxP* и *prn*, отвечающие за формирование субъединиц А-В-комплекса, промоторной области коклюшного токсина и пертактина в циркулирующей на тот момент популяции *B. pertussis*. Ивашинниковой Г.А. (2013) проведено генотипирование штаммов *B. pertussis*, выделенных в 1948-2012 гг., с использованием двух схем мультилокусного антигенного сиквенс-типирования – MAST1 и MAST2. На территории РФ результаты по генотипированию штаммов *B. pertussis* были представлены и в других работах (Н.Н. Курова и др., 2004, 2010; И.В. Бабаченко, 2007). Во всем мире для генотипирования *B. pertussis* применяются методы, требующие выделения чистой культуры (R.L. Friedman et al., 1992; F. Mooi et al., 2000; I.H. van Loo et al., 2002; H. Hallander et al., 2007; F. Carriquiriborde et al., 2019; V. Bouchez et al., 2021; J. Zhang et al., 2022; F. Mooi et al., 2023).

### **Цель исследования**

Изучить генотипические свойства возбудителя коклюша с оценкой клонального состава циркулирующей популяции в 2018 – 2024 гг. с использованием модернизированного методического подхода микробиологического мониторинга.

### **Задачи исследования:**

1. Провести анализ состояния лабораторной диагностики и этиологической структуры возбудителя коклюша на территории России в 2018 – 2024 гг.
2. Провести анализ чувствительности к антибиотикам штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2018 – 2024 гг.
3. Разработать и апробировать на практике способ генотипирования, основанный на вложенной (nested) ПЦР, для проведения мультилокусного антигенного сиквенс-типирования фрагментов гена пертактина *prn*, промотора *ptxP* гена коклюшного токсина, гена фимбриального белка 3 типа *fim3* в клинических образцах, полученных от больных с подозрением на коклюш.
4. Выявить особенности клонального состава популяции *B. pertussis*, циркулирующей с 2018 по 2024 гг. с помощью модернизированного методического подхода микробиологического мониторинга с использованием фрагментного и полногеномного секвенирования.
5. Провести сравнительный анализ особенностей генетической структуры производственных вакцинных штаммов *B. pertussis* и штаммов, циркулирующих в настоящее время.
6. Подобрать и охарактеризовать с помощью полногеномного секвенирования перспективные штаммы *B. pertussis* для включения в кандидаты при производстве вакцинных препаратов.

## Научная новизна

Проведенный многофакторный анализ состояния лабораторной диагностики коклюша на территории РФ позволил установить этиологическую структуру возбудителей с доминированием *B. pertussis* 73,7% (95% ДИ: 71,6 – 75,7) за период 2018 – 2024 гг. Установлено, что в период подъема заболеваемости коклюшем рост числа выявленных случаев происходит за счет интенсивного использования молекулярно-генетических исследований (прирост эффективности использования метода ПЦР 59% (95% ДИ: 58,8 – 59,2) и лабораторного подтверждения диагноза до 62,5% (95% ДИ: 61,9 – 63,1)).

На территории РФ в популяции *B. pertussis* в период 2018–2024 гг. циркулировали штаммы, чувствительные к эритромицину, кларитромицину, азитромицину и рокситромицину, и отсутствовали резистентные штаммы с мутацией в позиции A2047G в 23S rRNA, определяющей резистентность к макролидам. Показано, что у штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2023–2024 гг., отмечается уменьшение диаметра зоны задержки роста, который не превышал 42 мм, и увеличение МИК эритромицина и кларитромицина до 2,0 мкг/мл у 2,5% и до 4,0 мкг/мл у 5% штаммов соответственно, по сравнению со штаммами *B. pertussis* 2018 – 2020 гг., что может свидетельствовать о расширении адаптационных механизмов возбудителя на фоне длительного применения антибактериальной терапии эритромицином.

Впервые разработан способ генотипирования *B. pertussis* на основе вложенной (nested) ПЦР по определению аллельных профилей промотора *ptxP* гена коклюшного токсина, гена пертактина *prn* и гена фимбриального белка 3 типа *fim3*.

Данный способ предусматривает выделение ДНК из клинических образцов, а именно, мазков с задней стенки ротоглотки, далее проведение первого раунда nested ПЦР с внешними специфическими праймерами wide F-R для получения ампликонов фрагментов *ptxP*, *fim3* и *prn*, далее второго раунда nested ПЦР с внутренними праймерами и последующего мультилокусного антигенного сиквенс-типирования с определением аллельных профилей генов (Патент на изобретение РФ 2822353).

Впервые описана современная популяция *B. pertussis* по структуре 17 генов факторов патогенности – *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE*, *ptxP*, *fim2*, *fim3*, *prn*, *tcfA*, *fhaB*, *суаA*, *vag8*, *barC*, *brkA*, *ompQ*, *bscl*, в 9 генах выявлен однонуклеотидный полиморфизм, что может влиять на вирулентность и иммуногенность возбудителя: *суаA4* (93,6%), *суаA9* (6,4%), *fhaB1* (91,8%), *fhaB2* (7,3%), *fhaB37* (0,9%), *tcfA2* (57,3 %), *tcfA5* (0,9 %), *tcfA6* (41,8 %), *ptxA1* (87,2%), *ptxA2* (6,4%), *ptxP1* (6,4%), *ptxP2* (6,4%), *ptxP3* (87,2%), *ptxC1* (12,7%), *ptxC4* (87,3%), *fim2-1* (92,7%), *fim2-2* (6,4%), *fim2-16* (0,9%), *fim3-1* (67,3%), *fim3-2* (32,7%), *prn1* (10%), *prn2* (82,7%), *prn3* (1,3%), *prn4* (2,7%), *prn7* (2,7%). В период высокой заболеваемости коклюшем 2023–2024 гг. отмечается доминирование двух генотипов с аллельными профилями *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2*.

Установлено, что в настоящее время сохраняются генотипические различия между штаммами *B. pertussis*, используемыми для производства вакцинного коклюшного компонента, входящего в состав АКДС, и циркулирующей популяцией *B. pertussis*. Впервые с помощью полногеномного секвенирования дана характеристика восьми штаммам *B. pertussis*, которые предложены в качестве перспективных штаммов для включения в кандидаты при производстве вакцинных препаратов.

## Теоретическая и практическая значимость

Определены подходы к проведению геномного эпидемиологического мониторинга *B. pertussis* для выявления тенденций внутривидовых генетических различий в рамках эпидемиологического надзора за биологическими рисками распространения коклюшной инфекции на территории РФ, что может быть использовано как основа совершенствования

лабораторной диагностики, создания иммунопрофилактических препаратов и коррекции терапии при этой инфекции.

Полученные в ходе настоящего исследования результаты свидетельствуют о продолжающейся микроэволюции возбудителя коклюша и формируют представления о масштабах внутривидового генетического разнообразия *B. pertussis*, затрагивающих генетические детерминанты 17 факторов патогенности.

Установлено, что интенсивное использование метода ПЦР в лабораторной диагностике коклюша позволило увеличить долю лабораторно подтвержденных диагнозов и повысить количество положительных находок при обследовании в очагах инфекции, что послужило основанием для подачи предложения в новую редакцию СанПин о включении ПЦР-диагностики при обследовании в очагах.

Проведенные исследования по оценке антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis*, выделенных в период высокой заболеваемости коклюшем, к эритромицину, кларитромицину, азитромицину и рокситромицину указывают на возможное снижение эффективности указанных антибактериальных средств в отношении возбудителя коклюша *in vitro*.

Разработанный способ генотипирования *B. pertussis* непосредственно в клиническом материале позволяет оценить генетическое разнообразие циркулирующей популяции возбудителя. Это обеспечивает быстрое выявление *B. pertussis* с измененной структурой промотора гена коклюшного токсина, гена фимбриального белка 3 типа и гена белка пертактина в рамках эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией на территории РФ.

Разработанный алгоритм микробиологического мониторинга *B. pertussis* проводится с учетом вида биоматериала – из клинического материала осуществляется выделение ДНК, nested PCR и секвенирование по Сэнгеру, из бактериальной культуры осуществляется выделение ДНК и полногеномное секвенирование (WGS) с последующим проведением биоинформатического анализа для определения генетических характеристик, поиска мутаций, приводящих к устойчивости к антибактериальным препаратам, что в итоге позволит отслеживать адаптацию возбудителя к вакцинам и своевременно менять их штаммовый состав.

Создана и охарактеризована рабочая коллекция *B. pertussis* в количестве 222 штаммов, которая используется в научных целях и в качестве источника контрольных образцов для проведения внешнего контроля качества.

Полученные последовательности геномов 107 изолятов *B. pertussis* отправлены в Национальный каталог патогенных микроорганизмов «Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии» г. Оболенска, в процессе реализации федерального проекта «Санитарный щит страны – обеспечение биологической безопасности (профилактика, выявление, реагирование)».

500 нуклеотидных последовательностей фрагментов промотора *ptxP* гена коклюшного токсина и гена *fim3* *B. pertussis* депонированы на отечественной платформе агрегирования результатов расшифровок геномов возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний VGARus (genomenvpn.crie.ru).

Перспективные штаммы *B. pertussis* для включения в состав кандидатов производственных вакцинных штаммов переданы в «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» г. Москвы. Номера штаммов в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ): 900123, 900124, 900125, 900127, 900129, 900130, 900131, 900132.

Полученные результаты оценки эффективности лабораторной диагностики коклюша вошли в Государственные доклады «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году» и «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2024 году», а также в учебное пособие «Коклюш, дифтерия, столбняк: лабораторная диагностика и вакцинация», 2024 г. В процессе осуществления деятельности Референс-центра по мониторингу за коклюшем ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, послужили основой для подготовки информационно-методических писем Роспотребнадзора «О заболеваемости коклюшем, анализе состояния лабораторной диагностики, мониторинге за возбудителем и состоянии противокклюшного иммунитета населения в Российской Федерации» от 19.11.2024 г. № 02/20325-2024-27 и от 16.06.2025 г. № 02/11250-2025-27; были использованы при составлении ежемесячных отчетов в соответствии с «Положением об эпидемиологическом мониторинге» № 02/20475-2023-27 от 29.11.2023 г.; и интегрированы в учебные материалы лекционного курса, применяемого на региональных практических семинарах по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша (г. Ижевск, г. Казань, 2023 г.; г. Ярославль, г. Смоленск, 2024 г., г. Тюмень, г. Петропавловск-Камчатский, 2025 г.), а также на пяти онлайн-семинарах по лабораторной диагностике коклюша для специалистов Центрального, Приволжского и Уральского федеральных округов (2024 г.), Ханты-Мансийского автономного округа (2025 г.) (акт внедрения от 11.04.2025 г.).

Материалы диссертационного исследования используются в работе кафедры микробиологии и вирусологии Института профилактической медицины имени З. П. Соловьева ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России (Пироговский университет) при обучении студентов по направлениям подготовки (специальностям): «Лечебное дело», «Педиатрия» и «Фармация» (акт внедрения: от 11.04.2025 года); данные исследования используются в работе кафедры микробиологии им. В.С. Киктенко Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» при обучении студентов по направлениям подготовки (специальностям): 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.03 Стоматология, 33.05.01 Фармация, 06.06.01 Биологические науки, 06.03.01 Бакалавриат – микробиология (акт внедрения: от 14.04.2025 года).

### **Методология и методы исследования**

В рамках настоящей работы методологическая база сформирована с учетом намеченной цели исследования. В качестве предмета исследования выбрана разработка способа и алгоритма генотипирования, осуществляемого на клиническом материале, а также анализ генетического полиморфизма популяции *B. pertussis*. Для обзора научных трудов, рассматривающих разработку и использование методов генотипирования возбудителей бактериальных инфекций, были использованы формально-логические подходы. На всех этапах исследования использовали как общенаучные, так и специальные методы, которые включали микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические методы.

Экспериментальная часть проведена на базе лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. Все этапы работы выполнены при наличии одобрения Комитета по биомедицинской этике указанного учреждения (протокол № 63 от 22.12.2022 г.) в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г.

## Материалы исследования

Объектом исследования были клинический материал (мазки с задней стенки глотки), а также штаммы *B. pertussis*, выделенные от больных коклюшем в период 2018 - 2024 гг. и присланные из лабораторий ЛПО и ФБУЗ ЦГ и Э в субъектах РФ в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за коклюшем ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора согласно приказу Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

Образцы биологического материала и штаммы микроорганизмов. В работе были использованы типовые штаммы *B. pertussis* 143, *B. parapertussis* 386, *B. bronchiseptica* 9, полученные из ГКПМ, г. Оболенск, *B. pertussis* ATCC 9797, *S. aureus* ATCC 29213 (Американской коллекции типовых культур (ATCC, США).

В работе использовано 222 штамма *B. pertussis*, полученных от больных коклюшем в период с 2018 г. по 2024 г., 5652 образцов биологического материала, из них 5621 – мазки, взятые с задней стенки глотки у больных коклюшем и 31 фрагмент секционного материала, полученный от больных с летальным исходом коклюша, в период с 2023 по 2024 гг. из лабораторий ЛПО и ФБУЗ ЦГ и Э в субъектах РФ в соответствии с письмами Роспотребнадзора от 19.06.2012 г. № 01/6830-12-32, от 30.01.2023 г. № 02/1385-2023-27, от 22.01.2024 г. № 02/761-2024-27.

Микробиологические исследования. Культивирование и идентификацию штаммов *B. pertussis* проводили в соответствии с МУК 4.2.3701-21 «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами».

Определение антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis* проводили с использованием двух методов: ДДМ и МИК теста. Для ДДМ применяли диски с антибактериальными препаратами: эритромицин (15 мкг), рокситромицин (30 мкг), азитромицин (15 мкг), кларитромицин (15 мкг) («НИЦФ», г. Санкт-Петербург). Для определения МИК антибиотиков использовали набор MIC Test Strip ("ЛИОФИЛКЕМСРЛ", Италия) для грамотрицательных бактерий с диапазоном концентраций антибиотиков от 0,016 до 256 мг/л.

Выделение бактериальной ДНК. Из 24-часовых бактериальных культур *B. bronchiseptica*, 48-часовых бактериальных культур *B. parapertussis* и 72-часовых бактериальных культур *B. pertussis*, выращенных на Бордетелагаре с добавлением 10 % ККРС (ООО «Лейтран», Москва), выделяли ДНК методом кипячения (Т. Маниатис и др., 1984).

Выделение ДНК из клинических образцов проводили ручным способом с помощью набора реагентов «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя, или в автоматическом режиме с помощью станции выделения AutoPure 96 (Allsheng, Китай) с использованием наборов реагентов «МагноПрайм® ФАСТ» (ООО «НекстБио», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Полимеразная цепная реакция. Определение возбудителя коклюша в биологическом материале проводили методом ПЦР в режиме реального времени с помощью наборов реагентов «АмплиСенс Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), «АмплиПрайм Bordetella» (ООО «НекстБио», Россия) и «РеалБест ДНК Bordetella species/Bordetella pertussis/Bordetella bronchiseptica» (АО «Вектор-Бест», Россия), согласно инструкции производителя. Для амплификации ДНК использовали приборы: Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия), ДТ-прайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Для выявления фрагментов генов *ptxP*, *fim3*, *prn* использовали вложенную (nested) PCR. Протоколы проведения реакций описаны в результатах диссертационного исследования.

ПЦР для выявления фрагментов гена 23S rRNA проводили по опубликованному протоколу (M.J. Bart et al., 2014).

Мультиплексная аллель-специфическая ПЦР для выявления устойчивых к эритромицину штаммов *B. pertussis* проводилась по протоколу (Z. Wang et al., 2015).

Секвенирование по Сэнгеру проводили в генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Scientific, США) с использованием наборов реагентов Big Dye terminator v. 3.1 (Applied biosystems, США) по инструкции производителя. Полученные хроматограммы обрабатывали с использованием программы MEGA версия 11.0 (<https://www.megasoftware.net/>).

Полногеномное секвенирование. Выделение геномной ДНК из бактериальной культуры *B. pertussis* осуществляли с помощью набора реагентов «ExtractDNA Blood&Cells» («Евроген»; Россия) по протоколу производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли на флуориметре Qubit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) с помощью набора реагентов Spectra Q HS (Raissol, Россия). Библиотеки для секвенирования создавались с помощью набора MGIEasy Fast PCR-Free FS Library Prep Set (MGI, Китай). Циркуляцию полученных библиотек проводили с помощью набора MGIEasy Dual Barcode Circularization Kit (MGI, Китай) в соответствии с протоколом производителя. Для полногеномного секвенирования использовали проточную ячейку FCL PE 150 в платформе DNBSEG-G50 (MGI, Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные последовательности были обрезаны и удалены адаптеры с помощью fastp v0.23.4 (<https://github.com/OpenGene/fastp>). Из обрезанных последовательностей с помощью SPAdes-3.15.4 были получены контиги. Проверку качества сборки контигов проводили с использованием QUAST 5.2.0 (<https://github.com/ablab/quast>; Россия). Далее по схеме Института Пастера (<https://bigsd.b.pasteur.fr/bordetella/>) проводили мультилокусное антигенное типирование последовательностей (MAST). Анализ проводили по 17 генам патогенности (*ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE*, *ptxP*, *prn*, *fim2*, *fim3*, *tcfA*, *fhaB*, *vag8*, *bapC*, *brkA*, *ompQ*, *cyuA*, *bscI*).

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки полученных результатов использовали Microsoft Office Excel и библиотеки Python (Pandas и Numpy). Доверительный интервал (95% ДИ) рассчитывался с использованием точного метода Клоппера-Пирсона. Для визуализации полученных данных использовались программные инструменты Matplotlib, Plotly, а также Microsoft Office Excel.

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Автор осуществил сбор материала, аналитический обзор литературных источников, выполнил весь комплекс молекулярно-генетических исследований. Разработка и подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров для nested PCR проводилась совместно с научным сотрудником лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.м.н. А.В. Чаплиным; апробация разработанного способа генотипирования проводилась совместно с сотрудниками лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, ведущими научными сотрудниками к.м.н. Н.Т. Гадуа и к.м.н. А.С. Пименовой, старшим научным сотрудником лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, к.б.н. Ю.Н. Урбан. Автором проведен анализ и статистическая

обработка полученных данных, сформулированы выводы, даны практические рекомендации и определены перспективы дальнейшей разработки темы.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. По результатам проведенного анализа лабораторной диагностики коклюша за 2023-2024 гг. показано, что на территории РФ интенсивно используются молекулярно-генетические исследования и значительный процент лабораторно подтвержденного диагноза происходит при помощи ПЦР без выделения бактериальной культуры.

2. Впервые разработан способ генотипирования *B. pertussis* на основе вложенной ПЦР (nested PCR) по определению аллелей промотора гена коклюшного токсина (*ptxP*), белка пертактина (*prn*) и фимбриального белка Fim3 (*fim3*), предусматривающий выделение ДНК непосредственно из клинических образцов, а именно, из мазков с задней стенки ротоглотки пациента.

3. Установлено, что на территории РФ в циркулирующей популяции *B. pertussis* доминирующее положение занимают штаммы, несущие «невакцинные» аллели промотора *ptxP* гена коклюшного токсина и пертактина *prn*, а также «вакцинный» и «невакцинный» аллели гена *fim3*.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов подтверждается значительным количеством проведенных исследований. Исследования реализованы с использованием бактериологических и молекулярно-генетических подходов, которые обладают высокой чувствительностью и специфичностью, а также с использованием специализированного программного обеспечения для биоинформатического и статистического анализа данных. Работа была выполнена согласно отраслевой научно-исследовательской программе «Проблемно ориентированные научные исследования в отрасли эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» в процессе выполнения задач НИР ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского: «Изучение роли инфекций, вызванных различными видами бордетелл и коринебактерий, в эпидемическом процессе дифтерийной и коклюшной инфекций в Российской Федерации» (Рег. № 1022040800551-4) на 2021 – 2025 гг., а также в процессе деятельности Референс-центра по мониторингу за коклюшем при проведении микробиологического мониторинга возбудителя коклюша на территории России в соответствии с приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

Диссертационная работа была апробирована на заседании секции Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Эпидемиология, микробиология, клиника инфекционных заболеваний» (протокол № 2 от 24.04.2025 г.).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 9 научных конференциях: XVI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского к 300-летию Российской академии наук, (Москва, 2024); Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024» (Москва, 2024); X Межведомственной научно-практической конференция «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика» (Москва, 2024); X Юбилейном конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Санкт-Петербург, 2024); VIII Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2024); IX Национальном конгрессе бактериологов, посвященном 50-летию ФБУН ГНЦПМБ Роспотребнадзора (Москва, 2024); XVII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в

современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (конгресс с международным участием) (Москва, 2025), XI Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, посвященном 80-й годовщине Победы в Великой Отечественной войне 1941-1945 гг. (Санкт-Петербург, 2025), XI Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика» (Москва, 2025).

### **Публикации**

По данным проведенных исследований опубликовано 17 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, 1 статья – в другом издании, 2 тезиса в рецензируемых изданиях, 8 тезисов в сборниках материалов конференций, 1 патент на изобретение, 1 учебное пособие.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 157 листах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, 5 глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 40 рисунками. Список литературы включает 254 источника, в том числе 44 - отечественных и 210 - зарубежных авторов.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Анализ лабораторной диагностики и этиологической структуры возбудителя коклюша в России в 2018 – 2024 гг.**

С целью оценки этиологической структуры возбудителя коклюша, циркулирующего на территории России, нами проанализированы материалы, присланные в Референс-центр по мониторингу за коклюшем ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора из лабораторий МО и ФБУЗ ЦГ и Э Роспотребнадзора субъектов РФ, проводящих лабораторные исследования на коклюшную инфекцию. Установлено, что за период с 2018 по 2024 гг. проведено 970528 исследований на коклюшную инфекцию, из них 49,8% (95% ДИ: 49,7 – 49,9) проведено в 2024 году, что в 1,9 раз больше, чем в 2023 году (Рисунок 1).

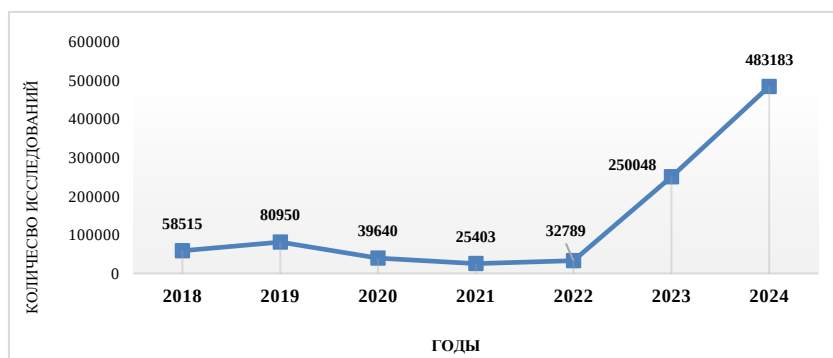


Рисунок 1 – Количество проведенных исследований на коклюшную инфекцию

Если проследить динамику использования трех методов лабораторной диагностики коклюша, видно, что в 2023 г. отмечается значительное увеличение удельного веса использования метода ПЦР до 59% (95% ДИ: 58,8 – 59,2) и снижение применения серодиагностики до 18,6% (95% ДИ: 18,4 – 18,7). В 2024 г. продолжается активное использование ПЦР, однако отмечается незначительное снижение до 53,0% (95% ДИ: 52,9 – 53,2), увеличение количества серологических исследований до 28,9% (95% ДИ: 28,8 – 29,0). Применение бактериологических методов сократилось до 18,1% (95% ДИ: 18,0 – 18,2) (Рисунок 2).

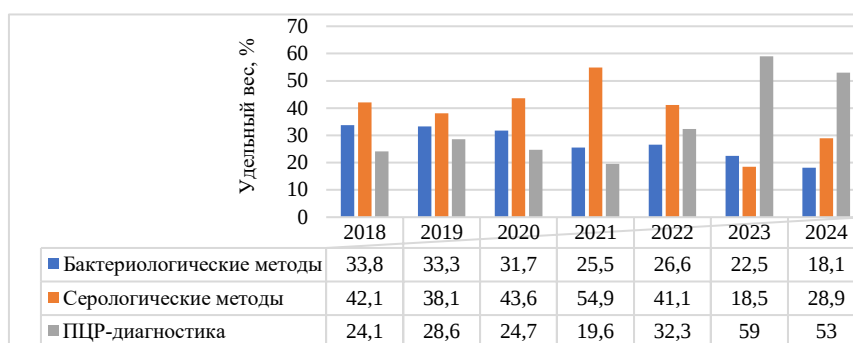


Рисунок 2 – Динамика использования различных методов для диагностики коклюшной инфекций

Анализ динамики использования трех методов лабораторной диагностики с диагностической целью показал, что в 2018 – 2022 гг. в основном применяли серодиагностику - 41,5% (95% ДИ: 41,2 – 41,7), бактериологическую диагностику использовали в 31,4% (95% ДИ: 31,2 – 31,6) случаев и ПЦР-диагностику – в 27,1% (95% ДИ: 26,9 – 27,3) случаев. В 2023 г. с диагностической целью в большинстве случаев - 59,2% (95% ДИ: 59,0 – 59,5) применяли ПЦР-диагностику, значительно сократилось количество серологических исследований до 22% (95% ДИ: 21,8 – 22,2). В 2024 г. ПЦР-диагностику также применяли в 52,9% (95% ДИ: 52,7 – 53,1).

По эпидемическим показаниям в 2018 - 2019 гг. в основном использовали бактериологическую и серологическую диагностику – в 48,2% (95% ДИ: 47,2 – 48,9) и 32,9% (95% ДИ: 32,1 – 33,7) случаев соответственно, ПЦР-диагностику применяли только в 19,1% (95% ДИ: 18,4 – 19,8) случаев. В 2021 г. отмечалось значительное увеличение доли ПЦР-диагностики до 57,8% (95% ДИ: 57,1 – 58,5). В 2023 – 2024 гг. по эпидпоказаниям в большинстве случаев применяли ПЦР-диагностику 59,6% (95% ДИ: 59,4 – 59,9), бактериологическую диагностику использовали в 30,9% (95% ДИ: 30,6 – 31,1) случаев и серодиагностику только в 9,5% (95% ДИ: 9,3 – 9,7) случаев.

В 2018 - 2022 гг. лабораторное подтверждение диагноза преимущественно было с помощью серодиагностики в 50,1% (95% ДИ: 49,6 – 50,6). В 2023 -2024 гг. увеличилось количество лабораторных подтверждений методом ПЦР до 51,5% (95% ДИ: 50,9 – 51,2).

Анализ этиологической структуры возбудителей коклюша показал, что на протяжении 2018 – 2024 гг. в структуре возбудителей коклюша доминировал *B. pertussis* – 73,7% (95% ДИ: 71,6 – 75,7). Этиологическая структура возбудителей коклюша в 2023 году в целом по России представлена следующим образом: *B. pertussis* – 98,7% (95% ДИ: 98,1 – 99,0), *B. parapertussis* – 0,8% (95% ДИ: 0,5 – 1,3), *B. bronchiseptica* - 0,3% (95% ДИ: 0,1 – 0,6), *B. holmesii* – 0,3% (95% ДИ: 0,1 – 0,6), в 2024 году увеличилось количество выявляемых *B. parapertussis* до 7,1% (95% ДИ: 6,4 – 7,8) и *B. bronchiseptica* до 3,7% (95% ДИ: 3,2 – 4,2), соответственно до 89,2% (95% ДИ: 88,3 – 89,9) снизилось выявление *B. pertussis* и до 0,1% (95% ДИ: 0,02 – 0,2) - *B. holmesii* (Рисунок 3 А, Б).

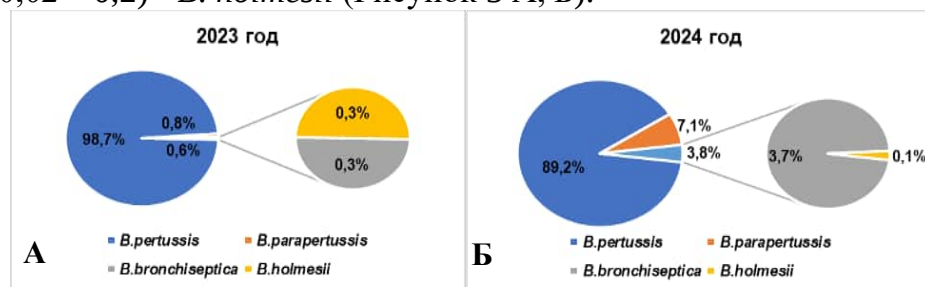


Рисунок 3 - Этиологическая структура возбудителей коклюша в 2023 г.(А) и 2024 г. (Б)

Учитывая рост заболеваемости коклюшем в 2023 г., мы проанализировали эффективность применения бактериологического и молекулярно-генетического методов исследования в очагах инфекции. Так, в 2023 г. было обследовано 39,7% (95% ДИ: 39,5 – 39,9), а в 2024 году количество обследованных лиц увеличилось до 57,9% (95% ДИ: 57,7% – 58,1%). Анализ применения бактериологического метода и ПЦР-диагностики в очагах коклюшной инфекции показал, что в очагах с 1 случаем коклюша ПЦР диагностику применяли в 77,8% случаях, в очагах с 2 случаями - в 75,2%, в очагах с 3 и более случаями - в 85,8% случаев. При этом отмечено, что увеличение применения ПЦР-диагностики в очагах коклюша приводило к росту числа положительных находок с 3,3% в очагах с 1 случаем до 9,9% в очагах с 3 и более случаями (Рисунок 4 А, Б).

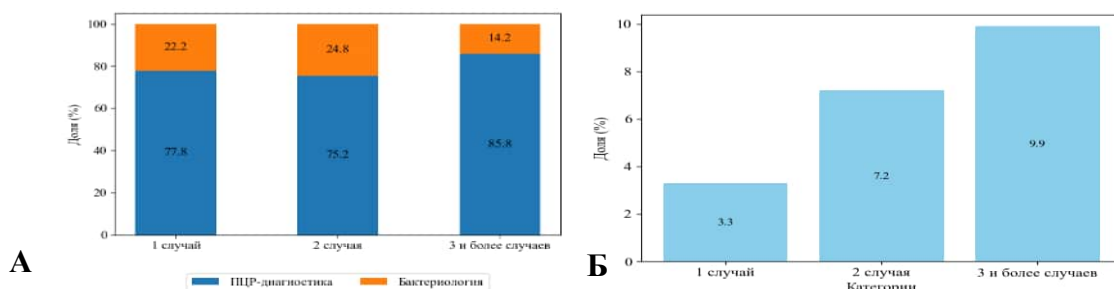


Рисунок 4 – Лабораторное подтверждение диагноза коклюш в очагах коклюшной инфекции с помощью разных методов диагностики (А) и оценкой положительных находок при проведении исследований (Б)

#### **Антибиотикочувствительность циркулирующих штаммов *B. pertussis***

В связи с ростом устойчивых к макролидам штаммов *B. pertussis* в мире, нами проведен мониторинг антибиотикочувствительности к макролидам штаммов *B. pertussis*, циркулирующих на территории России в 2018 – 2024 гг. Критериев пограничных значений антибиотикочувствительности для штаммов *B. pertussis* не существует, поэтому интерпретацию полученных результатов осуществляли на основании скрининговых исследований антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis*, которые проводятся специалистами в области изучения возбудителя коклюша в различных странах мира (N. Comolai et al., 1997; T. Tiwari et al., 2006; P.K. Cassidy et al., 2008; N.H. Carbonetti, 2016). В опубликованных ранее работах (K. Lewis et al., 1995; E.K. Korgenski et al., 1997; B.C. Hill et al., 2000) при анализе результатов ДДМ сообщалось, что размер зоны задержки роста, связанной с чувствительностью штаммов *B. pertussis* к макролидам соответствовал  $\geq 42$  мм, а в исследованиях с помощью МИК-тестов чувствительность штаммов *B. pertussis* связывали с МИК  $< 32$  мкг/мл.

#### **Изучение чувствительности штаммов *B. pertussis* к эритромицину и кларитромицину**

Проведенное исследование показало, что у исследуемых штаммов *B. pertussis*, выделенных в период 2018-2020 гг., диаметр зоны задержки роста к эритромицину находился в пределах 32 – 62 мм (95% ДИ: 43,3 – 46,0). В 2020 году наблюдалось увеличение количества штаммов с зоной задержки роста менее 42 мм до 83% (95% ДИ: 43,7 – 96,9). Диаметр зоны задержки роста у изучаемых штаммов, выделенных в 2023 и 2024 гг. составлял 23 – 50 мм (95% ДИ: 30,1 – 33,1) и 25 – 50 мм (95% ДИ: 30,0 – 37,6) соответственно. Удельный вес штаммов с зоной задержки роста менее 42 мм составил в 2023 году 91,7% (95% ДИ: 81,9 – 96,4), в 2024 году – 84,2% (95% ДИ: 62,4 – 94,5).

При изучении чувствительности штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2018 – 2020 гг., к кларитромицину диаметр зоны задержки роста находился в пределах 22 – 80 мм (95% ДИ: 43,5 – 58,5). При этом у штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2023 – 2024 гг., наблюдается уменьшение зоны задержки роста до 30 – 45 мм (95% ДИ: 35,5 – 40,6). Следовательно, в

популяции продолжают циркулировать штаммы *B. pertussis* с чувствительностью к эритромицину и кларитромицину.

Определение МИК эритромицина и кларитромицина проводилось для штаммов *B. pertussis* с зоной задержки роста <42 мм. МИК эритромицина для штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2018-2024 гг., варьировала от 0,032 до 2,0 мкг/мл. МИК кларитромицина штаммов *B. pertussis* составила от 0,032 до 4,0 мкг/мл (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации антибактериальных препаратов штаммов *B. pertussis*

| Кол-во изученных штаммов | МИК эритромицина, мкг/мл | МИК кларитромицина, мкг/мл |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1 (1,25%)                | 0,032                    | 0,032                      |
| 3 (3,75%)                | 0,064                    | 0,064                      |
| 12 (15%)                 | 0,125                    | 0,125                      |
| 24 (30%)                 | 0,25                     | 0,25                       |
| 27 (33,75%)              | 0,5                      | 0,5                        |
| 7 (8,75%)                | 1,0                      | 1,0                        |
| 2 (2,5%)                 | 2,0                      | 2,0                        |
| 4 (5%)                   | -                        | 4,0                        |

Для эритромицина МИК<sub>50</sub> составила 0,25 мкг/мл, МИК<sub>90</sub> – 1,0 мкг/мл. Для кларитромицина МИК<sub>50</sub> - 1,0 мкг/мл, МИК<sub>90</sub> – 2,0 мкг/мл. Отмечалось увеличение МИК эритромицина до 2,0 мкг/мл у 2,5% (95% ДИ: 0,7 – 8,7) штаммов *B. pertussis*. Также отмечалось увеличение МИК кларитромицина до 4,0 мкг/мл у 5% (95% ДИ: 1,9 – 12,2) штаммов *B. pertussis*.

Определение чувствительности штаммов *B. pertussis* к азитромицину и к рокситромицину

Анализ чувствительности штаммов *B. pertussis* к азитромицину показал, что у исследуемых штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2018 – 2020 гг., диаметр зоны задержки роста находился в пределах 22 – 80 мм (95% ДИ: 43,5 – 58,5). При этом у штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2023 – 2024 гг., наблюдается уменьшение зоны задержки роста до 23 – 38 мм (95% ДИ: 28,9 – 32,1). Оценка чувствительности штаммов *B. pertussis* к рокситромицину ДДМ показала, что у исследуемых штаммов диаметр зоны задержки роста находился в пределах 29-47 мм (95% ДИ: 34,1 – 38,4).

Молекулярно-генетическое исследование антибиоточувствительности штаммов *B. pertussis* к макролидам

Для штаммов *B. pertussis*, имеющих зону задержки роста диаметром < 42 мм, с целью поиска мутации A2047G в гене 23S rRNA, была проведена аллель-специфичная ПЦР с двумя парами праймеров: FPRP и MPRP; FPRP и WPRP. При постановке ПЦР с первой парой праймеров (Рисунок 5 А) у чувствительных штаммов *B. pertussis* показан только один фрагмент длиной 286 п.н., при этом у резистентных штаммов с мутацией в позиции A2047G дополнительно идентифицируется фрагмент размером 121 п.н. При проведении ПЦР с второй парой праймеров (Рисунок 5 Б) у чувствительных штаммов идентифицируются два фрагмента длиной 286 п.н. и 121 п.н., а у резистентных штаммов – один фрагмент размером 286 п.н. В нашем исследовании показано, что у всех изученных штаммов *B. pertussis* отсутствует мутация в позиции A2047 последовательности 23S rRNA.

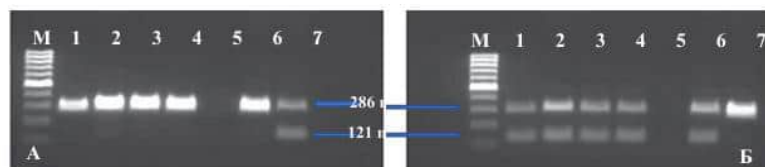


Рисунок 5 - Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных в ходе аллель-специфичной ПЦР с праймерами FPRP и MPRP (А) и FPRP и WPRP (Б)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder; 1 – 4 – штаммы *B. pertussis*, выделенные от пациентов при обследовании с диагностической целью; 5 – отрицательный контроль амплификации (ПЦР-смесь); 6 – типовой штамм *B. pertussis* № 143, чувствительный к макролидам; 7 – типовой штамм *B. pertussis* ATCC 9797, устойчивый к макролидам

Для подтверждения полученных результатов было проведено секвенирование фрагмента гена 23S rRNA длиной 521 п.н. Полученные последовательности были сопоставлены с последовательностью гена 23S rRNA, опубликованной в NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). У всех изученных клинических изолятов не было обнаружено мутации в позиции A2047G в 23S rRNA.

### Разработка методики генодиагностики *B. pertussis* на основе вложенной ПЦР

Учитывая сокращение проведения бактериологических исследований на коклюшную инфекцию и значительное снижение количества положительных находок на территории РФ, нами была разработана методика генотипирования *B. pertussis* непосредственно из клинического материала, полученного от больного, без выделения чистой культуры возбудителя на основе nested-ПЦР.

На первом этапе нами разработаны специфические праймеры (Таблица 2), которые были сконструированы на основании нуклеотидных последовательностей, имеющих в базах данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Таблица 2 – Праймеры, используемые в исследовании

| Ген         | Название праймера | Нуклеотидная последовательность 5' – 3' | Ориентация праймера | Размер продукта | Примечание |                           |
|-------------|-------------------|-----------------------------------------|---------------------|-----------------|------------|---------------------------|
| <i>ptxP</i> | PtxP1wide         | ATATCCCGAATTCGTCGC                      | прямой праймер      | 714 п.н.        | 1 раунд    | Оригинальный              |
|             | PtxP2wide         | GAGCACATTGTCGTGTT                       | обратный            |                 |            |                           |
|             | PtxP1             | AATCGTCCTGCTCAACCG                      | прямой праймер      | 573 п.н.        | 2 раунд    | F.R. Mooi et al., 2009    |
|             | PtxP2             | GGTATACGGTGGCGGGA                       | обратный            |                 |            |                           |
| <i>fim3</i> | Fim3Fwide         | CATGCTAATGGCCTCCGG                      | прямой праймер      | 900 п.н.        | 1 раунд    | Оригинальный              |
|             | Fim3Rwide         | GCGTGCTGAAGGACAAG                       | обратный            |                 |            |                           |
|             | Fim3F             | GACCTGATAATTCTGATGC                     | прямой праймер      | 715 п.н.        | 2 раунд    | О.Ю. Борисова и др., 2009 |
|             | Fim3R             | CGCAAGGCTTGCCGGTTT                      | обратный            |                 |            |                           |
| <i>prn</i>  | PrnFwide          | GGCGGTGTCTGTGTTGGG                      | прямой праймер      | 526 п.н.        | 1 раунд    | Оригинальный              |
|             | PrnRwide          | GGTCAGCGTCAGCTTCAC                      | обратный            |                 |            |                           |
|             | PrnC              | GTGCGGTTCCCGGCGGTG                      | прямой праймер      | 102 п.н.        | 2 раунд    | F.R. Mooi et al., 2009    |
|             | PrnD              | GCTCCACGCTGGAGCCCCG                     | обратный            |                 |            |                           |
|             | PrnE              | TGCGGTTCCCGGCGGCTT                      | прямой праймер      | 71 п.н.         | 2 раунд    | F.R. Mooi et al., 2009    |
|             | PrnD              | GCTCCACGCTGGAGCCCCG                     | обратный            |                 |            |                           |

Генотипирование *B. pertussis* из клинического материала от больного проводилось следующим образом: собранный биологический материал смывали с тампона в физиологический раствор; выделяли ДНК с применением коммерческих наборов реагентов в соответствии с инструкцией производителя; проводили nested PCR, а затем секвенирование по Сэнгеру для выявления аллельных вариантов фрагментов промоторной области *ptxP* гена коклюшного токсина, генов фимбрий 3 типа *fim3* и пертактина *prn*.

### Выявление фрагмента промотора (*ptxP*) гена коклюшного токсина

При проведении nested PCR в первом раунде для амплификации более крупного фрагмента ДНК *ptxP* размером 714 п.н. использовались внешние праймеры PtxP1wide и PtxP2wide. Во втором раунде на основе первой амплификации, с использованием внутренних праймеров PtxP1 и PtxP2, проводилась более точная амплификация целевого фрагмента размером 573 п.н. Реакционная смесь 1 и 2 раундов содержала 10xPCR (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs (все буферные растворы Thermo Scientific, США), 5M Betaine solution (Sigma-aldrich, США), Tag DNA Polymerase (Thermo scientific, США), праймеры в конечной концентрации не ниже 5 пкмоль/мкл. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия): 95°C 10 мин, 30 циклов 95°C 15 сек, 55°C 30 сек, 72° С 1 мин, и 72° С 10 мин. Детекцию результата амплификации проводили путем постановки горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. Результаты показали наличие четких полос участка *ptxP* в 1 раунде ПЦР размером 714 п.н., во 2 раунде - 573 п.н. Контрольный образец без матрицы (отрицательный контроль) не показал наличия полос, подтверждая отсутствие контаминации (Рисунок 6).

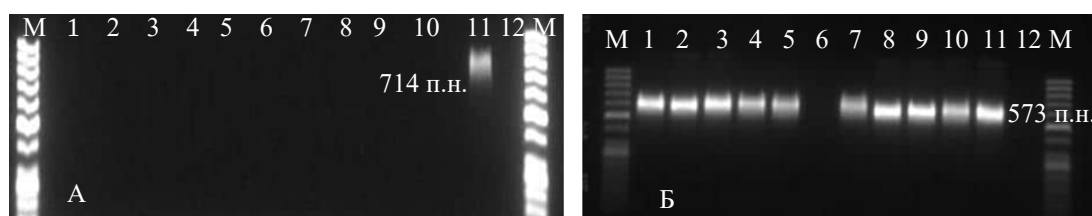


Рисунок 6 – Пример электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в ходе амплификации *ptxP* *B. pertussis* при проведении I раунда (А) и II раунда (Б)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 10 – ДНК клинических образцов *B. pertussis*, 11 – положительный контроль (*B. pertussis* 143), 12 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

### Выявление фрагмента гена *fim3*

В первом раунде для амплификации более крупного фрагмента ДНК *fim3* размером 900 п.н. использовались внешние праймеры Fim3Fwide и Fim3Rwide. Во втором раунде на основе первой амплификации, с использованием внутренних праймеров Fim3F и Fim3R, проводилась более точная амплификация целевого фрагмента размером 715 п.н. Состав реакционной смеси описан выше. Условия амплификации: 95°C 15 мин, 30 циклов 95°C 30 сек., 56°C 30 сек, 72° С 1 мин. Детекцию результата амплификации проводили по алгоритму, описанному выше, только для 1 раунда использовали 1,8% агарозный гель. Результаты показали наличие четких полос в 1 раунде размером 900 п.н., во 2 раунде размером 715 п.н. Контрольный образец без матрицы (отрицательный контроль) не показал наличия полос, что подтверждает отсутствие контаминации (Рисунок 7).

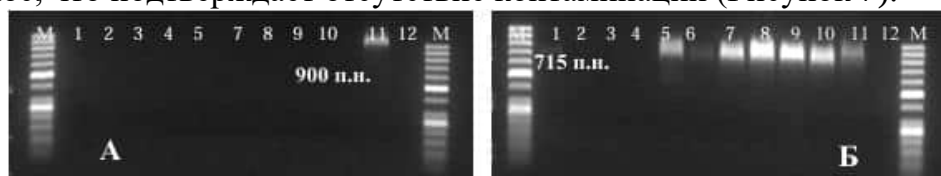


Рисунок 7 – Пример электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в ходе амплификации *fim3* *B. pertussis* при проведении I раунда (А) и II раунда (Б)

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 10 – ДНК клинических образцов *B. pertussis*, 11 – положительный контроль (*B. pertussis* 143), 12 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

### Выявление фрагментов гена *prn*

Полиморфизм в гене *prn* в основном ограничен регионом 1. В первом раунде для амплификации более крупного фрагмента ДНК размером 526 п.н. использовались внешние праймеры PrnFwide и Prn3Rwide. Во втором раунде на основе первой амплификации, с использованием внутренних пар праймеров *prnC-prnD* и *prnE-prnD*, проводилась амплификация фрагментов размером 102 п.н. и 71 п.н. Состав реакционной смеси 1 и 2 раундов описан выше. Условия амплификации: 94°C 10 мин, 40 циклов 94°C 1 мин, 66° С 1 мин 30 сек, 72° С 2 мин. Результаты электрофореза показали наличие четких полос размером 526 п.н., 102 п.н. и 71 п.н. Контрольный образец без матрицы (отрицательный контроль) не показал наличия полос, подтверждая отсутствие контаминации (Рисунок 8, 9).

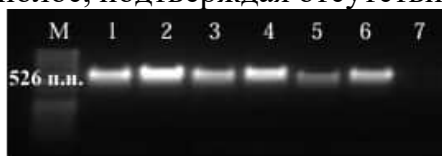


Рисунок 8 – Пример электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в ходе амплификации *prn* *B. pertussis* в 1 раунде

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - положительный контроль (*B. pertussis* 143), 3-6– ДНК клинических образцов *B. pertussis*, 7 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

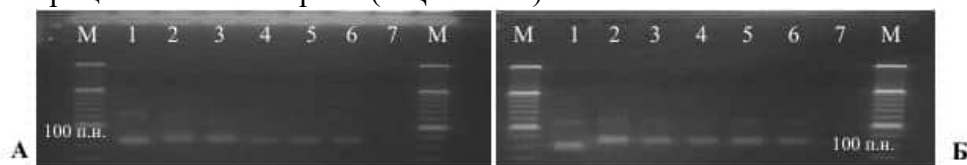


Рисунок 9 – Пример электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в ходе амплификации *prn* *B. pertussis* во 2 раунде, А - *prnC-prnD*, Б - *prnE-prnD*

Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - положительный контроль (*B. pertussis* 143), 3-6 – ДНК клинических образцов *B. pertussis*, 7 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Далее проводилось секвенирование по Сэнгеру полученных фрагментов *ptxP*, *fim3* и *prn* и определение аллельных вариантов. Разработанный способ был апробирован на 336 положительных пробах, содержащих ДНК *B. pertussis*, полученных из клинических образцов, которые были собраны от больных коклюшем с клинической симптоматикой заболевания. Получен патент на изобретение РФ № 2822353 «Способ генотипирования *B. pertussis* из клинических образцов на основе вложенной ПЦР».

### **Клональный состав современной популяции *B. pertussis***

#### Методический подход к проведению геномного мониторинга циркулирующей популяции *B. pertussis*

По результатам проведенного анализа лабораторной диагностики коклюша показано, что на территории РФ интенсивно используется ПЦР-диагностика и значительный процент лабораторного подтверждения происходит с помощью молекулярно-генетического метода без выделения бактериальной культуры. В связи с этим, учитывая разработанный новый способ генотипирования *B. pertussis* с диагностического материала, нами предлагается алгоритм микробиологического мониторинга возбудителя коклюша (Рисунок 10). Методический подход включает несколько ключевых аспектов, которые позволят увеличить охват территорий РФ по оценке структуры популяции *B. pertussis*.



Рисунок 10 - Алгоритм микробиологического мониторинга *B. pertussis*

#### Анализ генетической структуры популяции *B. pertussis* в 2018 – 2024 гг.

Для определения генетического разнообразия *B. pertussis* на основе анализа аллелей генов фимбрий 3 типа *fim3*, пертактина *prn* и промотора *ptxP* гена коклюшного токсина мы провели секвенирование по Сэнгеру клинических образцов, собранных в период подъема заболеваемости 2023 – 2024 гг., В исследование были включены образцы, полученные из 44 субъектов РФ, что составило 49,3% от числа субъектов Российской Федерации. Результаты показали, что в 2023 году циркулировали *B. pertussis* с аллельными профилями *ptxP3/fim3-2/prn2* - 19,4% (39/201), *ptxP3/fim3-1/prn2* - 73,6% (148/201), *ptxP3/fim3-1/prn1* - 1,5% (3/201), *ptxP3/fim3-2/prn3* - 0,5% (1/201), *ptxP3/fim3-1/prn9* - 1,0% (2/201), *ptxP3/fim3-3/prn2* - 0,5% (1/201), *ptxP3/fim3-1/prn3* - 2,0% (4/201), *ptxP3/fim3-1/prn4* - 1,5% (3/201), с доминированием генотипов *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2*. В 2024 году наблюдалось сокращение геномного разнообразия до трех генотипов: *ptxP3/fim3-2/prn2* - 23,9% (22/92), *ptxP3/fim3-1/prn2* - 72,8% (67/92), *ptxP3/fim3-1/prn1* - 3,3% (3/92). Предполагается, что «успешные клоны», несущие аллельные варианты *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2* вытеснили другие генотипы, которые в 2023 году встречались в единичных случаях.

С целью оценки динамики изменения генетического разнообразия, мы проанализировали результаты генотипирования штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2018-2020 гг. В результате было выявлено 4 генотипа с аллельными профилями: *ptxP3/fim3-2/prn2* - 37,6% (38/101), *ptxP3/fim3-1/prn2* - 44,6% (45/101), *ptxP3/fim3-1/prn9* - 6,9% (7/101), *ptxP3/fim3-2/prn9* - 10,9% (11/101). В 2021 и 2022 гг. в Референс-центр по мониторингу за коклюшем не поступали бактериальные культуры *B. pertussis* в связи с пандемией новой коронавирусной инфекции COVID-19.

#### Анализ изменений клонального состава циркулирующей популяции *B. pertussis*

С 2000-х годов штаммы *B. pertussis* с аллелем *ptxP3* заняли лидирующее положение, хотя в период 2007 – 2013 гг. в единичных случаях встречались «вакцинные» аллели *ptxP1* и *ptxP2*. Выявленное в исследовании доминирование «невакцинного» *ptxP3* в циркулирующей популяции возбудителя коклюша соответствует международной тенденции.

На основе полученных полногеномных последовательностей штаммов *B. pertussis* выполнен филогенетический анализ с использованием аллелей генов *ptxA*, *fim3* и промотора *ptxP* гена коклюшного токсина (Рисунок 11). Все изученные штаммы *B. pertussis* разделились на четыре группы, что отражает наличие генетически обособленных линий внутри популяции. Группы III и IV являются наиболее многочисленными и в основном представлены штаммами *B. pertussis* с аллелями *ptxA1*, *ptxP3* и *fim3-1/fim3-2*, что соответствует современным циркулирующим вариантам, ассоциированным с глобальными

вспышками коклюша и повышенной вирулентностью. Наблюдается хронологическая эволюция популяции возбудителя. Группы I и II представлены штаммами *B. pertussis*, выделенными в 1960-х годах. Тогда как III и IV группы в основном представлены штаммами *B. pertussis*, выделенными в 2023-2024 годах, однако встречаются 9 изолятов, полученных в 2016, 2017, 2018 и 2020 годах. Полное замещение аллелей *ptxA2/ptxA4/ptxP1/ptxP2* на *ptxA1/ptxP3* в современных штаммах (2016-2024 гг.) указывает на селективное преимущество этой комбинации. Историческое разнообразие *ptxA2/ptxA4/ptxP1/ptxP2* исчезло после 1997 года.

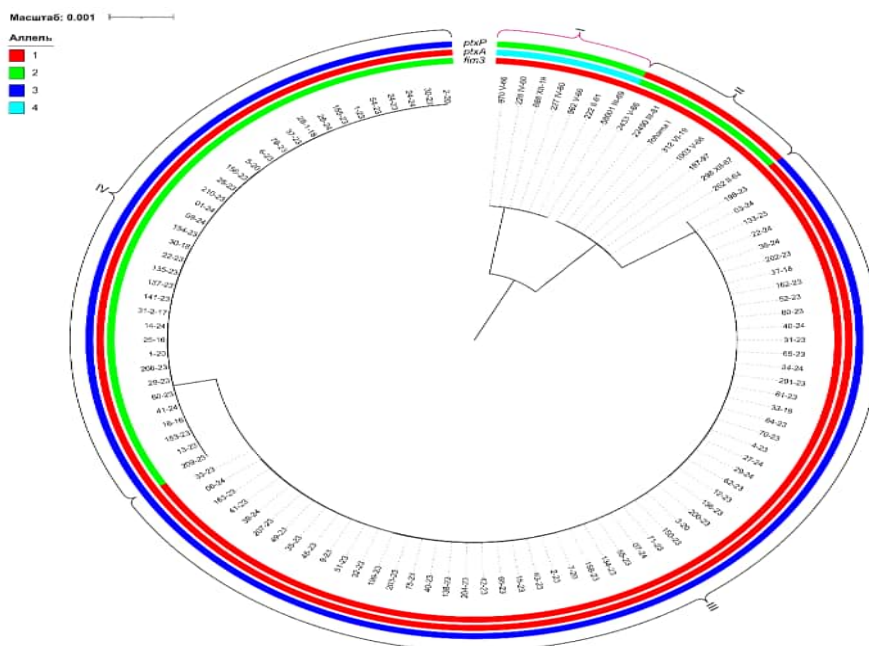


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево штаммов *B. pertussis*, построено на основе конкатенированных последовательностей локусов *ptxA*, *ptxP*, *fim3* по алгоритму максимального правдоподобия с использованием программы RaxML и модели GTR GAMMA

Примечание: корень дерева установлен в средней точке. На внешних кольцах цветом обозначены номера аллелей: красный – аллель 1, зеленый – аллель 2, синий – аллель 3, бирюзовый – аллель 4 (согласно легенде). Римскими цифрами обозначены клады. Масштабная линейка соответствует 0,001 нуклеотидных замен на сайт

С целью изучения дополнительной информации об эпидемических штаммах коклюша, были изучены особенности 17 генов патогенности: *ptxP* (промотор гена коклюшного токсина), *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE* (гены коклюшного токсина), *prn* (ген белка пертактина, автотранспортер), *tcfA* (ген фактора колонизации трахеи), *fhaB* (ген филаментозного гемагглютинина), *fim2* (ген фимбриального антигена 2 типа), *fim3* (ген фимбриального антигена 3 типа), *ompQ* (ген интегрального белка внешней мембраны), *brkA* (*Bordetella pertussis* resistance to killing by the immune system A, ген, связанный с устойчивостью *B. pertussis* к уничтожению иммунной системой, автотранспортер), *vag8* (virulence-associated gene 8, ген 8, ассоциированный с вирулентностью, автотранспортер), *суаА* (ген токсина аденилатциклазы), *barC* (ген белка-автотранспортёра), *bscI* (ген, кодирующий белок системы секреции 3 типа).

Благодаря своей роли в патогенезе и индукции иммунитета, коклюшный токсин, фимбрии *fim2/fim3*, пертактин и филаментозный гемагглютинин представляют собой антигены, которые включены в большинство бесклеточных вакцин против коклюша.

Полученные результаты представлены в виде кластерной тепловой карты, которая показывает распределение аллелей по отдельным образцам (Рисунок 12). Полиморфизм был обнаружен в 9 генах патогенности: *ptxA*, *ptxC*, *ptxP*, *tcfA*, *fim2*, *fim3*, *prn*, *fhaB*, *суаА*.

Аллель *ptxA1* обнаружена у 87,2% (96/110) изолятов, у 6,4% (7/110) изолятов с 1964 по 1997 гг. – *ptxA2* и 6,4% (7/110) изолятов с 1955 по 1969 гг. – *ptxA4*. Генетические изменения затронули также ген *ptxC*, кодирующий субъединицу S3 коклюшного токсина. Доминирующий аллель *ptxC* изменился. Если с 1955 по 1997 год все изоляты (n = 14) несли «вакцинный» аллель *ptxC1*, то с 2016 по 2024 год выявлен «не вакцинный» аллель *ptxC4* (96/110).

Хотя промотор *ptxP* гена коклюшного токсина не входит в компоненты бесклеточной вакцины, его обычно используют при типировании штаммов в качестве маркера возникшей генетической линии, которая распространилась по всему миру. Изучение последовательности *ptxP* показало, что у изученных штаммов присутствуют три аллеля — *ptxP1*, *ptxP2*, *ptxP3*. Аллель *ptxP3* несли 86,4% (95/110) штаммов *B. pertussis*. Аллели *ptxP1* и *ptxP2* обнаружены у одинакового количества штаммов *B. pertussis*: 6,4% (7/110) и 6,4% (7/110) соответственно. Аллель *ptxP3* отличается от *ptxP1* и *ptxP2* мутацией в положении – 65 нуклеотидной последовательности, что обеспечивает повышенную прочность связывания с димером BvgA, приводящую к увеличению продукции коклюшного токсина.

По структуре гена пертактина показано, что 82,8% (91/110) изолятов характеризовались аллелем *prn2*, 10% (11/110) – *prn1*, 1,8% (2/110) — *prn3* и по 2,7% (3/110) – *prn4* и *prn7*, что соответствует тенденции эволюции гена *prn* в мире. Аллель *prn1* был выявлен у 4 штаммов 1955 г., 1 штамма 1956 г., 2 штаммов 1965 г., 1 штамма 1967 г., по 1 штамму – 1981, 1997 и 2023 гг. Аллель *prn2* представлен у 1 штамма 1965 года и у штаммов 2016-2024 гг., аллель *prn3* – у 2-х штаммов 2023 года, *prn4* – у 3-х штаммов 2023 г., *prn7* – у 3-х штаммов 1956, 1965, 1969 гг. Из 110 клинических изолятов, полученных в 1955-2024 годах и исследованных на наличие полиморфизма *tcfA*, кодирующего фактор колонизации трахеи А, аллель *tcfA2* обнаружен у 63/110 (57,3 %) штаммов, 1/110 (0,9 %) несли *tcfA5* и 46/110 (41,8 %) штаммов характеризовались аллелем *tcfA6*. Аллель *tcfA5* был обнаружен в изоляте 2023 года. 43 штамма *B. pertussis* с новым типом *tcfA6* были выделены в 2023-2024 гг.

Аллели *fim2-1* и *fim3-1* генов были обнаружены в 92,7% (102/110) и 67,3% (74/110) случаях соответственно. В то же время в популяции обнаружены аллели *fim3-2* в 32,7% (36/110), *fim2-2* в 6,4% (7/110), *fim2-16* в 0,9% (1/110) штаммов *B. pertussis*. При анализе гена *fhaB* идентифицировано 3 варианта нуклеотидной последовательности: *fhaB1*, *fhaB2*, *fhaB37*. Среди изученных штаммов *B. pertussis* в большинстве случаев встречался аллель *fhaB1* в 91,8% (101/110), редкие штаммы *B. pertussis* несли аллели *fhaB2* – 7,3% (8/110) и *fhaB37* – 0,9% (1/110). Изучение полиморфизма гена *суаА* показало, что проанализированные штаммы несли два аллеля данного гена: *суаА4* и *суаА9* в 93,6% (103/110) и 6,4% (7/110) штаммов соответственно. При этом *суаА9* был обнаружен у некоторых штаммов 1955-1969 гг.

Было установлено, что 52,8% исследованных штаммов *B. pertussis* характеризуются носительством следующих аллельных профилей с отличием только по аллелю гена *tcfA*, кодирующего фактор колонизации трахеи А: 26,4% штаммов, выделенных в 2023 году, а также по одному штамму 2018 и 2020 годов имели генотип *ptxP3/fim3-1/prn2/ptxA1/ptxC4/tcfA2/fim2-1/fhaB1/суаА4*; и 26,4% штаммов 2023 и 2024 годов, а также один штамм 2020 года – *ptxP3/fim3-1/prn2/ptxA1/ptxC4/tcfA6/fim2-1/fhaB1/суаА4*.

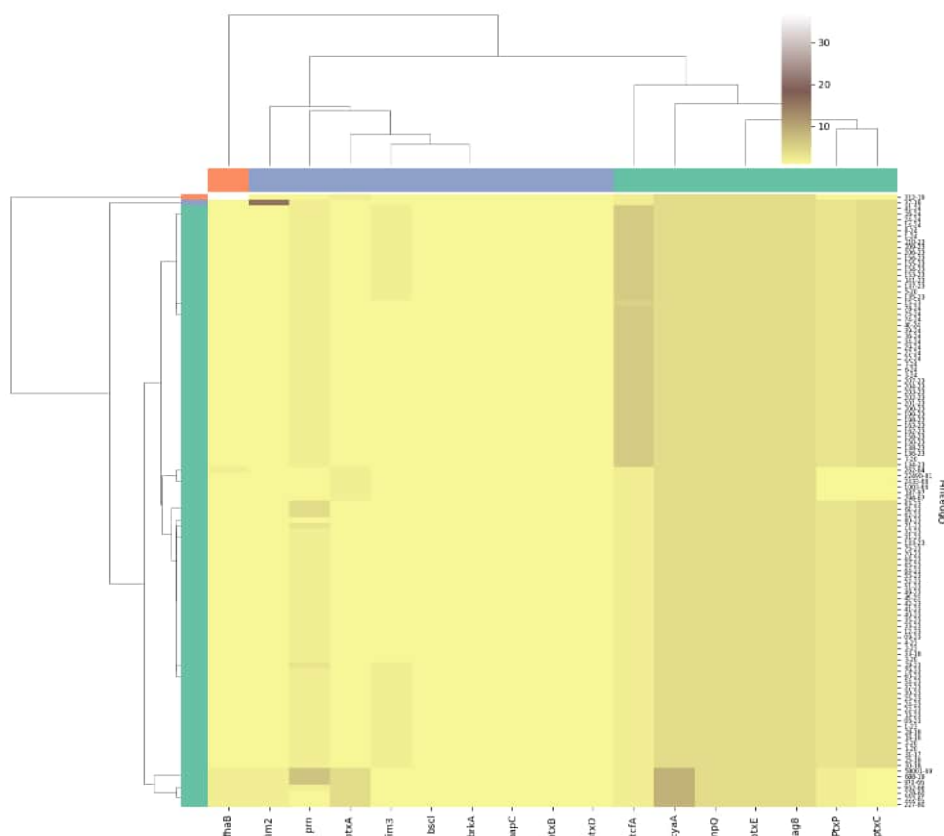


Рисунок 12 – Тепловая карта распределения аллелей генов в образцах

Примечание: цветовая шкала показывает значения аллелей (от 1 до 37) – от светло-жёлтого до коричневого. Если клетка светлая — у этого образца аллель гена от 1 до 2. Если клетка тёмно-коричневая — этот аллель гена встречается редко и имеет порядковый номер от 9 и выше. Если цвет средней насыщенности — номер аллеля от 3 до 7

Кроме того, 32,8% штаммов принадлежали к следующим аллельным вариантам, которые также отличались только по аллелю гена *tcfA*: *ptxP3/fim3-2/prn2/ptxA1/ptxC4/tcfA2/fim2-1/fhaB1/cyoA4* — 17,3% (штаммы 2023 года, два штамма 2016 года, один штамм 2017 года, по два штамма 2018 и 2020 годов); *ptxP3/fim3-2/prn2/ptxA1/ptxC4/tcfA6/fim2-1/fhaB1/cyoA4* — 15,5% (штаммы 2023 и 2024 годов, один штамм 2020 года).

### Сравнительный анализ производственных вакцинных штаммов и штаммов-кандидатов

Для оценки соответствия производственных штаммов *B. pertussis* и современной популяции возбудителя коклюша нами проведен анализ генетической структуры восьми вакцинных штаммов *B. pertussis*, входящих в банк штаммов для АКДС-вакцины в нашей стране (предоставлены д.м.н. И.А. Алексеевой, главный эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов ИЦ МИБП ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России) и восьми перспективных штаммов *B. pertussis* для включения в кандидаты при производстве вакцинных препаратов.

Штаммы *B. pertussis* были охарактеризованы по культурально-морфологическим свойствам на среде Бордетеллагар и были изучены особенности структуры семи генов основных факторов патогенности возбудителя коклюша (Таблица 3).

На основании полногеномных последовательностей перспективных штаммов было реконструировано филогенетическое дерево, отражающее эволюционное положение исследованных перспективных штаммов *B. pertussis* (Рисунок 13). Было установлено, что

все из них, кроме одного, формируют единый близкородственный кластер, вероятно, характерный для территории РФ.

Таблица 3 – Результаты изучения производственных и перспективных штаммов *B. pertussis*

| Штаммы                          | Серотип | Генотип                                            |
|---------------------------------|---------|----------------------------------------------------|
| <b>Вакцинные</b>                |         |                                                    |
| 305                             | 1.2.0   | <i>ptxA2/ptxB1/ptxC1/ptxP1/fim2-1/ fim3-1/prn1</i> |
| 312                             | 1.2.3   | <i>ptxA2/ptxB2/ptxC1/ptxP2/fim2-1/ fim3-1/prn1</i> |
| 475                             | 1.2.3   | <i>ptxA4/ptxB1/ptxC1/ptxP2/fim2-1/ fim3-1/prn1</i> |
| 267                             | 1.0.3   | <i>ptxA2/ptxB1/ptxC1/ptxP1/fim2-1/ fim3-1/prn1</i> |
| 38                              | 1.2.0   | <i>ptxA2/ptxB2/ptxC1/ptxP1/fim2-1/ fim3-1/prn1</i> |
| 39                              | 1.2.3   | <i>ptxA2/ptxB2/ptxC1/ptxP1/fim2-1/ fim3-1/prn1</i> |
| 345                             | 1.2.3   | <i>ptxA4/ptxB2/ptxC1/ptxP2/fim2-1/ fim3-1/prn1</i> |
| 703                             | 1.0.3   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC1/ptxP1/fim2-1/ fim3-1/prn1</i> |
| <b>Циркулирующие, кандидаты</b> |         |                                                    |
| Bp16                            | 1.0.3   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i> |
| Bp 31                           | 1.0.3   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn9</i> |
| Bp 25                           | 1.0.3   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i> |
| Bp37                            | 1.2.0   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-1/prn2</i> |
| Bp 30                           | 1.0.3   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i> |
| Bp 1                            | 1.0.3   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i> |
| Bp 2                            | 1.0.3   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i> |
| Bp 3                            | 1.2.0   | <i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-1/prn2</i> |

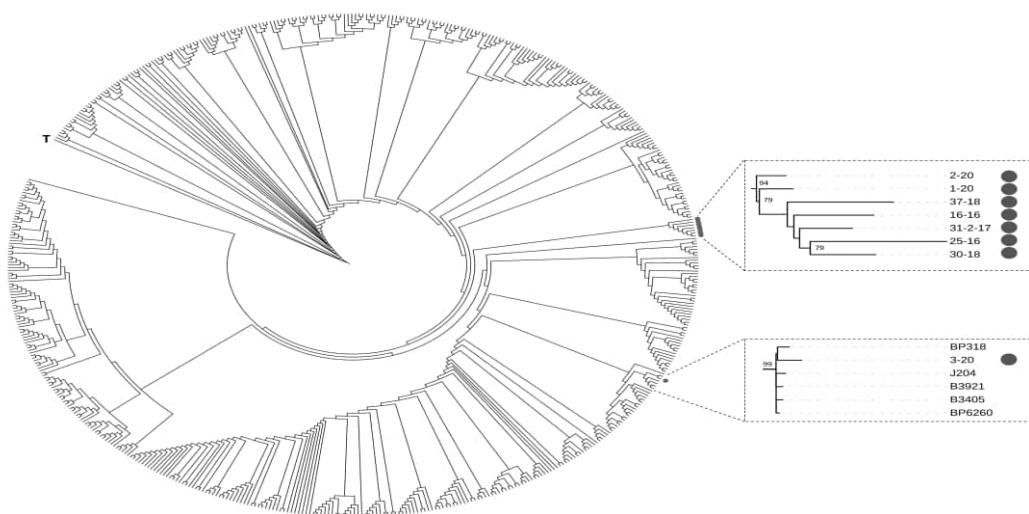


Рисунок 13 – Филогенетическое дерево *B. pertussis* сиквенс-типа ST2, построенное на основании полногеномного MLST

Примечание: Штаммы-кандидаты в вакцинные препараты отмечены серыми точками. Участки дерева содержащие данные штаммы, представлены рядом в увеличенном виде, в узлах отмечены уровни поддержки bootstrap (отображены только значения выше 70). На кольцевой диаграмме не отображены длины ветвей из-за их наличия отдельных штаммов с аномально длинными ветвями. Буква Т обозначает штамм Tohama I, использованный в качестве внешнего представителя

## ВЫВОДЫ

1. Показано увеличение применения ПЦР-диагностики до 59% от числа использованных методов и лабораторное подтверждение диагноза коклюш до 62,5%. В этиологической структуре возбудителей доминирует *B. pertussis* 73,7%. Установлено, что применение ПЦР-

диагностики в очагах коклюша способствовало росту числа положительных находок с 3,3% в очагах с 1 случаем до 9,9% в очагах 3 и более случаями.

2. Установлено, что на территории РФ в период 2018 – 2024 гг. продолжают циркулировать штаммы *B. pertussis*, чувствительные к макролидам, не содержащие мутацию в позиции A2047G в 23S rRNA, определяющую резистентность к макролидам. У штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2023 – 2024 гг., отмечено уменьшение диаметра зоны задержки роста в диско-диффузионном методе, который не превышал 42 мм, и увеличение МИК эритромицина и кларитромицина до 2,0 мкг/мл у 2,5% и до 4,0 мкг/мл у 5% штаммов соответственно.

3. Впервые разработан и апробирован способ генотипирования *B. pertussis* непосредственно из клинических образцов (мазки с задней стенки ротоглотки) на основе вложенной ПЦР (nested) по структуре промотора (*ptxP*) гена коклюшного токсина, белка пертактина (*prn*) и фимбриального белка Fim3 (*fim3*), что позволит улучшить эпидемиологический геномный мониторинг возбудителя коклюша.

4. Популяция *B. pertussis* демонстрирует клональную изменчивость в разные периоды эпидемического процесса. Отмечается доминирование в 2023 – 2024 гг. двух генотипов с аллельными профилями генов *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2*. Показаны полиморфизмы в 9 генах патогенности, которые могут влиять на вирулентность и иммуногенность бактерии: *суаA4* (93,6%), *суаA9* (6,4%), *fhaB1* (91,8%), *fhaB2* (7,3%), *fhaB37* (0,9%), *tcfA2* (57,3 %), *tcfA5* (0,9 %), *tcfA6* (41,8 %), *ptxA1* (87,2%), *ptxA2* (6,4%), *ptxP1* (6,4%), *ptxP2* (6,4%), *ptxP3* (87,2%), *ptxC1* (12,7%), *ptxC4* (87,3%), *fim2-1* (92,7%), *fim2-2* (6,4%), *fim2-16* (0,9%), *fim3-1* (67,3%), *fim3-2* (32,7%), *prn1* (10%), *prn2* (82,7%), *prn3* (1,3%), *prn4* (2,7%), *prn7* (2,7%).

5. Впервые охарактеризовано восемь производственных вакцинных штаммов *B. pertussis*, используемых в настоящее время в РФ для АКДС-вакцины, и установлена их принадлежность к шести генотипам с аллельными профилями *ptxA2/ptxB1/ptxC1/ptxP1/fim2-1/fim3-1/prn1*, *ptxA2/ptxB2/ptxC1/ptxP2/fim2-1/fim3-1/prn1*, *ptxA4/ptxB1/ptxC1/ptxP2/fim2-1/fim3-1/prn1*, *ptxA2/ptxB2/ptxC1/ptxP1/fim2-1/fim3-1/prn1*, *ptxA4/ptxB2/ptxC1/ptxP2/fim2-1/fim3-1/prn1*, *ptxA1/ptxB2/ptxC1/ptxP1/fim2-1/fim3-1/prn1*.

6. Установлено, что в настоящее время сохраняются генотипические различия между штаммами, используемыми для производства вакцинных препаратов, и циркулирующей популяцией *B. pertussis*. Предложены восемь штаммов *B. pertussis*, охарактеризованных с помощью полногеномного секвенирования и относящихся к четырем разным генотипам, в качестве перспективных штаммов для включения в кандидаты для производства вакцинных препаратов, которые соответствуют по генотипической структуре современной циркулирующей популяции *B. pertussis*.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для лабораторного обследования контактных лиц в очагах коклюша независимо от количества заболевших следует применять ПЦР-диагностику, позволяющую идентифицировать наибольший спектр возбудителей коклюша.

2. Для назначения адекватной антибиотикотерапии необходимо учитывать выявленную тенденцию увеличения МИК эритромицина и кларитромицина *in vitro*, что может свидетельствовать о возможном снижении эффективности действия этих антибиотиков на возбудителя коклюша.

3. Разработанный способ генотипирования *B. pertussis* непосредственно из клинического материала следует использовать для ускоренного выявления возбудителя коклюша с измененной генетической структурой промотора гена коклюшного токсина, белка фимбрий 3 типа и белка пертактина для контроля за биологическими рисками распространения коклюшной инфекции на территории РФ.

4. Обоснована необходимость обновления банка штаммов *B. pertussis* для производства вакцинных препаратов, из числа 8 предложенных штаммов *B. pertussis*, охарактеризованных с помощью полногеномного секвенирования.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Необходимо продолжить изучение антибиотикочувствительности циркулирующих штаммов *B. pertussis* к макролидам для выявления нарастания МИК антибиотиков.

Дальнейшие исследования необходимо направить на разработку расширенной методики генотипирования *B. pertussis* непосредственно из клинического материала с идентификацией аллельных профилей большего числа генетических детерминант факторов патогенности.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Борисова, О.Ю. Генотипическая характеристика штаммов *Bordetella pertussis* – кандидатов для получения коклюшного компонента вакцинных препаратов (Сообщение I) / О.Ю. Борисова, И.Ю. Андриевская, А.С. Пименова, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина, А.Б. Борисова, А.В. Чаплин, И.А. Алексеева, Л.И. Кафарская // Вестник РГМУ. – 2024. - № 2. – С. 4-10.

2. Пименова, А.С. Антибиотикочувствительность выделенных на территории России штаммов *Bordetella pertussis* к эритромицину и азитромицину / А.С. Пименова, Н.Т. Гадуа, И.Ю. Андриевская, О.Ю. Борисова, М.С. Петрова, А.Б. Борисова, С.С. Афанасьев, И.В. Подопригора, М.С. Афанасьев, Т.И. Москвина, Г.В. Воробьева, И.М. Дегтярева, О.В. Тимиркина, С.А. Лукьянцева, Т.Н. Тригорлова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2024. - № 3. – С. 27-37.

3. Борисова, А.Б. Выявление ко-инфекции, вызванной *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* / А.Б. Борисова, Е.А. Мурашова, И.Ю. Андриевская., О.Г. Пурская, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2024. - № 2. – С. 71-81.

4. Борисова, О.Ю. Анализ лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в 2023 году / О.Ю. Борисова, И.Ю. Андриевская, Н.Т. Гадуа, А.С. Пименова, И.А. Чагина, А.Ю. Миронов, Л.И. Кафарская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2024. – Т. 69, № 10. – С. 548-555.

5. Алексеева И.А. Влияние условий хранения цельноклеточной коклюшной вакцины на ее токсичность: исследование на аутбредных мышах / И.А. Алексеева, Д.Н. Лепихова, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, И.Ю. Андриевская, И.В. Ибрагимхалилова // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2025. – Т. 25, №1. – С. 111-120.

6. Скирда, Т.А. Определение иммунного статуса к коклюшу у детей 6-летнего возраста с жалобами на длительный кашель / Т.А. Скирда, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, А.Б. Борисова, И.Ю. Андриевская, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина, М.С. Петрова, С.Ю. Комбарова, Л.И. Кафарская // Материалы XVI Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского к 300-летию Российской академии наук, 25-27 марта 2024 г., г. Москва. – Москва, 2024. – С. 178-179.

7. Андриевская, И.Ю. Генотипирование возбудителя коклюша из клинических образцов / И.Ю. Андриевская, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, А.Б. Борисова, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина // Материалы XVI Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского к 300-летию Российской академии наук, 25-27 марта 2024 г., г. Москва. – Москва, 2024. – С. 19-20.

8. Андриевская, И.Ю. Аллельное типирование *ptxP Bordetella pertussis* в клинических образцах / И.Ю. Андриевская, А.С. Пименова, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина, О.Ю. Борисова // Конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024», 16 – 17 апреля 2024 г., г. Москва. – Москва, 2024. – С. 36.

9. Андриевская, И.Ю. Оценка генетического разнообразия *B. pertussis* в 2023 г. / И.Ю. Андриевская, Н.Т. Гадуа, А.С. Пименова, И.А. Чагина, Н.М. Каргальцева, О.Ю. Борисова // Материалы X Юбилейного конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. – Журнал инфектологии. – 2024. –Т. 16, № 2, Приложение 1. – С. 10 – 11.

10. Андриевская, И.Ю. Результаты исследования секционного материала от умерших от коклюша детей с помощью ПЦР / И.Ю. Андриевская, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина // Проблемы медицинской микологии. – 2024. – Т. 26, № 2. – С. 78.

11. Пименова, А.С. Анализ результатов проведения внешнего контроля качества исследований по выявлению возбудителя коклюша бактериологическим методом (2016 – 2022 гг.) / А.С. Пименова, И.Ю. Андриевская, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина, О.Ю. Борисова // Проблемы медицинской микологии. – 2024. – Т. 26, № 2. – С. 185-186.

12. Борисова, О.Ю. Анализ лабораторной диагностики коклюша в Российской Федерации в 2023 году / О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, И.Ю. Андриевская, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина // Материалы IX Национального конгресса бактериологов, посвященному 50-летию ФБУН ГНЦПМБ Роспотребнадзора, 17 – 19 сентября 2024 г., г. Москва. – Москва, 2024. – С. 23.

13. Борисова, О.Ю. Анализ состояния лабораторной диагностики коклюша в России / О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, И.Ю. Андриевская, А.С. Пименова, И.А. Чагина, М.А. Леонова // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XVII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, 24–26 марта 2025 г., г. Москва. – Москва, 2025. – С. 38.

14. Петрова, М.С. Эффективность ПЦР-диагностики коклюша у детей до 17 лет / М.С. Петрова, А.Б. Борисова, М.А. Леонова, И.Ю. Андриевская, А.С. Пименова, И.А. Чагина, О.Ю. Борисова, Л.И. Кафарская // Инфекционные болезни: мультидисциплинарный взгляд: сборник материалов научно-практической конференции, 15-16 апреля 2025 года, г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2025. – С. 359.

15. Андриевская, И.Ю. Оценка чувствительности *B. pertussis* к эритромицину молекулярно-генетическими методами / И.Ю. Андриевская, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, Н.Т. Гадуа, И.А. Чагина, М.А. Леонова, Н.М. Каргальцева // Материалы XI конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, посвященный 80-й годовщине Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг., 18-20 мая 2025 г., г. Санкт-Петербург. – Журнал инфектологии. – 2025. – Т. 17, №2, Приложение 1. – С. 9.

16. Патент на изобретение 2822353 Российская Федерация, С12Q 1/68 (2006.01), С12Q 1/6876 (2018.01). Способ генотипирования *B. pertussis* из клинических образцов на основе вложенной ПЦР / Борисова О.Ю., Андриевская И.Ю., Борисова А.Б., Пименова А.С., Гадуа Н.Т., Чагина И.А., Чаплин А.В., Афанасьев С.С., Чешева В.В. заявитель и патентообладатель: ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора (RU). – № 2023125556; заявл. 05.10.2023 г.; опубл. 04.07.2024, Бюл. № 19. – 19 с.

17. Коклюш, дифтерия, столбняк: лабораторная диагностика и вакцинация: учебное пособие / С.Г. Марданлы, О.Ю. Борисова, И.Ю. Андриевская, А.Б. Борисова, А.С. Пименова, И.А. Чагина, Н.Т. Гадуа. -Электрогорск: АО "ЭКОлаб", 2024. - 67с.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФБУЗ ЦГ и Э – Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения Центр гигиены и эпидемиологии

ЛПО – лечебно-профилактические организации

МО – медицинские организации

ГКМП – государственная коллекция патогенных микроорганизмов

ДДМ –диско-диффузионный метод

МИК –минимальная ингибирующая концентрация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п.н. – пара нуклетидов

NCBI – National Center for Biotechnology Information, национальный центр биотехнологической информации