

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

Андриевская Ирина Юрьевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИИ *B. PERTUSSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ
НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2018 – 2024 ГГ.**

1.5.11. – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор
Борисова Ольга Юрьевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

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.....	13
Материалы исследования	14
Образцы биологического материала и штаммы микроорганизмов	14
Микробиологические исследования	15
Идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOF MS.....	16
Определение антибиотикочувствительности штаммов <i>B. pertussis</i>	17
Выделение бактериальной ДНК	18
Выделение ДНК из клинических образцов	18
Полимеразная цепная реакция	19
Секвенирование по Сэнгеру.....	20
Полногеномное секвенирование.....	21
Статистическая обработка результатов	22
Личное участие автора в получении результатов.....	22
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	23
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	23
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	26
1.1. Современное состояние проблемы коклюшной инфекции.....	26

1.2. Микробиологический мониторинг антибиотикочувствительности	
<i>B. pertussis</i>	31
1.2.1. Антибиотикочувствительность <i>B. pertussis</i> и механизмы резистентности.	31
1.2.2. Методы определения антибиотикочувствительности штаммов <i>B. pertussis</i> к макролидам.....	33
1.2.3. Антибиотикочувствительность циркулирующих штаммов	
<i>B. pertussis</i>	36
1.3. Геномный мониторинг <i>B. pertussis</i>	40
1.3.1. Генетические детерминанты факторов патогенности – основа геномного мониторинга <i>B. pertussis</i>	40
1.3.2. Методы генотипирования.....	53
1.3.3. Геномный мониторинг <i>B. pertussis</i> в различных странах мира.....	55
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
ГЛАВА 2. Анализ лабораторной диагностики и этиологической структуры возбудителя коклюша в России в 2018 – 2024 гг.....	62
ГЛАВА 3. Антибиотикочувствительность циркулирующих штаммов <i>B. pertussis</i>	73
3.1 Изучение чувствительности штаммов <i>B. pertussis</i> к эритромицину и klarитромицину	75
3.2 Определение чувствительности штаммов <i>B. pertussis</i> к азитромицину и к рокситромицину	78
3.3 Молекулярно-генетическое исследование антибиотикочувствительности штаммов <i>B. pertussis</i> к макролидам.....	79
ГЛАВА 4. Разработка методики генодиагностики <i>B.pertussis</i> на основе вложенной ПЦР	82

ГЛАВА 5. Клональный состав современной популяции <i>B. pertussis</i>	91
5.1. Методический подход проведения геномного мониторинга циркулирующей популяции <i>B. pertussis</i>	91
5.2. Анализ генетической структуры популяции <i>B. pertussis</i> в 2018 – 2024 гг.	93
5.3. Анализ изменений клонального состава циркулирующей популяции <i>B. pertussis</i>	97
ГЛАВА 6. Сравнительный анализ производственных вакцинных штаммов и штаммов-кандидатов.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	125
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Исследование возбудителя коклюша продолжает быть востребованным в связи с ростом заболеваемости, тяжелым течением инфекции у детей раннего возраста и отмечаемыми смертельными исходами. В России в 2023 году было 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 заболеваемости (4,8 на 100 тыс. населения) [4, 15]. Среди зарегистрированных случаев коклюша почти 80% приходилось на детей в возрасте до 14 лет [15, 34, 38]. Проведение плановой иммунизации против коклюша в первый год жизни способствует формированию у ребенка поствакцинального иммунитета, что обеспечивает защиту от инфицирования коклюшем [1, 24, 32]. Начало обучения в школе сопровождается расширением круга социальных контактов, следовательно, увеличивается вероятность контакта с возбудителем коклюша, повышается риск заболевания непривитых детей и привитых, чей иммунитет снизился. Однако привитые лица с утраченным иммунитетом переносят коклюш в легкой форме, который может проявляться атипичным кашлем [10, 24, 31, 38]. Вероятными причинами роста заболеваемости коклюшем специалисты называют: генетические изменения возбудителя коклюша под действием избирательного давления вакцинации [7, 47, 59, 60, 90, 230]; распространение *B. pertussis* бессимптомными носителями [46]; увеличение отказов родителей от вакцинации детей в возрасте до одного года [2, 16, 23, 24]; накопление неиммунных лиц среди детей старших возрастных групп; потеря специфического иммунитета среди взрослого населения [31, 38]. Также увеличение количества молекулярно-генетических исследований методом полимеразной цепной реакции (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 (не опубликованные данные Референс-центра по мониторингу за коклюшем). В

России с конца 1950-х годов для профилактики коклюша применяется цельноклеточный коклюшный компонент в составе вакцины АКДС [27]. Несмотря на то, что вакцина обладала высокой эффективностью, была отмечена ее реактогенность. Данный факт способствовал созданию бесклеточных вакцин, которые были внедрены в мировую практику в 1990-х годах. Бесклеточные вакцины содержат очищенные коклюшные антигены, такие как коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин, пертактин и фимбриии второго и третьего типа, в разных комбинациях. Тем не менее, даже при массовой вакцинации не удастся полностью остановить циркуляцию коклюшной инфекции, что подтверждается данными из разных стран. Ряд исследователей отмечает существование взаимосвязи между использованием бесклеточных вакцин и увеличением заболеваемости коклюшем, что вызывает вопросы об их профилактической эффективности и способности обеспечивать контроль над инфекцией [152, 253].

Применение современных молекулярно-генетических методов значительно расширило возможности эпидемиологического надзора и мониторинга за инфекционными заболеваниями, в том числе и за коклюшем [30, 41, 45, 59, 66, 92, 120, 158, 222]. Однако используемые в мире технологии для генотипирования *B. pertussis* применяются с чистой культуры выделенного возбудителя. Учитывая физиологические особенности *B. pertussis*, длительность и трудоемкость культивирования, что составляет до 7 дней получения чистой культуры, биохимическую инертность бактерии при общей эффективности бактериологического исследования до 20 %, не всегда возможно проведение генотипирования штаммов и, следовательно, получение информации о генотипических свойствах возбудителя.

В связи с этим актуальным становится оценка клонального состава циркулирующей популяции возбудителя коклюшной инфекции и разработка новых методик 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 проведения научных исследований и работы Референс-центра ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора [1, 5, 7, 10, 11, 14, 17, 28]. Борисовой О. Ю. [5] 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*, который кодирует S1 субъединицу коклюшного токсина, *prn*, который кодирует пертактин, *fim2* и *fim3*, которые обеспечивают синтез фимбриальных белков 2 и 3 типа, а также *tcfA*, который отвечает за продукцию фактора колонизации трахеи. Позднее под руководством Н.Т. Гадуа [14] 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. [17] 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 [1, 2, 127, 128]. Зарубежными исследователями также проводится мониторинг генотипических свойств штаммов *B. pertussis* [67, 89, 101, 151, 220].

Все используемые в мире технологии для генотипирования *B. pertussis* основаны на использовании чистой культуры выделенного возбудителя. Однако в 2021 и 2022 годах в Референс-центр по мониторингу за коклюшем, функционирующий на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, не было прислано ни одной бактериальной культуры *B. pertussis*, что представляет трудности для проведения генотипирования возбудителя коклюша. В связи с

обозначенной проблемой представляется важным продолжение работы по изучению генетического разнообразия *B. pertussis*, полученных не только из бактериальных культур, но и непосредственно из клинических образцов.

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 секвенс-типирования фрагментов гена пертактина *prn*, промотора *ptxP* оперона 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 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*, *cyoA*, *vag8*, *bapC*, *brkA*, *ompQ*, *bscI*, в 9 генах выявлен однонуклеотидный полиморфизм, что может влиять на вирулентность и иммуногенность возбудителя: *cyoA4* (93,6%), *cyoA9* (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 дифтерии и коклюша 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 лечебно-профилактических организаций (ЛПО) и Федеральных бюджетных учреждений здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии» (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 *Bordetella pertussis* 143, *Bordetella parapertussis* 386, *Bordetella bronchiseptica* 9, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, г. Оболенск», *Bordetella pertussis* ATCC 9797, *Staphylococcus 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 лечебно-профилактических организаций (ЛПО) и Федеральных бюджетных учреждений здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах РФ в соответствии с письмами Роспотребнадзора от 19.06.2012 г. № 01/6830-12-32 «Об организации исследований культур возбудителей дифтерии и коклюша», от 30.01.2023 г. № 02/1385-2023-27 «О направлении штаммов в Референс-центр», от 22.01.2024 г. № 02/761-2024-27 «Об организации исследований возбудителей коклюша и дифтерии».

Биологический материал, а именно, мазок брали с задней стенки глотки с помощью двух стерильных одноразовых тампонов согласно Методическим рекомендациям МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша» и Методическим указаниям МУК 4.2.3701-21 «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами».

Микробиологические исследования

Культивирование штаммов *B. pertussis* проводили в соответствии с нормативной документацией [27]. Штаммы засевали на чашки Петри с плотной питательной средой Бордетелагар (Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск). Далее засеянные чашки Петри инкубировали при температуре 37 °С в течение 48–72 часов. Идентификацию полученных микроорганизмов выполняли на основании культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств. Культурально-морфологические свойства исследовали с помощью стереоскопического микроскопа Stereo Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия). Тинкториальные свойства изучали по способности окрашиваться по Граму. Окраску по Граму проводили согласно инструкции производителя (Закрытое акционерное общество «ЭКОлаб», Россия). Далее окрашенные мазки

просматривали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия). Биохимические свойства анализировали с помощью 8 тестов, таких как определение оксидазной активности, наличие фермента тирозиназы, определение уреазной активности, способность расти на цитратном агаре Симмонса, редукция нитратов в нитриты, определение подвижности и способность роста на 10% кровяном агаре и мясопептонном простом агаре (МПА). Оксидазную активность бактериальных культур оценивали с помощью готовых к применению коммерческих полосок «MIKROLATEST® OXItest» (Erba Lachema, Чехия), в соответствии с инструкцией производителя. При посеве испытуемой бактериальной культуры в пробирку на скошенную поверхность простого питательного ГРМ-агара (Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск) с 0,1 % содержанием тирозина (AppliChem GmbH, Германия), определяли тирозиназную активность. С использованием метода Заксе определяли уреазную активность. Для определения способности роста на цитратном агаре Симмонса испытуемую бактериальную культуру засекали в пробирку на скошенную поверхность цитратного агара Симмонса (Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск). Нитратредуктазную активность определяли с помощью посева бактериальной культуры в питательную среду № 7 ГРМ (Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск). Для определения подвижности использовали полужидкий питательный агар лабораторного приготовления в соответствии [27]. Способность расти на простых питательных средах определяли с использованием 10 % кровяного агара и мясо-пептонного агара (МПА). Учет результатов осуществляли в соответствии [27].

Идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOF MS

Для идентификации бактериальных культур методом масс-спектрометрии (MALDI TOF) использовали микробиологический анализатор

VactoSCREEN (Россия). На этапе пробоподготовки единичную колонию микроорганизма наносили на мишень прибора. Для усиления экстракции белков на анализируемый образец наносили 1 мкл 70 % муравьиной кислоты и высушивали при комнатной температуре. После высушивания наносили 1 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота). Органический растворитель матричного раствора экстрагирует из микроорганизмов преимущественно рибосомальные белки. После высушивания матрица кристаллизуется. Далее мишень с нанесенными образцами помещали в прибор VactoSCREEN. Полученные белковые спектры анализировались с использованием программы VactoSCREEN-ID. Идентификацию микроорганизма до вида считали достоверной при получении значения коэффициента достоверности идентификации (score) от 0,8 до 1,0.

Определение антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis*

Определение антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis* проводили с использованием двух методов, а именно: диско-диффузионного и системы МИК-теста. Для диско-диффузионного метода применяли картонные диски со следующими антибактериальными препаратами: эритромицин с концентрацией 15 мкг, рокситромицин - 30 мкг, азитромицин - 15 мкг, кларитромицин - 15 мкг («Научно-исследовательский центр фармакотерапии», г. Санкт-Петербург). Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотиков для грамотрицательных бактерий использовали MIC Test Strip ("ЛИОФИЛКЕМСРЛ", Италия), который представляет собой бумажные полоски, пропитанные антибиотиком с определенным градиентом концентраций на полоске — 15 двукратных разведений (диапазон концентраций антибиотиков от 0,016 до 256 мг/л), что соответствует референтному методу определения МИК в жидких средах. На полоску нанесена шкала концентрации антибиотика (в мкг/мл) и его идентификационный код.

Замороженные образцы бактериальных культур размораживали и засеивали на чашки Петри с Бордетеллагаром, содержащим 10 % ККРС и культивировали 72 часа при температуре 36 °C. Суспензии изолятов *B. pertussis* готовили в стерильном 0,9%

физиологическом растворе согласно 0,5 стандарту McFarland. Стерильные тампоны использовали для равномерного распределения суспензии на Бордетеллагаре с 10% ККРС, затем на поверхность агара накладывали тест-полоску. Через 18–24 часа инкубации вдоль тест-полоски формировалась зона ингибирования роста микроорганизмов в форме симметричного эллипса. За минимальную ингибирующую концентрацию принимали минимальное значение шкалы на поверхности тест-полоски в точке пересечения с узким краем эллипса.

Для контроля качества исследования использовали контрольные штаммы микроорганизмов *B. pertussis* ATCC 9797 и *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Выделение бактериальной ДНК

Из 24-часовых бактериальных культур *B. bronchiseptica*, 48-часовых бактериальных культур *B. paraptussis* и 72-часовых бактериальных культур *B. pertussis*, выращенных на Бордетеллагаре с добавлением 10 % ККРС (ООО «Лейтран», Москва), выделяли ДНК методом кипячения [29].

Для этого микробиологическую петлю с бактериальной культурой суспензировали в 150 мкл деионизированной воды. Далее полученную суспензию инкубировали 20 мин при температуре 95 °С, а затем центрифугировали 5 мин на 12000 об/мин. Полученную ДНК сохраняли в морозильнике при температуре минус 20 °С.

Выделение ДНК из клинических образцов

Пробирки типа эппендорф, содержащие тампоны с биологическим материалом, полученным с задней стенки ротоглотки пациента, перемешивали на вортексе в течение 5 минут, а затем центрифугировали в течение 5 секунд при 8000 об/мин. Далее удаляли тампоны из пробирок и центрифугировали смывы в течение 10 мин при 10000 об/мин. Далее удаляли супернатант, при этом оставляя в пробирке полученный осадок и 100 мкл надосадочной жидкости. Выделение ДНК проводили ручным способом с помощью набора реагентов «Рибо-преп» для выделения ДНК из клинического материала (Федеральное бюджетное учреждение

науки Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя, или в автоматическом режиме с помощью станции выделения нуклеиновых кислот Auto-Pure 96 (Allsheng, Китай) с использованием наборов реагентов для экстракции ДНК из биологического материала «МагноПрайм® ФАСТ» (ООО «НекстБио», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную ДНК хранили в морозильнике при температуре минус 20 °С.

Полимеразная цепная реакция

Определение возбудителя коклюша в биологическом материале проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью наборов реагентов «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL» (Федеральное бюджетное учреждение науки Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии 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) и п ДТ-прайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Для выявления фрагментов генов *ptxP*, *fim3*, *prn* использовалась nested PCR, представляющая собой полимеразную цепную реакцию, состоящую из двух этапов. Сначала амплифицируется участок, включающий в себя целевой фрагмент ДНК и фланкирующие его последовательности, к которым отжигается первая пара праймеров: для *ptxP* - PtxP1wide (5'-ATATCCCGAATTTCGTCGCCT-3') и PtxP2wide (5'-GAGCACATTGTCTGTTGTTTCC-3'); для *fim3* - Fim3Fwide (5'-CATGCTAATGGCCTCCGGT-3') и Fim3Rwide (5'-GCGTGCTGAAGGACAAGATGG-3'); для *prn* - PrnFwide (5'-GGCGGTGTCTGTGTTGGG-3') и PrnRwide (5'-GGTCAGCGTCAGCTTCAC-3'). На втором этапе добавляются праймеры, комплементарные концам целевого фрагмента, полученного на первом этапе: для *ptxP* - PtxP1 (5'-

AATCGTCCTGCTCAACCGCC-3') и PtxP2 (5'-GGTATACGGTGGCGGGAGGA-3'); для *fim3* - Fim3F (5'-GACCTGATATTCTGATGCCG-3') и Fim3R (5'-CGCAAGGCTTGCCGGTTTTTTTTTGG-3'); для *prn* – PrnC (5'-GTGCGGTTCGCCGGCGGTG-3'), PrnE (5'-TGCGGTTCGCCGGCGGCTTC-3') и PrnD (5'-GCTCCACGCTGGAGCCCCG-3').

ПЦР для выявления фрагментов гена 23S rRNA

Для определения фрагмента гена 23S rRNA размером 521 п.н. проводили амплификацию с помощью следующих праймеров: 1907U (5'-TTCCTTGTCTGGGTAAGTTCC-3') и 2408L (5'-GCGGTATCAGCCTGTTATCC-3'), по протоколу [50]. Методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле с 1х ТАЕ буфера проводили детекцию продуктов амплификации. Для этого полученные продукты ПЦР смешивали с 6х «DNA Loading Dye» (Thermo Scientific, США) и 10000х SYBR Green I (Lumiprobe, Россия), а затем полученную смесь помещали в лунки агарозного геля. Электрофорез проходил 1 час при напряжении 160 V. Визуализацию результатов электрофореза проводили с использованием гельдокументирующей системы Quantum-ST41100/26M (Франция). Далее проводили секвенирование по Сэнгеру.

*Мультиплексная аллель-специфическая ПЦР для выявления устойчивых к эритромицину штаммов *B. pertussis**

Мультиплексная аллель-специфическая ПЦР (multiplex allele-specific MAS-ПЦР) проводилась по протоколу [224] с помощью следующих праймеров: FP (5'-GTGATGGGGTGCAAGCTCTT-3'), RP (5'-TCTGGCGACTCGGTTCTGC-3'), MP (5'-ATCTACCCGCGGCTAGACAG-3'), WP (5'-ATCTACCCGCGGCTAGACAGA-3'). Детекция полученных ампликонов проводилась методом горизонтального электрофореза в агарозном геле, как описано выше.

Секвенирование по Сэнгеру

Ферментативная очистка ПЦР-продукта была проведена набором Exo-Sap Express PCR Product Cleanup reagent (Applied biosystems by ThermoFisher scientific, Нидерланды) в соответствии с инструкцией производителя. Далее осуществляли

сиквенсовую реакцию с общим объемом реакционной смеси 20 мкл: деионизированная H₂O - 6,68 мкл, праймеры по 10 pmol/мкл – 0,32 мкл, Q solution 4 мкл (Invitrogen, Нидерланды), 5 x sequencing buffer 7 мкл (Invitrogen, Нидерланды), Big Dye terminator v. 3.1 (Великобритания) 1 мкл, ПЦР-продукт 1 мкл. Сиквенсовая реакция проводилась в приборе ABI Applied Biosystems 9902 Veriti PCR Thermal Cycler Thermocycler (Thermo Scientific, США) с использованием следующей программы: 96° С 1 мин, 25 циклов 96° С 10 сек, 50° С 5 сек, 60° С 4 мин. Затем проводилась очистка продуктов реакции от не включенных меченных дидезоксинуклеотидов и других примесей, которые могут влиять на подвижность или флуоресценцию полученных продуктов с помощью набора Big Dye Xterminator Purification kit (Applied biosystems, США) по инструкции производителя. Капиллярный электрофорез проводили в генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Scientific, США), 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). Далее циркуляцию полученных библиотек проводили с помощью набора MGIEasy Dual Barcode Circularizacion 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*). Для сравнения использовали следующие номера генов из базы NCBI: промотор коклюшного токсина *ptxA* (Gene ID: 69599992), *ptxB* (Gene ID: 69599991), *ptxC* (Gene ID: 69599988), *ptxD* (Gene ID: 69599990), *ptxE* (Gene ID: 69599989), *ptxP* (*ptxP1* (FN252323.1), *ptxP2* (FN252322.1), *ptxP3* (FN252324.1), ген *fim3* (*fim3-1* (X51543.1) и *fim3-2* (AY464180.1)); ген *prn* (*prn1* (AJ011091.1), *prn2* (AJ011092.1), *prn9* (AJ315611.1)), *fim2* (NC_017223.1), *tcfA* (Gene ID: 69601115), *fhaB* (Gene ID: 69601663), *vag8* (Gene ID: 69602212), *bapC* (Gene ID: 69602641), *brkA* (Gene ID: 69600507), *ompQ* (NC_017223.1), *cyuA* (Gene ID: 69600712), *bscI* (Gene ID: 69602144).

Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки полученных результатов использовали Microsoft Office Excel и библиотеки Python (Pandas [173], Numpy [165]). Доверительный интервал (95% ДИ) рассчитывался с использованием точного метода Клоппера-Пирсона. Для визуализации полученных данных использовались программные инструменты Matplotlib [144], Plotly [180], 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 ПЦР 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 диссертации, 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* 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современное состояние проблемы коклюшной инфекции

Bordetella pertussis — грамотрицательная бактерия, вызывающая у человека коклюш - высококонтагиозное инфекционное респираторное заболевание. О происхождении коклюша выдвинуто много версий. Несмотря на хорошо выраженные клинические проявления этой болезни и высокую смертность среди детей, в источниках древнеевропейской литературы не обнаружено сведений о симптомах, аналогичных проявлениям коклюша. Первая зафиксированная эпидемия коклюша была отмечена в Париже в 1578 году [207]. В литературе XVI-XVII веков чаще появляются описания эпидемий коклюша в Европе, что, вероятно, свидетельствует о его распространении в европейских странах [133]. Появление коклюша в европейском регионе за последние несколько столетий может объясняться его завозом из других частей света, так как схожие с коклюшем симптомы были описаны в одном из корейских медицинских трактатов XV века [141].

До появления вакцинации коклюш был основной причиной детской смертности. Внедрение вакцинации значительно снизило заболеваемость коклюшем, однако, несмотря на массовую вакцинацию, коклюш по-прежнему остается нерешенной проблемой. Увеличение случаев заболеваемости коклюшем среди населения, сохраняющего высокий охват вакцинацией, начали наблюдаться с 1990-х годов. С тех пор коклюш стал наиболее распространенным заболеванием, предупреждаемым с помощью вакцин [160].

Крупные вспышки со значительной смертностью среди младенцев наблюдались в 2010-2012 годах в Австралии, Нидерландах, Великобритании и США [76, 205].

В последние годы во многих странах мира, в т. ч. в Австралии [188], Бразилии [186, 187], Боливии [186], Канаде [164], Китае [161], Израиле [93], Черногории [112], Сербии [43], США [71] и Великобритании [100], наблюдается заметный рост числа зарегистрированных случаев коклюша [209]. Рост заболеваемости коклюшем

в мире происходит на фоне высокого уровня охвата профилактическими прививками. Согласно данным на 2022 год, охват вакцинацией тремя дозами вакцины, содержащей коклюшный компонент, достигает 94%, с наблюдаемой тенденцией к снижению с 97% в 2012 году до 94% в 2022 году [113] (Рисунок 1).

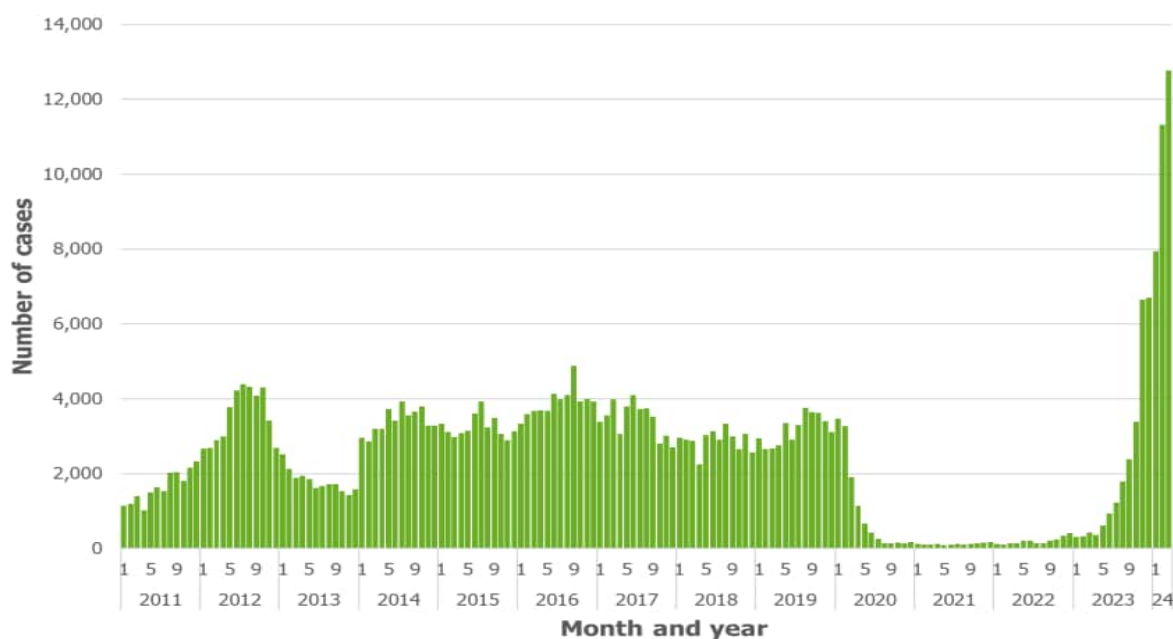


Рисунок 1 – Количество случаев коклюша, зарегистрированных в ECDC, по месяцам и годам, с 1 января 2011 г. по 31 марта 2024 г. [113]

Полностью справиться с коклюшем до настоящего времени не удалось ни одной стране мира. Нынешний всплеск случаев заболевания коклюшем превысил исторический пик, наблюдавшийся с начала широкомасштабной вакцинации, что подчеркивает настоятельную необходимость дальнейшего расследования и вмешательства.

С 1957 года в Российской Федерации началась масштабная иммунизация детей против коклюша. Первоначально использовалась моновакцина, которая позже была объединена с дифтерийным и столбнячным анатоксинами, а с 1964 года стала применяться адсорбированная вакцина АКДС. Благодаря этим мерам, начиная с 1967 года, произошло снижение заболеваемости коклюшем более чем в 50 раз. В течение последних 10 лет в Российской Федерации отмечались колебания

показателей заболеваемости коклюшем: от 0,76 на 100 тыс. населения в 2021 г. до 35,98 на 100 тыс. населения в 2023 г. [15]. В 2024 году зафиксировано заметное снижение заболеваемости коклюшем, который составил 22,1 на 100 тысяч населения, что на 38,8% ниже показателя 2023 года (данные Референс-центра по мониторингу за коклюшем Роспотребнадзора).

Согласно российскому национальному календарю, вакцинация против коклюша проводится детям в 3, 4,5 и 6 месяцев, ревакцинация проводится детям 18 месяцев жизни [22]. В Российской Федерации только на отдельных территориях предусмотрена вторая ревакцинация в 6-7 лет (например, в Москве). Выбор вакцины для проведения иммунизации зависит от наличия противопоказаний, возраста пациента и нарушения сроков вакцинации, рекомендованных календарем прививок.

В настоящее время в РФ зарегистрированы и применяются цельноклеточные и бесклеточные вакцинные препараты (Таблица 1).

Таблица 1 - Характеристика используемых в РФ вакцинных препаратов

Цельноклеточные вакцины		
Название вакцины	Производитель / Регистрационное удостоверение	
1	2	
Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина) (Pertussis vaccine, diphtheria-tetanus adsorbed (DTP vaccine))	регистрационный №: ЛС-000659 от 18.08.10 – бессрочно (НПО МИКРОГЕН, АО, Россия)	
Бубо®-Кок. Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая	Регистрационное удостоверение: Р N003327/01. от 03.03.2009 (ЗАО НПК "КОМБИОТЕХ", Россия)	
Бесклеточные вакцины		
Название вакцины	Производитель/Регистрационное удостоверение	Бесклеточные антигенные компоненты вакцины
1	2	3
Пентаксим Вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная, инфекции, вызываемой Haemophilus influenzae тип b конъюгированная	Санофи Пастер С.А., Франция/№ ЛСР-005121/08-010708 от 1.07.2008	ptx, fha

Продолжение таблицы 1

1	2	3
Инфанрикс <i>Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная) трехкомпонентная адсорбированная жидкая)</i>	GlaxoSmithKline Biologicals (Франция)/ П N016083/01 от 23.11.2009	<i>ptx, fha, prn</i>
Тетраксим <i>Вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная</i>	SANOFI PASTEUR, S.A. (Франция)/ ЛП-000548 от 12.05.2011	<i>ptx, fha</i>
Адасель <i>Вакцина для профилактики дифтерии (с уменьшенным содержанием антигена), столбняка и коклюша (бесклеточная)</i>	SANOFI PASTEUR, Limited (Канада)/ ЛП-003707 от 28.06.2016	<i>ptx, fha, prn, fim2, fim3</i>
Инфанрикс Гекса <i>Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), полиомиелита (инактивированная), гепатита В комбинированная, адсорбированная в комплексе с вакциной для профилактики инфекции, вызываемой Haemophilus influenzae тип b конъюгированной, адсорбированной</i>	GlaxoSmithKline Biologicals (Франция)/ ЛП- N (000115) - (РГ- RU) от 15.01.2021	<i>ptx, fha, prn</i>

В 2023 году на территории Российской Федерации своевременную вакцинацию против коклюша получили 96,7 % детей в возрасте 12 месяцев, а ревакцинацию в возрасте 24 месяцев – 96,3% детей. Эти данные соответствуют показателям вакцинации 2022 года. Тем не менее, установленный показатель своевременности охвата вакцинацией среди детей в возрасте 12 месяцев не был достигнут в некоторых регионах страны.

Возможные причины увеличения заболеваемости коклюшем до сих пор обсуждаются и включают в себя: ослабление вакцин-индуцированного иммунитета, переход от цельноклеточных вакцин к бесклеточным, адаптация штаммов *B. pertussis* к иммунному ответу, вызванному вакцинацией, а также прогресс в методах лабораторной диагностики и эпидемиологического надзора за коклюшем [124, 149, 152, 155, 198].

Установлено, что существующее генетическое различие между вакцинными штаммами и клиническими изолятами является общей тенденцией во всем мире [199]. Вклад этой причины, вероятно, различается в зависимости от страны.

Недавние исследования показывают, что переход от цельноклеточных вакцин к менее реактогенным бесклеточным вакцинам привел к увеличению

заболеваемости коклюшем, поскольку иммунитет, индуцированный бесклеточными вакцинами, имеет более короткую продолжительность защиты по сравнению с цельноклеточными вакцинами [238].

По данным многочисленных исследований показано, что адаптация возбудителя коклюша осуществляется за счет антигенной дивергенции – различий между циркулирующими и вакцинными штаммами, а также появления штаммов, вырабатывающих больше токсина [105, 155].

Изначально антигенные изменения ограничивались небольшим числом мутаций, затрагивающих до 12 аминокислот в пяти белках *B. pertussis*, используемых в составе бесклеточных коклюшных вакцин: филаментозном гемагглютанине (FHA), пертактине (Prn), субъединице PtxA коклюшного токсина, а также фимбриях серотипа 2 (Fim2) и серотипа 3 (Fim3). С конца 1980-х годов начали распространяться штаммы с новым аллельным вариантом промотора гена коклюшного токсина - *ptxP3*, которые, как было показано, синтезируют повышенное количество коклюшного токсина *in vitro* [153]. Примечательно, что мутации в этих шести локусах были ассоциированы с появлением клональных волн распространения патогена [217].

Наибольший интерес представляет линия *ptxP3*, так как штаммы с этим аллелем постепенно вытесняли штаммы, несущие аллель *ptxP1* в ряде европейских стран, США и Австралии [44, 117, 130, 153, 166, 179].

Поэтому мониторинг генетических вариаций в популяциях *B. pertussis* и изучение влияния этих вариаций на увеличение заболеваемости коклюшем важны для разработки более эффективных вакцин против коклюша. Кроме того, мониторинг изменений в популяциях *B. pertussis* позволяет оценить появление и распространение новых вариантов изолятов, что важно для прогнозирования эволюции популяции *B. pertussis*.

1.2. Микробиологический мониторинг антибиотикочувствительности

B. pertussis

1.2.1. Антибиотикочувствительность *B. pertussis* и механизмы резистентности

При лечении коклюша применяются антибиотики группы макролидов. Лечение макролидами может облегчить течение болезни, если начать его вскоре после заражения, до появления приступов кашля [50, 115]. Это группа антибиотиков, структурной особенностью которых является макроциклическое лактонное кольцо. Макролиды классифицируют по количеству атомов углерода в этом кольце: выделяют 14-членные соединения, к ним относятся эритромицин, рокситромицин и кларитромицин, а также 15-членные макролиды, примером которых является азитромицин. Макролиды относятся к наименее токсичным антибактериальным препаратам. Принцип действия макролидов заключается в ингибировании синтеза белка на рибосомах бактериальных клеток. В большинстве случаев они проявляют бактериостатический эффект, однако при высоких дозах способны оказывать бактерицидное влияние на возбудителя коклюша. Помимо этого, для макролидов характерны иммуномодулирующие свойства и умеренная противовоспалительная активность. В нескольких исследованиях была показана эффективность макролидов против *B. pertussis in vitro* и в клинических условиях [65, 104, 213].

Резистентность к макролидам может быть вызвана тремя различными механизмами. Один из наиболее распространенных механизмов устойчивости, в том числе для *B. pertussis*, связан с однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) A2047G, возникающим в гене 23S rRNA в домене V [50, 223]. Этот полиморфизм эквивалентен замене A2058G, описанной у *E. coli* и A2064G у *M. pneumoniae* [159, 231]. Мутация A2047G приводит к изменению участка связывания макролидов в компоненте 23S rRNA 50S субъединицы рибосомы и не позволяет макролидам блокировать удлинение пептидной цепи [50]. В геноме *B. pertussis* обнаружены три копии указанного гена, причем Bartkus J.M. et. al. установили, что SNP A2047G может присутствовать либо в одной, либо в нескольких из них. Согласно их

предположениям, мутация минимум в двух копиях необходима для формирования устойчивости к антибиотикам [50]. Тем не менее, по данным ряда работ, у резистентных к макролидам штаммов *B. pertussis* чаще всего мутации выявляются во всех трех копиях гена [97, 225, 242].

Другой потенциальный путь развития резистентности — это приобретение гена метилазы семейства *erm*, обеспечивающего модификацию 23S rRNA путём добавления метильной группы в участок, связывающий эритромицин, и тем самым препятствующего его действию [50, 243]. Однако *B. pertussis* не имеет этого гена: исследование, охватившее 167 клинических изолятов, не выявили его ни в одном из штаммов [243]. На сегодняшний день не было подтверждено, что данный механизм способствует формированию устойчивости к макролидам штаммов *B. pertussis*.

Третий возможный путь формирования резистентности связан с активацией экспрессии насосной системы MexAB-OprM, экспрессируемой опероном *mexAB-oprM*. Данный механизм способствует выведению макролидов из клетки, тем самым ограничивая их внутриклеточное накопление. Для *P. aeruginosa* этот путь досконально изучен и известен как вызывающий устойчивость к широкому спектру антимикробных препаратов, включая макролидные антибиотики [178]. Недавние исследования Fong W. и коллег показали, что у резистентных к макролидам штаммов *B. parapertussis* запускается экспрессия оперона *mexAB-oprM*. Более того, в условиях воздействия эритромицина в концентрации 256 мг/мл отмечалось значительное увеличение уровня экспрессии данного оперона. Поскольку альтернативные механизмы формирования резистентности выявлены не были, авторы высказали предположение, что именно этот путь может быть ответственен за устойчивость *B. parapertussis* к макролидам. Однако они также показали, что этот оперон не функционирует у *B. pertussis* из-за делеций в генах *mexA* и *oprM* [86]. Функционирование оперона *mexAB-oprM* в клетках *B. pertussis* пока остаётся предметом дальнейших исследований. На сегодняшний день имеются всего два сообщения (происходящих из Ирана и Китая), где отмечалась устойчивость *B. pertussis* к макролидам, не связанная с полиморфизмом SNP A2047G [148, 247].

Однако в этих работах не проводился анализ присутствия гена *erm* или оперона *texAB-oprM*, что не позволило установить молекулярные механизмы устойчивости. В частности, в исследовании Mirzaei В. и соавторов выявленный в ходе работы изолят, демонстрировавший устойчивость к макролидам, был резистентен к эритромицину и кларитромицину, но сохранял чувствительность к азитромицину [148]. Следовательно, присутствие гена *erm* может рассматриваться в качестве потенциальной причины развития устойчивости к макролидам в подобных случаях.

1.2.2. Методы определения антибиотикочувствительности штаммов

B. pertussis к макролидам

Тестирование штаммов *B. pertussis* на чувствительность к противомикробным препаратам проводится с использованием культивируемых изолятов *B. pertussis* или специфичной ДНК *B. pertussis*. Первые подходы к изучению антибиотикочувствительности заключались в серийном разведении в агаре и бульоне, где плотную и жидкую питательные среды готовили со стандартными концентрациями противомикробных препаратов [72, 104]. Позже были предложены диско-диффузионный метод (ДД) и МИК тесты, которые сделали тестирование менее трудоёмким и простым [126]. Для проведения тестирования ДД или МИК-тестом необходима бактериальная культура *B. pertussis*. До сих пор не существует пороговых значений ни для одного из предыдущих методов, рекомендованных EUCAST, и все определения чувствительности или резистентности основаны на результатах клинических исследований. Результаты исследований, в которых использовался диско-диффузионный метод, различаются, и для учета результатов с чашек Петри использовались разные интервалы. В среднем, у штаммов *B. pertussis*, чувствительных к эритромицину, диаметр зоны подавления роста варьирует от 37 до 60 мм, в то время как у резистентных изолятов он составляет около 6 мм по диагонали диска [67, 72, 109, 126]. Показано, что на размеры зоны ингибирования оказывает влияние длительность инкубации: увеличение времени инкубации, как правило, приводит к расширению зоны [72].

Следует отметить, что для определения чувствительности к антибиотикам

МИК тесты применяются чаще, чем диско-диффузионный метод. После того, как стали доступны и были протестированы МИК тесты, они в значительной степени заменили диско-диффузионный метод [109]. В отношении *B. pertussis* были проведены многочисленные исследования по определению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для различных антимикробных препаратов (например, эритромицин, азитромицин). Для чувствительных изолятов значения МИК колебались от менее 0,016 до 0,25 мкг/мл, тогда как большинство резистентных штаммов имели МИК выше 256 мкг/мл [90, 140, 225, 248, 250]. Однако, по данным одного из исследований в Иране, был зафиксирован штамм с устойчивостью к эритромицину (МИК 128 мкг/мл), но сохранявший чувствительность к азитромицину (МИК менее 0,06 мкг/мл), при этом у данного изолята не была обнаружена ранее описанная мутация A2047G [148]. Кроме того, Hill В.С. и Korgenski Е.К. с коллегами впервые сообщили о случаях выявления макролид-резистентных штаммов *B. pertussis* на территории США (Аризона, Калифорния), для которых был получен показатель МИК 64 мкг/мл в отношении эритромицина [109, 126]. В результате анализа накопленных данных была разработана схема обнаружения и трактовки результатов устойчивости *B. pertussis* к антибиотикам. Дополнительно рекомендовано, чтобы наряду с культуральным выявлением *B. pertussis* в образцах, применялась амплификация нуклеиновых кислот, позволяющая быстро идентифицировать возможное наличие мутации A2047G в участке 23S rRNA (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Схема выявления и интерпретации результатов антибиотикорезистентности *B. pertussis*, адаптировано из [115]

Для обнаружения мутации A2047G применяется ряд различных методических подходов. Один из них базируется на полимеразной цепной реакции с амплификацией участка гена 23S rRNA размером 521 п.н., с последующим рестрикционным анализом с использованием фермента *BbsI*. При этом у резистентных штаммов наблюдается формирование двух ДНК-фрагментов (393 и 128 п.н.), а у чувствительных – одного фрагмента длиной 521 п.н., что можно определить при электрофоретическом разделении [50, 225]. Другая методика заключается в секвенировании продукта амплификации методом Сэнгера для поиска специфического однонуклеотидного полиморфизма A2047G [50, 135, 225]. Однако традиционное секвенирование с использованием коротких прочтений неспособно отличить все три копии гена 23S rRNA внутри генома *B. pertussis*; для верификации числа мутировавших копий требуется секвенирование с длинными прочтениями [86]. В ряде случаев применимо также полногеномное секвенирование (WGS), однако этот подход ещё не использовался в публикациях исключительно для детекции устойчивых к макролидам штаммов *B. pertussis*. В 2015 году Wang Z. с коллегами разработали аллель-специфическую ПЦР для поиска SNP A2047G [224], в которой используются модифицированные праймеры; после амплификации на агарозном геле появляется одна или две полосы, где две полосы указывают на наличие резистентности, а одна — на чувствительность исследуемого изолята. В свою очередь, Zhang Q. с соавторами описали высокоразрешающий анализ плавления (HRMA) для выявления мутации A2047G [251]. Данная технология позволяет определять мутацию по различным температурам плавления продуктов ПЦР, причём для повышения эффективности анализируемую ДНК смешивали с ДНК дикого типа. Следует отметить, что применение этого метода ограничено использованием ДНК, выделенной из культур *B. pertussis*; возможность использования метода с ДНК, полученной из клинических мазков, требует дальнейших исследований. В целом, рассмотренные подходы сегодня активно применяются для идентификации изолятов *B. pertussis*, обладающих устойчивостью к макролидам. [83, 225, 241].

1.2.3. Антибиотикочувствительность циркулирующих штаммов

B. pertussis

За последнее десятилетие во многих странах мира были зарегистрированы штаммы *B. pertussis*, устойчивые к эритромицину.

Первый случай выявления макролид-резистентного штамма *B. pertussis* был зафиксирован в 1994 году у двухмесячного ребёнка из города Юма, Аризона, США [134]. Данный штамм характеризовался высокой устойчивостью к эритромицину, при этом МИК превышала 64 мкг/мл. Происхождение этого изолята установить не удалось. Несмотря на то, что стандартизированные пороговые значения для оценки антимикробной устойчивости у клинических изолятов *B. pertussis* отсутствуют, верифицированные случаи устойчивости демонстрировали МИК выше 256 мкг/мл к эритромицину и кларитромицину при использовании метода МИК-теста, что ясно свидетельствует о наличии устойчивости к макролидам. В рамках того же исследования были также протестированы семь других изолятов *B. pertussis* из региона, однако ни у одного из них резистентность к макролидам не обнаружили. Аналогичные результаты получены в ходе анализа 47 изолятов *B. pertussis*, выделенных от детей в штате Юта (США) за период с 1985 по 1997 год: только один штамм, выделенный в январе 1997 года, оказался устойчив к эритромицину [126].

С момента первой регистрации макролид-резистентных штаммов *B. pertussis* устойчивость к препаратам данной группы была исследована среди тысяч изолятов, культивируемых в различных странах мира (Рисунок 3) (Таблица 2).

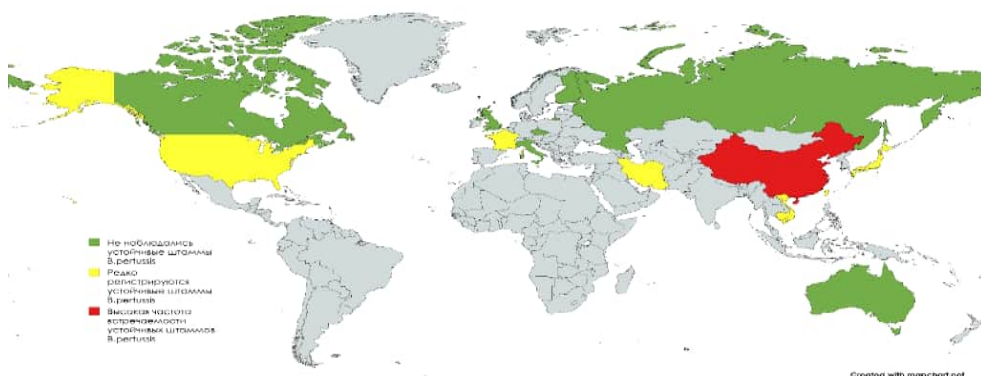


Рисунок 3 – Страны, в которых проводились исследования чувствительности *B. pertussis* к противомикробным препаратам (создано с помощью MapChart) на основе данных [115]

Таблица 2 – Распространенность в мире резистентных штаммов *B. pertussis*

Страна	Период выделения штаммов	Количество / частота выделения штаммов (%)	Ссылка
Австралия	1971–2010	0/120 (0.0)	[79, 201]
Камбоджа	2017–2020	1/71 (1.4)	[125]
Канада	2011–2013	0/275 (0.0)	[143]
Китай	2017–2019	265/311 (85.2)	[90, 111, 135, 136, 138, 149, 212, 223, 225, 226, 242, 247, 250]
Чешская Республика	1967–2015	0/135 (0.0)	[116]
Финляндия	2006–2017	0/148 (0.0)	[140]
Франция	2003 и 2012 гг.	1/41 (2.4)	[99]
Иран	2009–2010	2/11 (18.2)	[148, 196]
Италия	2012–2015	0/18 (0.0)	[206]
Япония	2017–2019	1/33 (3.0)	[125, 245]
Тайвань	2003–2007	2/76 (2.6)	[125, 247]
Великобритания	2001–2009	0/582 (0.0)	[89]
США	1997–2000	1/8 (12.5)	[50, 70, 94, 109, 126, 129]

В ходе исследования, охватившего 1030 изолятов, собранных из различных регионов США, было выявлено, что пять из них (0,5%) оказались устойчивыми к эритромицину. Четыре из этих изолятов были получены в Аризоне в 1994–1995 годах, а еще один — в Джорджии в 1995 году. Изначально при применении метода диффузии в агаре наблюдалось подавление роста *B. pertussis*, однако спустя 5–7 дней инкубации внутри зон задержки роста возникали новые бактериальные колонии с гетерогенным фенотипом [237]. В 2003 году в рамках обзора 38 изолятов *B. pertussis* из Франции случаи устойчивости к эритромицину обнаружены не были [61]. Однако спустя девять лет — в 2012 году — в городе Лион, Франция, был задокументирован первый европейский случай макролид-резистентного штамма *B.*

pertussis [97]. У новорожденного трехнедельного возраста с тяжелым течением коклюша, которому неоднократно назначались макролиды, был выделен резистентный изолят. Из трех последовательных изолятов, полученных у данного пациента, первые два показали чувствительность к макролидам, в то время как третий приобрел устойчивость. Данный случай свидетельствует о возможности формирования мутации, приводящей к возникновению устойчивости у *B. pertussis* во время лечения макролидами. В 2024 г. во Франции был обнаружен еще один резистентный штамм [189]. В 2009 году в Иране также были зарегистрированы единичные случаи выделения *B. pertussis*, устойчивых к макролидам [196].

Устойчивые к макролидам штаммы *B. pertussis* были выявлены в нескольких странах Азии, таких как Камбоджа, Япония, Тайвань и Вьетнам. Предполагается, что эти изоляты генетически связаны с резистентными штаммами, обнаруженными на материковом Китае [118, 125, 245]. В исследовании, проведенном в северном Вьетнаме, среди 184 образцов мазков из носоглотки у пациентов с подтвержденным коклюшем за 2016–2020 годы, у 24 (13,0%) были обнаружены устойчивые к макролидам штаммы *B. pertussis*. В Японии первый случай выделения макролид-резистентного штамма *B. pertussis* относится к 2018 году, когда штамм был изолирован от двухмесячного ребёнка. Минимальная ингибирующая концентрация эритромицина и кларитромицина составила более 256 мкг/мл, а азитромицина — более 32 мкг/мл. Полная геномная последовательность этого японского резистентного штамма была опубликована [125]. Было подтверждено наличие гомозиготной мутации A2047G во всех трёх копиях гена 23S rRNA, а также установлено, что данный изолят принадлежит к генотипу, характерному для макролид-резистентных штаммов *B. pertussis* из Китая. Вопрос устойчивости *B. pertussis* к макролидам широко исследуется и обсуждается в Китае. Первые случаи выявления резистентных изолятов в КНР были зафиксированы в 2011 году у двух бессимптомных школьников из провинции Шаньдун [251]. Анализ исторических китайских коллекций изолятов, датированных 2008 годом и ранее, не выявил признаков устойчивости к макролидам [247, 248]. В последующих исследованиях отмечается стремительный

рост доли резистентных штаммов *B. pertussis* в различных регионах Китая.

Генетический анализ показал, что изоляты *B. pertussis* могут относиться к разным генетическим линиям. До последнего времени в Китае устойчивая к макролидам *B. pertussis* была почти исключительно связана с линией *ptxP1* [225, 226, 247]. Однако в одном из последних исследований были описаны два изолята *ptxP3*, выделенные на востоке Китая, обладающие мутацией A2047G в гене 23S rRNA [241]. Для США типичны резистентные штаммы *B. pertussis* с профилями *ptxP1/fhaB1* и *ptxP3/fhaB1*, для Франции — с *ptxP3/fhaB1*. Следует отметить, что аллель *ptxP3* на сегодняшний день стал преобладающей генетической линией *B. pertussis* в большинстве экономически развитых государств, где за последние десятилетия произошёл переход на применение бесклеточных коклюшных вакцин [47, 62].

Авторами высказывается предположение, что одна из возможных причин низкой циркуляции резистентных штаммов связана с запуском у возбудителя дополнительных механизмов с точки зрения приспособленности, препятствуя быстрому распространению этого фенотипа [125]. Распространение макролид-резистентных штаммов *B. pertussis* в Китае стало более интенсивным после внедрения в национальный календарь иммунизации бесклеточной коклюшной вакцины, заменившей цельноклеточный препарат. Существенную роль в распространении резистентности штаммов *B. pertussis* также сыграло частое использование макролидных антибиотиков при лечении респираторных инфекций у детей, а также высокая плотность населения страны [83]. В связи с этим, чтобы не создавать селективное преимущество для штаммов, устойчивых к макролидам, следует с осторожностью использовать противомикробные препараты группы макролидов.

В СССР исследования по оценке антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis* проводились с 1980-х годов прошлого века с помощью метода последовательных серийных разведений в плотной питательной среде и диско-диффузионного метода в отношении тетрациклина и стрептомицина. В результате таких исследований было выявлено 8 – 12% и 10 – 35% устойчивых к разным

концентрациям тетрациклина и стрептомицина штаммов *B. pertussis*, что способствовало переходу к использованию макролидов, в частности эритромицина, при лечении коклюшной инфекции [23, 32, 33, 36, 40].

Специалистами лаборатории, занимающейся диагностикой коклюшной инфекции в ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, проведено изучение чувствительности к эритромицину, азитромицину, спирамицину, кларитромицину, ампициллину и гентамицину штаммов *B. pertussis*, выделенных в 1990 – 2012 гг., и проведено сравнение с чувствительностью к этим антибиотикам штаммов, выделенных в 1948 – 1989 гг. Было установлено, что за более чем пятидесятилетний период отмечается тенденция снижения общей антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis* и в начале 2000-х годов были обнаружены изоляты с промежуточной устойчивостью к эритромицину и азитромицину, однако полностью резистентных штаммов *B. pertussis* зафиксировано не было [17]. Антибиотикочувствительность к эритромицину и азитромицину была исследована для 165 клинических штаммов *B. pertussis*, выделенных в период с 2014 по 2020 годы — анализ проводили с использованием диско-диффузионного метода и МИК-теста. Для обнаружения мутации A2047G в 23S rRNA у данных штаммов был применён ПЦР-анализ с последующим секвенированием амплифицированных фрагментов. Полученные результаты показали, что штаммы *B. pertussis*, выделенные на территории России за 2014–2020 годы, *in vitro* остаются чувствительными к эритромицину и азитромицину и имеют гомозиготный фенотип [35].

1.3. Геномный мониторинг *B. pertussis*

1.3.1. Генетические детерминанты факторов патогенности – основа геномного мониторинга *B. pertussis*

Геном *B. pertussis* состоит из кольцевой хромосомы с 4086189 парами оснований и средним содержанием гуанина (G) и цитозина (C) 67,3% [253]. Поверхность *B. pertussis* состоит из трех основных компонентов, а именно: внешней мембраны, внутренней мембраны и периплазматического пространства с тонким слоем пептидогликана между ними (Рисунок 4). Внешняя мембрана

содержит липополисахаридные (ЛПС) эндотоксины, которые отличаются от таковых у других грамотрицательных бактерий тем, что они содержат две формы ЛПС, различающиеся по фосфатному составу липидной части [91].

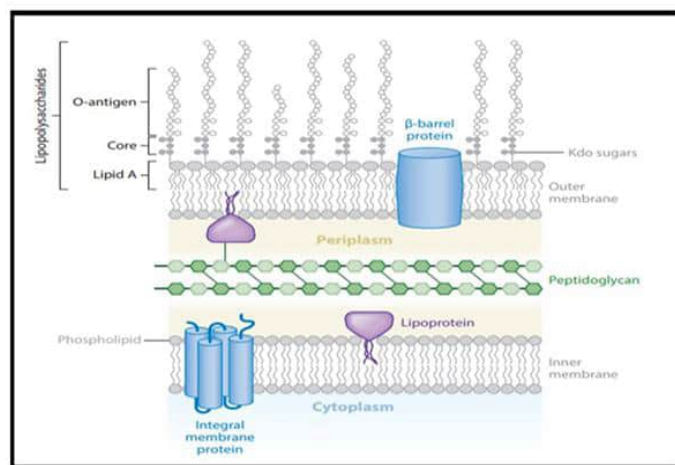


Рисунок 4 – Клеточная стенка грамотрицательных бактерий [106]

Геном *B. pertussis* также содержит ряд генов факторов вирулентности, позволяющим возбудителю уклоняться от иммунного ответа человека [108]: *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE* (гены коклюшного токсина), *ptxP* (промотор гена коклюшного токсина), *prn* (ген белка пертактина), *tcfA* (ген фактора колонизации трахеи), *fhaB* (филаментозный гемагглютинин), *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), *vag8* (*virulence-associated gene 8*, ген 8, ассоциированный с вирулентностью), *суаА* (ген токсина аденилатциклазы), *барС* (ген белка-автотранспортёра), *bscI* (система секреции 3 типа). Белки *VarC*, *Prn*, *Vag8*, *BrkA*, *TcfA* относятся к семейству автотранспортёров *Bordetella* и являются потенциальными факторами вирулентности и защитными антигенами.

Благодаря своей роли в патогенезе и индукции иммунитета, коклюшный токсин, фимбрии *fim2/fim3* и филаментозный гемагглютинин (FHA) представляют собой антигенные компоненты, входящие в состав большинства современных ацеллюлярных вакцин против коклюша [203].

Коклюшный токсин

Коклюшный токсин классифицируется как А-В токсин, относящийся к семейству подобных бактериальных токсинов. Участок между аминокислотами 65 и 233 является консервативным. Домен А содержит субъединицу S1, которая обладает иммунопротекторными свойствами и различными ферментными функциями и экспрессируется геном *ptxA* [95]. В соответствии с различиями в нуклеотидах 68-й, 228-й и 232-й аминокислот S1 ген *ptxA* делится на четыре аллельных типа: 1, 2, 3 и 4 [253]. Ген состоит из 810 оснований. Было обнаружено 46 аллелей.

Подтипы гена *ptxA* в вакцинных штаммах коклюша и штаммах, выделенных до или в начале вакцинации, во многих странах были аллельными типами *ptxA2* или *ptxA4*. Защитный эффект вакцины, содержащей штамм *ptxA2*, слабее, чем у вакцины, содержащей штамм *ptxA1* [154]. В настоящее время вариант белка *ptxA1* является высокодминирующим среди изолятов [44, 47, 82, 137, 153, 160, 179].

Участок промотора (*ptxP*) находится примерно в 170 основаниях выше гена коклюшного токсина в геноме *B. pertussis*. Отсутствие экспрессии коклюшного токсина у *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* связано с различиями в промоторных областях оперонов, которые имеют видовые различия [174]. Эта область содержит сайты связывания РНК-полимеразы и 6 сайтов связывания димеров регуляторного белка BvgA, которые могут способствовать транскрипционной экспрессии коклюшного токсина, взаимодействуя с регуляторным белком BvgA. В последние годы исследователи обнаружили, что *ptxP* *B. pertussis* обладает определённым полиморфизмом, и в зависимости от мутаций в определённых позициях *ptxP* делится на 11 подтипов. Голландские исследователи подтвердили, что штаммы, содержащие *ptxP3*, могут в высокой степени экспрессировать коклюшный токсин и постепенно стать доминирующими эпидемическими штаммами в Нидерландах. Предполагается, что с этим может быть связан подъем заболеваемости коклюшем во многих странах мира. Таким образом, промотор *ptxP* гена коклюшного токсина *B. pertussis* привлекает всё больше внимания и используется в качестве молекулярно-генетического маркера эволюции *B. pertussis* [153].

Аллели гена субъединицы S3 коклюшного токсина (*ptxC*) определяются однонуклеотидным полиморфизмом в позиции 3625: *ptxC1* (TGC, Cys) и *ptxC2* (TGT, Cys) [220].

Ген *ptxB* кодирует В-субъединицу S2 коклюшного токсина. Эта субъединица играет важную роль в механизме связывания токсина с клеточными рецепторами. Она участвует в образовании комплекса, который позволяет токсину прикрепляться к поверхности клетки хозяина, что является важным этапом в процессе инфицирования. Исследования показывают, что именно взаимодействие В-субъединиц с клеточными рецепторами определяет специфичность и эффективность прикрепления бактерии *B. pertussis*.

S4 субъединицу коклюшного токсина *B. pertussis* кодирует ген *ptxD*. Хотя конкретная функция *ptxD* менее изучена по сравнению с другими субъединицами, считается, что она играет роль в регуляции активности токсина и его взаимодействии с клетками хозяина. Коклюшный токсин влияет на иммунный ответ, подавляя функцию макрофагов и других клеток иммунной системы. Экспрессия *ptxD*, как и других генов, связанных с коклюшным токсином, может влиять на патогенез коклюша, способствуя уклонению от иммунного ответа человека и обеспечивая выживание бактерий в организме хозяина. Вакцины против коклюша, такие как адсорбированные цельноклеточные вакцины (АКДС)(DTP), содержат компоненты, связанные с коклюшным токсином, включая антитела к *ptxD*. Это помогает организму формировать иммунный ответ против инфекции. Таким образом, *ptxD* является важным компонентом системы патогенности *B. pertussis*, способствует ее способности вызывать заболевание и взаимодействовать с иммунной системой человека.

Ген *ptxE* входит в состав генетического комплекса, ответственного за синтез коклюшного токсина, который является важным фактором вирулентности бактерии *B. pertussis* и кодирует S5 субъединицу В-комплекса коклюшного токсина. Коклюшный токсин, включающий субъединицу, кодируемую *ptxE*, ингибирует множество внутриклеточных процессов. Это воздействует на

иммунную систему и способствует долговременному выживанию бактерии в организме хозяина.

Исследования показывают, что субъединицы коклюшного токсина, включая *ptxE*, структурно и функционально схожи с токсинами других патогенов, таких как холерный токсин. Это может предоставлять возможность для кросс-сравнительных исследований и увеличивать понимание механизмов токсигенности. Экспрессия *ptxE* наряду с другими генами коклюшного токсинного кластера регулируется комплексными механизмами, включая температурные и фазовые изменения. Это помогает бактерии адаптироваться к различным условиям среды в организме хозяина. Исследования в области генетики и молекулярной биологии *ptxE* и коклюшного токсина в целом продолжают развиваться, что улучшает диагностику и профилактику коклюша.

Ген фактора колонизации трахеи

Фактор колонизации трахеи уникален для *B. pertussis* и, как показано на мышинной модели, важен для колонизации трахеи [218]. Последовательность нуклеиновых кислот гена *tcfA* определяется между основаниями 688–1339. Ген *tcfA* также демонстрирует аллельную вариабельность. Новый тип *tcfA*, обозначенный как *tcfA6*, был обнаружен в двух изолятах *B. pertussis* в Великобритании в 1983 году и содержал делецию в 15 пар оснований, которой не было в других аллелях. На сегодняшний день *tcfA1*, содержащий сегмент в 75 пар оснований, был описан только в штамме-оригинале 18323Т. В аллелях *tcfA* (2–4 и 6) этот сегмент отсутствует, и эти аллели отличаются друг от друга как нуклеотидной, так и аминокислотной последовательностью.

Аллель *tcfA2* был выявлен у изолятов, полученных из Нидерландов, Финляндии, Италии, Японии и Соединённых Штатов. В указанных странах, за исключением Италии, этот вариант аллеля преобладал [220]. Среди десяти исследованных итальянских штаммов *B. pertussis* шесть имели вариант *tcfA3*, тогда как четыре относились к *tcfA2*. Аллель *tcfA3* не был обнаружен среди американских и японских изолятов *B. pertussis*. В Нидерландах, Финляндии и Италии данный тип аллеля встречался исключительно в штаммах, выделенных в период с 1990 по 1999

годы. Необычным оказался изолят из Великобритании с аллелью *tcfA5*, поскольку ранее такой вариант отмечался лишь среди американских *B. pertussis* 1990–1999 годов [220]. Возможно, заслуживает внимания тот факт, что редкие аллели *tcfA4* и *tcfA6* были обнаружены в британских изолятах с конца 1970-х до середины 1980-х, что совпало с периодом падения охвата вакцинацией и двумя эпидемиями коклюша, произошедшими в Великобритании в 1979 и 1983 годах.

Автотранспортеры

Автотранспортеры — это белки внешней мембраны, которые содержатся в грамотрицательных бактериях. Это мультидоменные белки, состоящие из N-концевой сигнальной последовательности, которая направляет транслокацию через внутреннюю мембрану, «пассажирской» области, доставляемой на поверхность клетки, и консервативной С-концевой транспортной области, которая, как предполагается, обеспечивает секрецию через внешнюю мембрану [169]. Большинство автотранспортеров подвергаются протеолитическому расщеплению в области транспортера с образованием α -домена, составляющего большую часть «пассажирской» области, и оставшегося фрагмента, называемого β -доменом, который включает в себя транспортер. К автотранспортерам относятся: Ptn, varC, vag8, brkA.

Пертактин (Ptn) — это белок внешней мембраны массой около 93 кДа, не содержащий реснички, вырабатывается *B. pertussis* и является важным фактором вирулентности. Белок играет важную роль в адгезии возбудителя к мембране эпителиальных клеток дыхательной системы хозяина, а также является важным защитным антигеном, который может вызывать гуморальный и клеточный иммунный ответ. Пертактин показал хорошую эффективность в защите от инфицирования *B. pertussis* на животной модели [95]. В соответствии с различиями в структуре этого региона и аминокислотах в определённых положениях, ген *prn* делится на восемнадцать аллельных типов *prn1-18* [101, 200, 253]. В исследованиях, проведённых в некоторых странах, было установлено, что у штаммов, выделенных до начала массовой вакцинации или на её ранних этапах, а также у штаммов, используемых для производства коклюшных вакцин,

преобладает генотип *prn1*. Начиная с 1980-х годов в некоторых европейских странах появился аллель *prn2*. К 2000-м годам аллели *prn2* или *prn3* стали доминирующими генотипами изолятов в Нидерландах, Финляндии, Франции, США и других странах [168, 182]. В европейском регионе *prn2* в настоящее время является преобладающим аллелем, причем 95% циркулирующих изолятов имеют этот генотип [47, 155]. Кроме того, было отмечено появление и увеличение клинических изолятов, которые не экспрессируют *prn*. Биоинформационный анализ вторичной структуры аминокислот, полученных из последовательностей генов *prn* штаммов, выделенных в разные периоды, показывает, что генотип *prn*-отрицательных штаммов, выделенных после 2000-х годов, в определённой степени изменился, появилась гидрофильная область, что привело к изменению его иммуногенности. Однако ранее выделенные *prn1*, *prn7*, *prn10* и *prn11* полностью гидрофобны в области 1 [172]. Ген, отвечающий за синтез пертактина (*prn*), состоит примерно из 2 800 нуклеотидов и обеспечивает кодирование крупного белка-предшественника. Участок на 5'-конце этого гена отвечает за фрагмент белка, который подлежит экспорту из клетки, а 3'-конец определяет структуру интегрального белка наружной мембраны, необходимого для реализации данного процесса. Интегральный белок внешней мембраны показывает мало вариаций и не включен в состав бесклеточных вакцин. Хотя экспортируемый *prn* содержит SNP, большая часть вариаций обнаружена в одном из двух повторяющихся регионов (регион 1) в *prn*. Следовательно, генное типирование сосредоточено на регионе 1.

VarC — это белок автотранспорта, который является фактором вирулентности у бактерии *B. pertussis* [232]. Он играет важную роль в вирулентности бактерии. Роль VarC была определена путем создания мутанта *var*. Исследование, проведенное Noofeli et al., показало, что VarC ведет себя как BrkA (фактор устойчивости к сыворотке) [163], то есть он обеспечивает устойчивость *B. pertussis* к уничтожению комплементом человеческой сыворотки. Лocus VarC, помимо генома *B. pertussis*, существует у *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis*. Как и другие представители-автотранспортеров *B. pertussis*, VarC состоит из нескольких ключевых доменов. Сигнальную последовательность представляет небольшой

участок на N-конце белка, который направляет белок к секреции через цитоплазматическую мембрану. Пассажирский домен расположен между сигнальной последовательностью и бета-стволом, содержит функциональные части белка, такие как адгезивные или протеолитические мотивы. Бета-ствол представляет собой C-концевой домен, формирующий пору в наружной мембране, через которую пассажирский домен может быть секретирован или экспортирован. Такая архитектура может обеспечивать VarC более избирательную адгезию [163].

Одним из потенциальных белков, который можно включить в бесклеточную вакцину, является Vag8. Данный белок играет роль в вирулентности, помогая бактерии взаимодействовать с клетками хозяина и избегать иммунного ответа. Было показано, что вакцинация с использованием Vag8, который был известен как молекула, препятствующая связыванию комплемента, вырабатывает антитела, защищающие мышей от заражения *B. pertussis* [74]. Кроме того, у пациентов с коклюшем были обнаружены антитела к Vag8, что указывает на то, что Vag8 вырабатывается *B. pertussis* во время заражения человека [171]. Белок Vag8 в большом количестве присутствует на везикулах внешней мембраны *B. pertussis*, составляя 34-50% от общего количества белков везикул внешней мембраны, а также может быть обнаружен на мембране бактерий [85, 110, 184]. В 2024 году было обнаружено, что везикулы внешней мембраны, полученные из *B. pertussis*, являются мощным адъювантом, стимулирующим реакцию, обусловленную Th1. Это позволило изучить их потенциал в качестве вакцины третьего поколения против коклюша [183]. Ассоциированный с вирулентностью ген 8 (*vag8*) *B. pertussis* связывается с C1-INH (ингибитором, основная функция которого - ингибирование системы комплемента для предотвращения самопроизвольной активации) [110, 143]. C1-INH является острофазовым белком, циркулирующим в крови. Vag8 представляет собой автотранспортер массой 95 кДа [85]. Пассажирский домен проходит через канал и может либо оставаться прикрепленным к бактериальной мембране, либо секретироваться в окружающую бактерию среду [106, 110, 140, 184]. Было показано, что связывание секретируемого Vag8 с C1-INH приводит к высвобождению активных протеаз C1s, C1r и MASP-2, поскольку C1-INH больше

не может связываться с ними и таким образом подавлять их протеолитическую активность. Присутствие в сыворотке активных протеаз C1s, C1r и MASP-2 приводит к разрушению белков комплемента C4 и C2, находящихся на поверхности бактерий [110, 143].

BrkA — белок наружной мембраны *B. pertussis*, который подавляет бактерицидную активность комплемента. Наиболее изученной функцией BrkA является способность обеспечивать устойчивость к уничтожению иммунной сыворотки человека *in vitro* [84, 139]. BrkA ингибирует классический путь активации комплемента и предотвращает накопление C4. Белок-автотранспортер BrkA также действует как адгезин [84]. BrkA был идентифицирован в ходе скрининга на наличие транспозонов в генах, регулируемых *bvg* [233]. Было обнаружено, что для того, чтобы вызвать летальный исход у наивных мышей, штамму с вставкой в гене *brkA* требуется в 10 раз большая доза [84, 232]. Локус *brk* содержит две дивергентно транскрибируемые открытые рамки считывания (ОРС), *brkA* и *brkB*, с предполагаемым сайтом связывания *bvgA* между ними.

Экспрессия BrkA контролируется системой регулятора сенсорной киназы под названием «Bvg» [232]. В соответствии с моделью секреции автотранспортера, BrkA экспрессируется в виде предшественника массой 103 кДа, который во время секреции расщепляется на N-концевой α -домен массой 73 кДа и С-концевой β -домен массой 30 кДа [197]. После транслокации расщеплённый α -домен остаётся тесно связанным с поверхностью бактерии и не обнаруживается в надосадочной жидкости *B. pertussis* [170]. Обработанный β -домен был выделен из фракций внешней мембраны *B. pertussis*, и было установлено, что место обработки находится между остатками Asn731 и Ala732 [175]. Было показано, что у BrkA есть сигнальный пептид из 42 аминокислот, который проходит через внутреннюю мембрану, и определена минимальная единица транслокации, необходимая для секреции BrkA на поверхность бактерии [169]. Механизм, с помощью которого BrkA ингибирует комплемент, теоретически может работать по одной из двух схем: предотвращая функцию комплемента или привлекая белок, ингибирующий комплемент. BrkA способен ингибировать комплемент, функционируя как

протеаза по отношению к компонентам C1r, C1s или C4. Блокирование активности C1r или C1s препятствует осаждению C4. Также расщепление активированной формы C4 вызывает уменьшение его депонирования. Помимо этого, предполагается, что BrkA способен связывать ингибиторы комплемента. Несмотря на разнообразие регуляторов комплемента, только четыре из них могут действовать на этапе взаимодействия C1 и C4: растворимый связывающий C4 белок, ингибитор C1, а также мембранно-ассоциированные регуляторы — CD46 (кофактор мембранного белка) и CR1. Среди данных молекул именно растворимые факторы регуляции комплемента, вероятно, больше всего склонны к взаимодействию с BrkA [53, 84, 185].

Связывание ингибитора C1 является еще одним привлекательным механизмом действия, поскольку BrkA имеет два связывающих протеогликаны мотива SGXG [84], которые могут обеспечивать эффективное связывание высокогликозилированного ингибитора C1 [55]. Привлечение BrkA либо связывающего C4 белка, либо ингибитора C1 приведет к снижению накопления C4 на поверхности бактерий.

Предотвращая активацию каскада комплемента после C4, BrkA защищает бактерию от всех последствий активации комплемента, таких как усиление иммунного ответа с помощью C4a, C3a и C5a; опсонизация патогенов с помощью C3b и iC3b; а также прямое уничтожение грамотрицательных бактерий с помощью мембраноатакующего комплекса. Подавление этих иммунных функций имеет очевидные преимущества для бактерий. Важно подчеркнуть, что сами по себе антитела, как правило, хорошо выполняют функцию опсонизации бактерий и способствуют их поглощению фагоцитами [48, 214].

BrkA не входит в состав современных бесклеточных вакцин против коклюша. Однако, учитывая его роль в обеспечении защиты от комплемента, его следует рассмотреть для включения в бесклеточные вакцины будущих поколений.

Гены фимбриальных белков – fim

B. pertussis содержит четыре основных субъединицы фимбрий (*fim*) (*fimA*, *fimX*, *fim2* и *fim3*) и одну второстепенную субъединицу (*fimD*) [235]. Гены основной

и второстепенной субъединиц фимбрий содержат около 600 и 1098 оснований соответственно. Ген *fimD* демонстрирует очень мало вариаций, и на сегодняшний день обнаружено только два аллеля [220]. Ген *fimA* содержит большую делецию, и поэтому белок не собирается в фимбрии. Ген *fimX* не поврежден, но предполагается, что его промотор не активен из-за делеции. Оставшиеся два гена основных субъединиц фимбрий, *fim2* и *fim3*, могут экспрессироваться одновременно или по отдельности изолятами *B. pertussis* из-за фазово-вариабельного промотора [235]. Известны два и семь аллелей для *fim2* и *fim3* соответственно. Изоляты, которые в настоящее время используются в бесклеточных вакцинах, производят *fim2-1* и/или *fim3-1*. Оба аллеля *fim2-1* и *fim2-2* обнаружены в изолятах из довакцинальной эпохи. Однако *fim2-2* теперь обнаруживается и в современных изолятах, что позволяет предположить, что мутация возникла заново. В довакцинальных изолятах был идентифицирован только аллель *fim3-1*. Аллели *fim3-2*, *fim3-4*, *fim3-5*, *fim3-6* и *fim3-7*, вероятно, возникли после введения вакцинации [217]. Интересно, что все новые аллели *fim3* связаны с аллелем *ptxP3*.

Клинические испытания, проведённые в некоторых странах, показали, что существует связь между Fim-белком, входящим в состав коклюшной вакцины, иммунным откликом у мышей и формированием иммунитета у детей. В соответствии с рекомендациями ВОЗ по профилактике коклюша, для производства вакцин рекомендуется применять определённые штаммы, экспрессирующие антигены фимбрий 2-го и 3-го типа [240]. Как сообщалось, эти два белка фимбрий также обладают определённой иммуногенностью и используются в качестве компонентов бесклеточной вакцины некоторыми производителями вакцин.

Ген токсина аденилатциклазы

Аденилатциклазный токсин (СуаА) вместе с коклюшным токсином является одним из основных секретируемых факторов вирулентности этого патогена, наряду с другими факторами, такими как филаментозный гемагглютинин, пертактин, фимбрии и трахеальный цитотоксин [80]. СуаА является существенным фактором на ранней стадии бактериальной колонизации дыхательных путей. Он позволяет

бактериям избегать иммунной системы хозяина, в первую очередь нацеливаясь на клетки миелоидной линии, экспрессирующие CD11b и CD18, такие как макрофаги и нейтрофилы. Эти клетки являются основными клеточными мишенями для *SuaA* [52, 96, 110]. *SuaA* отличается от других токсинов с повторами в токсине (RTX) своей сборкой и функцией, поскольку белок 177 кДа проявляет цитотоксическую и гемолитическую активность. Иммунодоминантная область гена *suaA* *B. pertussis* (около 2,5 кб) чрезвычайно стабильна, что позволяет предположить, что антигенные вариации в *suaA* будут крайне редкими. В исследованиях на мышах было показано, что токсин аденилатциклазы (*SuaA*) обеспечивает защиту [110], и, учитывая стабильность его иммунодоминантной области, он может быть подходящим компонентом для бесклеточных вакцин нового поколения.

OmpQ — это белок пориновой структуры внешней мембраны у видов *Bordetella*, экспрессия которого регулируется системой BvgAS. OmpQ хорошо сохраняется у *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *Bordetella parapertussis*, и предполагается, что он действует как универсальный переносчик, обеспечивающий доступ к необходимому питательному веществу [85]. В первых исследованиях OmpQ Finn T.M. et al. сообщили, что отсутствие этого белка не влияет на способность *B. pertussis* выживать в дыхательных путях мышей. Однако в последних исследованиях OmpQ был признан иммунодоминантным антигеном и, более того, потенциальным новым защитным антигеном [172, 211, 236]. Кроме того, было высказано предположение, что OmpQ может играть роль в патогенезе *Bordetella*, возможно, на первых этапах заражения или при формировании состояния носительства [211]. Учитывая, что экспрессия OmpQ находится под контролем системы BvgAS, логично предположить, что этот порин играет роль в цикле бактериальной инфекции.

Полиморфизм *ompQ* был исследован в 42 британских изолятах, взятых в разные периоды времени, в четырёх вакцинных штаммах и в типовом штамме. Варианты аллелей *ompQ* различаются однонуклеотидным полиморфизмом в позиции 1465: аллель *ompQ1* (CTG, кодирующий лейцин) был выявлен исключительно в референсном штамме, тогда как аллель *ompQ2* (CCG,

кодирующий пролин) был обнаружен у всех 42 британских изолятов, а также в четырёх штаммах, используемых для производства вакцин в Великобритании [211].

Филаментозный гемагглютинин (FHA) является основным адгезином *B. pertussis*, экспрессируемым на поверхности бактериальных клеток, а также секретируется во внеклеточную среду. Он содержит несколько доменов, которые способствуют прилипанию бактерий к реснитчатым респираторным эпителиальным клеткам, включая RGD (Arg-Gly-Asp), домены распознавания углеводов и гепарин-связывающие домены [74, 139]. FHA-опосредованное прилегание к респираторному эпителию усиливается в присутствии аденилат-циклазного токсина [176], холестеринсодержащих липидных плотов [132] и связано с повышенной экспрессией молекулы внутриклеточной адгезии [114]. FHA также способствует фагоцитозу *B. pertussis* макрофагами и полиморфноядерными лейкоцитами, эффект, который был ингибирован *in vitro* антителами против FHA у детей, инфицированных *B. pertussis* [150]. FHA инициирует фагоцитоз путем связывания и активации рецептора комплемента 3 лейкоцитарного интегрина на макрофагах и других клетках, после чего опосредованное токсинами подавление внутриклеточного уничтожения способствует выживанию бактерий [88]. Антитела к FHA играют защитную роль против инфекции *B. pertussis* у мышей, хотя исследования на мышах и людях показывают, что они не являются ключевым защитным антигеном [147, 208].

FHA также выполняет важные иммуномодулирующие функции [74], в том числе индукция IL -6 и IL -10, подавление продукции IL -12 макрофагами и дендритными клетками [145, 146]. Это приводит к образованию IL-10-продуцирующих Treg-клеток, которые подавляют выработку ИФН- γ и, таким образом, ингибируют генерацию и функцию Th1-клеток. Кроме того, было показано, что IL-10, полученный из моноцитов, ингибирует индуцированную FHA секрецию ИФН- γ мононуклеарными клетками вакцинированных младенцев, что позволяет предположить, что FHA обладает иммуносупрессивной функцией во время инфицирования человека *B. pertussis* [78]. Исследование полногеномного

транскрипционного ответа моноклеарных клеток периферической крови человека на ФНА *B. pertussis* показало иммуномодулирующее воздействие на несколько членов ИФН I типа и пути ISGylation [77].

Bscl – один из секреторных генов III типа (T3SS), который находится под контролем локуса *BvgAS* [121]. Экспрессия большинства факторов вирулентности *B. pertussis* контролируется на уровне транскрипции двухкомпонентной системой, кодируемой локусом *bvg*.

1.3.2. Методы генотипирования

Молекулярное генотипирование возбудителей инфекционных заболеваний стало важным инструментом их эпидемиологического надзора и исследований вспышек [119].

Развитие генотипирования *B. pertussis* началось с применения мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) на основе изучения особенностей структуры «*housekeeping*» генов, но данный метод не получил развития, т.к. не обладал достаточной дифференцирующей способностью для оценки структуры циркулирующей популяции.

Дальнейшее развитие генотипирования *B. pertussis* шло по пути изучения генотипических особенностей отдельных детерминант, входящих в состав бесклеточной вакцины, – *ptxA*, *prn*, *fim2*, *fim3* и *fhaB* [57, 73, 75, 81, 82, 87, 193, 227].

Была предложена схема МЛСТ на основе изучения особенностей структуры трех генов, отвечающих за синтез субъединиц S1 и S3 коклюшного токсина (*ptxA* и *ptxC*), а также за экспрессию фактора колонизации трахеи (*tcfA*). Впоследствии, в связи с выявлением однонуклеотидного полиморфизма в промоторной области (*ptxP*) гена коклюшного токсина, играющего значительную роль в продукции главного фактора патогенности возбудителя – коклюшного токсина, была проведена модернизация генотипирования путем разработки мультилокусного антигенного сиквенс-типирования (MAST), сначала по схеме MAST1 с выявлением аллельных вариантов генов *prn-ptxP-tcfA*, который в последствии был заменен на MAST2, позволяющий выявлять аллельные варианты *ptxP-fim3-prn* генов.

Методами типирования штаммов, используемыми в настоящее время для *B. pertussis*, являются гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE) [47, 69], мультилокусное сиквенс типирование (MLST) [62, 220], многоцелевой анализ тандемных повторов с переменным числом (MLVA) [199] и типирование однонуклеотидного полиморфизма (SNP) [49, 166, 217, 230, 242, 253]. Хотя PFGE обладает большей дискриминационной способностью, его недостаток заключается в том, что межлабораторное сравнение моделей PFGE затруднено. MLST нацелен на ассоциированные с вирулентностью аллельные гены *B. pertussis* (обычно аллели *ptxP*, *ptxA*, *prn* и *fim3*), тогда как MLVA нацелен на шесть локусов тандемных повторов с переменным числом повторений *B. pertussis*. Методы MLST и MLVA позволяют проводить прямые сравнения изолятов *B. pertussis* в разных лабораториях, при этом метод MLVA является наиболее широко используемым для изучения молекулярной эпидемиологии этого организма. Однако MLST и MLVA теряют свою дискриминационную способность, поскольку штамм MLVA типа 27 (MT27), несущий аллельный профиль *ptxP3/ptxA1/prn2/fim3-1*, стал преобладающим штаммом в популяции *B. pertussis* по всему миру [47, 158, 195, 218]. В настоящее время наиболее прецизионным подходом считается определение генотипа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с использованием полногеномного секвенирования (WGS). Существуют работы, в которых популяции *B. pertussis* были исследованы методом полногеномного анализа SNP [191, 244]. Для осуществления глобального сопоставления изолятов *B. pertussis* был разработан новый метод генотипирования на основе WGS, получивший название core genome MLST (cgMLST) [60]. Однако недостатком WGS является то, что он трудоёмок, дорог и требует много времени для использования в рамках рутинного мониторинга, особенно при расследовании вспышек заболеваний.

Наиболее популярным способом исследования разнообразия генома является подход «ген за геном», который рассматривает аллели как единицы анализа [142]. Процесс поиска аллелей облегчается существованием международных баз данных, таких как База данных геномных последовательностей бактериальных изолятов (BIGSdb *B. pertussis* доступен по адресу <https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>) [64].

Последовательности, загруженные в BIGSdb, можно сканировать по всем известным аллелям, которые представляют собой ключевые цели для *B. pertussis*. Исследование может включать как анализ отдельных генов, так и использование более комплексных стратегий, например, типирование локусов основного генома (cgMLST). На сегодняшний день этот метод считается самым распространённым инструментом для субтипирования с высокой детализацией [216].

Вместе с тем, для проведения генотипирования необходимо выделение чистой бактериальной культуры *B. pertussis*, что занимает достаточно длительное время и не всегда есть возможность получить чистую культуру, учитывая, что эффективность бактериологической диагностики не превышает в практических условиях 20% [40]. Поэтому учитывая, что *B. pertussis* является длительно и труднокультивируемым микроорганизмом, в мире появляются единичные сообщения на ограниченном количестве образцов о проведении генотипирования непосредственно из клинического материала [158].

1.3.3. Геномный мониторинг *B. pertussis* в различных странах мира

Исследование полиморфизма в генах бактерий может быть полезно при эпидемиологическом наблюдении за возбудителями инфекционных заболеваний [141]. Нуклеотидные полиморфизмы в генах, кодирующих два фактора вирулентности *B. pertussis*, пертактин (*prn*) и субъединицу S1 коклюшного токсина (*ptxA*), были впервые обнаружены после крупной вспышки коклюша в Нидерландах в 1996 году [154]. Одним из возможных объяснений увеличения заболеваемости стало то, что циркулирующая популяция возбудителя состояла из штаммов, которые отличались по антигенам от вакцинных штаммов. Дальнейшие исследования выявили аллельные вариации этих двух маркеров в Финляндии, Великобритании, Польше, США и Канаде и изучили другие мишени, предположительно находящиеся под селективным давлением, на предмет вариаций нуклеотидных последовательностей [67, 89, 101, 151, 220].

В большинстве стран, использующих бесклеточные вакцины, изоляты, характеризующиеся аллелями *ptxP3* и *fim3-1* или *fim3-2*, преобладающие в настоящее время. Тогда как изоляты генотипа *ptxP1* все еще присутствуют в

некоторых странах, несмотря на увеличение частоты *ptxP3*, например, в Китае, где бесклеточную вакцину начали использовать после 2012 года. Филогения глобальной коллекции штаммов *B. pertussis* позволяет отследить ключевые аллельные варианты вакцинных антигенов. Увеличение генетического разнообразия наблюдалось до и после появления аллели *ptxP3*. Такое увеличение разнообразия может представлять собой отбор клонов, в некоторой степени ускользнувших от вакцины. Вариации в генах патогенности могут играть важную роль в адаптации *B. pertussis* к вакцинации.

В Иране цельноклеточную вакцину против коклюша (WCV) ввели с 1950-х годов [162, 190, 249]. Программа иммунизации против коклюша в Иране рекомендует вводить три дозы цельноклеточной вакцины против дифтерии, столбняка и коклюша (DTwP) в возрасте 2, 4 и 6 месяцев, а также ревакцинацию в 18 месяцев и в 6 лет. Несмотря на высокий уровень вакцинации против коклюша (96% с 2000 года), число случаев заражения сократилось, но с 2007 года в Иране наблюдается подъем заболеваемости коклюшем, достигший пика в 2012 и 2013 годах [121, 157]. На территории Ирана в 2005 – 2018 гг. было проведено несколько мониторинговых исследований по изучению структуры циркулирующей популяции *B. pertussis*. Так было установлено, что под давлением вакцинации цельноклеточными вакцинами циркулируют следующие аллельные варианты генов патогенности - четыре аллеля S1 субъединицы коклюшного токсина (*ptxA1*, *ptxA2* и *ptxA4*, *ptxA5*), четыре аллеля промотора коклюшного токсина *ptxP* (*ptxP1*, *ptxP2*, *ptxP3* и *ptxP4*), три аллеля пертактина (*prn1*, *prn2*, *prn9*), два аллеля филаментозного гемагглютинина (*fhaB1*, *fhaB2*), три аллеля фимбриального белка Fim3 *fim3* (*fim3-1*, *fim3-2*, *fim3-3*) и два аллеля фимбриального белка Fim2 *fim2* (*fim2-1*, *fim2-2*) [107]. В настоящее время преобладающими в Иране являются *B. pertussis* с *ptxP3/ptxA1/prn2/fim2-1/fim3-2* аллельным профилем, однако в последние годы отмечается рост *B. pertussis* с аллельным профилем *ptxP3/prn9* (до 14% всех изолятов с *ptxP3* аллелем). Все изоляты *prn9* были выделены после 2013 года и выросли с 12,5% (2/15) в 2013 году до 27% (3/11) в 2016 году. Ранее об этих изолятах в Иране не сообщалось, и они были собраны из разных провинций, что

свидетельствует о распространении изолятов *prn9* внутри страны. Было только четыре изолята, не относящихся к *ptxP3*, один содержал аллель *ptxP4* (полный профиль: *ptxP4/ptxA5/prn6/fhaB2/fim2-1/fim3-1*), и три были *ptxP1*, которые в дальнейшем дифференцировались по аллелю *ptxA* в *ptxP1/ptxA1/fim2-1/fim3-1/prn* (один изолят) и *ptxP1/ptxA2/fim2-1/fim3-1/prn1* (два изолята) (Рисунок 5) [191]

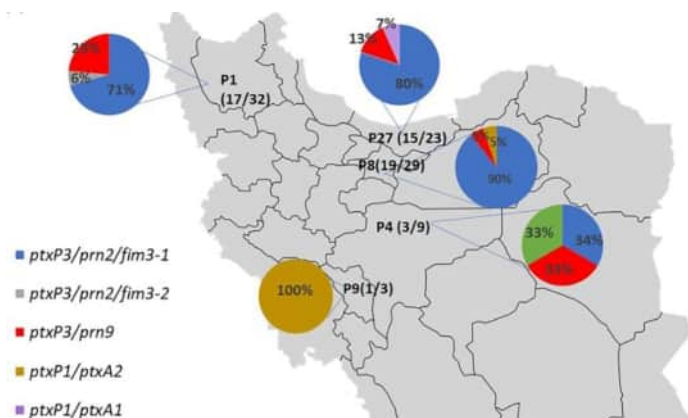


Рисунок 5 – Циркуляция *B. pertussis* в Иране [191]

Преобладающий аллельный профиль соответствует профилям образцов из стран с вакцинацией бескеточной вакциной (ACV) и с сообщениями о *Prn*-негативных изолятах [101, 107, 166, 199]. Что касается экспрессии *Fha*, было обнаружено два *B. pertussis*, которые не экспрессировали *Fha*. Основываясь на данных секвенирования, один изолят имел мутацию в позиции 1087, которая была описана и ранее [229], и аллельный профиль *prn2/ptxP3/ptxA1*, который являлся аналогичным профилям, преобладающим в странах, использующих бескеточные вакцины, и отличался от вакцинного штамма *B. pertussis*, который используется в Иране. Второй штамм имел крупную делецию гена в позиции 6423 в *fhaB* и характеризовался *prn1/ptxP1/ptxA2* аллельным профилем, аналогичным Tohama I.

В 2009 году в Южной Африке [156] цельноклеточную вакцину против коклюша заменили шестивалентной вакциной, которая защищает от дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита и гемофильной инфекции типа b и вводится младенцам в рамках программы плановой иммунизации (Пентаксим (2009–2014) заменен Гексаксимом (с 2015 года по настоящее время); Sanofi Pasteur) [204]. И Пентаксим, и Гексаксим содержат коклюшный токсин и антигены филаментозного гемагглютинаина и не содержат пертактин. Исследования, проведенные в Южной

Африке, показали, что в период с 2015 – 2019 гг. доминирующим аллельным профилем был *ptxP3/ptxA1/ptxB2/prn2/fim3-2* (96,9%), все изоляты имели *ptxP3* аллель промотора гена коклюшного токсина и отсутствовали пертактин-дефицитные штаммы, что свидетельствует о том, что южноафриканские изоляты *B. pertussis* относятся к тому же типу последовательности, который доминирует во всем мире с конца 1990-х годов [122]. Кроме того, все они содержат один и тот же аллель промотора гена коклюшного токсина *ptxP3*. В глобальном масштабе штаммы, содержащие аллель *ptxP3*, впервые появились в 1980-х годах [49]. Впоследствии более 90 % штаммов, циркулирующих по всему миру, стали носителями этого аллеля [130].

Исследования, проведенные в Аргентине за период с 2000 – 2017 гг., показали, что на фоне применения для первичной вакцинации цельноклеточной вакцины 90,6% *B. pertussis* содержали аллельный профиль *ptxP3/ptxA1/prn2/fim3-2* и было обнаружено только 2 штамма с дефицитом пертактина.

Причина появления штаммов типа *ptxP3* в Индии может быть связана с увеличением использования бесклеточных вакцин или с отсутствием данных о геномной эпидемиологии клинических изолятов [221].

В исследовании Weigand et al. в США был выявлен один изолят с сильно сниженной выработкой Fha, в котором наблюдались мутации в гомополимерном G участке (HPTs) в гене *fhaB* [229]. В Австралии исследователи обнаружили Fha-отрицательный изолят с помощью вестерн-блоттинга с той же мутацией HPTs в *ptxP3* в *prn*-отрицательном штамме [242].

Полученные результаты дополнительно подтвердили, что циркулирующая популяция *B. pertussis* эволюционировала, в основном перейдя от *ptxP1* к *ptxP3* и штаммы *ptxP3* распространились по всему миру, включая регионы с применением цельноклеточной вакцины (WCV), и могут эффективно конкурировать со штаммами, не содержащими *ptxP3*. Было высказано предположение, что распространение штаммов *ptxP3* отражает селективное преимущество при высоком охвате бесклеточной вакциной против коклюша [130]. Другим исследованием было установлено, что вариация *prn2* влияет на эффективность вакцины, а исследования

на мышах показали, что включение *prn2* в вакцину может повысить эффективность бесклеточной вакцины [90]. Более того, исследования Safarchi et al. [192] и Van Gent et al. [219] показывают, что штамм *ptxP3/prn2* демонстрирует более высокую способность к колонизации дыхательных путей, чем штамм *ptxP1/prn3*, и предоставляют доказательства повышенной жизнеспособности и лучшего уклонения от иммунного ответа штаммов *ptxP3/prn2* в иммунизированной 3-компонентными АСВ мышинной модели. Поэтому можно предположить, что *prn2* и *ptxP3* могут способствовать повышению адаптивности *B. pertussis* и уклонению от иммунного ответа, что приводит к селекции этих штаммов в условиях вакцинации и последующему быстрому распространению. Вместе с тем, изучение взаимосвязи между *prn2/ptxP3* аллелями и уклонением от вакцинации штаммов *B. pertussis* требует дальнейшего изучения. В Польше, где WCV также использовался десятилетиями, в 2000-2013 годах преобладали изоляты *ptxP1* - 77,5% [160]. Однако в недавнем исследовании было обнаружено, что 61,5% изолятов в 2010-2016 годах были *ptxP3*, что было связано с растущим использованием АСВ с 2013 года для первичной иммунизации [90, 98, 103, 123, 140, 192, 219].

Микробиологический мониторинг фенотипических и генотипических свойств *B. pertussis* в России проводится в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора с 1980-х годов. Первые исследования были посвящены изучению серотипового пейзажа и антибиотикочувствительности штаммов [3, 5, 28]. С 2000-х годов исследования циркулирующей популяции были расширены за счет использования молекулярно-генетических методов.

Так, Борисовой О.Ю. впервые был проведен молекулярно-генетический мониторинг штаммов *B. pertussis*, циркулирующих в 1948 – 2006 гг., изучены особенности структуры пяти генов патогенности – *ptxA*, *prn*, *fim3*, *fim2* и *tcfA*. Установлена смена штаммов *B. pertussis* с «вакцинными» аллелями, на штаммы с «невакцинными» аллелями генов, кодирующих S1-субъединицу коклюшного токсина (все исследованные штаммы имели *ptxA1*), а также пертактина (преобладали аллели *prn2* и *prn3*), демонстрировали существенные отличия и по организации генов, кодирующих фимбриальные белки: в 53,3% штаммов

обнаруживался аллель *fim* 2-2, а в 83,4% – *fim* 3B. Что касается структуры гена *tcfA*, отвечающего за синтез фактора колонизации трахеи, все штаммы оказались однотипными, и у них был выявлен аллель *tcfA2* [5, 10].

В исследовании Н.Т. Гадуа анализировалась специфика семи генов (*ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE*, *ptxP* и *prn*), определяющих субъединицы А-В-комплексов и промотор гена коклюшного токсина, а также пертактина у изолятов *B. pertussis*, полученных в 2000–2010 годах. Впервые были выявлены изменения в структуре промоторной области гена токсина – *ptxP*, что позволило установить циркуляцию вариантов с «невакцинным» аллелем *ptxP3* [14].

Работы Г.А. Ивашинниковой включали микробиологический мониторинг *B. pertussis* с анализом серотипов, чувствительности к антибиотикам и характеристик структуры генов *ptxA*, *ptxC*, *fim3*, *prn* и *tcfA* среди штаммов, выделенных в России в 2006–2012 гг. Впервые на территории России для генотипирования *B. pertussis* был применён инновационный подход – мультилокусное секвенирование генов (MLST, MAST1, MAST2). По мере проведения этих исследований было зафиксировано постепенное вытеснение «вакцинных» сиквенс- и MAST-типов новыми, «невакцинными», которые доминировали в популяции к 2006–2012 гг. Кроме того, был разработан экспресс-метод определения структуры промотора *ptxP* на основе ПЦР-ПДРФ [17].

Данные, полученные в Референс-центре по мониторингу за коклюшем, свидетельствуют о том, что в период с 1948 по 1969 годы на территории России преобладала циркуляция штаммов с «вакцинными» аллельными профилями MAST2 –*ptxP1/fim3A/prn1* и *ptxP2/fim3A/prn1*. В 1970 – 1989 гг. зарегистрированы штаммы с пятью аллельными профилями, среди которых преобладали штаммы с «вакцинным» профилем *ptxP1/fim3A/prn1* и появились штаммы с *ptxP1/fim3B/prn3*, *ptxP1/fim3B/prn1* и *ptxP1/fim3A/prn3* аллельными профилями. В 1990 – 2005 гг. выявлены штаммы *B. pertussis* восьми аллельных профилей, среди которых доминировали штаммы с двумя «невакцинными» аллельными профилями – *ptxP3/fim3B/prn2* и *ptxP3/fim3A/prn2* и зафиксировано снижение частоты выявления штаммов с «вакцинными» аллельными профилями. Среди штаммов *B. pertussis*,

выделенных в 2006 – 2012 гг., зарегистрировано 14 различных аллельных профилей с преобладанием *ptxP3/fim3B/prn2* аллельного профиля, а также циркуляция штаммов *ptxP3/fim3B/prn9* и *ptxP3/fim3A/prn2* аллельных профилей. Среди штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2013 – 2015 гг., выявлено пять аллельных профилей и большинство штаммов характеризовались *ptxP3/fim3B/prn9* и *ptxP3/fim3A/prn2* профилями [7]. В рамках проведения мониторинга также были охарактеризованы три вакцинных штамма *B. pertussis*, используемых для производства АКДС-вакцины, - №№ 305 и 267, выделенные в 1950-х годах, и штамм № 475, выделенный в 1960-х годах [7].

Резюме. Возбудитель коклюша адаптировался за счет накопления небольших мутаций. В контексте сложных бактериальных геномов небольшие мутации в отдельных генах могут оказывать существенное влияние на приспособленность штамма, приводя к клональным зачисткам. Для проведения генотипирования необходимо выделение бактериальной культуры *B. pertussis*, что занимает достаточно длительное время [40]. Поэтому, учитывая, что *B. pertussis* является длительно и труднокультивируемым микроорганизмом, в мире стали появляться единичные сообщения о проведении генотипирования непосредственно из клинического материала на ограниченном количестве образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. 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 медицинских организаций и Федеральных бюджетных учреждений здравоохранения «Центры гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека субъектов РФ, проводящих лабораторные исследования на коклюшную инфекцию (согласно письмам № 77-52-09/103-2024 от 13.02.2024 г. и № 77-52-09/580-2024 от 01.07.2024 г.).

В результате анализа полученных данных установлено, что за период с 2018 по 2024 гг. проведено 970528 исследований на коклюшную инфекцию, из них большее количество 49,8% (95% ДИ: 49,7 – 49,9) исследований проведено в 2024 году, что в 1,9 раз больше, чем в 2023 году (Рисунок 6).

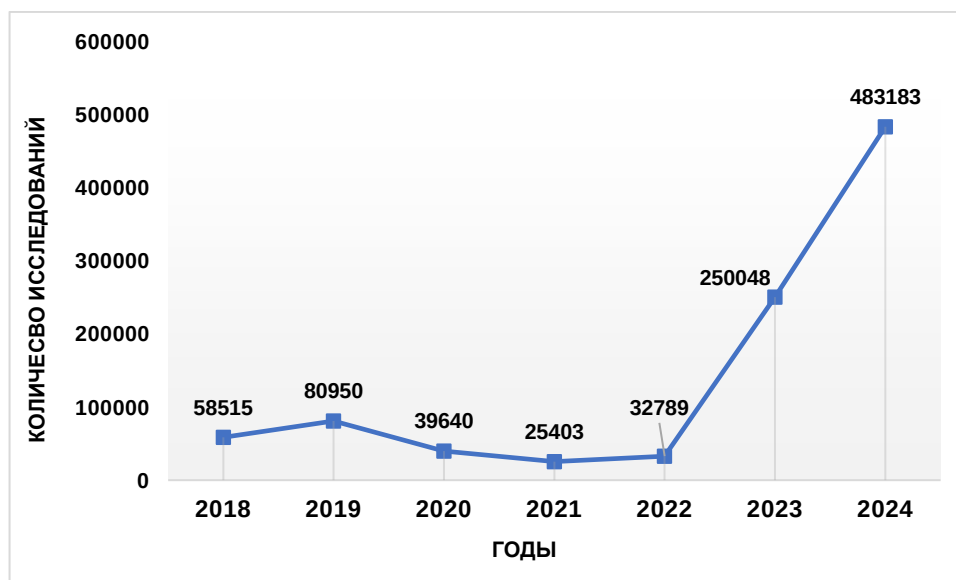


Рисунок 6 – Количество проведенных исследований на коклюшную инфекцию

Если проследить динамику использования трех методов лабораторной диагностики коклюша, видно, что в 2018 - 2022 гг. в основном применяли серологическую диагностику в 42,4% (95% ДИ: 42,2 – 42,6) случаев,

бактериологическую диагностику использовали в 31,5% (95% ДИ: 31,3 – 31,7) случаев и молекулярно-генетические исследования - в 26,1 % (95% ДИ: 25,9 – 26,3) случаев. В 2023 г. отмечается значительное увеличение удельного веса использования молекулярно-генетических методов 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 метода 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 7).

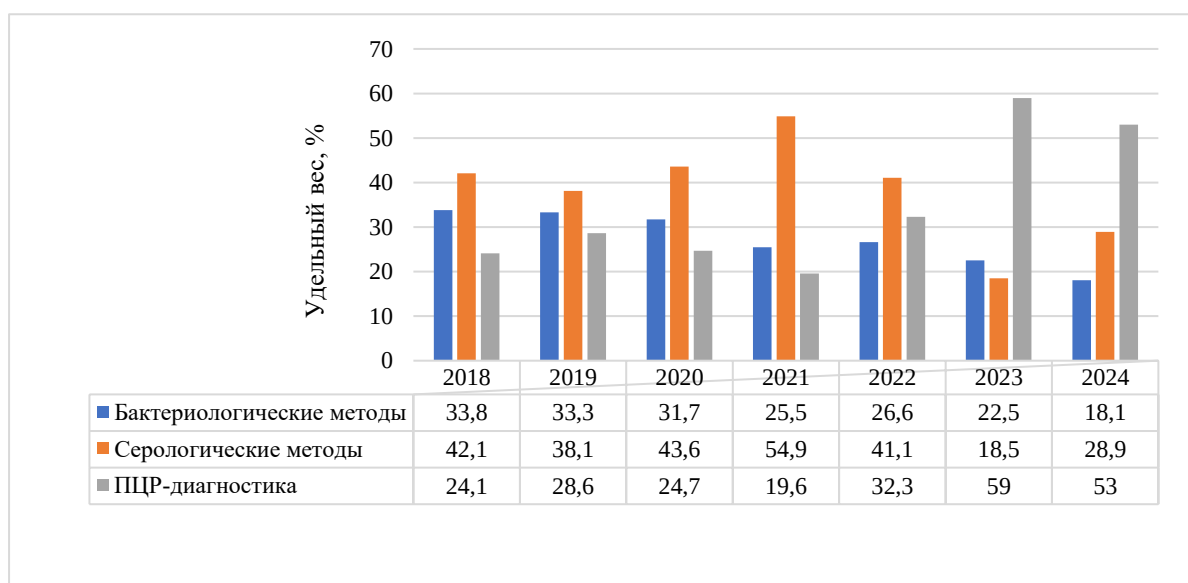


Рисунок 7 – Динамика использования различных методов для диагностики коклюшной инфекции

С диагностической целью за анализируемый период проведено 403377, по эпидпоказаниям – 83968 исследований, из них большинство исследований проведено в 2023 году (с диагностической целью – 47,4% (95% ДИ: 47,3 – 47,6), по эпидпоказаниям – 65,2% (95% ДИ: 64,9 – 65,6) (Рисунок 8). В 2024 г. с диагностической целью проведено 58,9% (95% ДИ: 58,7 – 59,1) исследований, по эпидпоказаниям - 41,1% (95% ДИ: 40,9 – 41,3).

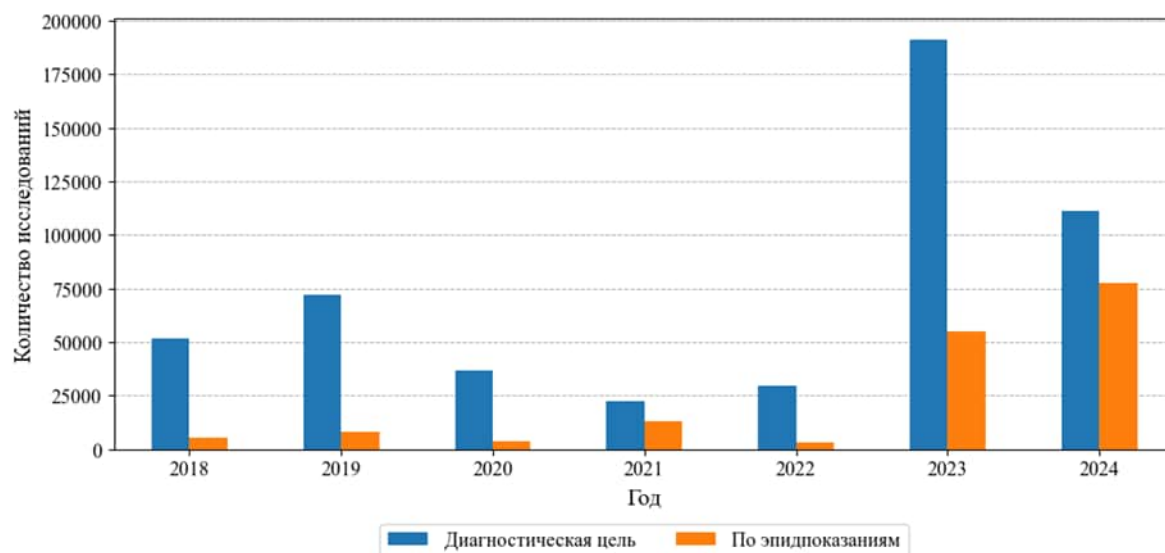


Рисунок 8 – Количество проведенных исследований на коклюшную инфекцию с диагностической целью и по эпидпоказаниям

Анализ динамики использования трех методов 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) (Рисунок 9).

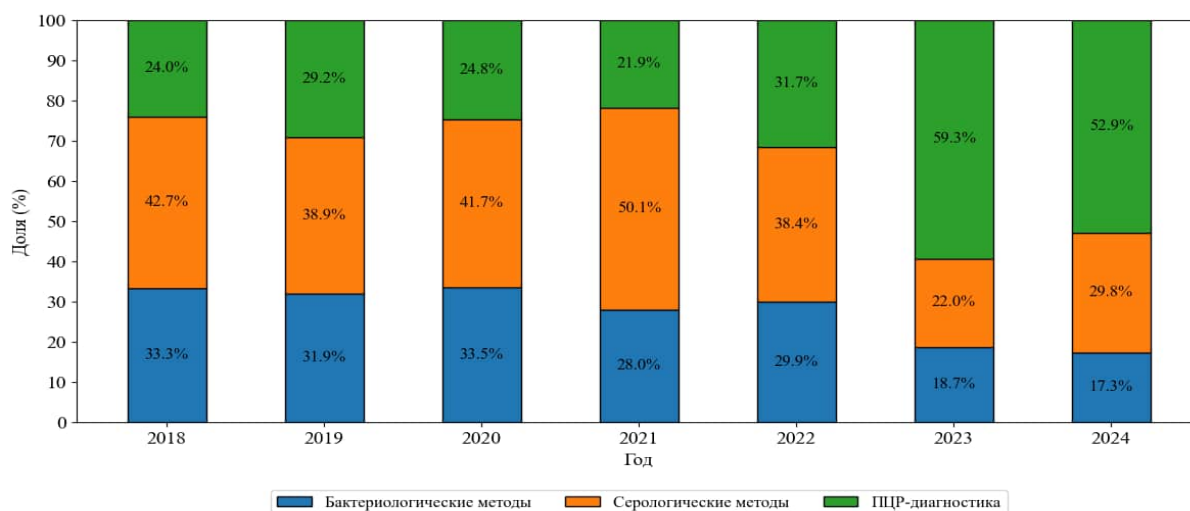


Рисунок 9 – Удельный вес использования различных методов исследований с диагностической целью

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 значительно 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 (Рисунок 10).

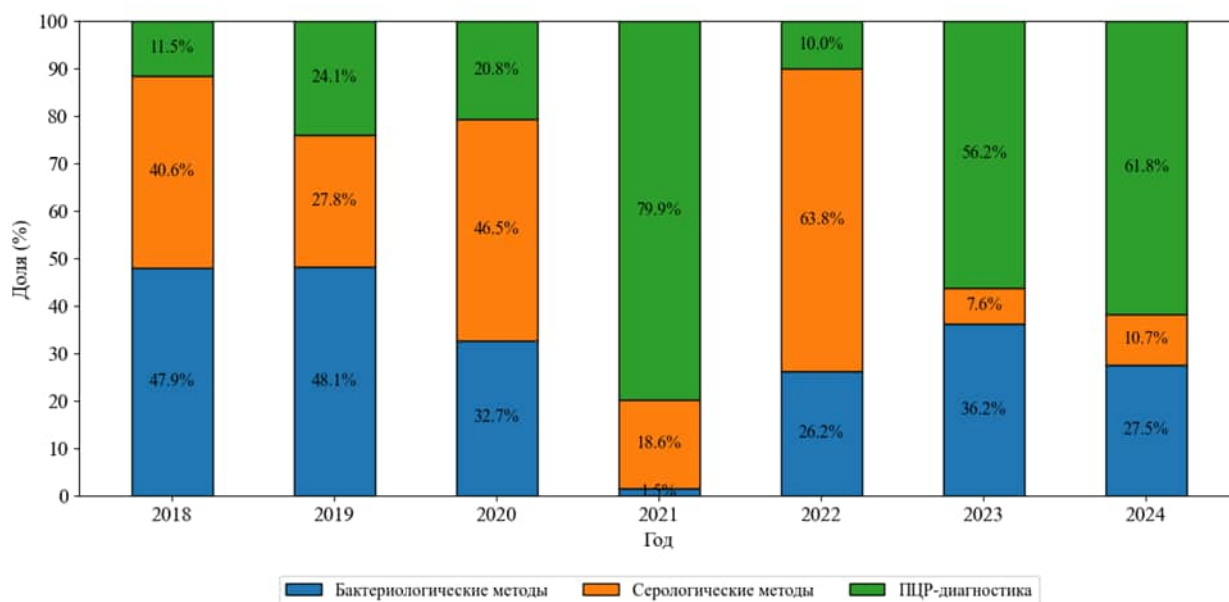


Рисунок 10 - Удельный вес использования различных методов исследований по эпидпоказаниям

Нами проведен анализ использования трех методов диагностики для лабораторного подтверждения диагноза коклюш. Так, в 2018 - 2022 гг. лабораторное подтверждение диагноза преимущественно было с помощью серодиагностики в 50,1% (95% ДИ: 49,6 – 50,6) (Рисунок 11). В 2023 -2024 гг. увеличилось количество лабораторных подтверждений методом ПЦР до 51,5% (95% ДИ: 50,9 – 51,2).

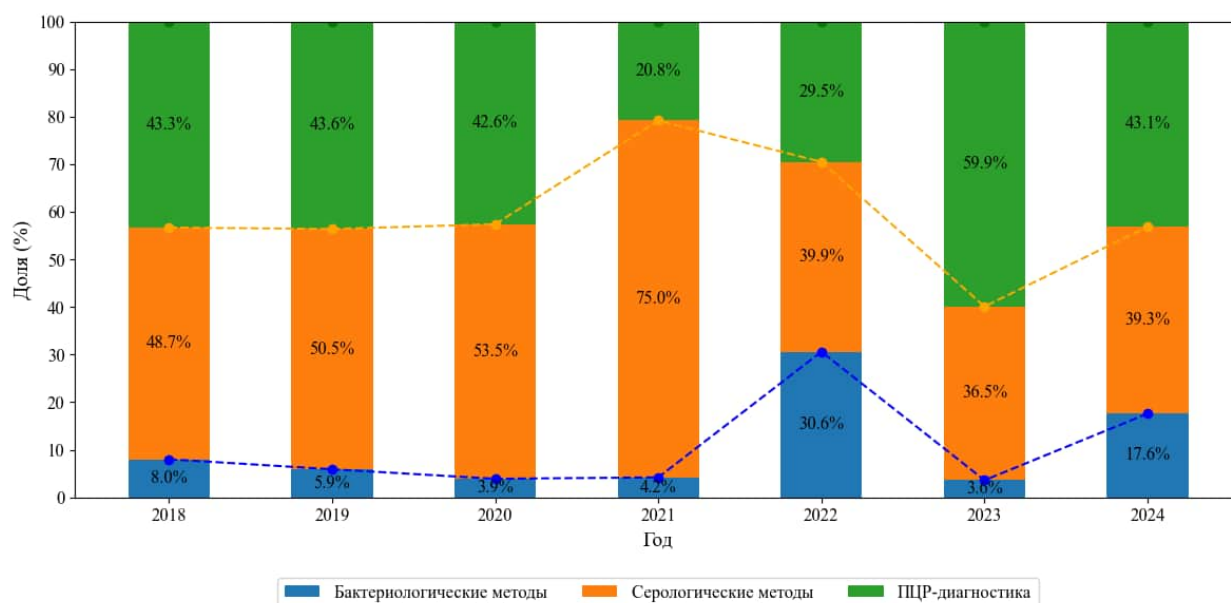


Рисунок 11 – Лабораторное подтверждение диагноза коклюш в РФ в 2018 – 2024 гг.

В 2023 г. подтверждение диагноза коклюш с помощью методов лабораторной диагностики составило 95,4% (95% ДИ: 95,1 – 95,7) случаев; без лабораторного подтверждения поставлено 4,6% (95% ДИ: 4,4 – 4,9) диагнозов, а в 2024 г. в РФ увеличилась доля лабораторно подтвержденного диагноза коклюш – до 98,5% (95% ДИ: 98,4 – 98,7) (Рисунок 12).

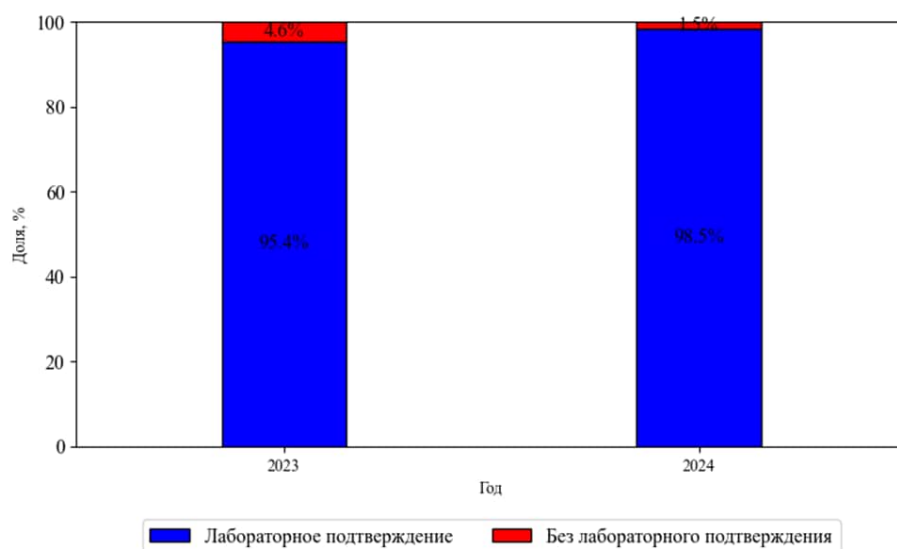


Рисунок 12 - Лабораторное подтверждение диагноза коклюш в РФ в 2023 г. и в 2024 г.

В 2023 г. и в 2024 г. большинство случаев коклюша было подтверждено с помощью ПЦР-диагностики 61,1% (95% ДИ: 57,9 – 63,9) и 62,5% (95% ДИ: 61,9 –

63,1) (Рисунок 13).

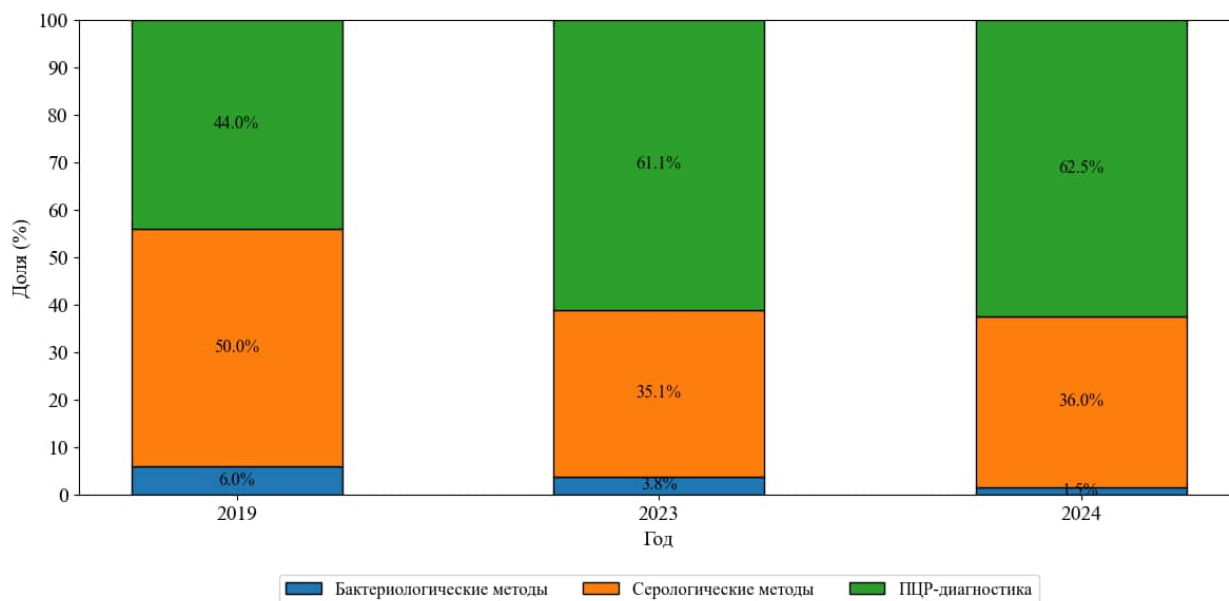


Рисунок 13 – Удельный вес методов, применяющихся для лабораторного подтверждения диагноза коклюша в 2019 г., 2023 г. и 2024 г.

Если сравнить с аналогичными данными за 2019 г., то видно, что ранее в большинстве случаев для постановки диагноза была использована серодиагностика 50% (95% ДИ: 46,9 – 53,1), ПЦР-диагностика – в 44% (95% ДИ: 40,9 – 47,1) случаев и бактериологическая диагностика – в 6% (95% ДИ: 4,7 – 7,6) случаев.

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) (Рисунок 14).

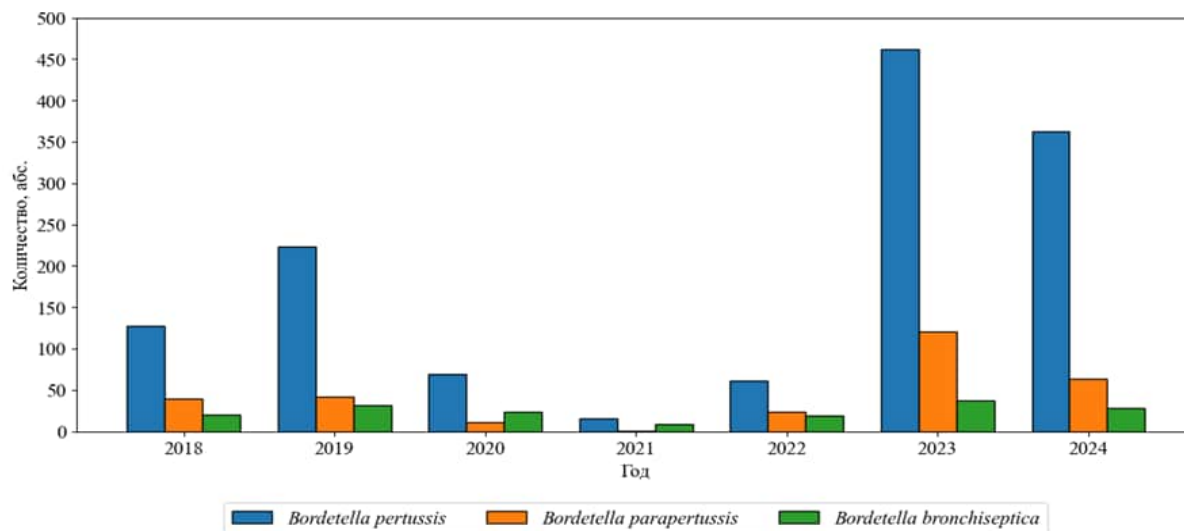


Рисунок 14 - Структура возбудителей коклюша в 2018 – 2024 гг.

Этиологическая структура возбудителей коклюша в 2023 году в целом по России с учётом трех методов микробиологической диагностики 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 *B. holmesii* до 0,1% (95% ДИ: 0,02 – 0,2) (Рисунок 15).

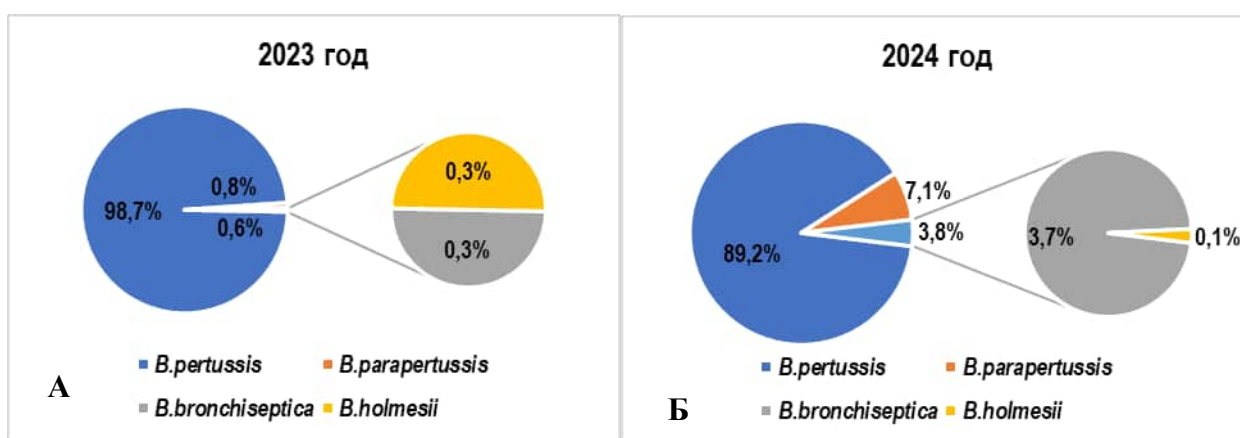


Рисунок 15 - Этиологическая структура возбудителей коклюша в 2023 г. (А) и 2024 г. (Б)

Циркуляция *B. pertussis* была на всех территориях РФ, *B. parapertussis* - зарегистрирована на территории 10 регионов, *B. bronchiseptica* – 11 регионов и *B. holmesii* – 5 регионов. Кроме того, отмечались случаи ко-инфекции *B. pertussis* + *B. parapertussis* - на двух территориях, *B. pertussis* + *B. bronchiseptica* - на трех территориях. В последних случаях наличие ко-инфекции привело к утяжелению клинической картины заболевания с развитием бронхопневмоний.

Учитывая рост заболеваемости коклюшем в 2023 г., мы провели анализ эффективности использования трех методов лабораторной диагностики коклюша в РФ.

Так, с помощью бактериологического метода проведено 35868 исследований с диагностической целью и 19840 исследований по эпидпоказаниям. Однако бактериологическая диагностика была использована только на 45,3%

территориях РФ. Анализ удельного веса применения бактериологического метода при подтверждении диагноза коклюш показал, что данный метод был использован на 89,4% территориях для подтверждения 5% диагнозов, на 5,9% территориях – для подтверждения от 5 до 10% диагнозов и на 4,7% территориях – для подтверждения более 10% диагнозов коклюша. В большинстве случаев у больных были выделены штаммы *B. pertussis*. Следует отметить, что для проведения бактериологической диагностики коклюша на территории РФ имеется весь необходимый спектр питательных сред и реагентов отечественного производства. Однако в целом по РФ в 2023 г. удельный вес положительных находок при бактериологической диагностике не превышал 1,5% (95% ДИ: 1,2 – 1,7), в 2024 г. - 0,9% (95% ДИ: 0,7 – 1,0).

В 2023 г. на территории РФ с помощью молекулярно-генетических методов проведено 147 577 исследований, из них 113343 исследований – с диагностической целью и 30794 исследований по эпидпоказаниям. На территории РФ используются только отечественные зарегистрированные в установленном порядке ПЦР-тест-системы: набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*» (АО «Вектор Бест», Россия); набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* и *Bordetella holmesii* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм *Bordetella*» (ООО «НекстБио», Россия). Большинство 70,9% (95% ДИ: 70,7 – 71,1) исследований проведено с помощью набора реагентов «АмплиСенс *Bordetella* multi-FL», 6,2% (95% ДИ: 6,1 – 6,3) исследований - с помощью «АмплиПрайм

Bordetella»; 22,9% (95% ДИ: 22,7 – 23,1) исследований - с помощью «РеалБест ДНК *Bordetella species/ Bordetella pertussis/ Bordetella bronchiseptica*», поэтому можно сказать, что в настоящее время на территории нашей страны ПЦР-диагностика позволяет охватить весь спектр возбудителей коклюша. Анализ удельного веса применения ПЦР-диагностики при подтверждении диагноза коклюш показал, что данный метод был использован на 45,3% территорий для подтверждения более 70% диагнозов, на 28,6% территориях – для подтверждения от 50 до 70% диагнозов, на 17,8% территориях – для подтверждения от 15 до 50% диагнозов и на 8,3% территорий – для подтверждения менее 15% диагнозов коклюша.

Серологическая диагностика коклюша была использована на 90,8% территориях РФ для проведения 42145 исследований с диагностической целью и 4153 исследований по эпидпоказаниям. Анализ удельного веса применения серодиагностики при подтверждении диагноза коклюш показал, что данный метод был использован на 12,7% территорий для подтверждения более 70% диагнозов, на 10,1% территорий для подтверждения от 50% до 70% диагнозов и на 32,9% территорий для подтверждения менее чем 15% диагнозов. Кроме того, установлено, что на некоторых территориях с помощью серодиагностики было поставлено более 84% диагнозов коклюша. Однако серодиагностика позволяет подтвердить диагноз коклюша не ранее чем на третьей неделе болезни, т.е. ретроспективно. Согласно нормативной и методической документации до 2021 года в РФ для проведения серодиагностики были регламентированы - РА, РПГА и ИФА, однако с 2021 года для диагностических целей должен быть использован только ИФА. Анализ применявшихся методов для серодиагностики в 2023 г. показал, что только 61,0% серологических исследований проведен с помощью ИФА, а 39,0% исследований – с помощью РА и РПГА. В 2024 г. ситуация изменилась в положительную сторону и увеличилась доля применения ИФА с

диагностической целью до 89,5% (95% ДИ: 89,3 – 89,7) (Рисунок 16).

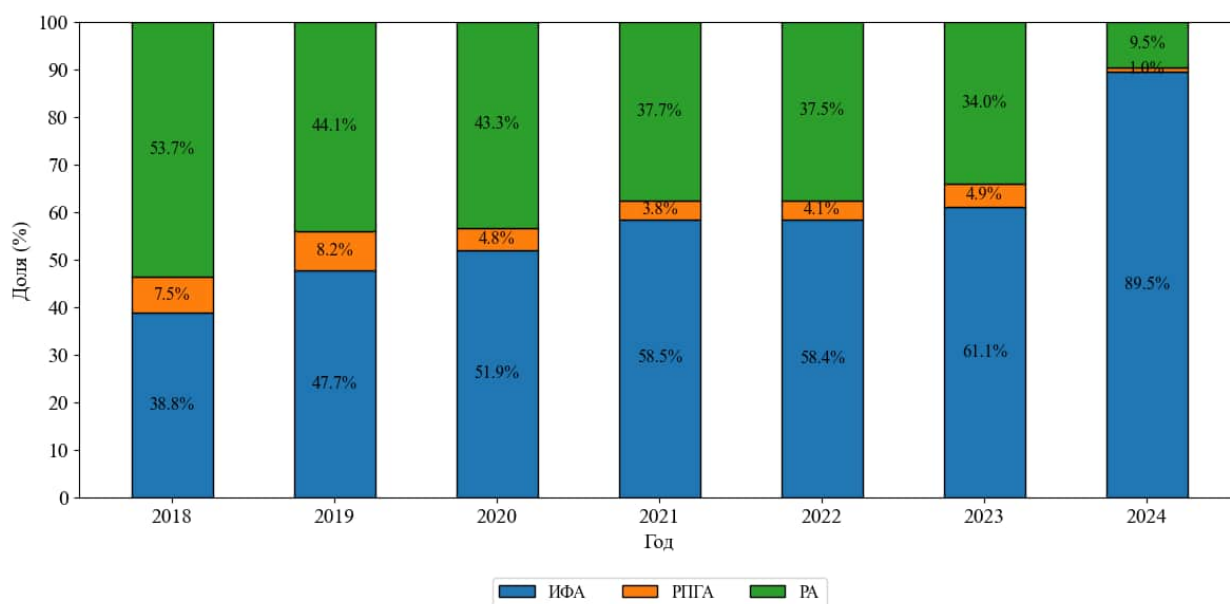


Рисунок 16 - Используемые методы для проведения серологической диагностики коклюша в РФ в 2018 – 2024 гг.

Учитывая степень распространенности коклюша, мы проанализировали эффективность применения бактериологического и молекулярно-генетических 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%). Положительные находки составили 5% и 9,7% в 2023 г. и в 2024 г. соответственно. В очагах с одним случаем коклюша лабораторное подтверждение диагноза отмечено в 53,2% случаев, в очагах с 2 случаями – в 76,4% случаев и в очагах с 3 и более случаями – в 72,6% случаев. 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 17 А, Б).

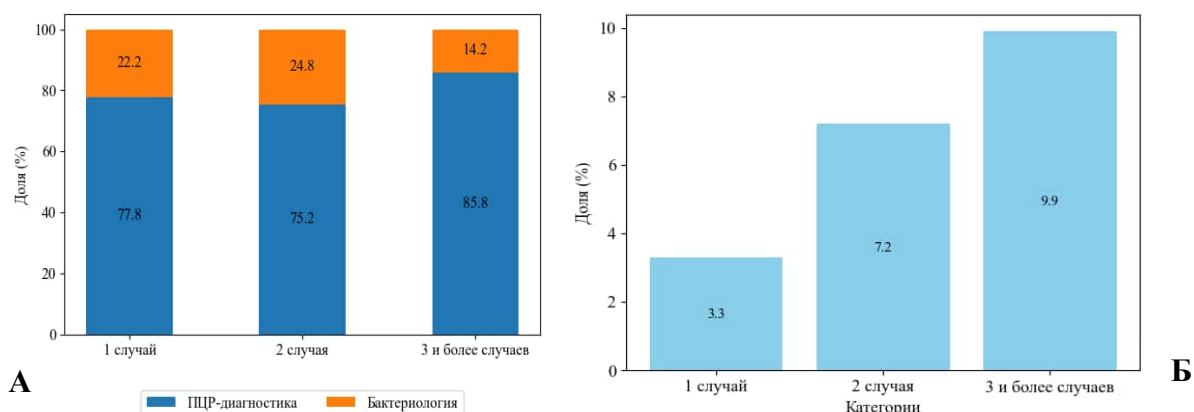


Рисунок 17 - Лабораторное подтверждение диагноза коклюш в очагах коклюшной инфекции с помощью разных методов диагностики (А) и оценкой положительных находок при проведении исследований (Б)

Резюме. Одной из причин роста заболеваемости коклюшем в период 2023–2024 гг. является улучшение диагностики из-за применения более чувствительных и специфичных молекулярно-генетических методов, которые приводят к увеличению числа выявленных случаев заболевания. В структуре возбудителей коклюша преобладает *B. pertussis* 73,7% (95% ДИ: 71,6 – 75,7). Кроме того, отмечается циркуляция *B. holmesii* до 0,3% случаев. Зарегистрированы случаи ко-инфекции *B. pertussis* и *B. parapertussis*, а также *B. pertussis* с *B. bronchiseptica*, что способствует более тяжелому течению болезни. Установлено, что положительные результаты при бактериологическом исследовании диагностического материала с целью лабораторного подтверждения диагноза коклюш, составляют менее 1,5%. ПЦР-диагностика оказалась эффективной в эпидемических очагах коклюшной инфекции. На основании проведенного исследования по оценке эффективности различных диагностических методов для подтверждения диагноза коклюш предложено включить ПЦР-диагностику в новую редакцию СанПин и исключить бактериологический метод при обследовании контактных лиц. Полученные результаты по низкой эффективности бактериологической диагностики обосновали необходимость разработки нового подхода к генотипированию *B. pertussis* с учетом активного использования ПЦР-диагностики.

ГЛАВА 3. Антибиотикочувствительность циркулирующих штаммов

B. pertussis

На протяжении многих лет эритромицин считался самым эффективным антимикробным препаратом, применяемым при терапии коклюша [104, 129]. Данный природный антибактериальный препарат является первым антибиотиком, положившим начало фармакологической группе макролидов, в его химической структуре содержится макроциклическое лактонное кольцо, состоящее из 14 атомов. Кларитромицин является производным эритромицина, также относится к подгруппе 14-членных макролидов и обладает выраженной активностью *in vitro* против *B. pertussis* и лучшей переносимостью, чем эритромицин. Для лечения инфекций верхних дыхательных путей также применяется азитромицин. Данный полусинтетический антибиотик, также, как и эритромицин, входит в группу макролидов, однако относится к подгруппе аzaлидов, полученных путем химической модификации 14-членных макролидных препаратов и отличающихся от них более сложным строением и повышенной кислотоустойчивостью. Рокситромицин также относится к группе 14-членных макролидов. Он имеет широкий спектр антибактериальной активности. Кроме того, рокситромицин оказывает выраженный постантибиотический эффект, что подразумевает персистирующее ингибирование жизнедеятельности бактерий после прекращения их контакта с антибактериальным препаратом. За счет этого общее антибактериальное действие рокситромицина усиливается и пролонгируется [167]. Рокситромицин проявляет высокую активность *in vitro* в отношении *B. pertussis*, что в сочетании с благоприятными фармакокинетическими свойствами и хорошей переносимостью делает его перспективным препаратом для лечения и профилактики коклюша [39, 63].

Рокситромицин имеет существенные преимущества перед эритромицином и по фармакокинетическим характеристикам. Он является кислотоустойчивым препаратом и имеет более высокую биодоступность, мало зависящую от приема пищи, более длительный период полувыведения и создает более высокие и стабильные концентрации в крови и тканях. Следует подчеркнуть, что создание

высоких концентраций в сыворотке крови выгодно отличает рокситромицин не только от эритромицина, но и от других современных макролидов (азитромицина, кларитромицина) [54]. Рокситромицин оказывает слабое действие на цитохром Р-450, в связи с чем риск лекарственных взаимодействий при его применении значительно ниже, чем при применении эритромицина и кларитромицина. Безопасность и отличная переносимость рокситромицина обуславливают его особую терапевтическую ценность у педиатрических пациентов, включая детей самого младшего возраста [39].

Учитывая глобальный рост устойчивых к антибиотикам микроорганизмов, в том числе среди возбудителей воздушно-капельных инфекций, а также регистрацию за последнее десятилетие во многих странах мира штаммов *B. pertussis*, устойчивых к макролидам, нами проведен мониторинг антибиотикочувствительности к макролидам 222 штаммов *B. pertussis*, циркулирующих на территории России в 2018 – 2024 гг. Изученные штаммы были выделены от больных коклюшем в г. Москве, Челябинской, Новосибирской, Свердловской, Воронежской, Ульяновской, Мурманской, Кемеровской, Самарской областях, Пермском и Хабаровском краях, Ханты-Мансийском автономном округе – Югре, Республике Коми, Мордовии, Татарстан.

Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [177] и Европейский комитет по тестированию чувствительности к антибактериальным препаратам (EUCAST) [210] пока не предоставляют критерии пограничных значений антибиотикочувствительности для штаммов *B. pertussis*. 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 [65, 68, 72, 104, 213].

В опубликованных ранее работах [50, 109, 126, 134] при анализе результатов диско-диффузионного метода сообщалось, что размер зоны задержки роста, связанной с чувствительностью штаммов *B. pertussis* к макролидам соответствовал

≥ 42 мм, а в исследованиях, с помощью МИК-тестов чувствительность штаммов *B. pertussis* связывали с МИК < 32 мкг/мл.

Тестирование чувствительности к антибиотикам клинических изолятов *B. pertussis* проводили диско-диффузионным методом к азитромицину, эритромицину, кларитромицину и рокситромицину. Чувствительность к макролидам подтверждалась с помощью МИК-теста (Рисунок 18). В качестве контрольных штаммов использовали *B. pertussis* ATCC 9797, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

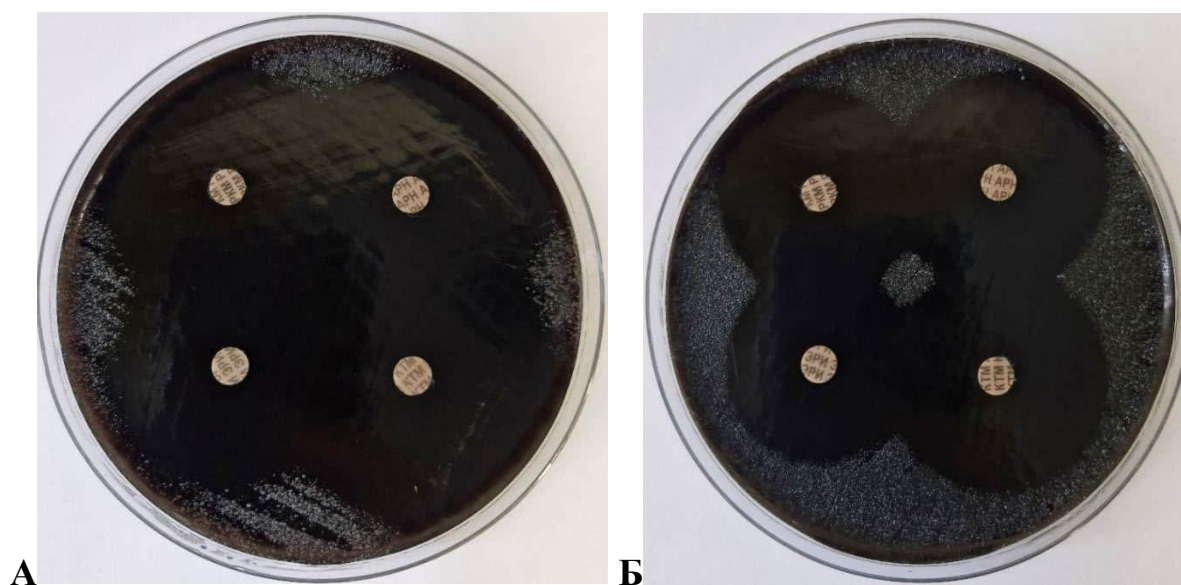


Рисунок 18 - Определение антибиотикочувствительности бактериальных культур *B. pertussis* диско-диффузионным методом (А и Б примеры постановки)

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

Проведенное исследование показало (Рисунок 19), 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).

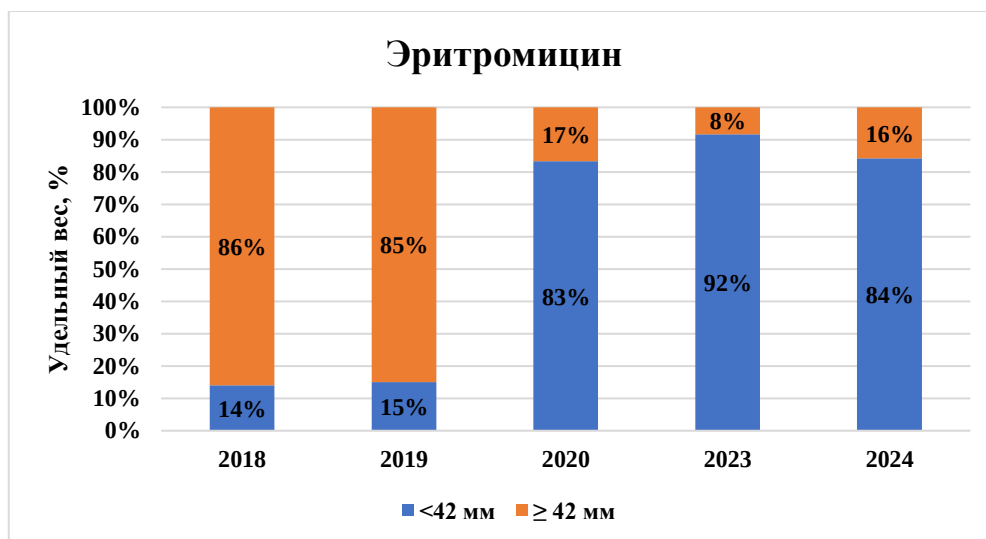


Рисунок 19 - Количество штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2018-2024 гг., с различным диаметром зон задержки роста к эритромицину в диско-диффузионном методе

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.

С помощью системы МИК Тест Стрип (MIC Test Strip) ("ЛИОФИЛКЕМСРЛ", Италия) проведено определение МИК эритромицина и кларитромицина для штаммов *B. pertussis* с зоной задержки роста <42 мм (Рисунок 20).

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 3). Анализ показал, что МИК эритромицина и кларитромицина у 30% (95% ДИ: 21,1 – 40,8) штаммов *B. pertussis* составила 0,25 мкг/мл, у 33,8% (95% ДИ: 24,4 – 44,6) штаммов – 0,5 мкг/мл.

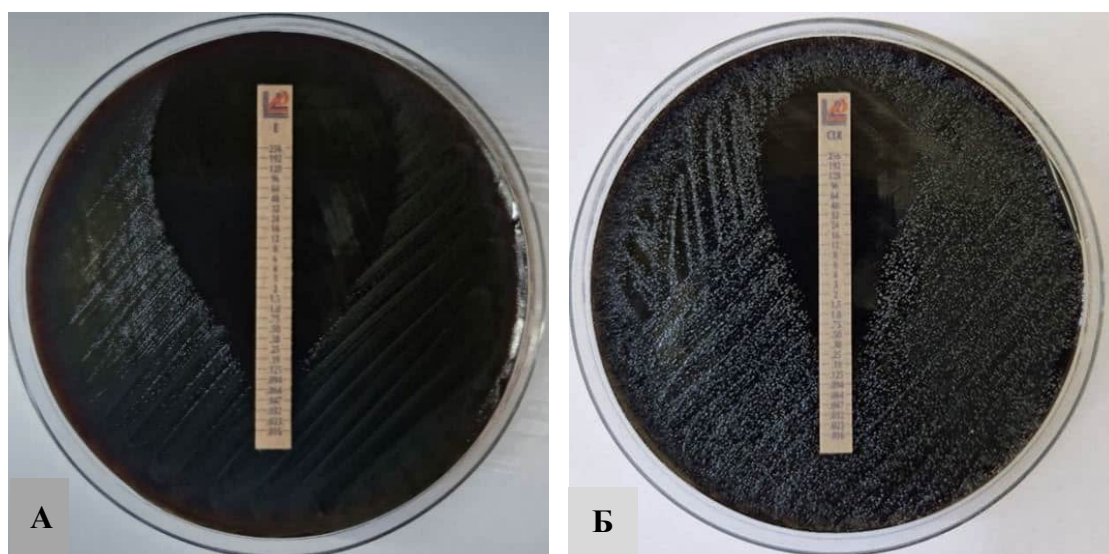


Рисунок 20 - Определение значений МИК антибиотиков бактериальных культур *B. pertussis* с помощью МИК теста (А и Б примеры постановки)

Для эритромицина по результатам МИК-теста МИК₅₀ составила 0,25 мкг/мл, МИК₉₀ – 1,0 мкг/мл. Для кларитромицина МИК₅₀ составила 1,0 мкг/мл, МИК₉₀ – 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*.

Таблица 3 – Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации антибактериальных препаратов штаммов *B. pertussis* (n = 80)

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

Проведенные исследования показали тенденцию к уменьшению диаметра зон задержки роста штаммов *B. pertussis* к эритромицину и кларитромицину и

увеличение МИК препарата, что может свидетельствовать о возможном снижении эффективности действия данных антибактериальных препаратов на возбудителя коклюша *in vitro* и расширении адаптационных механизмов возбудителя на фоне длительного применения антибактериальной терапии эритромицином.

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

Если проанализировать чувствительность штаммов *B. pertussis* к азитромицину, то видно, 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) (Рисунок 21).

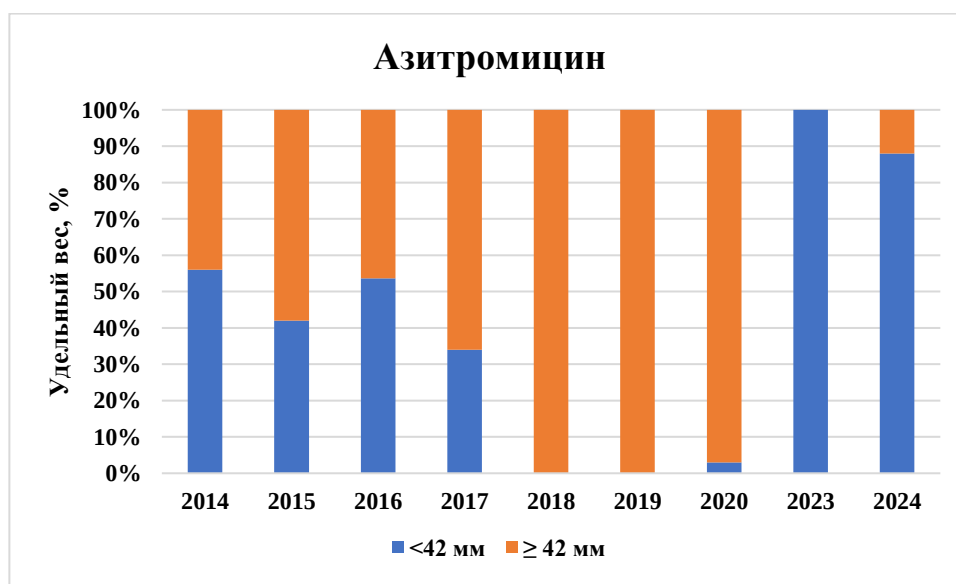


Рисунок 21 - Количество штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2014-2024 гг. с различным диаметром зон задержки роста к азитромицину

Полученные данные позволяют проследить тенденцию увеличения частоты выявляемости штаммов с диаметром зоны задержки роста к азитромицину в интервале 22-42 мм. Оценка чувствительности штаммов *B. pertussis* к рокситромицину диско-диффузионным методом показала, что у исследуемых штаммов диаметр зоны задержки роста находился в пределах 29-47 мм (95% ДИ: 34,1 – 38,4).

3.3 Молекулярно-генетическое исследование антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis* к макролидам

Устойчивость к макролидам может быть связана с тремя различными механизмами. Наиболее распространённым механизмом, в том числе и для *B. pertussis*, является однонуклеотидный полиморфизм (SNP) A2047G в гене 23S rRNA в домене V [50]. Он равнозначен SNP в позиции A2058G у *E. coli* и A2064G у *M. pneumoniae* [159, 231]. Мутация A2047G влияет на сайт связывания макролидов в компоненте 23S rRNA 50S рибосомальной субъединицы и не позволяет макролидам ингибировать удлинение белка. В геноме *B. pertussis* есть три копии этого гена, SNP A2047G можно найти в одной или нескольких копиях.

Для штаммов *B. pertussis*, которые имели 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, по опубликованному протоколу [224]. Праймер MP комплементарен 2047G последовательности 23S rRNA, что характерно для нуклеотидной последовательности резистентного к эритромицину штамма *B. pertussis*, праймер WP комплементарен A2047 последовательности 23S rRNA, что соответствует нуклеотидной последовательности чувствительного к эритромицину штамма *B. pertussis*. При постановке аллель-специфичной ПЦР с праймерами FPRP и MPRP (Рисунок 22 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 аллель-специфичной ПЦР с парами праймеров FPRP и WPRP (Рисунок 22 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.

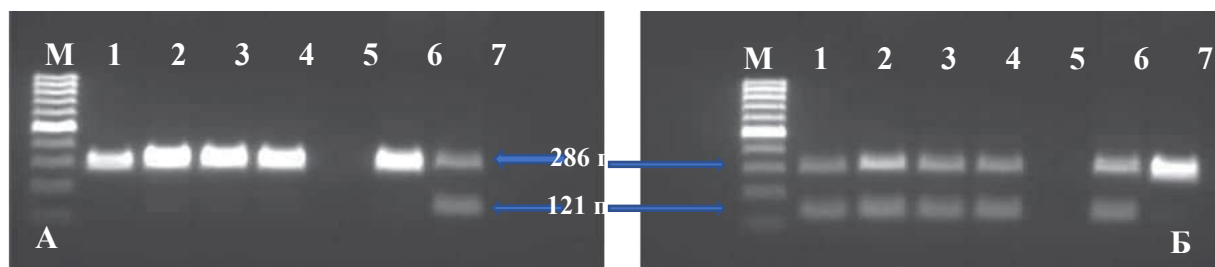


Рисунок 22 - Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных в ходе аллель-специфичной ПЦР с праймерами FP-RP и MP-RP (А) и FP-RP и WP-RP (Б)

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 (Рисунок 23).



Рисунок 23 - Выровненные последовательности изученных штаммов *B. pertussis*

Все проанализированные последовательности содержали базовый нуклеотид А в позиции 2047, следовательно, были все чувствительные к макролидам.

Резюме. Проведенные нами исследования показали, что в циркулирующей в РФ популяции возбудителя коклюша доминируют штаммы *B. pertussis*, чувствительные к эритромицину, кларитромицину, азитромицину и рокситромицину. Однако, для штаммов *B. pertussis*, выделенных в последние два

года, в диско-диффузионном методе наблюдалось уменьшение зоны задержки роста до 28-40 мм для эритромицина и кларитромицина и до 23-38 мм для азитромицина. Кроме того, для штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2023-2024 гг., наблюдалось увеличение МИК эритромицина и кларитромицина, что может свидетельствовать о снижении эффективности действия *in vitro* этих антибиотиков на возбудителя коклюша, а также быть следствием широкого применения этих препаратов в период резкого подъема заболеваемости коклюшем в 2023-2024 гг. В настоящем исследовании изучение молекулярных механизмов резистентности к макролидам, связанной с мутацией в 23S rRNA, не выявило наличия мутации в позиции A2047G в 23S rRNA.

ГЛАВА 4. Разработка методики генодиагностики *B. pertussis* на основе вложенной ПЦР

Одним из методов, используемых для геномного мониторинга за возбудителем коклюша, является мультилокусное антигенное секвенирование (MAST). Данный метод основан на секвенировании фрагментов основных протективных антигенов возбудителя, что позволяет выявлять генетические различия и оценивать клональный состав циркулирующей популяции *B. pertussis*.

Генотипирование направлено на исследование фрагментов генов *ptxP-fim3-prn*, кодирующих промоторную *ptxP* область коклюшного токсина, фимбрии 3 типа и пертактин. Это позволяет идентифицировать гены, кодирующие белки, включённые в состав бесклеточных коклюшных вакцин [155].

В настоящее время для изучения особенностей генетической структуры основных факторов патогенности штаммов *B. pertussis* необходимо выделение чистой бактериальной культуры *B. pertussis*. Это занимает длительное время культивирования до 7 дней. При этом общая эффективность бактериологического исследования до вида составляет около 20%, что связано с приемом антибактериальных препаратов, сложностью выделения бактериальной культуры у детей раннего возраста [40].

По данным предыдущих исследований в рамках работы Референс центра по мониторингу за коклюшем в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора показано, что в динамике эпидемического процесса коклюшной инфекции на территории России циркулировали штаммы девятнадцати (генотипирование по *ptxP-fim3-prn*) генотипов: *ptxP1/fim3-1/prn1*, *ptxP2/fim3-1/prn1*, *ptxP2/fim3-1/prn9*, *ptxP1/fim3-2/prn3*, *ptxP1/fim3-2/prn1*, *ptxP1/fim3-1/prn3*, *ptxP1/fim3-3/prn2*, *ptxP3/fim3-4/prn1*, *ptxP3/fim3-4/prn2*, *ptxP1/fim3-2/prn2*, *ptxP2/fim3-2/prn1*, *ptxP3/fim3-1/prn9*, *ptxP1/fim3-1/prn2*, *ptxP3/fim3-1/prn1*, *ptxP3/fim3-2/prn9*, *ptxP3/fim3-1/prn2*, *ptxP3/fim3-2/prn3*, *ptxP2/fim3-2/prn4* и *ptxP3/fim3-2/prn2*, большинство из которых зарегистрированы с конца 1990-х годов [1, 7, 11, 12, 13, 18, 19, 20]. Ранее предлагались способы генотипирования

B. pertussis [8, 10] после выделения чистой бактериальной культуры возбудителя на плотных питательных средах.

Поэтому, 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 (мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки), полученного от больного, без выделения чистой культуры возбудителя на основе nested-ПЦР для наблюдения за циркулирующим возбудителем коклюша, выявления эпидемических клонов при молекулярно-генетическом мониторинге в системе эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией.

На первом этапе нами разработаны специфические праймеры (Рисунок 24), которые были сконструированы на основании нуклеотидных последовательностей, имеющихся в базах данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

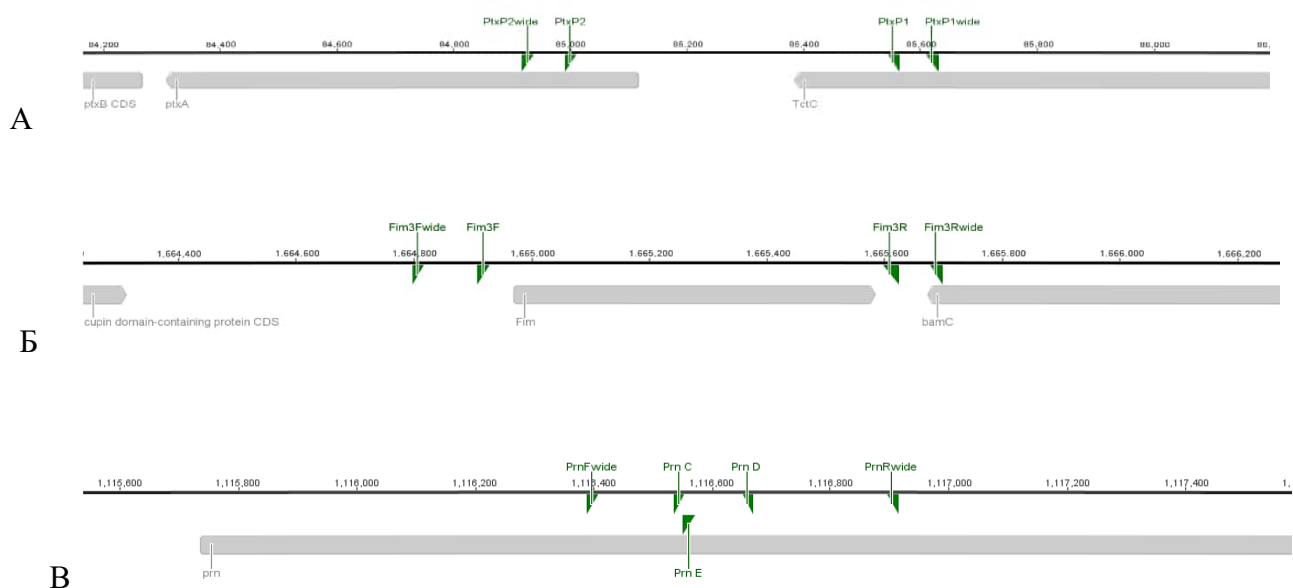


Рисунок 24 – Положение праймеров, фланкирующих участки генов, кодирующих промотор гена коклюшного токсина (*ptxP*)(А), фимбриальный белок Fim3 (*fim3*)(Б) и белок пертактин (*prn*)(В)

Для создания и анализа праймеров использовали компьютерные программы Primer3Plus (<https://primer3plus.com>) и Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Генотипирование *B. pertussis* из клинического материала от больного проводилось следующим образом (Рисунок 25);

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. Проведение nested PCR с праймерами (Таблица 4)
5. Проведение электрофореза продуктов ПЦР в горизонтальном агарозном геле.
6. Проведение секвенирования по Сэнгеру для выявления аллельных вариантов фрагментов промоторной области *ptxP* коклюшного токсина, генов фимбрий 3 типа *fim3* и пертактина *prn*.

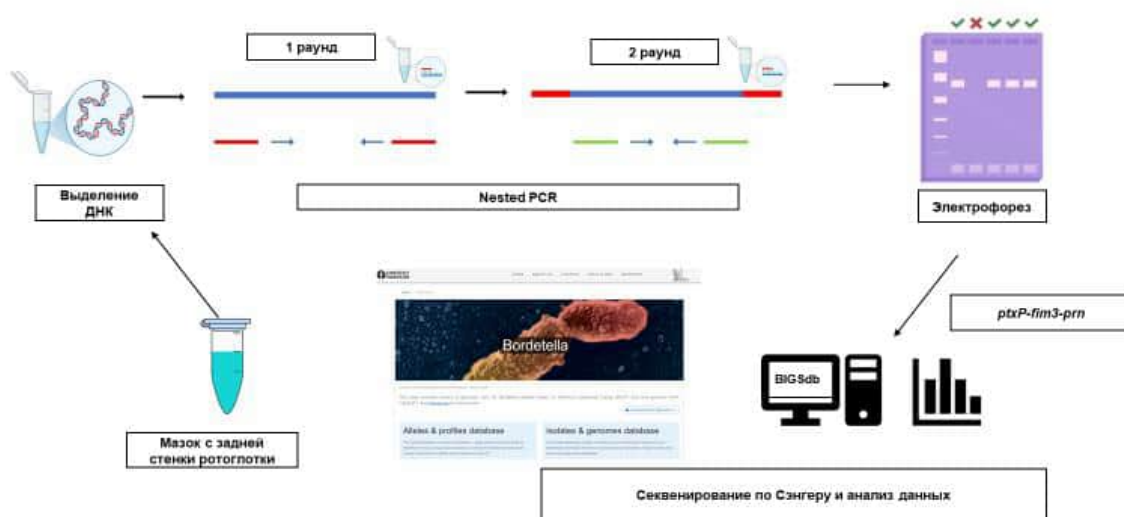


Рисунок 25 – Методика генотипирования из клинического материала от больного коклюшем (создано с использованием BioRender.com)

Таблица 4 – Праймеры, используемые в исследовании

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Ориентация праймера	Размер продукта	Примечание	
1	2	3	4	5	6	
<i>ptxP</i>	PtxP1wide	ATATCCCGAATTCGTCGCCT	прямой праймер	714 п.н.	1 раунд	Оригинальный
	PtxP2wide	GAGCACATTGTGCTGTTTCC	обратный праймер			
	PtxP1	AATCGTCCTGCTCAACCGCC	прямой праймер	573 п.н.	2 раунд	[153]
	PtxP2	GGTATACGGTGGCGGGAGGA	обратный праймер			
<i>fim3</i>	Fim3Fwide	CATGCTAATGGCCTCCGGT	прямой праймер	900 п.н.	1 раунд	Оригинальный
	Fim3Rwide	GCGTGCTGAAGGACAAGATGG	обратный праймер			
	Fim3F	GACCTGATATTCTGATGCCG	прямой праймер	715 п.н.	2 раунд	[5]
	Fim3R	CGCAAGGCTTGCCGGTTTTTTTTTG	обратный праймер			
<i>prn</i>	PrnFwide	GGCGGTGTCTGTGTTGGG	прямой праймер	526 п.н.	1 раунд	Оригинальный
	PrnRwide	GGTCAGCGTCAGCTTCAC	обратный праймер			
	PrnC	GTGCGGTTCCCGGCGGTG	прямой праймер	102 п.н.	2 раунд	[153]
	PrnD	GCTCCACGCTGGAGCCCCG	обратный праймер			
	PrnE	TGCGGTTCCCGGCGGCTTC	прямой праймер	71 п.н.	2 раунд	[153]
	PrnD	GCTCCACGCTGGAGCCCCG	обратный праймер			

Выявление фрагмента промотора(ptxP) гена коклюшного токсина

Для выявления фрагмента промотора *ptxP* гена коклюшного токсина при проведении nested-ПЦР в первом раунде для амплификации более крупного фрагмента ДНК 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 (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 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 фрагментов нуклеотидных последовательностей проводили в термоциклере «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) при следующих условиях: 95° С 10 мин, 30 циклов 95° С 15 сек, 55° С 30 сек, 72° С 1 мин, и 72° С 10 мин. Детекцию результата амплификации проводили путем постановки горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле при 160V в течении 1 часа с последующим сравнением электрофоретической подвижности специфических светящихся фрагментов амплифицированных продуктов с подвижностью фрагментов маркера молекулярных весов Thermo Scientific GeneRuller 50 bp DNA Ladder (Thermo scientific, США). Визуализацию проводили с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST41100/26M (Франция). Результаты электрофореза показали наличие четких полос участка промотора *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 26).

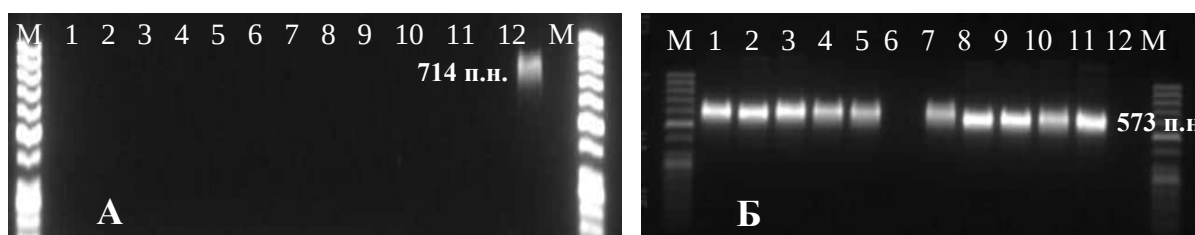


Рисунок 26 – Пример электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в ходе амплификации *ptxP* гена *B. pertussis* при проведении I раунда (А) и II раунда (Б) Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 10 – ДНК клинических образцов *B. pertussis*, 11 – положительный контроль (*B. pertussis* 143), 12 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Выявление фрагмента гена *fim3*

Для выявления фрагмента гена *fim3* при проведении nested-ПЦР в первом раунде для амплификации более крупного фрагмента ДНК 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 1 и 2 раундов описан выше. Амплификацию проводили с помощью прибора «Терцик» (ДНК-технология, Россия) при следующих условиях: 95°C 15 мин, 30 циклов 95°C 30 сек., 56°C 30 сек, 72°C 1 мин. Детекцию результата амплификации проводили по алгоритму, описанному выше, только для 1 раунда использовали 1,8% агарозный гель. Результаты электрофореза 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 27).

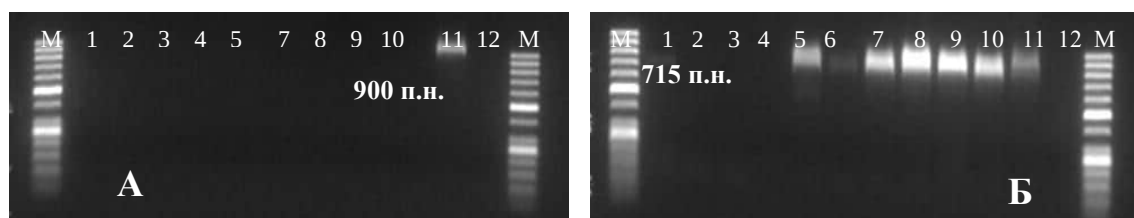


Рисунок 27 – Пример электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в ходе амплификации *fim3* гена *B. pertussis* при проведении I раунда (А) и II раунда (Б)
Примечание: М – маркер молекулярных весов ДНК: GeneRuler 50 DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1 - 10 – ДНК клинических образцов *B. pertussis*, 11 – положительный контроль (*B. pertussis* 143), 12 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь)

Выявление фрагментов гена *prn*

Полиморфизм в гене *prn* в основном ограничен регионом 1. Для выявления фрагмента гена *prn* при проведении nested-ПЦР 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. Амплификацию проводили с помощью прибора «Терцик» (ДНК-технология, Россия) при следующих условиях: 94 °С 10 мин, 40 циклов 94 °С 1 мин, 66 °С 1 мин 30 сек, 72 °С 2 мин. Состав реакционной смеси и детекция результатов амплификации проводили путем, описанным выше. 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 28, 29).

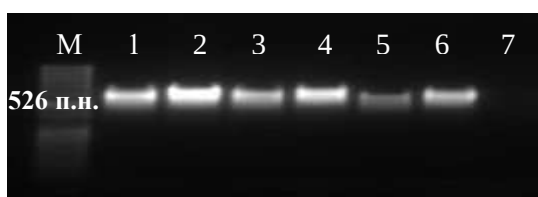


Рисунок 28 – Пример электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в ходе амплификации *prn* гена *B. pertussis* в 1 раунде

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)

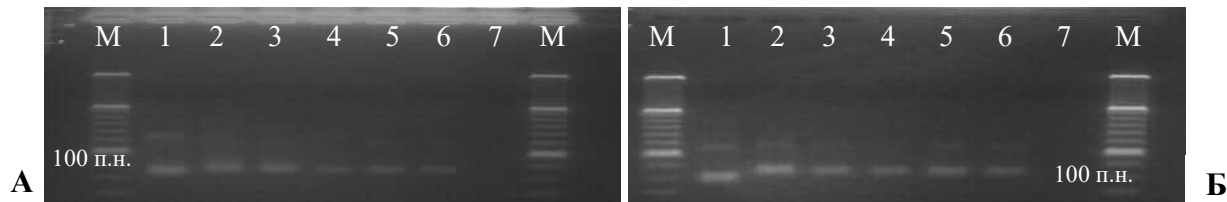


Рисунок 29 – Пример электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в ходе амплификации *prn* гена *B. pertussis* во 2 раунде, А - *prnC-prnD*, Б - *prnE-prnD*

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)

В результате проведенной ПЦР нарабатывали целевые фрагменты исследуемых генов *ptxP*, *fim3* и *prn*, в которых методом мультилокусного антигенного сиквенс-типирования путем секвенирования по Сэнгеру определяли аллельные варианты.

На разработанный способ генотипирования *B. pertussis* получен патент на изобретение РФ № 2822353 «Способ генотипирования *B. pertussis* из клинических образцов на основе вложенной ПЦР».

Разработанный способ был апробирован на 336 положительных пробах, содержащих ДНК *B. pertussis*, полученных из клинических образцов (мазков с задней стенки ротоглотки), которые были собраны от больных коклюшем с клинической симптоматикой заболевания, в возрасте от 1 месяца до 73 лет. Все образцы были охарактеризованы методом мультилокусного антигенного сиквенс-типирования фрагментов трех генов *ptxP*, *fim3* и *prn*. Было установлено, что доминирующими были генотипы с аллельными профилями *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2*, обнаруженные в 76,9% (95% ДИ: 69,1 – 83,1) и 17,4% (95% ДИ: 12,0 – 24,6) образцах соответственно (Рисунок 30).

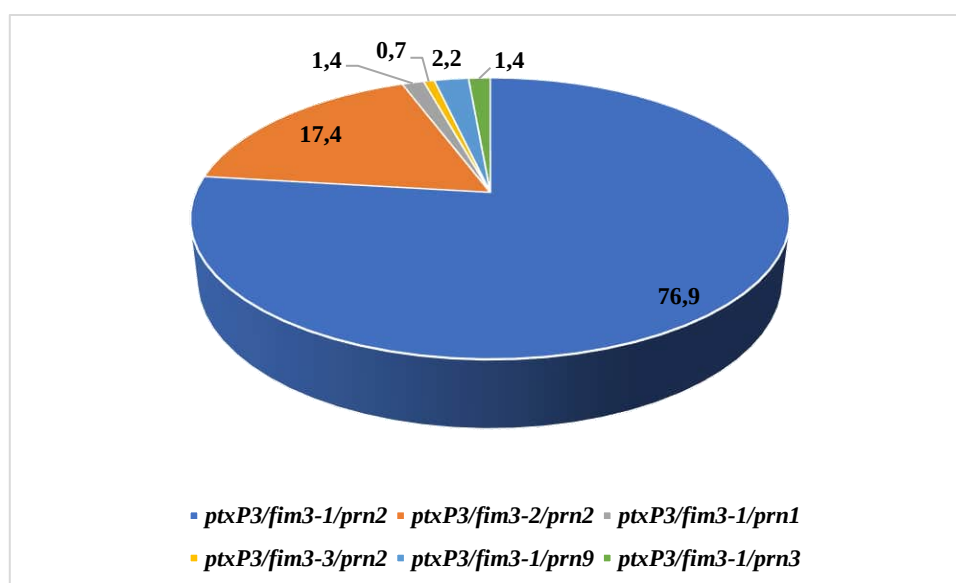


Рисунок 30 – Результаты проведения мультилокусного антигенного сиквенс-типирования фрагментов *ptxP*, *fim3* и *prn*

Также были выявлены в единичных случаях следующие генотипы с аллельными профилями: *ptxP3/fim3-1/prn1* (1,4% (95% ДИ: 0,4 – 5,1)), *ptxP3/fim3-1/prn3* (1,4% (95% ДИ: 0,4 – 5,1)), *ptxP3/fim3-1/prn9* (2,2% (95% ДИ: 0,7 – 6,2)), *ptxP3/fim3-3/prn2* (0,7% (95% ДИ: 0,1 – 4,0)). Во всех образцах обнаружена «невакцинный» аллель *ptxP3* промотора коклюшного токсина *ptxP*. По структуре гена *fim3*, кодирующего фибриальный белок Fim3, в большинстве образцов обнаружена «вакцинный» аллель *fim3-1*. Пертактин также представлен как «вакцинным» *prn1* аллелем, так и «невакцинными» *prn2*, *prn3*, *prn9* аллелями.

Резюме. Проведенные исследования показали, что использование разработанного способа генотипирования *B. pertussis* на основе nested-ПЦР

позволяет наработать целевые фрагменты, которые подвергают генотипированию с целью идентификации аллельных вариантов фрагментов промотра *ptxP* коклюшного токсина, фимбрий 3 типа *fim3* и пертактина *prn*.

ГЛАВА 5. Клональный состав современной популяции *B. pertussis*

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

Адаптация патогенов к вмешательству человека, определяемая как движение популяции к фенотипу, который лучше всего приспособлен к окружающей среде, давно признана серьезной проблемой. Самым известным примером адаптации патогена является появление резистентных штаммов после введения антибиотиков. Менее изучена адаптация возбудителей к вакцинации, что делает *B. pertussis* интересным объектом для изучения адаптации.

В исследованиях прошлых лет было показано, что генотипы штаммов коклюша отличаются от генотипов вакцинных штаммов, и была выдвинута гипотеза об антигенных сдвигах в геноме *B. pertussis*. Гипотеза состояла в том, что изменения в бактериальных генах происходят под давлением иммунной системы, что приводит к увеличению количества основных эпидемических штаммов [137, 153].

Для проведения геномного мониторинга нами были учтены результаты и опыт проведения микробиологического мониторинга, который ранее осуществлялся в лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. Бактерия *B. pertussis* является длительно растущим, трудно культивируемым микроорганизмом и эффективность выделения бактериальной культуры в практических лабораториях в идеальных условиях не превышает 20%, а в рутинной практике значительно ниже. Работа с бактериальной культурой также осложняется тем, что для полученной хорошей биомассы и характерных биологических свойств возбудителя допускается проведение не более 3 пассажей на питательных средах. Кроме того, учитывая работу в рамках Референс-центра по мониторингу за коклюшем, отмечается снижение профессиональной подготовленности бактериологов и трудности с выделением бактериальной культуры. Также согласно СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» для лабораторной диагностики коклюша допускается использование

трех методов диагностики – бактериологического, серологического и ПЦР исследований согласно стадии заболевания. По результатам проведенного анализа лабораторной диагностики коклюша показано, что на территории РФ интенсивно используется ПЦР-диагностика и значительный процент лабораторного подтверждения диагноза происходит с помощью ПЦР-исследований без выделения бактериальной культуры. В связи с этим, учитывая разработанный новый способ генотипирования *B. pertussis* с диагностического материала, нами предлагается новый алгоритм микробиологического мониторинга возбудителя коклюша (Рисунок 31).



Рисунок 31 - Алгоритм микробиологического мониторинга *B. pertussis*

Методический подход микробиологического мониторинга циркулирующей популяции *B. pertussis* включает несколько ключевых аспектов, которые помогают в исследовании возбудителя коклюша. Во-первых, важно собрать клинические образцы и образцы штаммов *B. pertussis* из различных регионов РФ, чтобы получить представление о генетическом разнообразии и распространении возбудителя. Во-вторых, с учетом полученного вида биоматериала проводится выделение ДНК и nested PCR с последующим секвенированием по Сэнгеру или

выделение ДНК и полногеномное секвенирование (WGS) для определения генетических характеристик, поиска мутаций, приводящих к устойчивости к антибактериальным препаратам. В-третьих, проведение анализа данных, который поможет установить связь между генетическими изменениями в популяции *B. pertussis* и подъемами заболеваемости коклюшем. Микробиологический мониторинг позволит увеличить охват территорий РФ по оценке структуры популяции *B. pertussis* в рамках эпидемиологического мониторинга и оценке биологических рисков циркуляции разных аллельных вариантов возбудителя коклюша.

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

В данном разделе представлен анализ клонального состава *B. pertussis*, выделенных в различных регионах Российской Федерации. Проведенные исследования позволили выявить разнообразие среди циркулирующих штаммов, что имеет важное эпидемиологическое значение.

На первом этапе мы провели секвенирование по Сэнгеру клинических образцов (мазки с задней стенки ротоглотки), собранных в период подъема заболеваемости 2023 – 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. В исследование были включены образцы, полученные (Рисунок 32) из 44 субъектов РФ: г. Москва, г. Санкт-Петербург, Архангельская, Брянская, Вологодская, Волгоградская, Воронежская, Иркутская, Калужская, Калининградская, Кемеровская, Курская, Мурманская, Нижегородская, Новгородская, Новосибирская, Омская, Пензенская, Ростовская, Самарская, Свердловская, Смоленская, Тверская, Томская, Тюменская, Ульяновская, Ярославская области, Забайкальский, Камчатский, Краснодарский, Красноярский, Хабаровский края, Республики Башкортостан, Бурятия, Дагестан, Карачаево-Черкессия, Коми, Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Тыва, Хакасия,

ХМАО-Югра, ЯНАО, что составило 49,3% от числа субъектов Российской Федерации.



Рисунок 32 – Распределение генотипов на территории РФ в 2023 - 2024 гг.

В результате секвенирования по Сенгеру в 2023 году было идентифицировано восемь генотипов 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) (Рисунок 33 А), с доминированием генотипов *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2*. Вероятно, в 2023 году в результате генетического дрейфа могли произойти случайные изменения в частоте аллелей, и поэтому остальные шесть аллельных профилей встречались в единичных случаях.

В 2024 году наблюдалось сокращение геномного разнообразия до трех генотипов с аллельными профилями: *ptxP3/fim3-2/prn2* (23,9%, 22/92), *ptxP3/fim3-1/prn2* (72,8%, 67/92), *ptxP3/fim3-1/prn1* (3,3%, 3/92) (Рисунок 33 Б). 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.

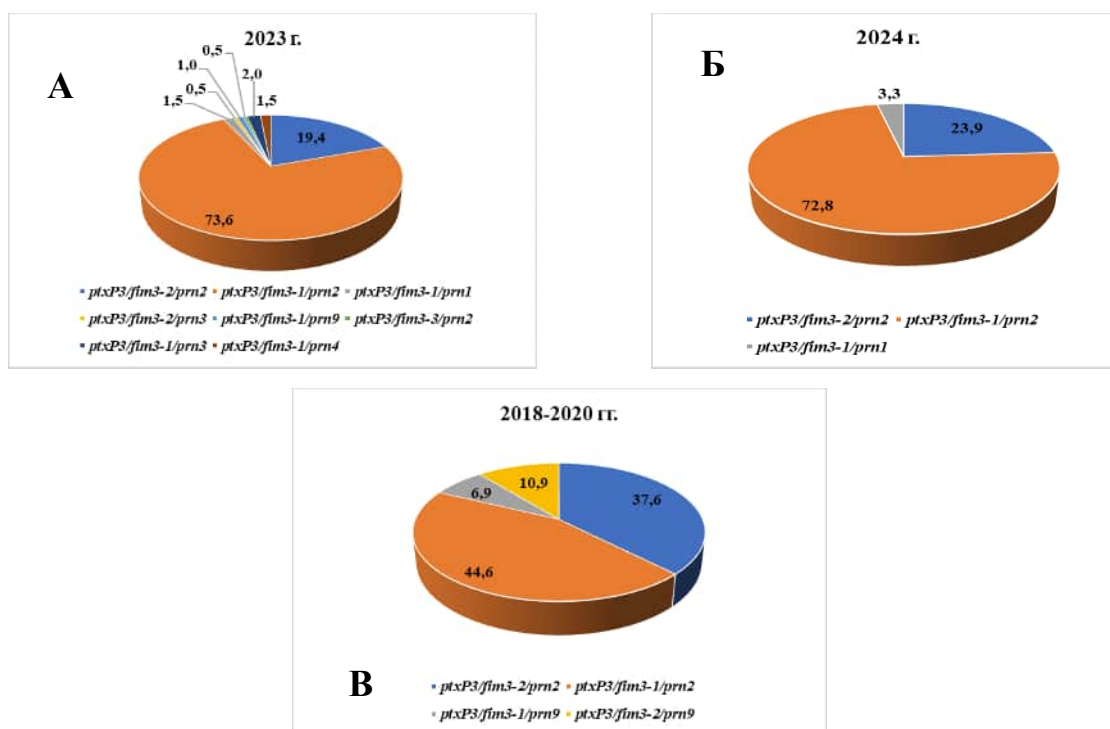


Рисунок 33 – Распределение генотипов с аллельными профилями в 2023 г. (А), 2024 г. (Б), 2018 -2020 гг. (В)

С целью оценки динамики изменения генетического разнообразия, мы проанализировали результаты генотипирования штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2018-2020 гг. (Рисунок 33 В). 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.

Таким образом, результаты исследований показали, что с 2018 по 2024 годы в популяции возбудителя коклюша присутствовали 9 генотипов с аллельными профилями: *ptxP3/fim3-1/prn2* (66%, 260/394), *ptxP3/fim3-2/prn2* (25,1%, 99/394), *ptxP3/fim3-2/prn9* (2,8%, 11/394), *ptxP3/fim3-1/prn9* (2,3%, 9/394), *ptxP3/fim3-1/prn1* (1,5%, 6/394), *ptxP3/fim3-1/prn3* (1%, 4/394), *ptxP3/fim3-1/prn4* (0,8%, 3/394), *ptxP3/fim3-3/prn2* (0,3%, 1/394), *ptxP3/fim3-2/prn3* (0,3%, 1/394) с доминированием на территории РФ 2-х генотипов: *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2*.

На втором этапе, с целью изучения дополнительной информации об эпидемических штаммах коклюша, было проведено полногеномное секвенирование 84 штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в 2023 – 2024 гг., для, с изучением особенностей 17 генов патогенности (Таблица 5): *ptxP* (промотор коклюшного токсина), *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE* (гены коклюшного токсина), *prn* (ген белка пертактина, автотранспортер), *tcfA* (ген фактора колонизации трахеи), *fhaB* (филаментозный гемагглютинин), *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), *bapC* (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.

Таблица 5 – Секвенирование бактериальных культур *B. pertussis* за 2023-2024 гг.

Ген	Аллель	Количество штаммов/%
1	2	3
<i>ptxA</i>	1	84 (100%)
<i>PtxP</i>	3	84 (100%)
<i>ptxB</i>	1	84 (100%)
<i>ptxC</i>	4	84 (100%)
<i>ptxD</i>	1	84 (100%)
<i>ptxE</i>	4	84 (100%)
<i>tcfA</i>	2	39 (46,4%)
	5	1 (1,2%)
	6	44 (52,4%)
<i>fim2</i>	1	84 (100%)
<i>fim3</i>	1	56 (66,7%)

Продолжение таблицы 5

1	2	3
	2	28 (33,3%)
<i>prn</i>	1	1 (1,2%)
	2	78 (92,9%)
	3	2 (2,4%)
	4	3 (3,5%)
<i>fhaB</i>	1	84 (100%)
<i>vag8</i>	4	84 (100%)
<i>bapC</i>	1	84 (100%)
<i>brkA</i>	1	84 (100%)
<i>ompQ</i>	4	84 (100%)
<i>cyaA</i>	4	84 (100%)
<i>bscl</i>	1	84 (100%)

Как видно из таблицы, все изученные штаммы *B. pertussis* (100%) имели аллели *ptxA1*, *ptxB 1*, *ptxD1*, *ptxC4*, *ptxE4*, *ptxP3*, *fim2-1*, *fhaB1*, *vag8-4*, *bapC1*, - *brkA1*, *ompQ4*, *cyaA4*, *bscl-1*. Разнообразие аллелей наблюдалось в генах *tcfA*, где *tcfA1* аллель содержали 46,4% (39/84) штаммов, *tcfA5* аллель был обнаружен у 1,2% (1/84) штамма и 52,4% (44/84) штамма представлены *tcfA6* аллелем. Фимбрии 3 типа были представлены двумя аллелями: *fim3-1* аллель несли 66,7% (56/84) штаммов, в то время как *fim3-2* аллель встречался у 33,3% (8/84). Пертактин представлен четырьмя разными аллелями: *prn1* аллель в 1,2% (1/84), *prn2* аллель - 92,9% (78/84), *prn3* аллель - 2,4% (2/84), *prn4* аллель - 3,5% (3/84).

5.3. Анализ изменений клонального состава циркулирующей популяции

B. pertussis

В лаборатории диагностики коклюшной и дифтерийной инфекций Референс-центра по мониторингу за коклюшем ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора проводится многолетний мониторинг генетических свойств штаммов *B. pertussis*. С целью оценки изменений клонального состава в динамике развития эпидемического процесса мы сопоставили данные, полученные ранее [1,

5, 17], с результатами наших исследований по динамике структуры трех генетических детерминант факторов патогенности – *ptxP*, *fim3*, *prn*.

В допрививочный период и первые тридцать лет проведения массовой иммунизации детского населения с 1948 по 1989 гг. выявлены штаммы двух генотипов – несущих «вакцинные» *ptxP1*/*ptxP2* аллельные профили промотора *ptxP* коклюшного токсина. В 1990 годы в популяции *B. pertussis* появились штаммы, несущие новый аллель *ptxP3* на фоне снижения частоты встречаемости штаммов с «вакцинными» аллелями промотора коклюшного токсина (Рисунок 34).

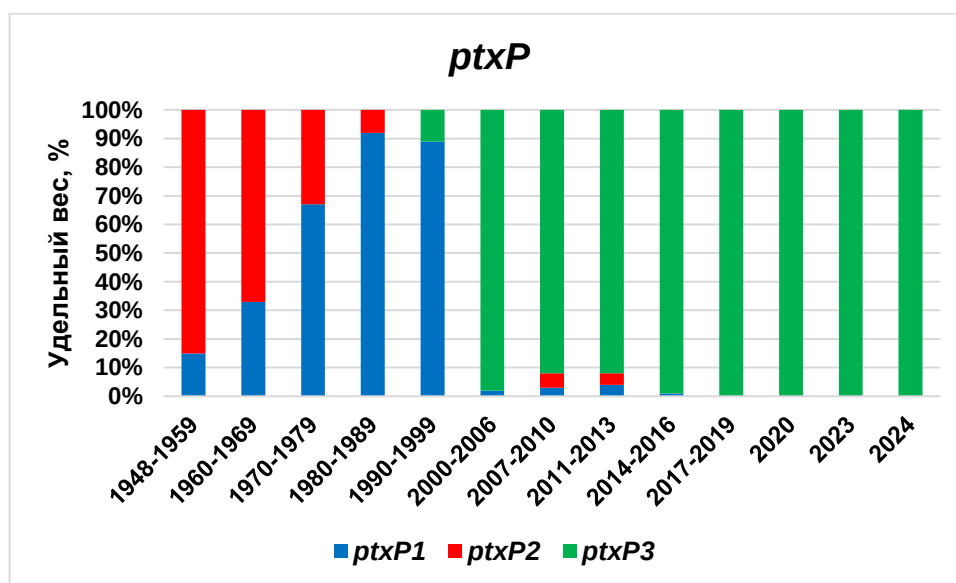


Рисунок 34 – Распределение аллельных профилей промотора коклюшного токсина

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.

Руководящие принципы ВОЗ для вакцины от коклюша рекомендуют выбирать штаммы, экспрессирующие антигены белка Fim типа 3, в качестве производственного штамма при производстве бесклеточной вакцины от коклюша. Этот белок фимбрий обладает определенной иммуногенностью и используется в качестве одного из компонентов бесклеточных вакцин некоторыми производителями. В нашем исследовании по гену *fim3* наблюдалось равномерное

распределение аллелей *fim3-1* и *fim3-2* в течение всего периода 1948-2024 гг. (Рисунок 35), что указывает на то, что ген *fim3*, связанный с антигеном, является относительно консервативным. Большинство изолятов содержали гены *fim3-1* 77,4% (196/253), аллель *fim3-2* представлен у 22,5% (57/253) штаммов.

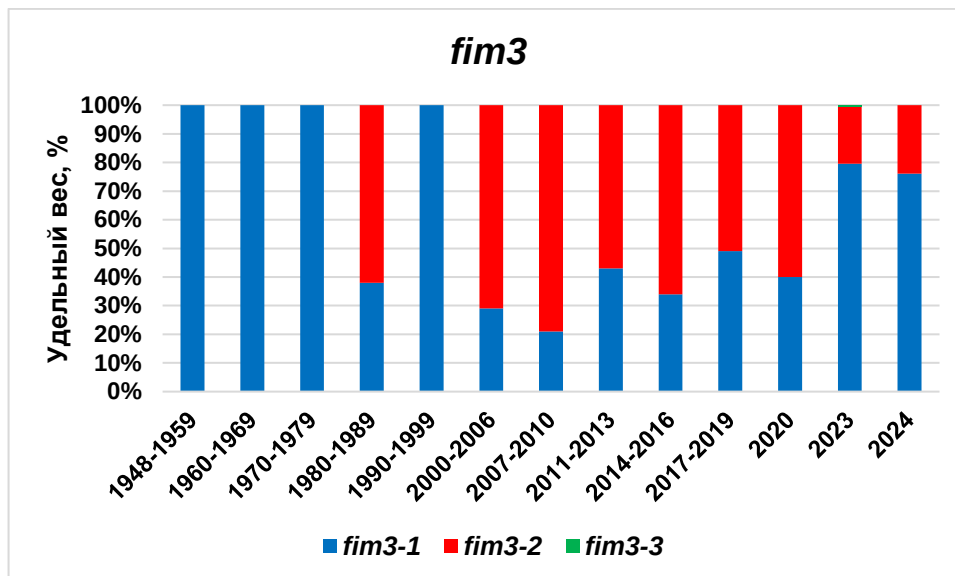


Рисунок 35 – Распределение аллельных профилей фимбрий 3 типа

Для понимания эволюционных процессов в популяции возбудителя коклюша нами прослежена динамика появления у штаммов аллельных профилей гена пертактина (Рисунок 36). Показано, что вакцинные аллели *prn1* доминировали в популяции до 1989 г. С 1990 гг. в популяции *B. pertussis* стал регистрироваться *prn2*, который лидировал с 2000 по 2010 и с 2017 по 2024 гг. Период 2011 – 2016 гг. характеризовался появлением штаммов *B. pertussis* с аллелем *prn9*. Полученные нами данные коррелируют с исследованиями, проводимыми в других странах мира.

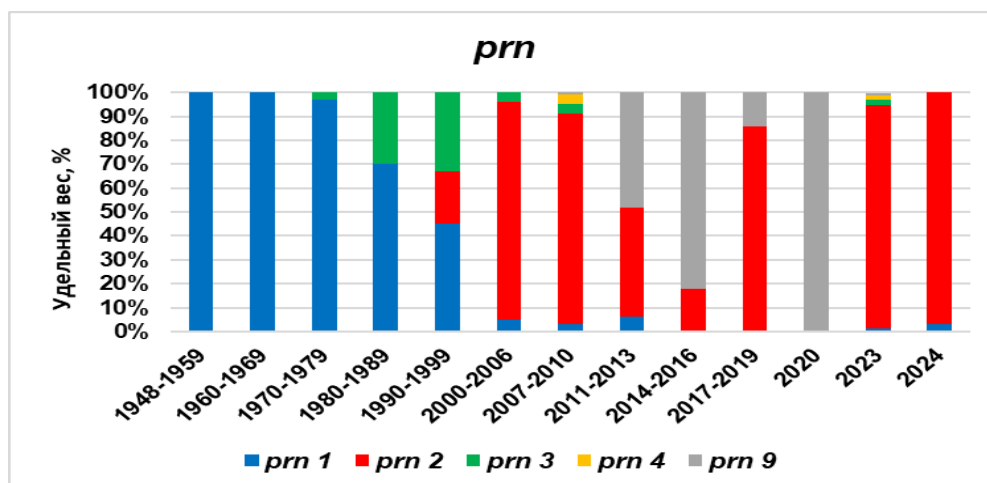


Рисунок 36 – Распределение аллельных профилей гена пертактина

Чтобы проиллюстрировать взаимосвязи между наблюдаемыми геномными структурами (*fim3*, *prn*, *ptxP*) в образцах клинического материала, полученные при секвенировании по Сенгеру, последовательности генов были выровнены, а затем кластеризованы в виде тепловой карты (Рисунок 37).

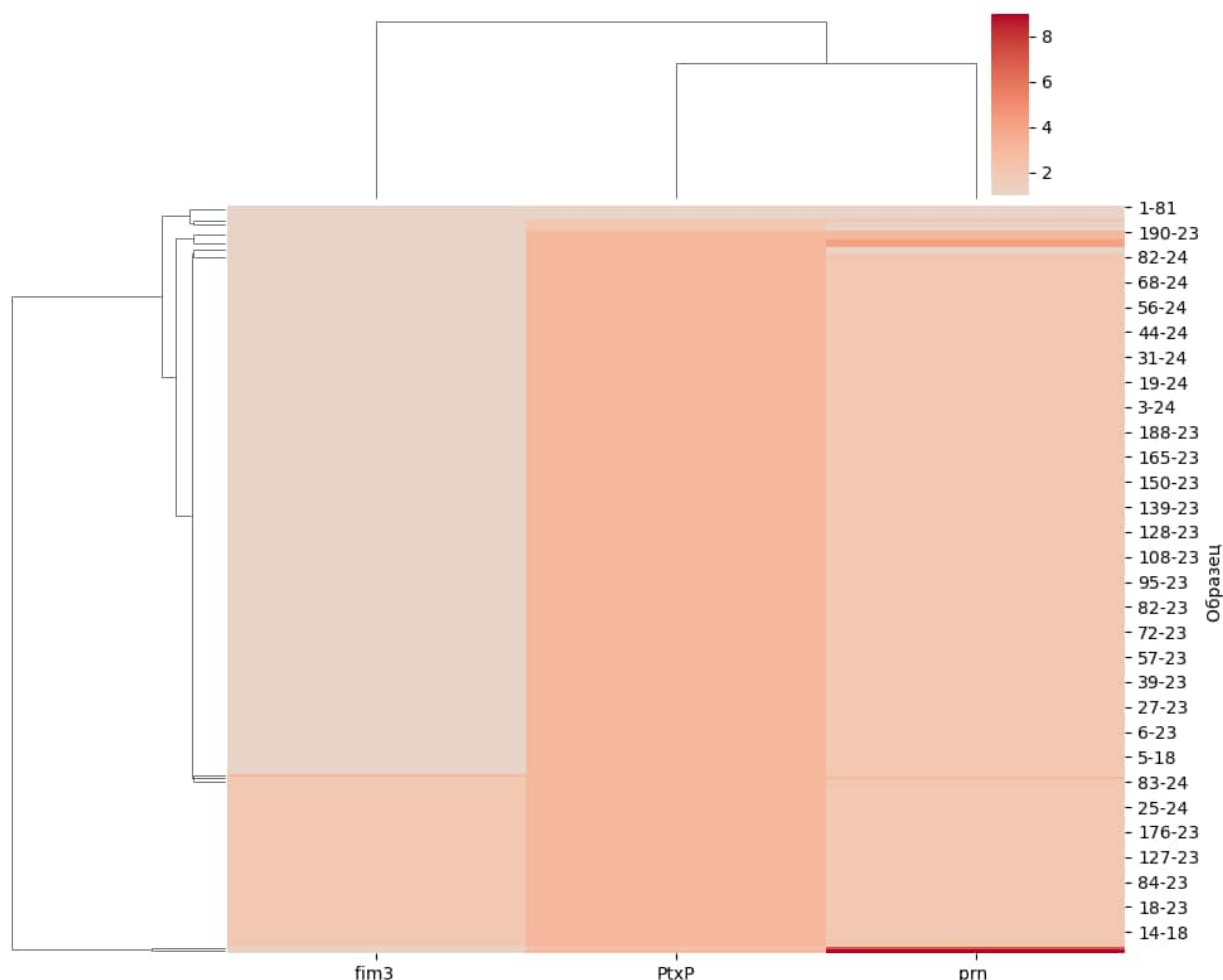


Рисунок 37 - Тепловая карта кластеризации образцов по *ptxP*, *fim3*, и *prn*

Примечание: столбцы *ptxP*, *fim3*, *prn* сгруппированы на основе сходства их аллелей; в строках образцы группируются в кластеры. Темно-красные области соответствуют редким аллелям (*prn7*, *prn 9*). Светло-красные области соответствуют доминирующим аллелям (*fim3-1*, *prn2*, *ptxP3*). Светлые тональности наблюдаются в зонах с меньшей встречаемостью (*fim3-1*, *prn1*, *ptxP1*)

Штаммы, принадлежащие к одному кластеру, вероятно, имеют общие эволюционные черты. Например, *fim3-1* может формировать кластер с определёнными профилями *prn* (например, *prn2*), что может указывать на их совместную эволюцию. Каждая строка показывает аллельный профиль для определенного образца. У большинства образцов выделен «невакцинный» аллель *ptxP3*. Штаммы с аллелем *ptxP3* могут образовывать группы из-за их ассоциации с

современной высокой вирулентностью. В современных штаммах *B. pertussis* часто обнаруживается замена "вакцинного" аллеля *prn1* на «невакцинные» *prn2* и в редких случаях на *prn3*, что связано с адаптацией возбудителя коклюша из-за естественного отбора под давлением вакцинации, которая стимулировала изменения в *ptxP* и *prn*, что привело к возникновению сегодняшних доминирующих штаммов с *ptxP3/prn2*. Аллель *fim3-2* менее распространен в популяции *B. pertussis*, тогда как *fim3-1* ассоциируется с современной циркуляцией патогена. Аллель *fim3-3* встретился только в одном образце 181-23, возникший, возможно, в результате генетического дрейфа. При изучении гена пертактина *prn* у штаммов *B. pertussis* выявлено шесть аллелей гена *prn* — *prn1*, *prn2*, *prn3*, *prn4*, *prn7*, *prn9*. Большинство образцов содержит *prn2*. Аллели *prn3*, *prn4*, *prn7*, *prn9* встречаются редко, которые также возникли в результате генетического дрейфа. Последовательности нуклеотидов аллелей *prn2* и *prn9* отличаются от последовательности *prn1* наличием значимых мутационных изменений в шести положениях (828, 831, 832, 833, 834 и 836) нуклеотидной последовательности гена *prn* с заменами на аминокислотном уровне — V279G и A278F. Последовательность нуклеотидов аллеля *prn2* имеет вставку дополнительного фрагмента в 15 п.н. — GGCGGCCTCGGTCCC в 1-й области гена в положениях 841–855, а *prn9* аллель гена — дополнительный фрагмент в 30 п.н. — GGCGGCCTCGGTCCCCGGCGGCCTCGGTCCC в 1-й области гена в положениях 841–871. Все изменения в *prn2* и *prn9* аллелях произошли в 1-й области гена, которая является иммуногенной и участвует в формировании В-клеточного иммунного ответа.

Можно выделить несколько крупных кластеров, которые соответствуют основным группам образцов с идентичными или близкими аллельными профилями. Крупный кластер соответствует доминирующему аллельному профилю: *ptxP3/fim3-1/prn2*. Отдельные небольшие кластеры образованы редкими комбинациями аллелей, которые имеют высокую интенсивность цвета.

На основе полученных полногеномных последовательностей штаммов *B. pertussis* выполнен филогенетический анализ с использованием аллелей генов *ptxA*, *fim3* и промотора *ptxP* гена коклюшного токсина (Рисунок 38). Филогенетическое

дерево демонстрирует, что все изученные штаммы *B. pertussis* разделились на четыре группы, что отражает наличие генетически обособленных линий внутри популяции.

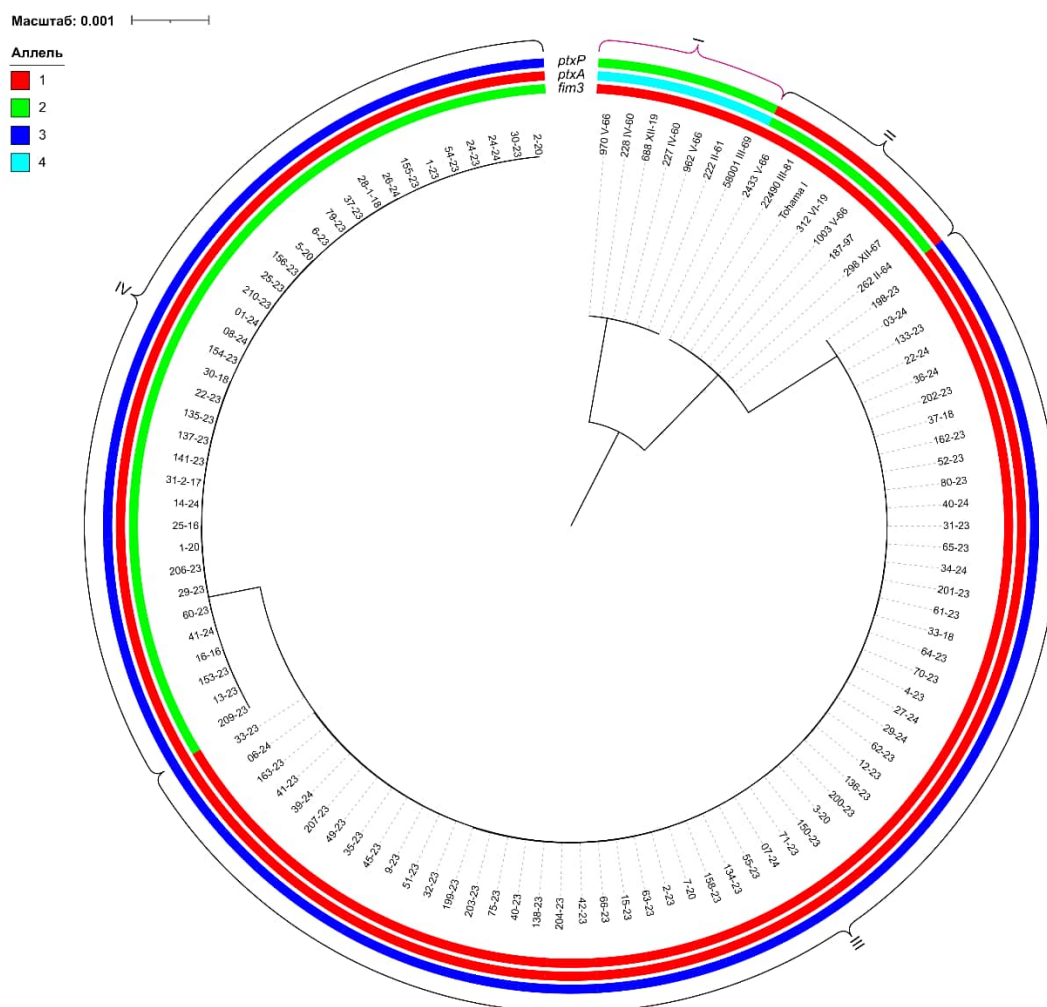


Рисунок 38 – Филогенетическое дерево штаммов *B. pertussis*, построено на основе конкатенированных последовательностей локусов *ptxA*, *ptxP*, *fim3* по алгоритму максимального правдоподобия с использованием программы RAxML и модели GTR GAMMA

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

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.

Также нами был проведен анализ 17 факторов патогенности, в которые входят токсигенные компоненты: коклюшный токсин, представленный генами *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE* и промотором *ptxP*, аденилатциклазный токсин *суаА*, факторы адгезии: фимбрии 2 и 3 типа *fim2* и *fim3*, фактор колонизации трахеи *tcfA*, филаментозный гемагглютинин *fhaB*, автотранспортеры *prn*, *vag8*, *bapC*, *brkA*, пориновый белок *ompQ*, один из генов системы секреции III типа (T3SS) *bscI*, который кодирует базальный белок тела T3SS.

Полученные результаты представлены в виде кластерной тепловой карты, которая показывает распределение аллелей по отдельным образцам (Рисунок 39). По вертикали указаны образцы, по горизонтали — гены. Кластеризация группирует образцы по аллелям. Горизонтальные и вертикальные линии дендрограммы указывают на степень сходства образцов и генов по аллельному составу — близко лежащие друг к другу ветви объединяют схожие группы.

Полиморфизм был обнаружен в 9 генах патогенности: *ptxA*, *ptxC*, *ptxP*, *tcfA*, *fim2*, *fim3*, *prn*, *fhaB*, *суаА*.

Показано, что 87,2% (96/110) изолятов содержали аллель *ptxA1*, 6,4% (7/110) изолятов с 1964 по 1997 гг. - *ptxA2* и 6,4% (7/110) изолятов с 1955 по 1969 гг. — *ptxA4*. Сравнительный анализ изолятов, выделенных в разные периоды времени показал, что штаммы, несущие аллель *ptxA1* начали появляться в циркулирующей на территории РФ популяции возбудителя коклюша с 2016 года. 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).

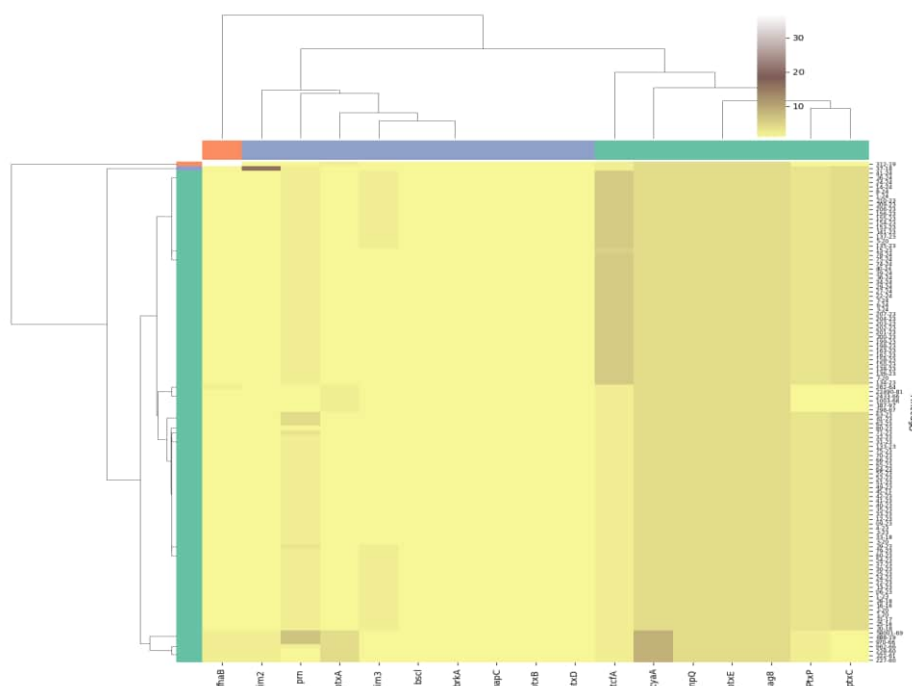


Рисунок 39 – Тепловая карта распределения аллелей генов в образцах

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

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 промоторной области *ptxP* коклюшного токсина показало, что у изученных штаммов присутствуют три аллеля *ptxP* — *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 генов *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.

Вакцинные аллели *ptxP1*, *ptxP2*, *ptxC1* и *prn1* несли штаммы, выделенные в 1960-1997 гг. В остальных образцах обнаружены новые не вакцинные аллели этих генов, что соответствует тенденции эволюции генов в мире.

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, кодирующих фимбрии 2 и 3 типа, 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*, кодирующего филаментозный гемагглютинин, 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*, кодирующего бифункциональный аденилатциклазный токсин/гемолизин 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. Причем *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/fhaB-1/cyaA4*; и 26,4% штаммов 2023 и 2024 годов, а также один штамм 2020 года - *ptxP3/fim3-1/prn2/ptxA1/ptxC4/tcfA6/fim2-1/fhaB-1/cyaA4*.

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/fhaB-1/cyaA4* — 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/fhaB-1/cyaA4* — 15,5% (штаммы 2023 и 2024 годов, один штамм 2020 года).

Таким образом, большинство современных циркулирующих штаммов характеризуются принадлежностью к аллельному профилю *ptxP3* и наличием вариантов *fim3-1* или *fim3-2*, а также кластера *prn2/ptxA1/ptxC4/fim2-1/fhaB-1/cyaA4*, что свидетельствует о генетической однородности популяции *B. pertussis* с определённым уровнем аллельного разнообразия по ряду генов, отвечающих за вирулентность данного возбудителя.

В генах *ptxB*, *ptxD*, *ptxE*, *vag8*, *VapC*, *brkA*, *ompQ*, *bscI* полиморфизмы не были обнаружены.

Все штаммы *B. pertussis*, исследованные на антибиотикочувствительность, содержали аллель *ptxP3*. В изученных изолятах были идентифицированы два аллеля гена *fim3*: *fim3-1* и *fim3-2* и три аллеля гена *prn*: *prn2*, *prn3*, *prn4*. Совокупность обнаруженных аллелей этих генов определила формирование пяти генотипов: *ptxP3/fim3-1/prn2*, *ptxP3/fim3-1/prn3*, *ptxP3/fim3-1/prn4*, *ptxP3/fim3-2/prn2*, *ptxP3/fim3-2/prn3*.

Таким образом, сохраняется доминирование клонов с аллелем *ptxP3* в сочетании с различными вариантами *fim3* и *prn*, что указывает на существование определённого аллельного разнообразия среди циркулирующих штаммов. При

этом все исследованные штаммы продемонстрировали чувствительность к макролидным антибиотикам по результатам МИК-теста. Чувствительность к макролидам и генотипическое распределение 78 изолятов *B. pertussis* суммированы в таблице 6.

Таблица 6 – Антибиотикочувствительность к макролидам и распределение аллелей генов патогенности штаммов *B. pertussis* (n = 78)

МИК антибиотика, мкг/мл		A2047G	Типы аллелей			n, %
Эритромицин, Е	Кларитромицин, CLR		<i>ptxP</i>	<i>fim3</i>	<i>prn</i>	
0,064-2	0,032-4	A	3	1	2	47 (60,2%)
0,125-0,5	1	A	3	1	3	2 (2,6%)
0,25-1	0,125-1	A	3	1	4	3 (3,8%)
0,064-1	0,064-4	A	3	2	2	25 (32,1)
0,25	0,25	A	3	2	3	1 (1,3%)

Резюме. Проведенные исследования показали, что популяция *B. pertussis* демонстрирует значительную клональную изменчивость в разные периоды эпидемического процесса. Это связано как с естественными мутациями, так и с давлением иммунитета вакцинированных и переболевших лиц. Отмечается продолжающееся доминирование двух генотипов с аллельными профилями генов *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2* в циркулирующей популяции возбудителя коклюша. Обнаружены специфические мутации в некоторых ключевых генах, которые могут влиять на вирулентность и иммуногенность бактерии, что требует дальнейшего изучения. Данные выводы подчеркивают необходимость постоянного мониторинга клонального состава *B. pertussis* для адаптации стратегий вакцинации и профилактики, что может способствовать более эффективному контролю коклюшной инфекции.

ГЛАВА 6. Сравнительный анализ производственных вакцинных штаммов и штаммов-кандидатов

В Российской Федерации для проведения вакцинопрофилактики используют цельноклеточную и бесклеточные коклюшные вакцины, входящие в состав комбинированных препаратов. В состав цельноклеточной вакцины АКДС входят три производственных вакцинных штамма *B. pertussis* разных серотипов. Предыдущие исследования показали, что вакцина от коклюша очень эффективна в течение трёх лет после вакцинации, но затем иммунитет постепенно ослабевает, и через 7 лет защита практически отсутствует [181, 194].

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 вакцинных штаммов.

На первом этапе все восемь перспективных штаммов *B. pertussis* были охарактеризованы по культурально-морфологическим свойствам на среде Бордетелагар. Колонии были серовато-белого цвета размером до 1,5 мм, выпуклыми, круглыми, блестящими, гладкими, маслянистой консистенции и легко снимались петлей. При окраске по Граму наблюдались хаотично расположенные мелкие, грамотрицательные палочки. По биохимическим свойствам выделенные штаммы обладали только каталазной и оксидазной активностью, не давали рост на кровяном, мясопептонном агаре и агаре Симмонса, не продуцировали ферменты тирозиназу и уреазу, не редуцировали нитраты в нитриты, не обладали подвижностью. Все исследуемые штаммы *B. pertussis* характеризовались присутствием агглютиногена 1 (видовой признак) и агглютинировались адсорбированными типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам 1,2,3 не ниже 1:280, принадлежали к двум серотипам – 1.0.3. и 1.2.0. Производственные вакцинные штаммы относились к трем разным серотипам – 1.2.0., 1.0.3. и 1.2.3.

На втором этапе были изучены особенности структуры семи генов основных факторов патогенности возбудителя коклюша (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты изучения производственных и перспективных штаммов *B. pertussis*

Штаммы	Серотип	Генотип
Вакцинные		
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>
Циркулирующие, кандидаты		
Вр16	1.0.3	<i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i>
Вр 31	1.0.3	<i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn9</i>
Вр 25	1.0.3	<i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i>
Вр37	1.2.0	<i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-1/prn2</i>
Вр 30	1.0.3	<i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i>
Вр 1	1.0.3	<i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i>
Вр 2	1.0.3	<i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-2/prn2</i>
Вр 3	1.2.0	<i>ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/ fim3-1/prn2</i>

Примечание: *ptxA*, *ptxB*, *ptxC* – гены, кодирующие субъединицы коклюшного токсина; *ptxP* – промотор коклюшного токсина; *prn* – ген, кодирующий белок пертактин; *fim2*, *fim3* – гены, кодирующие фимбрии 2 и 3 типа

Домен А коклюшного токсина содержит субъединицу S1, которая обладает иммунопротективными свойствами, различными ферментативными функциями и экспрессируется геном *ptxA*. Участок между 65-й 233-й аминокислотами является консервативной последовательностью коклюшного токсина, вызывающего иммунный ответ и местом распознавания антигена Т-клетками. В соответствии с различиями в нуклеотидах 68-й, 228-й, и 232-й аминокислот S1 ген *ptxA* делится на четыре аллельных типа: 1, 2, 3 и 4. При изучении генетической структуры производственных вакцинных штаммов было показано, что большинство производственных вакцинных штаммов *B. pertussis* несут два аллеля гена *ptxA* – *ptxA4* и *ptxA2*, и один штамм имел *ptxA1* аллель. Все штаммы-кандидаты *B. pertussis* несут *ptxA1* аллель, который проявляется несинонимичными мутациями (А в G),

т.е. от исходного изолейцина (I), кодируемого АТА, к метионину (М), кодируемого АТГ. S2 субъединицу коклюшного токсина кодирует ген *ptxB*. По последовательности гена *ptxB* три производственных вакцинных штамма соответствуют *ptxB1* аллелю гена и пять штаммов - *ptxB2* аллелю. Перспективные штаммы *B. pertussis* также несли *ptxB2* аллель. Аллель *ptxB2* характеризуется наличием значимых мутаций в положениях 65-ом и 290-ом нуклеотидной последовательности, которые сопровождаются контрастными заменами на аминокислотном уровне – серина на цистеин (S22C) и валина на глутаминовую кислоту (V97Glu), что оказывает существенное влияние как на скорость сборки самой субъединицы, так и на транспорт А-комплекса внутрь клетки хозяина. По структуре гена *ptxC*, кодирующего S3 субъединицу В-комплекса коклюшного токсина, все производственные вакцинные штаммы *B. pertussis* соответствует *ptxC1* аллелю, а перспективные штаммы несли *ptxC2* аллель, который отличается наличием незначимой мутации в положении 681 нуклеотидной последовательности. Участок промоторной области *ptxP* коклюшного токсина находится примерно в 170 основаниях выше гена коклюшного токсина в геноме *B. pertussis*. Эта область содержит сайты связывания РНК-полимеразы и 6 сайтов связывания димеров регуляторного белка BvgA, которые могут способствовать транскрипционной экспрессии коклюшного токсина, взаимодействуя с регуляторным белком BvgA. Изучение промоторной области *ptxP* коклюшного токсина показало, что пять производственных вакцинных штаммов *B. pertussis* несли *ptxP1* аллель и три производственных штамма - *ptxP2* аллель, а все перспективные штаммы *B. pertussis* имели *ptxP3* аллель. В предыдущих исследованиях было показано, что штаммы, содержащие *ptxP3*, могут в высокой степени экспрессировать коклюшный токсин [49]. Предполагается, что с этим может быть связано повышение заболеваемости коклюшем. Таким образом, *ptxP* привлекает все больше внимания и используется в качестве молекулярно-генетического маркера эволюции *B. pertussis*. Два белка фимбрий, кодируемых генами *fim2* и *fim3* соответственно, обладают определенной иммуногенностью и используются в качестве компонентов бесклеточных вакцин. В нашем

исследовании все производственные вакцинные штаммы и перспективные штаммы *B. pertussis* имели аллели *fim3-1*, *fim2-1*, что указывает на относительную консервативность этих двух генов, связанных с антигенами.

Исследования, проведенные в некоторых странах, показали, что *prn* -генотипы штаммов, выделенных до или в первые годы начала вакцинации, как и вакцинные штаммы в основном являются *prn1*, что и подтверждается нашим исследованием. У перспективных штаммов идентифицирован *prn2* аллель и *prn9* аллель гена. Наши результаты соответствуют тенденции эволюции гена *prn* в мире.

Таким образом, у производственных вакцинных штаммов выявлены следующие аллельные профили генов – *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* и *ptxA1/ptxB2/ptxC1/ptxP1/fim2-1/fim3-1/prn1*, а у перспективных штаммов *B.pertussis* для включения в кандидаты вакцинных штаммов при производстве вакцинных препаратов другие – *ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/fim3-2/prn2*, *ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/fim3-2/prn9*, *ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-1/fim3-1/prn1* и *ptxA1/ptxB2/ptxC2/ptxP3/fim2-2/fim3-1/prn2*.

На основании полногеномных последовательностей перспективных штаммов было реконструировано филогенетическое дерево, отражающее эволюционное положение исследованных перспективных штаммов *B. pertussis* (Рисунок 40). Было установлено, что все из них, кроме одного, формируют единый близкородственный кластер, вероятно, характерный для территории РФ.

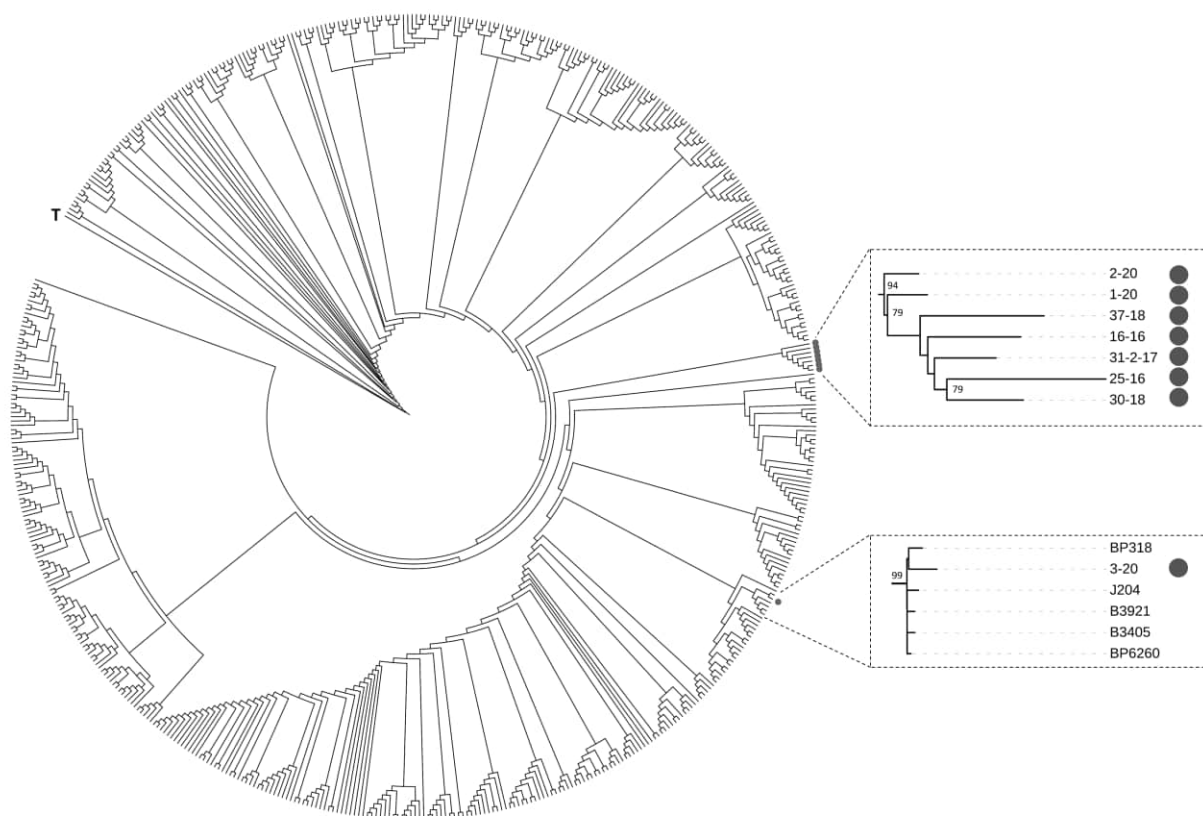


Рисунок 40 – Филогенетическое дерево бактерий сиквенс-типа ST2, построенное на основании полногеномного MLST

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

Резюме. Проведенное исследование показало генотипические различия между штаммами, используемыми для производства вакцинных препаратов, и циркулирующей популяцией возбудителя коклюша. В рамках реализации п. 32 «Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных заболеваний на 2022 - 2035 гг.)), утвержденной распоряжением Правительства РФ от 18.09.2020 № 2390-р., по актуализации вакцинных препаратов на территории РФ, нами предложены восемь перспективных штаммов *B. pertussis* для включения в кандидаты при производстве вакцинных препаратов, которые относятся к четырем разным генотипам и отличаются от генотипов производственных вакцинных штаммов, используемых для получения АКДС-вакцины в настоящее время. Для включения перспективных штаммов *B. pertussis* в состав банка производственных вакцинных

штаммов в дальнейшем будут изучены их иммунобиологические свойства с определением гемагглютинирующей, гемолитической и лейкоцитозстимулирующей активностей, вирулентности и токсичности на животных.

Все полученные геномные последовательности штаммов *B. pertussis* включены в Национальный каталог на базе ФБУН ГНЦПМБ Роспотребнадзора в рамках федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» в соответствии с постановлением Совета Федерации Федерального Собрания Российской Федерации от 22.11.2023 № 673-СФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До появления вакцин коклюш был одной из ведущих причин смертности среди детей. Массовая иммунизация привела к значительному снижению числа заболевших, однако, несмотря на высокий процент привитых и широкое распространение вакцинации, эта проблема до конца не решена. В последние годы во многих странах мира наблюдается заметный рост числа зарегистрированных случаев коклюша на фоне высокого уровня охвата профилактическими прививками [43, 71, 93]. В настоящее время коклюш остается наиболее частой инфекцией, которую можно предотвратить с помощью вакцинации [160]. Рост случаев заболевания коклюшем 2023-2024 годов превысил исторический пик, наблюдавшийся с начала широкомасштабной вакцинации, что подчеркивает необходимость дальнейшего изучения возбудителя коклюшной инфекции *B. pertussis*.

Возможные причины увеличения заболеваемости коклюшем до сих пор обсуждаются во всем мире и включают в себя: ослабление вакцин-индуцированного иммунитета, переход от цельноклеточных вакцин к бесклеточным, адаптация возбудителя к вакцинации, снижение эффективности вакцин [124, 149, 152, 155, 198]. Кроме того, повышение осведомленности о коклюше, улучшение лабораторной диагностики и надзора за коклюшем, позволяет выявлять случаи заболевания у лиц с легким течением, со стертой клинической картиной, что особенно важно на ранних стадиях заболевания и при обследовании в очагах.

ПЦР-исследования способствуют улучшению диагностики коклюша, обеспечивая быстрое и эффективное выявление возбудителя. Проведённый нами анализ лабораторной диагностики коклюша в РФ демонстрирует значительное повышение эффективности благодаря использованию метода полимеразной цепной реакции. Значительное увеличение доли ПЦР среди применяемых диагностических методов до 59% позволило повысить лабораторное подтверждение случаев заболевания с помощью этого метода до 61,1%. Это

указывает на надёжность и высокую чувствительность ПЦР-диагностики по сравнению с традиционными методами.

Показана зависимость между числом регистрируемых случаев в очаге и частотой получения положительных результатов методом ПЦР. Применение молекулярно-генетических методов способствовало увеличению числа положительных случаев с 3,3% в очагах с одним заболевшим до 9,9% в очагах, где зарегистрировано три и более случаев заболевания. Этот факт может быть связан как с особенностями распространения инфекции в закрытых коллективах, так и с повышением вероятности выявления бессимптомных, атипичных и стёртых форм заболевания, которые бактериологические методы лабораторной диагностики фиксируют значительно реже. Таким образом, полученные результаты подтверждают высокую чувствительность и диагностическую ценность метода ПЦР при исследовании очагов коклюша. Использование современных молекулярно-генетических технологий в рутинной лабораторной практике способствует не только повышению специфичности выявления *B. pertussis*, но и более раннему обнаружению вспышек, что обеспечивает своевременное проведение ограничительных и профилактических мероприятий.

В этиологической структуре выявленных возбудителей с заметным превосходством доминирует *B. pertussis* (98,7%), что подтверждает актуальность данного патогена в современной эпидемической ситуации.

Важно отметить, что активное использование ПЦР-диагностики, а также комплексное использование различных методов выявления возбудителя позволят существенно улучшить эпидемиологический надзор за коклюшем, снизить уровень заболеваемости и предупредить тяжёлые осложнения.

Одной из задач проведенного исследования была оценка чувствительности циркулирующих штаммов *B. pertussis* к антибактериальным препаратам группы макролидов.

Тестирование штаммов *B. pertussis* на чувствительность к противомикробным препаратам проводится с использованием культивируемых изолятов *B. pertussis* или специфичной ДНК *B. pertussis* [72, 104]. До сих пор не

существует пороговых значений для определения антибиотикочувствительности *B. pertussis*, рекомендованных EUCAST, и все определения чувствительности основаны на результатах клинических исследований. В опубликованных ранее работах [50, 109, 126, 134] при анализе результатов диско-диффузионного метода сообщалось, что размер зоны задержки роста, связанной с чувствительностью штаммов к макролидам соответствовал ≥ 42 мм, а в исследованиях с помощью МИК-тестов чувствительность штаммов *B. pertussis* связывали с МИК < 32 мкг/мл. Для бактериальных культур *B. pertussis*, помимо диско-диффузионного метода и МИК-тестов, рекомендуется также использовать амплификацию нуклеиновых кислот для быстрой идентификации возможной мутации A2047G в 23S rRNA, отвечающей за устойчивость к макролидам. Существуют различные подходы к выявлению мутации A2047G. В 2015 году Wang Z. и др. представили аллель-специфичную ПЦР для выявления однонуклеотидного полиморфизма (SNP) A2047G [224]. В этом методе используются специфические праймеры с небольшими модификациями, которые после амплификации дают один или два фрагмента при визуализации на геле. Две полосы обозначают устойчивость, а одна — чувствительность исследуемых изолятов *B. pertussis*. Другой вариант — секвенирование по Сэнгеру продукта амплификации для выявления специфического SNP A2047G [50, 135, 225]. Кроме того, используется полногеномное секвенирование (WGS), но до сих пор ни в одном исследовании этот метод не применялся в качестве единственного способа выявления *B. pertussis*, устойчивых к макролидам. За последние десятилетия в некоторых странах мира, например, в Китае, Иране, США, были зарегистрированы штаммы *B. pertussis*, устойчивые к эритромицину [83, 225, 241].

Нами был проведен анализ антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis*, с использованием диско-диффузионного метода, МИК-тестов и молекулярно-генетических методов, включающих в себя поиск мутации A2047G в 23S rRNA. В ходе проведенной работы было установлено, что на территории РФ в популяции *B. pertussis* в период 2018 – 2024 гг. продолжали циркулировать штаммы, чувствительные к макролидам и не было обнаружено резистентных

штаммов. Хотя критериев оценки антибиотикочувствительности *B. pertussis* не существует, у штаммов, выделенных в 2023 – 2024 гг., отмечалось уменьшение диаметра зоны задержки роста в диско-диффузионном методе, который не превышал 42 мм, и увеличение МПК эритромицина и кларитромицина до 2,0 мкг/мл у 2,5% штаммов и до 4,0 мкг/мл у 5% штаммов *B. pertussis* соответственно.

Молекулярное генотипирование возбудителей инфекционных заболеваний стало важным инструментом эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями и расследованием вспышек [119]. Наиболее популярным способом исследования разнообразия генома является подход «ген за геном», который рассматривает аллели как единицы анализа [142].

Геном *B. pertussis* содержит ряд генов факторов патогенности [108], среди которых: *ptxP* (промотор коклюшного токсина), *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE* (гены коклюшного токсина), *prn* (ген белка пертактина, автотранспортер), *tcfA* (ген фактора колонизации трахеи), *fhaB* (филаментозный гемагглютинин), *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), *bapC* (ген белка-автотранспортёра), *bscl* (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 [203].

Голландскими исследователями было показано, что штаммы *B. pertussis*, содержащие аллель *ptxP3*, могут в высокой степени экспрессировать коклюшный токсин [154]. Таким образом, промотор коклюшного токсина *ptxP* *B. pertussis* привлекает всё больше внимания и используется в качестве молекулярно-генетического маркера эволюции *B. pertussis* [153].

В большинстве стран, например, в Иране, Южной Африке, США, Канаде, использующих бесклеточные вакцины, изоляты, характеризующиеся аллелями *ptxP3*, *fim3-1* или *fim3-2*, в настоящее время преобладают, тогда как изоляты с аллелем *ptxP1* все еще присутствуют в некоторых других странах, несмотря на увеличение частоты *ptxP3*, например, в Китае, где бесклеточную вакцину начали использовать после 2012 года. Филогения глобальной коллекции штаммов *B. pertussis* позволяет отследить ключевые аллельные варианты вакцинных антигенов. Увеличение генетического разнообразия наблюдалось до и после появления аллеля *ptxP3*. Вариации в генах патогенности могут играть важную роль в адаптации *B. pertussis* к вакцинации. В глобальном масштабе штаммы, содержащие аллель *ptxP3*, впервые появились в 1980-х годах [49]. Впоследствии более 90 % штаммов, циркулирующих по всему миру, стали носителями этого аллеля [130]. Было высказано предположение, что распространение штаммов *ptxP3* отражает селективное преимущество при высоком охвате бесклеточной вакциной против коклюша [130]. Другим исследованием было установлено, что аллель *prn2* влияет на эффективность вакцины, а исследования на мышах показали, что включение *prn2* в вакцину может повысить эффективность бесклеточной вакцины [90]. Более того, исследования Safarchi et al. [192] and Van Gent et al. [219] показывают, что штаммы, несущие аллели *ptxP3/prn2* лучше колонизируют дыхательные пути, чем штаммы *ptxP1/prn3*, и предоставляют доказательства повышенной жизнеспособности и лучшего «уклонения» от иммунного ответа штаммов *ptxP3/prn2* в мышинной модели с участием мышей, иммунизированных 3-компонентными бесклеточными вакцинами. Поэтому можно предположить, что *prn2* и *ptxP3* могут играть роль в повышении приспособляемости и «уклонении» от иммунитета, что приводит к тому, что данные штаммы отбираются в результате вакцинации, а затем быстро распространяются в популяции возбудителя.

Нами были исследованы нуклеотидные последовательности штаммов *B. pertussis*, выделенных за период 2018-2024 гг. При анализе данных полногеномного секвенирования был обнаружен полиморфизм в 9 генах патогенности: *ptxA*, *ptxC*, *ptxP*, *tcfA*, *fim2*, *fim3*, *prn*, *fhaB*, *суаА*. 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, из них: 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/fhaB-1/cyaA4* и 26,4% штаммов 2023 - 2024 годов, а также один штамм 2020 года - *ptxP3/fim3-1/prn2/ptxA1/ptxC4/tcfA6/fim2-1/fhaB-1/cyaA4*. Кроме того, 32,8% штаммов принадлежали к следующим аллельным вариантам, которые также отличались только по аллелю гена *tcfA*, из них: *ptxP3/fim3-2/prn2/ptxA1/ptxC4/tcfA2/fim2-1/fhaB-1/cyaA4* — 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/fhaB-1/cyaA4* — 15,5% (штаммы 2023 и 2024 годов, один штамм 2020 года). Данные генотипы соответствуют современным преобладающим аллельным профилям *B. pertussis*. Штаммы с комбинацией *ptxP3* и *prn2* и вариациями по *fim*, *tcf*, *cyaA* широко распространены по всей Европе (Великобритания, Франция, Германия, Польша, Нидерланды, Испания, Италия, Бельгия, Швеция, Финляндия), в США и Канаде, Австралии и Новой Зеландии.

Таким образом, большинство современных циркулирующих штаммов характеризуются принадлежностью к аллельному профилю *ptxP3*, *fim3-1* или *fim3-2*, а также кластера *prn2/ptxA1/ptxC4/fim2-1/fhaB-1/cyaA4*, что свидетельствует о генетической однородности популяции *B. pertussis* с определённым уровнем аллельного разнообразия по ряду генов, отвечающих за вирулентность данного возбудителя.

В генах *ptxB*, *ptxD*, *ptxE*, *vag8*, *VapC*, *brkA*, *ompQ*, *bscI* полиморфизмы не были обнаружены, все образцы содержали один аллель каждого гена: *ptxB1*, *ptxD1*, *ptxE4*, *vag8-4*, *VapC1*, *brkA1*, *ompQ4*, *bscI-1*. Однако в других странах фиксируются изменения аллелей вышеперечисленных генов. Например, в ряде стран Европы, Японии и США были найдены два аллеля *ptxB1* и *ptxB2*, но вклада в изменчивость фенотипа они дают меньше, чем *ptxA* и *ptxP*. Для *ptxD* и *ptxE* описаны единичные редкие варианты. В США, Европе и Австралии встречаются разные аллели *vag8*:

vag8-1, *vag8-2*, *vag8-3*. Что касается *VapC*, *brkA*, *ompQ*, *bscI*, то разные варианты аллелей также встречаются в выше перечисленных странах [123, 153, 166, 171].

Вместе с тем, для проведения генотипирования необходимо выделение чистой бактериальной культуры *B. pertussis*, что занимает достаточно длительное время и не всегда удается получить чистую культуру [40].

Поэтому следующей задачей была разработка нового способа генотипирования *B. pertussis* из клинических образцов, а именно, мазков с задней стенки ротоглотки, полученных от больных коклюшем. В соответствии с поставленной задачей был разработан способ генотипирования *B. pertussis* на основе nested-ПЦР, который позволяет увеличивать количество целевого фрагмента. На данный способ генотипирования был получен патент № 2822353 от 04.07.2024 г.

Для генотипирования были выбраны участок промотора *ptxP* коклюшного токсина, фрагменты гена *prn*, кодирующего белок пертактин и гена *fim3*, кодирующего фимбриальный белок 3 типа. Способ предусматривает выделение ДНК из клинических образцов, проведение полимеразной цепной реакции (первого раунда nested-ПЦР) с внешними специфическими праймерами wide F-R для получения фрагментов выбранных участков генома *B. pertussis*, которые являются матрицей для проведения второго раунда nested-ПЦР с внутренними праймерами для получения целевого продукта. Далее проводилось секвенирование по Сэнгеру и оценка аллельных профилей по схеме мультилокусного антигенного сиквенс-типирования для указанных выше фрагментов генома.

С помощью нового способа генотипирования были охарактеризованы клинические образцы, полученные в период высокой заболеваемости 2023 и 2024 гг. Данный способ, был апробирован на 336 положительных пробах, содержащих ДНК *B. pertussis*, полученных из клинических образцов (мазков с задней стенки ротоглотки), которые были собраны от больных коклюшем с клинической симптоматикой заболевания в возрасте от 1 месяца до 73 лет. Все образцы были охарактеризованы методом мультилокусного антигенного сиквенс-типирования трех фрагментов *ptxP*, *fim3* и *prn*. Было установлено, что доминирующими были

генотипы с аллельными профилями *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2*, обнаруженные в 76,9% (95% ДИ: 69,1 – 83,1) и 17,4% (95% ДИ: 12,0 – 24,6) образцах соответственно. В единичных случаях были выявлены следующие генотипы с аллельными профилями: *ptxP3/fim3-1/prn1* (1,4% (95% ДИ: 0,4 – 5,1), *ptxP3/fim3-1/prn3* (1,4% (95% ДИ: 0,4 – 5,1), *ptxP3/fim3-1/prn9* (2,2% (95% ДИ: 0,7 – 6,2), *ptxP3/fim3-3/prn2* (0,7% (95% ДИ: 0,1 – 4,0). Во всех образцах обнаружен «невакцинный» аллель *ptxP3* промотора коклюшного токсина *ptxP*. По структуре гена *fim3*, кодирующего фибриальный белок Fim3, в большинстве образцов обнаружен «вакцинный» аллель *fim3-1*. Пертактин также представлен как «вакцинным» *prn1* аллелем, так и «невакцинными» *prn2*, *prn3*, *prn9* аллелями. Полученные результаты согласуются с мировыми данными об изменениях в популяции основного возбудителя коклюшной инфекции.

Одной из причин увеличения заболеваемости коклюшем как в РФ, так и в мире считается различие между вакцинными и циркулирующими штаммами *B. pertussis*. Почти во всех странах, где проводится массовая вакцинация против коклюша, особенно с использованием бесклеточных вакцин, обнаружены генетические различия между штаммами, включенными в вакцины и циркулирующими в популяции бактериями [49, 58, 153]. Различия выявлены практически на всех континентах [166, 219].

Нами было проведено сравнение производственных вакцинных штаммов *B. pertussis*, используемых для АКДС-вакцины в РФ, и циркулирующих в настоящее время штаммов. В ходе этого эксперимента были выбраны восемь штаммов *B. pertussis*, относящихся к четырем разным генотипам, в качестве перспективных штаммов для включения в кандидаты для производства вакцинных препаратов, и были показаны генотипические различия между штаммами, используемыми для производства вакцинных препаратов, и циркулирующей популяцией *B. pertussis*.

Генетическое разнообразие *B. pertussis* варьировало до массовой вакцинации цельноклеточными вакцинами и значительно снизилось с 1990-х годов, за которым последовало клональное расширение, совпадающее с эпидемическими периодами. Поэтому молекулярный мониторинг эпидемических штаммов особенно важен.

Возбудитель коклюша адаптировался за счет накопления небольших мутаций. Похоже, что в контексте сложных бактериальных геномов небольшие мутации в отдельных генах могут оказывать существенное влияние на приспособленность штаммов, приводя к клональным зачисткам. Таким образом, полученные результаты дают некоторые объяснения повышения заболеваемости коклюшем, включая методы лабораторного обнаружения и адаптацию *B. pertussis* в современных условиях. Следует продолжать геномный анализ циркулирующих изолятов *B. pertussis*, поскольку исследования помогут выявлять вариабельность антигенов и генов бактерии; новые знания о генетической структуре возбудителя коклюша позволят создавать вакцинные препараты на основе современных штаммов *B. pertussis*; поможет устанавливать механизмы формирования популяции *B. pertussis* в различные периоды эпидемического процесса коклюшной инфекции, а также следить за изменениями чувствительности к антибиотикам.

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*) 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 антибитикочувствительности 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 СОКРАЩЕНИЙ

ДД – диско-диффузионный метод

ДИ – доверительный интервал

ККРС – кровь крупного рогатого скота

ЛПС – липополисахарид

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МИК 50– минимальная концентрация антибактериального препарата, при которой наблюдается подавление роста 50% исследуемых штаммов микроорганизма

МИК 90– минимальная концентрация антибактериального препарата, при которой наблюдается подавление роста 90% исследуемых штаммов микроорганизма

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ACV – бесклеточный коклюшный компонент вакцины

barC – ген, кодирующий белок адгезии и инвазии

brkA – ген, кодирующий белок, обеспечивающий сопротивлению бактерии действию сывороточных антител

bscI – один из генов системы секреции 3 типа

C1-INH – регуляторный белок системы комплемента

C1r - субкомпонент системы комплемента, часть комплекса C1

C1s - субкомпонент системы комплемента, часть комплекса C1

C3 - белок иммунной системы, фактор врожденного иммунитета

cyoA – ген, кодирующий аденилатциклазный токсин

DPT (DTWP) - цельноклеточная вакцина от коклюша (whole cells of the *B. pertussis*), содержащая анатоксины дифтерии (diphtheria) и столбняка (tetanus).

DTAP - бесклеточная вакцина от коклюша (acellular pertussis), дифтерии (diphtheria) и столбняка (tetanus), предназначенная для детей

fhaB – ген, кодирующий филаментозный гемагглютинин

fim3, *fim3* – гены, кодирующие фимбрии 2 и 3 типа

HRMA – (High-resolution melting analysis - анализ плавления высокого разрешения) высокочувствительный молекулярный метод сканирования мутаций и генотипирования

nested PCR – вложенная ПЦР

ompQ – ген, кодирующий синтез белка наружной мембраны

prn – ген, кодирующий белок пертактин

ptxA, ptxB, ptxC, ptxD, ptxE – гены, кодирующие субъединицы коклюшного токсина

ptxP – промотор коклюшного токсина

SNP – (Single Nucleotide Polymorphism) однонуклеотидный полиморфизм

tcfA – ген, кодирующий фактор колонизации трахеи

TDAP - бесклеточная вакцина от коклюша (acellular pertussis), дифтерии (diphtheria) и столбняка (tetanus) с пониженным содержанием дифтерийного и коклюшного компонентов, предназначенная для детей, подростков и взрослых. Компоненты в пониженной концентрации обозначают строчными буквами (diphtheria, acellular pertussis)

Th1 - Т-хелперы 1 типа

vag8 – ген, кодирующий синтез белка VAG8

WCV – цельноклеточный коклюшный компонент вакцины

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин, В. А. Клональный состав популяции штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных в России / В. А. Алешкин, О. Ю. Борисова, А. В. Алешкин [и др.]. – Текст: электронный // Инфекционные болезни. – 2013. – Т. 11 – № 1. – С. 103-109. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=18963306> (дата обращения: 20.04.2023).
2. Бабаченко, И. В. Клинико-лабораторные особенности коклюшной инфекции у детей в современных условиях: специальность 14.00.10 – инфекционные болезни, 03.00.07 – микробиология: дис. на соиск. уч. степ. д-ра мед. наук // Бабаченко Ирина Викторовна, ГОУ ВПО "Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" - СПб., 2007. - 332 с, - Место защиты: ГОУ ВПО "Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" – Текст: непосредственный.
3. 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.
4. Бакулина, Н. А. Ультраструктура свежевыделенных штаммов *B. pertussis* / Н. А. Бакулина, О. Г. Ефимова, В. В. Высотский, Р. Г. Шакирова // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. – 1984. – № 11. – С. 24-26.
5. Басов, А. А. Критерии оценки эпидемиологической ситуации по коклюшу в Российской Федерации / А. А. Басов, С. О. Высочанская, О. В. Цвиркун [и др] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2024; Т. 23 – № 2 – С. 4-13.
6. Борисова, О. Ю. Молекулярно – генетические особенности структуры генов патогенности возбудителей коклюша и дифтерии; совершенствование лабораторной диагностики при этих инфекциях: специальность 03.00.07 – микробиология: дис. на соиск. уч. степ. д-ра мед. наук // Борисова Ольга Юрьевна, ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав

потребителей и благополучия человека – Москва., – 2009. – 293 с, Место защиты: ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Текст: непосредственный.

7. Борисова, О. Ю. Мониторинг штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в 1948 – 2007 гг. / О. Ю. Борисова, Н. Т. Гадуа // Биологическая безопасность в современном мире: Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора. – 2009. – С. 49 - 51.

8. Борисова, О.Ю. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России / О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, А.С. Пименова [и др.]// Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15 – № 4 (89). - С. 22-28.

9. Патент № 2495132 Российская Федерация, МПК C12Q1/68 C12P19/30, C12N1/20 C12R1/01. Способ молекулярно-генетического типирования штаммов *Bordetella pertussis*: № 2012141063/10: заявл. 26.09.2012: опубл. 10.10.2013 / Борисова О.Ю., Ивашинникова Г.А., Гадуа Н.Т., Мазурова И.К., Алешкин В.А.; заявитель: ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора (RU). – 10 с.: ил. – Текст: непосредственный.

10. Патент № 2299908 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 (2006.01). Способ дифференциации штаммов *Bordetella pertussis*: № 2005140623/13: заявл. 26.12.2005: опубл. 27.05.2007 / Борисова О.Ю., Комбарова С.Ю., Алешкин В.А., Мазурова И.К.; заявитель: ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора (RU). – 11 с.: – Текст: непосредственный.

11. Борисова, О.Ю. Характеристика штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем / О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова, Н.Т. Гадуа [и др.] // Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями: Материалы международной конференции. - Санкт-Петербург: НИИЭМ им. Пастера, 2010. - 148 с.; 30 см.; ISBN 978-5-904405-11-32010. - С. 120; – Текст: непосредственный.

12. Борисова, О.Ю. Генетическая характеристика штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России / О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова, Г.А. Ивашинникова [и др.] // Медицинский альманах. – 2012. - № 2 (21). – С. 30 – 34.
13. Борисова, О.Ю. Характеристика штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в г. Москве, с помощью мультилокусного секвенирования / О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова, Г.А. Ивашинникова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. - № 2. – С. 28 – 34.
14. Борисова, О.Ю. Особенности распространения штаммов *B.pertussis*, выделенных от больных коклюшем, с различными аллельными вариантами гена, кодирующего промоторную область коклюшного токсина (*ptxP*) / О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова, Г.А. Ивашинникова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2012. - №2. – С. 14 – 19.
15. Гадуа Н.Т. Особенности генетической структуры современных штаммов *Bordetella pertussis*: автореф. дис. канд. мед. наук.: 03.02.03 / Гадуа Натия Торникевна; ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва, 2012. – 27 с.
16. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году»: М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва, 2024. – 364 с.
17. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году»: М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва, 2023. – 368 с.
18. Ивашинникова Г. А. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *B. pertussis* и совершенствование микробиологического мониторинга коклюшной инфекции: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / Ивашинникова Галина Антоновна; ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и

микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Москва, 2013. – 187 с.

19. Ивашинникова, Г.А. Ускоренный молекулярно-генетический метод типирования штаммов *Bordetella pertussis* по структуре промотора РТХР коклюшного токсина / Г.А. Ивашинникова, О.Ю. Борисова, А.В. Алешкин, А.С. Пименова // Астраханский медицинский журнал. – 2012. – № 7 (4). – С. 121- 124.

20. Ивашинникова, Г.А. Совершенствование генотипирования штаммов *B. pertussis* / Г.А. Ивашинникова, О.Ю. Борисова, А.В. Алёшкин, А.С. Пименова, В.А. Алешкин // Детские инфекции. – 2013. – № 1. – С. 34 – 36.

21. Ивашинникова, Г.А. Применение метода мультилокусного секвенирования для наблюдения за циркулирующими штаммами *B. pertussis* / Г.А. Ивашинникова, О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, И.А. Рудакова, И.К. Мазурова // Здоровье населения и среда обитания. – 2012. – № 9. – С. 28 – 30.

22. Ивашинникова, Г.А. Ускоренный метод мониторинга штаммов *Bordetella pertussis* по структуре промотора *ptxP* коклюшного токсина / Г.А. Ивашинникова, О.Ю. Борисова, А.С. Пименова // Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – 2013. – С. 169 – 170.

23. Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемиологическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок: Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.12.2021 № 1122н // Российская газета. – 2021. – 21 декабря. – С.12.

24. Козлов, Р.С. Антибиотикорезистентность *S. pyogenes* в России: результаты многоцентрового проспективного исследования ПеГАС-1 / Р.С. Козлов, О.В. Сивая, К.В. Шпынев [и др.] // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2005. – № 7. – С. 154-166.

25. Краснов, В.В. Коклюш у детей первого года жизни / В.В. Краснов, К.Ф. Ильенков, Л.Р. Павлович, М.В. Кузмичева // Детские инфекции. – 2018. – т. 17. – № 1. – С. 12-17.

26. Курова, Н.Н. Молекулярно-биологическая характеристика *B. pertussis*, циркулирующих в период подъема заболеваемости и совершенствование лабораторной диагностики коклюша: автореф. дис. канд. мед. наук: 2003 / Курова Наталия Николаевна: ФГУ «НИИЭМ им. Пастера» РАМН. – Санкт-Петербург, 2004. – 20 с.
27. МУК 4.2.3701-21. Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами: издание официальное: утверждены Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 01.09.2021: введены 01.09.2021 – Москва, 2021. – 34 с.
28. Лыткина, И.Н. Заболеваемость коклюшем в Москве и организация мероприятий по ее снижению / И.Н. Лыткина, Г.Г. Чистякова, Н.Н. Филатов // Новости вакцинопрофилактики: Вакцинация. – 2004. – № 5 (35). – С. 8–9.
29. Мазурова, И.К. Динамика изменчивости основных генов патогенности штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в г. Москве (1948 – 2005 гг.) / И.К. Мазурова, О.Ю. Борисова, С.Ю. Комбарова, Н.Т. Гадуа, В.А. Алешкин // Журнал молекулярной медицины. – 2008. – № 1. – С. 40–45.
30. 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. – ISBN 5-1572255: 0.00.
31. Мерцалова, Н. У. Динамика изменений патогенных свойств штаммов *Bordetella pertussis* / Н. У. Мерцалова, О. Ю. Борисова, А. С. Шинкарев [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 6. - С. 7-11.
32. 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 [и др.] // Журнал инфектологии. – 2019. – № 11(1). – С. 17-24.
33. Петрова, М. С. Коклюш у детей раннего возраста / М. С. Петрова, О. П. Попова, О. Ю. Борисова, Е. Н. Абрамова, Р. В. Вартанян, Е. И. Келли // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 6. – С. 19-24.

34. Петрова, М. С. Антибиотикотерапия при коклюше у детей / М. С. Петрова, Р. Г. Шакирова, Н. А. Антонова, Г. Н. Феоктистова // Антибиотики и химиотерапия. – 1992. – № 11. – С. 40-43.
35. 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 // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 7 (2). – С. 162–170.
36. Пименова, А. С. Антибиотикочувствительность выделенных на территории России штаммов *Bordetella pertussis* к эритромицину и азитромицину / А. С. Пименова, Н. Т. Гадуа, И. Ю. Андриевская [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2024. – № 23 (3). – С. 27-37.
37. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: издание официальное: утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 04.03.2004: введены 04.03.2004 – Москва, 2008. – 25 с.
38. Скирда, Т. А. Серологическая диагностика коклюша у лиц старшего возраста / Т. А. Скирда, О. Ю. Борисова, М. С. Петрова, А. Б. Борисова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – № 65 (8). – С. 492–495.
39. Скирда, Т.А. Определение противокклюшных антител у школьников с длительным кашлем / Т. А. Скирда, О. Ю. Борисова, А. Б. Борисова [и др.] // Журнал инфектологии. – 2020. – № 15 (1). – С. 93-100.
40. Ушкалова, Е.А. Применение рокситромицина в педиатрии / Е. А. Ушкалова // Фарматека: международный медицинский журнал – 2006. – №2 (117). – С.16-21. – Реферирована.
41. Ценева, Г. Я. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша / Г. Я. Ценева, Н. Н. Курова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2003. – № 4 (5). – С. 329–341.

42. Ценева, Г. Я. Мониторинговые исследования возбудителя коклюша в связи с усилением мероприятий по ограничению распространения коклюша среди организованных детей. / Г. Я. Ценева, И. Б. Блиман, Т. Е. Быстрая // Современное лабораторное обеспечение. – 2012. – Т. 2. – № 1–2 – С.339.
43. Шинкарев, А. С. Современные штаммы *Bordetella pertussis*. Иммунологические свойства совершенствования вакцины / А. С. Шинкарев, Н. У. Мерцалова, И. К. Мазурова, О. Ю. Борисова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 4. – С.20–25.
44. Agence France-Presse (AFP). Four children die in Serbia whooping cough outbreak. Paris: AFP; 2024. Available at: <https://insiderpaper.com/four-children-die-in-serbia-whooping-cough-outbreak>.
45. Advani, A. Appearance of Fim3 and ptxP3-*Bordetella pertussis* strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs / A. Advani, L. Gustafsson, C. Åhrén, F. Mooi, H. Hallander // Vaccine. – 2011. - № 29. – P. 3438–3442.
46. Alai, S. Characterization of *Bordetella pertussis* Strains Isolated from India / S. Alai, M. Gautam, S. Palkar, J. Oswal, S. Gairola, D. Dhotre // Pathogens. – 2022. - № 11 (7). – P. 794.
47. Althouse, B.M. Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis* / B.M. Althouse, S.V. Scarpino // BMC Med. – 2015. - № 13. – P. 146.
48. Barkoff, A.M. Surveillance of Circulating *Bordetella Pertussis* Strains in Europe during 1998 to 2015 / A.M. Barkoff, J. Mertsola, D. Pierard [et al] // J. Clin. Microbiol. – 2018. - № 56 (5). – P. 17.
49. Barnes, M.G. BrkA Protein of *Bordetella pertussis* Inhibits the Classical Pathway of Complement after C1 Deposition / M.G. Barnes, A.A Weiss // Infect Immun. – 2001. - № 69. - P. 12-16.
50. Bart, M.J. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination / M.J. Bart, S.R. Harris, A. Advani [et al.] // mBio. – 2014. - № 5. – P. 10-18.

51. Bass, J.W. Susceptibility of *Bordetella Pertussis* to Nine Antimicrobial Agents / J.W. Bass, F.W. Crast, J.B. Kotheimer, I.A. Mitchell // *Am. J. Dis. Child.* – 1969. - № 117. - P. 276–280.
52. Baxter, R. Effectiveness of pertussis vaccines for adolescents and adults: case-control study / R. Baxter, J. Bartlett, A. Rowhani-Rahbar [et al.] // *BMJ.* – 2013. – P. 347.
53. Betsou, F. Cloning and sequence of the *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase-hemolysin-encoding gene: comparison with the *Bordetella pertussis* gene / F. Betsou, O. Sismeiro, A. Danchin, N. Guiso // *Gene.* – 1995. - vol. 162. - № 1. – P. 165-166.
54. Berggård, K. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin / K. Berggård, E. Johnsson, FR. Mooi, G. Lindahl // *Infect Immun.* – 1997. - № 65(9). - Pp. 3638-3643.
55. Bergogne-Berezin, E. New pharmacological approaches of macrolides. Example of roxithromycin / E. Bergogne-Berezin // *Presse Med.* – 1997. - № 26. - suppl. 2. - Pp. 4–10.
56. Bock, S.C. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization / S.C. Bock, K. Skriver, E. Nielsen [et al.] // *Biochemistry.* – 1986. - Vol. 25. - № 15. - Pp.4292-4301.
57. Bodilis, H. Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France / H. Bodilis, N. Guiso // *Emerg Infect Dis.* – 2013. - Vol. 19. - № 3. - Pp. 471–474.
58. Boterro, D. Genotypic and phenotypic characterization of *Boerdetella pertussis* strains used in different vaccine formulation in Latin America / D. Boterro, M.E. Gaillard, L.A. Basile [et al.] // *J Appl Microbiology.* - 2012. - Vol. 112. - № 6. - Pp. 1266-1276.
59. Bouchez, V. *Bordetella parapertussis* isolates not expressing pertactin circulating in France / V. Bouchez, D. Brun, G. Dore [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2011. - Vol. 17. - № 5. - Pp.675–682.
60. Bouchez, V. Evolution of *Bordetella pertussis* over a 23-year period in France, 1996 to 2018 / V. Bouchez, S. Guillot, A. Landier [et al.] // *Euro Surveill.* – 2021. – Vol. 26. - № 37. – P. 2001213.

61. Bouchez, V. Genomic sequencing of *Bordetella pertussis* for epidemiology and global surveillance of whooping cough / Bouchez V. [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2018. - № 24. - Pp.988–994.
62. Bourgeois, N. In Vitro Activity of Fluoroquinolones against Erythromycin-Susceptible and -Resistant *Bordetella Pertussis* / N. Bourgeois, J.C. Ghnassia // *J Antimicrob Chemother.* – 2003. - Vol. 51. - № 3. - Pp. 742–743.
63. Bowden, K.E. Molecular Epidemiology of the Pertussis Epidemic in Washington State in 2012 / K.E. Bowden, M.M. Williams, P.K. Cassiday [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol.52. – № 10. - Pp. 3549–3557.
64. Brett, M. The comparative in-vitro activity of roxithromycin and other antibiotics against *Bordetella pertussis* / M. Brett, P. Short, S. Beatson // *J Antimicrob Chemother.* – 1998. – № 41. – suppl. B. – Pp. 23–27.
65. Bridel, S. A comprehensive resource for *Bordetella* genomic epidemiology and biodiversity studies / S. Bridel, V. Bouchez, B. Brancotte [et al.] // *Nat Commun.* – 2022. - № 13. – P. 141.
66. Carbonetti, N.H. *Bordetella Pertussis*: New Concepts in Pathogenesis and Treatment // *Curr Opin Infect Dis* – 2016. - № 29. - Pp. 287–294.
67. Carriquiriborde, F. Rare Detection of *Bordetella pertussis* Pertactin-Deficient Strains in Argentina / F. Carriquiriborde, V. Regidor, P.M. Aispuro [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2019. - № 25. - Pp. 2048-2054.
68. Cassiday, P. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935–1999 / P. Cassiday, G. Sanden, K. Heuvelman [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 182. – № 5. – Pp. 1402 – 1408.
69. Cassiday, P.K. Co-Infection with Two Different Strains of *Bordetella Pertussis* in an Infant / P.K. Cassiday, M. Tobin-D’Angelo, J.R. Watson [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 57. – Pt. 3. – Pp. 388–391.
70. Cassiday, P. K. Changes in predominance of pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates, United States, 2000–2012 / P. K. Cassiday, T. H. Skoff, S. Jawahir [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2016. – № 22. – Pp.442–448.

71. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Erythromycin-Resistant *Bordetella Pertussis* – Yuma County, Arizona, May-October 1994. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*, 1994 Nov, no. 43, Pp. 807–810. PMID: 7968996.
72. Central District Health (CDH). CDH Alerts about Rising Cases of Pertussis in 2024. Boise, ID: CDH; 2024 Feb. Available at: <https://cdh.idaho.gov/cdh-alerts-about-rising-cases-of-pertussis-in-2024>.
73. Cimolai, N. Correlation of Erythromycin Agar Dilution Susceptibility Testing with Disc Diffusion Susceptibility for *Bordetella Pertussis* / N. Cimolai, A. Zaher, C. Trombley // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 1997. – № 9. – Pp. 113–116.
74. Cordova, S.P. The outbreak that had to happen: *Bordetella pertussis* in north-west Western Australia in 1999 / S.P. Cordova, M.T. Gilles, M.Y. Beers // *Commun. Dis. Intell.* – 2000. – Vol. 24. – Pp. 375 – 379.
75. de Gouw, D. Pertussis: a matter of immune modulation / D. de Gouw, D.A. Diavatopoulos, H.J. Bootsma [et al.] // *FEMS Microbiol Rev.* – 2011. – № 35. – Pp. 441–474.
76. 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 [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 6. – Pp. 348 – 357.
77. DeBolt, C. Pertussis epidemic – Washington, 2012. Morbidity and Mortality Weekly / C. DeBolt, A. Tasslimi, J. Bardi [et al.] // *Report (MMWR)*. – 2012. – Vol. 61. – Pp. 517–522.
78. Dieterich, C. Modulation of the host interferon response and ISGylation pathway by *B. pertussis* filamentous hemagglutinin / C. Dieterich, D. A. Relman // *PLoS One*. – 2011. – № 6 :e27535.
79. Dirix, V. Monocyte-derived interleukin-10 depresses the *Bordetella pertussis*- specific gamma interferon response in vaccinated infants / V. Dirix, V. Verscheure, F. Mascart [et al.] // *Clin Vaccine Immunol.* – 2009. – Vol. 16. – iss. 12. – Pp. 1816-1821.
80. Dorji, D. Biofilm Forming Potential and Antimicrobial Susceptibility of Newly Emerged Western Australian *Bordetella Pertussis* Clinical Isolates / D. Dorji, R.M. Graham, P. Richmond [et al.] // *Biofouling*. – 2016. – № 32. – Pp. 1141–1152.

81. Dorji, D. Bordetella Pertussis virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance / D. Dorji, F. Mooi, O. Yantorno [et al.] // *Med Microbiol Immunol.* – 2018. – № 207. – Pp. 3-26.
82. Edwards, K.M. Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination // *J. Pediatr Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 24. – suppl. 6. – Pp. 104-108.
83. Elomaa, A. Population dynamics of Bordetella pertussis in Finland and Sweden, neighbouring countries with different vaccination histories / A. Elomaa, A. Advani, D. Donnelly [et al.] // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – № 5. – Pp. 918-926.
84. Feng, Y. Emerging Macrolide Resistance in Bordetella Pertussis in Mainland China: Findings and Warning from the Global Pertussis Initiative / Y. Feng, C.H. Chiu, U. Heininger [et al.] // *Lancet Reg Health West Pac.* – 2021. - № 8: e. 100098.
85. Fernandez, R. C. Cloning and sequencing of a Bordetella pertussis serum resistance locus / R. C. Fernandez, A. A. Weiss // *Infect. Immun.* – 1994. – Vol. 62. – № 11. – Pp. 4727-4738.
86. Finn, T.M. Vag8, a Bordetella pertussis bvg-regulated protein / T.M. Finn, D.F. Amsbaugh // *Infect Immun.* – 1998. – № 66. – Pp. 3985–3989.
87. Fong, W. Genomic and Transcriptomic Variation in Bordetella spp. Following Induction of Erythromycin Resistance / W. Fong, V. Timms, E. Sim [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2022. – № 77. – Pp. 3016–3025.
88. Forsyth, K.D. Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting / K.D. Forsyth, C.H. Wirsing von Konig, T. Tan [et al.] // *Vaccine.* – 2007. – Vol.25. – Pp. 2634-2642.
89. Friedman, R.L. Uptake and intracellular survival of Bordetella pertussis in human macrophages / R.L. Friedman, K. Nordensson, L. Wilson // *Infect. Immun.* – 1992. – № 60. – Pp. 4578-4585.
90. Fry, N.K. Antimicrobial Susceptibility Testing of Historical and Recent Clinical Isolates of Bordetella Pertussis in the United Kingdom Using the Etest Method / N.K. Fry, J. Duncan, L. Vaghji [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2010. – № 29. – Pp. 1183–1185.

91. Fu, P. Bordetella Pertussis Infection in Infants and Young Children in Shanghai, China, 2016-2017: Clinical Features, Genotype Variations of Antigenic Genes and Macrolides Resistance / P. Fu, C. Wang, H. Tian [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2019. – № 38. – Pp. 370–376.
92. Geurtsen, J. Identification of a novel lipopolysaccharide core biosynthesis gene cluster in *Bordetella pertussis*, and influence of core structure and lipid A glucosamine substitution on endotoxic activity / J. Geurtsen, M. Dzieciatkowska, L. Steeghs [et al.] // *Infection and immunity.* – 2009. – № 77. – Pp.2602-2611.
93. Fullen, A.R. Whoop! There it is: The surprising resurgence of pertussis / A.R. Fullen, K.S. Yount, P. Dubey, R. Deora // *PLoS Pathog.* – 2020. – № 16: e1008625.
94. Ghert-Zand, R. Cases of whooping cough spike among children in Haredi Jerusalem communities. Jerusalem: The Times of Israel. – 2023. available at: <https://www.timesofisrael.com/cases-of-whooping-cough-spike-amongchildren-in-haredi-jerusalem-communities/>.
95. Gordon, K.A. Antimicrobial Susceptibility Testing of Clinical Isolates of *Bordetella Pertussis* from Northern California: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program / K.A. Gordon, J. Fusco, D.J. Biedenbach [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – № 45. – Pp. 3599–3600.
96. Gu, W. Pathogen analysis of pertussis-like syndrome in children / W. Gu, K. Wang, X. Zhang [et al.] // *BMC Infect Dis.* – 2020. – № 20. – Pp. 353–360.
97. Gueirard, P. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo / P. Gueirard, A. Druilhe, M. Pretolani, N. Guiso // *Infection and immunity.* – 1998. – Vol. 66. – № 4. – Pp. 1718-1725.
98. Guillot, S. Macrolide-Resistant *Bordetella Pertussis* Infection in Newborn Girl, France / S. Guillot, G. Descours, Y. Gillet [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2012. – №. 18. – Pp. 966-968.
99. Guiso N. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines // *Clin Infect Dis.* – 2009. – № 49. – Pp.1565–1569.

100. Guiso N., Liese J., Plotkin S. The Global Pertussis Initiative: Meeting Report from the Fourth Regional Roundtable Meeting, France, 2010 // *Hum. Vaccin.* – 2011. – № 7. – Pp. 481–488.
101. Guttridge, R. Warning to parents over serious condition affecting kids after highest weekly cases for years. Birmingham: Reach plc, 2024. Available at: <https://www.birminghammail.co.uk/black-country/warning-parentsover-serious-condition-28572063>.
102. Hallander, H. Bordetella pertussis strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by pulsed-field gel electrophoresis / H. Hallander, A. Advani, M. Riffelmann [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2007. – №45. – Pp. 3257–3262.
103. Han, H.J. Differential expression of type III effector BteA protein due to IS481 insertion in Bordetella pertussis / H.J. Han, A. Kuwae, A. Abe [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – № 6: e17797.
104. Hardy, E. Elution of Lipopolysaccharides from Polyacrylamide Gels / E. Hardy, E. Pupo, H. Santana [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1998. – № 259. – Pp. 162–165.
105. Hegerle, N. Bordetella pertussis and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines / N. Hegerle, N. Guiso // *Expert Rev Vaccines.* – 2014. – № 13. – Pp.1135–1146.
106. Hegerle, N. Evolution of French Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis isolates: increase of bordetellae not expressing pertactin / N. Hegerle, A.S. Paris, D. Brun [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – №18. – Pp. 340–346.
107. Heravi, F.S. Strain variation and antigenic divergence among Bordetella pertussis circulating strains isolated from patients in Iran / F.S. Heravi, V.S. Nikbin, M.N. Lotfi [et al.] // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2018. – Vol. 37. – № 10. – Pp. 1893–1900.
108. Higgs, R. Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis / R. Higgs, S.C. Higgins, P.J. Ross, K. H. G. Mills // *Mucosal Immunol.* – 2012. – Vol. 5. – Issue 5 p. – Pp. 485-500.
109. Hill, B.C. A simplified method for testing Bordetella pertussis for resistance to erythromycin and other antimicrobial agents / B.C. Hill, C.N. Baker, F.C. Tenover // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38. – № 3. – Pp. 1151–1155.

110. Hormozi, K. Adjuvant and protective properties of native and recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin preparations in mice / K. Hormozi, R. Parton, J. Coote // FEMS Immunol Med Microbiol. – 1999. – Vol. 23. – № 4. – Pp. 273-282.
111. Hua, C.Z. In vitro activity and clinical efficacy of macrolides, cefoperazone-sulbactam and piperacillin/piperacillin-tazobactam against *Bordetella pertussis* and the clinical manifestations in pertussis patients due to these isolates: A single-centre study in Zhejiang Province, China / C.Z. Hua, H.J. Wang, Z. Zhang [et al.] // J. Glob. Antimicrob. Resist. – 2019. – №18. – Pp. 47–51.
112. Institut za javno zdravlje Crne Gore. Pertussis (veliki kasalj) u Crnoj Gori. Podgorica: Institut za javno zdravlje Crne Gore, 2024. URL: <https://www.ijzcg.me/me/pertussis> (date accessed 26.01.2025).
113. Increase of pertussis cases in the EU/EEA. European Centre for Disease Prevention and Control. 8 May 2024. Stockholm: ECDC; 2024. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/increase-pertussis-cases-eueea> (date accessed 26.12.2024).
114. Ishibashi, Y. *Bordetella pertussis* infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin / Y. Ishibashi, A. Nishikawa // Microb. Pathog. – 2002. – №33. – Pp. 115-125.
115. Ivaska, L. Macrolide Resistance in *Bordetella pertussis*: Current Situation and Future Challenges / L. Ivaska, A.M. Barkoff, J. Mertsola, Q. He // Antibiotics (Basel). – 2022. – Vol.11. – № 11. – P. 1570.
116. Jakubů, V. Trends in the Minimum Inhibitory Concentrations of Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin, Ciprofloxacin, and Trimethoprim/Sulfamethoxazole for Strains of *Bordetella Pertussis* Isolated in the Czech Republic in 1967–2015 / V. Jakubů, J. Zavadilová, K. Fabiánová, P. Urbášková // Cent. Eur. J. Public Health. – 2017. – Vol. 25. – Pp. 282–286.
117. Kallonen, T. Rapid detection of the recently emerged *Bordetella pertussis* strains with the ptxP3 pertussis toxin promoter allele by real-time PCR / T. Kallonen, J. Mertsola, F.R. Mooi, Q. He // Clin. Microbiol. Infect. – 2012. – Vol. 18. – Pp. 377–379.

118. Kamachi, K. Macrolide-Resistant *Bordetella Pertussis*, Vietnam, 2016–2017 / K. Kamachi, H.T. Duong, A.D. Dang [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2020. – № 26. – Pp. 2511–2513.
119. Kamachi, K. Rapid and simple SNP genotyping for *Bordetella pertussis* epidemic strain MT27 based on a multiplexed single-base extension assay / K. Kamachi, S.M. Yao, C.S. Chiang [et al.] // *Sci Rep.* – 2021. – № 11. – 4823 p.
120. Katfy, K. Epidemiology of pertussis in Casablanca (Morocco): contribution of conventional and molecular diagnosis tools / K. Katfy, N. Guiso, I. Diawara [et al.] // *BMC Infect Dis.* – 2017. – Vol. 17. – 348 p.
121. Khazaei, S. Pertussis incidence by time, province and age group in Iran, 2006–2011 / S. Khazaei, E. Ayubi, K. Mansori, S. Khazaei // *Iran J Public Health.* – 2016. – Vol. 45. – № 11. – Pp. 1525–1527.
122. Kim, S-H. Recent trends of antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates in Korea / S-H. Kim, J. Lee, H.Y. Sung [et al.] // *J Korean Med Sci.* – 2014. – № 29. – Pp. 328–333.
123. King, A.J. Genome-wide gene expression analysis of *Bordetella pertussis* isolates associated with a resurgence in pertussis: elucidation of factors involved in the increased fitness of epidemic strains / A.J. King, S. van der Lee, A. Mohangoo [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – № 8 : e66150.
124. Klein, N.P. Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children / N.P. Klein, J. Bartlett, A. Rowhani-Rahbar [et al.] // *N Engl J Med.* – 2012. – № 367. – Pp. 1012–1019.
125. Koide, K. Complete Genome Sequence of a Macrolide-Resistant *Bordetella Pertussis* Isolated in Japan / K. Koide, T. Yamaguchi, C. Katsukawa [et al.] // *Microbiol Resour Announc.* – 2022. – Vol. 11 : e00718-22.
126. Korgenski, E.K. surveillance and detection of erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the Intermountain West region of the United States / E.K. Korgenski, J.A. Daly // *J Clin Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – № 11. – Pp. 2989–2991.

127. Kourova, N. Comparison of the *Bordetella pertussis* and *Bordetella paraper-tussis* isolates circulating in Saint Petersburg between 1998 and 2000 with Russian vac-cine strains / N. Kourova, V. Caro, C. Weber [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2003. –№ 41(8):3706-11.
128. Kurova, N. Monitoring of *Bordetella* isolates circulating in Saint Petersburg, Russia between 2001 and 2009 / N. Kurova, E. Njamkepo, D. Brun [et al.] // *Res Micro-biol.* – 2010. – № 161(10):810-5.
129. Kurzynski, T.A. Antimicrobial susceptibilities of *Bordetella* species isolated in a Multicenter Pertussis Surveillance Project / T.A. Kurzynski, D.M. Boehm, J.A. Rott-Petri [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1988. – Vol. 32. – № 1. – Pp. 137–140.
130. Lam, C. Selection and emergence of pertussis toxin promoter ptxP3 allele in the evolution of *Bordetella pertussis* / Lam C., Octavia S., Bahrame Z., Sintchenko V., Gilbert G.L. [et al.] // *Infect Genet Evol.* – 2012. – Vol. 12. – no. 2. – Pp. 492–495.
131. Lam C., Octavia S., Ricafort L., et al. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis*, 2014 Apr, vol. 20, no. 4, Pp. 626–633. doi: 10.3201/eid2004.131478. PubMed PMID: 24655754; PubMed Central PMCID: PMC3966384.
132. Lamberti Y., Alvarez H.J., Perez Vidakovics M.L. Cholesterol-dependent at-tachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Mi-crobiol*, 2009 Jul, no. 56, Pp. 143-150.
133. Lapin J.H. 1943. Whooping cough. Charles C. Thomas Publisher Ltd., Springfield, IL.
134. Lewis K., Saubolle M.A., Tenover F.C., Rudinsky M.F., Barbour S.D., Cherry J.D. Pertussis caused by an erythromycin-resistant strain of *Bordetella Pertussis*. *Pediatr Infect Dis J*, 1995 May, vol. 14, no. 5, Pp. 388–391.
135. Li L., Deng J., Ma X., Zhou K., Meng Q., Yuan L., Shi W., Wang Q., Li Y., Yao K. High Prevalence of Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* and PtxP1 Geno-type, Mainland China, 2014–2016. *Emerg Infect Dis*, 2019 Dec, vol. 25, no. 12, Pp. 2205–2214.

136. Lin L.-N., Zhou J.-S., Hua C.-Z., Bai G.-N., Mi Y.-M., Zhou M.-M. Epidemiological and clinical characteristics of Pertussis in children and their close contacts in households: A cross-sectional survey in Zhejiang Province, China. *Front Pediatr*, 2022 Aug, no. 10, 1442 p.
137. Litt D.J., Neal S.E., Fry N.K. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J Clin Microbiol*, 2009 Mar, vol. 47, no. 3, Pp. 680-688.
138. Liu X., Wang Z., Zhang J., Li F., Luan Y., Li H., Li Y., He Q. Pertussis Outbreak in a Primary School in China: Infection and Transmission of the Macrolide-resistant *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J*, 2018 Jun, vol. 37, no. 6, Pp.145–148.
139. Loch C., Bertin P., Menozzi F.D. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol*, 1993 Aug, vol. 9, no. 4, Pp. 653-660.
140. Lönnqvist E., Barkoff A.M., Mertsola J., He Q. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *J Glob Antimicrob Resist*, 2018 Sep, no. 14, Pp. 12–16.
141. Magner L.N. Diseases of the premodern period in Korea. In Kiple K.F. (ed), *The Cambridge world history of human disease*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1993, Pp. 392–400. ISBN 0-521-33286-9.
142. Maiden M.C., Jansen van Rensburg M.J., Bray J.E., Earle S.G., Ford S.A., Jolley K.A., et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol*, 2013 Oct, vol. 11, no. 10, Pp. 728-36.
143. Marchand-Austin A., Memari N., Patel S.N., Tang P., Deeks S.L., Jamieson F.B., Crowcroft N.S., Farrell D.J. Surveillance of antimicrobial resistance in contemporary clinical isolates of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada. *Int J Antimicrob Agents*, 2014 Jun, vol. 44, no.1, Pp.82–84.
144. Matplotlib — Visualization with Python [Электронный ресурс]. — URL: <https://matplotlib.org/> (дата обращения: 28.02.2025).

145. McGuirk P, Mc Cann C., Mills K.H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med*, 2002 Jan, vol. 195, no. 2, Pp. 221-231.
146. McGuirk P., Mills K.H. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol*, 2000, vol. 30, no. 2, Pp. 415-422.
147. Mills K.H., Ryan M., Ryan E. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, 1998 Feb, vol. 66, no. 2, Pp. 594-602.
148. Mirzaei B., Bameri Z., Babaei R., Shahcheraghi F. Isolation of High Level Macrolide Resistant *Bordetella pertussis* without Transition Mutation at Domain V in Iran. *Jundishapur J Microbiol*, 2015 Jul, vol. 8, no. 7, e 18190.
149. Misegades L.K., Winter K., Harriman K., Talarico J., Messonnier N.E., Clark T.A., Martin S.W. Association of childhood pertussis with receipt of 5 doses of pertussis vaccine by time since last vaccine dose, California, 2010. *JAMA*, 2012 Nov, vol. 308, no. 20, Pp. 2126–2132.
150. Mobberley-Schuman P.S., Connelly B., Weiss A.A. Phagocytosis of *Bordetella pertussis* incubated with convalescent serum. *J Infect Dis*, 2003 May, vol. 187, no. 10, Pp. 1646-1653.
151. Mooi F., Hallander H., Von König C.W., et al. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000 Mar, vol. 19, no.3, Pp. 174–181.
152. Mooi F.R., van der Maas N.A., de Melker H.E. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect*, 2014, vol.142, no. 4, Pp. 1–10.

153. Mooi F.R., van Loo I.H., van Gent M., He Q., Bart M.J., Heuvelman K.J., de Greeff S.C., Diavatopoulos D., Teunis P., Nagelkerke N., Mertsola J. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis*, 2009, vol. 15, no.8, Pp. 1206–1213.
154. Mooi F.R., van Oirschot H., Heuvelman K., van der Heide H.G., Gaastra W., Willems R.J. Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun*, 1998, vol. 66, no. 2, Pp.670–675.
155. Mooi F.R. Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol*, 2010, vol. 10, no. 1, Pp. 36–49.
156. Moosa F., du Plessis M., Weigand M.R., Peng Y., Mogale D., de Gouveia L., Nunes M.C., Madhi S.A., Zar H.J., Reubenson G., Ismail A., Tondella M.L., Cohen C., Walaza S., von Gottberg A., Wolter N. Genomic characterization of Bordetella pertussis in South Africa, 2015-2019. *Microb Genom*, 2023, vol. 9, no. 12, e001162.
157. Moradi-Lakeh Mю, Esteghamati A. National Immunization Program in Iran: whys and why nots. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, vol. 9, no. 1, Pp. 112–114.
158. Moriuchi T., Vichit O., Vutthikol Y., Hossain M.S., Samnang C., Toda K., Grabovac V., Hiramatsu Y., Otsuka N., Shibayama K., Kamachi K. Molecular epidemiology of Bordetella pertussis in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens. *Int J Infect Dis*, 2017, no. 62, Pp. 56-58.
159. Morozumi M., Hasegawa K., Kobayashi R., Inoue N., Iwata S., Kuroki H., Kawamura N., Nakayama E., Tajima T., Shimizu K., et al. Emergence of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA Gene Mutation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, vol. 49, no. 6, Pp. 2302–2306.
160. Mosiej E., Zawadka M., Krysztopa-Grzybowska K., Polak M., Augustynowicz E., Piekarska K., et al. Sequence variation in virulence-related genes of Bordetella pertussis isolates from Poland in the period 1959-2013. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, vol. 34, no. 1, Pp. 147-152.
161. National Agency for Disease Control and Prevention - China. Overview of the national epidemic situation of notifiable infectious diseases in March 2024. Beijing:

NDCPA, 2024. Available at: https://www.ndcpa.gov.cn/jbkzzx/c100016/common/content/content_1782571426407886848.html.

162. Nikbin V.S., Ahmadi N.J., Hosseinpour M., et al. Virulence factors variation among *Bordetella pertussis* isolates in Iran. *Int J Mol Cell Med*, 2015, vol. 4, no. 2, Pp. 138–142.

163. Noofeli M., et al. BapC autotransporter protein is a virulence determinant of *Bordetella pertussis*. *Microbial Pathogenesis*, 2011 Sep, vol. 51, no. 3, Pp. 169-177. doi: 10.1016/j.micpath.2011.04.004. Epub 2011 May 4.

164. Northwestern Health Unit (NWHU). Increased risk of pertussis. Kenora NWHU, 2023. doi. 10.2900/831122. Available at: <https://nwhu.on.ca/media-releases/increased-risk-of-pertussis/>.

165. NumPy [Электронный ресурс]. — URL: <https://numpy.org/> (дата обращения: 28.02.2025).

166. Octavia S., Sintchenko V., Gilbert G.L., et al. Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying prn2 and ptxP3 alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008–2010. *J Infect Dis*, 2012, vol. 205, no. 8, Pp. 1220–1224.

167. Odenholt-Tornqvist I., Lowdin E., Cars O. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of roxithromycin, clarithromycin, and azithromycin on respiratory tract pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, vol. 39, no.1, Pp.221–226.

168. Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, Hallander HO, Heijbel H, Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet*, 1997, vol. 350, no.9091, Pp. 1569–1577.

169. Oliver D.C., Huang G., Fernandez R.C. Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *J Bacteriol*, 2003, vol.185, no.2, Pp.489-495.

170. Oliver D.C., Fernandez R.C. Antibodies to BrkA augment killing of *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, 2001, vol.20, no.1-2, Pp.235-241.

171. Otsuka N., Han H.J., Toyoizumi-Ajisaka H., et al. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS One, 2012; vol.7, no.2: e31985.
172. Packard E.R., Parton R., Coote J.G., Norman K.F. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. Journal of Medical Microbiology, 2004, vol.53, iss.5, Pp.355–365.
173. Pandas - Python Data Analysis Library [Электронный ресурс]. - URL: <https://pandas.pydata.org/> (дата обращения: 28.02.2025).
174. Parkhill J., Sebahia M., Preston A., Murphy L.D., Thomson N., Harris D.E., et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet, 2003, vol.35, no.1, Pp.32–40.
175. Passerini de Rossi B.N., Friedman L.E., Gonzalez Flecha F.L., Castello P.R., Franco M.A., Rossi J.P. Identification of *Bordetella pertussis* virulence-associated outer membrane proteins. FEMS Microbiol Lett, 1999, vol.172, no.1, P.9-13.
176. Perez Vidakovics M.L., Lamberti Y., van der Pol W.L. Adenylate cyclase influences filamentous haemagglutinin-mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, vol.48, no.1, P.140-147.
177. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 14th ed. CLSI standard M02. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024. ISBN 978-1-68440-171-0.
178. Pesingi P.V., Singh B.R., Pesingi P.K., Bhardwaj M., Singh S.V., Kumawat M., Sinha D.K., Gandham R.K. MexAB-OprM Efflux Pump of *Pseudomonas Aeruginosa* Offers Resistance to Carvacrol: A Herbal Antimicrobial Agent. Front. Microbiol. 2019;10:2664.
179. Petersen R.F., Dalby T., Dragsted D.M., Mooi F., and Lambertsen L. Temporal trends in *Bordetella pertussis* populations, Denmark, 1949-2010. Emerg Infect Dis, 2012 May, vol.18, no.5, Pp.767–774.
180. Plotly: Low-Code Data App Development [Электронный ресурс]. — URL: <https://plotly.com/> (дата обращения: 28.02.2025).

181. Pool V., Tomovici A., Johnson D.R., Greenberg D.P., Decker M.D. Humoral immunity 10 years after booster immunization with an adolescent and adult formulation combined tetanus, diphtheria, and 5-component acellular pertussis vaccine in the USA. *Vaccine*, 2018 Apr, vol.36, no.17, Pp.2282–2287.
182. Preston N.W., Carter E.J. Serotype specificity of vaccine-induced immunity to pertussis. *Commun Dis Rep CDR Rev*, 1992 Dec, vol.2, no.13, Pp.155–156. PMID: 1285135.
183. Pschunder B., Locati L., López O., Martin Aispuro P., Zurita E., Stuible M., Durocher Y., Hozbor D. Outer membrane vesicles derived from *Bordetella pertussis* are potent adjuvant that drive Th1-biased response. *Front Immunol*, 2024 Apr, vol.156 : e1387534.
184. Raeven R.H., Brummelman J., Pennings J.L., van der Maas L., Tilstra W., Helm K., et al. *Bordetella pertussis* outer membrane vesicle vaccine confers equal efficacy in mice with milder inflammatory responses compared to a whole-cell vaccine. *Sci Rep*, 2016 Dec, no.6: e38240.
185. Rautemaa R., Jarvis G.A., Marnila P., Meri S. Acquired resistance of *Escherichia coli* to complement lysis by binding of glycoposphoinositol-anchored protectin (CD59). *Infect Immun*, 1998 May, vol.66, no.5, Pp.1928-1933.
186. Redação do A Crítica. Com casos na fronteira de MS, Sesau acende alerta para circulação de coqueluche na Capital. Campo Grande: A Crítica; 2023. Available at: <https://www.acritica.net/editorias/saude/com-casos-nafronteira-sesau-acente-alerta-para-circulacao-de/682964/>.
187. Redação do Notícias da Hora. Após surto de coqueluche na Bolívia, Acre dá início a ação preventiva de vacinação na fronteira. Notícias da Hora; 2023. Available at: <https://www.noticiasdahora.com.br/cidades/outras-noticias/apos-surto-de-coqueluche-na-bolivia-acre-da-inicioa-acao-preventiva-de-vacinacao-na-fronteira.html>.
188. Rigby M. Spike in whooping cough cases prompts warning from health officials and infectious disease expert. Gold Coast: Australian Broadcasting Corporation (ABC), 2024. Available at: <https://www.abc.net.au/news/2024-02-08/whooping-cough-spike-child-parent-vaccine/103431862>.

189. Rodrigues C., Bouchez V., Soares A., Trombert-Paolantoni S., Aït El Belghiti F., Cohen J.F., Armatys N., Landier A., Blanchot T., Hervo M., et al. Resurgence of *Bordetella pertussis*, including one macrolide-resistant isolate, France, 2024. *Euro Surveill*, 2024 Aug, vol.29, no.31, pii-2400459.
190. Saedi S., Safarchi A., Moghadam F.T., Heidarzadeh S., Nikbin V.S., Shahcheraghi F. Fha Deficient *Bordetella pertussis* Isolates in Iran with 50 Years Whole Cell Pertussis Vaccination. *Iran J Public Health*, 2021 Jul, vol.50, no.7, Pp.1454-1462.
191. Safarchi A., Octavia S., Nikbin V.S., Lotfi M.N., Zahraei S.M., Tay C.Y., Lamichhane B., Shahcheraghi F., Lan R. Genomic epidemiology of Iranian *Bordetella pertussis*: 50 years after the implementation of whole cell vaccine. *Emerg Microbes Infect*, 2019, vol.8, no.1, Pp.1416-1427.
192. Safarchi A., et al. Genomic dissection of Australian *Bordetella pertussis* isolates from the 2008–2012 epidemic. *J Infect*, 2016 Apr, vol.72, no.4, Pp.468–477.
193. Sato Y., Kimura M., Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet*, 1984 Jan, vol.1, no.8369, Pp.122-126.
194. Schwartz K.L., Kwong J.C., Deeks S.L., Campitelli M.A., Jamieson F.B., Marchand-Austin A., et al. Effectiveness of pertussis vaccination and duration of immunity. *CMAJ*, 2016 Nov, vol.188, no.16, Pp.399-406.
195. Sealey K.L. et al. Genomic analysis of isolates from the United Kingdom 2012 pertussis outbreak reveals that vaccine antigen genes are unusually fast evolving. *J Infect Dis*, 2015 Jul, vol.212, no.2, Pp.294–301.
196. Shahcheraghi F., Lotfi M.N., Nikbin V.S., Shooraj F., Azizian R., Parzadeh M., Torkaman M.R.A., Zahraei S.M. The First Macrolide-Resistant *Bordetella Pertussis* Strains Isolated From Iranian Patients. *Jundishapur J Microbiol*, 2014 Jun, vol.7, no.6, : e10880.
197. Shannon J.L., Fernandez R. C. The C-terminal domain of the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA forms a pore in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol*, 1999 Sep, vol.181, no.18, Pp.5838-5842.

198. Sheridan S.L., Ware R.S., Grimwood K., Lambert S.B. Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection. *JAMA*, 2012 Aug, vol.308, no.5, Pp.454–456.
199. Shuel M., Jamieson F.B., Tang P., Brown S., Farrell D., et al. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *Int J Infect Dis*, 2013 Jul, vol.17, no.6, Pp.413-417.
200. Simmonds K., Fathima S., Chui L., Lovgren M., Shook P., Shuel M., et al. Dominance of two genotypes of *Bordetella pertussis* during a period of increased pertussis activity in Alberta, Canada: January to August 2012. *Int J Infect Dis*, 2014 Dec, no. 29, Pp.223–225,
201. Sintchenko V., Brown M., Gilbert G.L. Is *Bordetella Pertussis* Susceptibility to Erythromycin Changing? MIC Trends among Australian Isolates 1971–2006. *J Anti-microb Chemother*, 2007 Nov, vol.60, no.5, Pp.1178–1179.
202. Skoff T.H., Kenyon C., et al. Sources of Infant Pertussis Infections in the United States. *Pediatrics*, 2015 Oct, vol.136, no.4, Pp.635-641.
203. Smith A.M., Guzman C.A., Walker M.J. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS microbiology reviews*, 2001 May, vol.25, no.3, Pp.309-333.
204. Soofie N., Nunes M.C., Kgagudi P., van Niekerk N., Makgobo T., et al. The Burden of Pertussis Hospitalization in HIV-Exposed and HIV-Unexposed South African infants. *Clin Infect Dis*, 2016 Dec, no.63, suppl 4, Pp.165–173.
205. Spokes P.J., Quinn H.E., McAnulty J.M. Review of the 2008-2009 pertussis epidemic in NSW: notifications and hospitalisations. *N S W Public Health Bull*, 2010 Jul-Aug, vol.21, no.7-8, Pp.167–173.
206. Stefanelli P., Buttinelli G., Vacca P., Tozzi A.E., Midulla F., Carsetti R., Fedele G., Villani A., Concato C., Carannante A., et al. Severe Pertussis Infection in Infants Less than 6 Months of age: Clinical Manifestations and Molecular Characterization. *Hum Vaccines Immunother*, 2017 Jan, vol.13, no.5, Pp.1073–1077.
207. Still G.F. Frederic G. The history of paediatrics. Oxford University Press, London, United Kingdom. 1965. Library: RJ36 S7 1965.

208. Storsaeter J., Hallander H.O., Gustafsson L. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, 1998 Dec; vol.16, no.20, Pp.1907-1916.
209. Tan T., Dalby T., Forsyth K., Halperin S.A., Heininger U. et al. Pertussis across the globe: recent epidemiologic trends from 2000 to 2013. *Pediatr Infect Dis J*, 2015 Sep, vol.34, no.9, Pp.222-232.
210. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST 2025. <https://www.eucast.org/>
211. Tefon B.E., Maass S., Ozcengiz E., Becher D., Hecker M., Ozcengiz G. A comprehensive analysis of *Bordetella pertussis* surface proteome and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine*, 2011 Apr, vol.29, no.19, Pp.3583–3595.
212. Tian S., Hu N., Lou J., Chen K., Kang X., Xiang Z., Chen H., Wang D., Liu N., Liu D., et al. Characteristics of COVID-19 Infection in Beijing. *J Infect*, 2020 Apr, vol.80, no.4, Pp.401–406.
213. Tiwari T., Murphy T.V., Moran J. Recommended Antimicrobial Agents for the Treatment and Postexposure Prophylaxis of Pertussis: 2005 CDC Guidelines. *MMWR Recomm. Rep.* 2006 Jan, vol.54, RR-14, Pp.1–16. mmwrgm@cdc.gov.
214. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979 Sep, vol.76, no.9, Pp.4350-4354.
215. Tsang R.S.W., Lau A.K.H., Sill M.L., Halperin S.A., van Caesele P., Jamieson F., Martin I.E. Polymorphisms of the Fimbria *fim3* Gene of *Bordetella pertussis* Strains Isolated in Canada. *J Clin Microbiology*, 2004 Nov, vol.42, no.11, Pp.5364 – 5367.
216. Uelze L., Grutzke J., Borowiak M., Hammerl J.A., Juraschek K., Deneke C., et al. Typing methods based on whole genome sequencing data. *One Health Outlook*, 2020 Feb, vol.18, no.2-3.
217. van Gent M, Bart MJ, van der Heide HG, Heuvelman KJ, and Mooi FR. 2012. Small mutations in *Bordetella pertussis* are associated with selective sweeps. *PLoS One*, 2012, vol.7, no.9: e46407.

218. van Gent M. et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015 Apr, vol.34, no.4, Pp.821–830.
219. van Gent M. et al. SNP-based typing: a useful tool to study *Bordetella pertussis* populations. *PLoS ONE*, 2011, vol.6, no.5 : e20340.
220. van Loo I.H., Heuvelman K.J., King A.J., Mooi F.R. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol*, 2002 Jun, vol.40, no.6, Pp.1994–2001.
221. Vashishtha V.M., Bansal C.P., Gupta S.G. Pertussis vaccines: position paper of Indian Academy of Pediatrics (IAP). *Indian Pediatr*, 2013 Nov, vol.50, no.11, Pp.1001–1009.
222. Wakimoto Y., Otsuka N., Yanagawa Y., Koide K., Kamachi K., Shibayama K., Teruya K., Kikuchi Y., Oka S. The First Reported Case of *Bordetella pertussis* Bacteremia in a Patient With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Open Forum Infect Dis*, 2022 Feb, vol.9, no.3: ofac020.
223. Wang Z., Cui Z., Li Y., Hou T., Liu X., Xi Y., Liu Y., Li H., He Q. High Prevalence of Erythromycin-Resistant *Bordetella Pertussis* in Xi'an, China. *Clin Microbiol Infect*, 2014 Nov, vol.20, no.11, Pp.825–830.
224. Wang Z., Han R., Liu Y., Du Q., Liu J., Ma C., Li H., He Q., Yan Y. Direct Detection of Erythromycin-Resistant *Bordetella Pertussis* in Clinical Specimens by PCR. *J Clin Microbiol*, 2015 Nov, vol.53, no.11, Pp.3418–3422.
225. Wang Z., Li Y., Hou T., Liu X., Liu Y., Yu T., Chen Z., Gao Y., Li H., He Q. Appearance of Macrolide-Resistant *Bordetella Pertussis* Strains in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013 Sep, vol.57, no.10, Pp.5193–5194.
226. Wang Z., Luan Y., Du Q., Shu C., Peng X., Wei H., Hou T., Liu Y., Liu X., Li Y. The Global Prevalence ptxP3 Lineage of *Bordetella Pertussis* Was Rare in Young Children with the Co-Purified APV Vaccination: a 5 years retrospective study. *BMC Infect Dis*, 2020 Aug, vol.20, no.1, 615 p.
227. Watanabe M., Nagai M. Acellular pertussis vaccines in Japan: past, present and future. *Expert Rev Vaccines*, 2005 Apr, vol.4, no.2, Pp.173–184.

228. Weber C., Boursaux-Eude C., Coralie G., Caro V., Guiso N. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiology*, 2001 Dec, vol.39, no.12, Pp.4396 – 4403.
229. Weigand, M.R. Screening and genomic characterization of filamentous hemagglutinin-deficient *Bordetella pertussis* / M.R. Weigand, L.C. Pawloski, Y. Peng [et al.] // *Infect Immun.* – 2018. – Vol. 86. – № 4: e00869–17.
230. Weigand M.R. et al. Genomic Survey of *Bordetella pertussis* Diversity, United States, 2000–2013. *Emerg Infect Dis*, 2019 Apr, vol.25, no.4, Pp.780–783.
231. Weisblum B. Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995 Mar, vol.39, no.3, Pp.577–585.
232. Weiss A.A., Melton A.R., Walker K.E., Andraos-Selim C., Meidl J.J. Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun*, 1989 Sep, vol.57, no.9, Pp.2674-2682.
233. Weiss, A.A. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model / A.A. Weiss, M.S. Goodwin // *Infection and immunity.* – 1989. – Vol.57. – № 12. – P. 3757-3764.
234. Weiss, A.A. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis* / A.A. Weiss, E. Hewlett, G.A. Myers, S. Falkow // *Infection and immunity.* – 1983. – Vol. 42. – № 1. – P. 33-41.
235. Willems, R. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation / R. Willems, A. Paul, H.G. van der Heide [et al.] // *EMBO J.* – 1990. – Vol. 9. – № 9. – P. 1460-2075.
236. Willems, R.J. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA / R.J. Willems, C. Geuijen, H.G. van der Heide [et al.] // *Molecular Microbiology.* – 1994. – Vol.11. – № 2. – P. 337-347.
237. Williamson, Y.M. A gel-free proteomic-based method for the characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates / Y.M. Williamson, H. Moura, K. Simmons [et al.] // *Journal of Microbiological Methods.* – 2012. – Vol.90. – № 2. – P. 119–133.

238. Wilson, K.E. Bordetella Pertussis Isolates with a Heterogeneous Phenotype for Erythromycin Resistance / K.E. Wilson, P.K. Cassiday, T. Popovic, G.N. Sanden // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – Vol. 40. – № 8. – P. 2942–2944.
239. Witt, M.A. Reduced risk of pertussis among persons ever vaccinated with whole cell pertussis vaccine compared to recipients of acellular pertussis vaccines in a large US cohort / M.A. Witt, L. Arias, P.H. Katz [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2013. – Vol.56. – № 9. – P. 1248–1254.
240. World Health Organisation (WHO) Laboratory Manual for the Diagnosis of Whooping Cough Caused by Bordetella Pertussis/Bordetella Parapertussis. Update 2014. World Health Organisation (WHO); Geneva, Switzerland: 2014. ISBN: WHO_IVB_14.03_eng.
241. Wu, S. Molecular epidemiology of Bordetella pertussis and analysis of vaccine antigen genes from clinical isolates from Shenzhen, China / S. Wu, Q. Hu, C. Yang [et al.] // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobial* – 2021. – Vol. 20. – № 1. – P. 53.
242. Wu, X. Cross-Sectional Study Revealing the Emergence of Erythromycin-Resistant Bordetella Pertussis Carrying PtxP3 Alleles in China / X. Wu, Q. Du, D. Li [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol.13. – P. 2504.
243. Xu, Z. Pertactin-negative and filamentous hemagglutinin-negative Bordetella pertussis, Australia, 2013-2017 / Z. Xu, S. Octavia, L.D.W. Luu [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2019. – Vol.25. – № 6. – P.1196–1199.
244. Xu, Z. Genomic Epidemiology of Erythromycin-Resistant Bordetella Pertussis in China / Z. Xu, Z. Wang, Y. Luan [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2019. – Vol.8. – № 1. – P.461–470.
245. Xu, Y. Whole-genome sequencing reveals the effect of vaccination on the evolution of Bordetella pertussis / Y. Xu, B. Liu, K. Gröndahl-Yli-Hannuksila [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol.5: e12888.
246. Yamaguchi, T. The First Report of Macrolide-Resistant Bordetella Pertussis Isolation in Japan / T. Yamaguchi, Y. Kawasaki, C. Katsukawa [et al.] // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 73. – № 5. – P. 361–362.

247. Yang, Y. Variation in *Bordetella Pertussis* Susceptibility to Erythromycin and Virulence-Related Genotype Changes in China (1970–2014) / Y. Yang, K. Yao, X. Ma [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 9: e0138941.
248. Yao, K. The Epidemic of Erythromycin-Resistant *Bordetella Pertussis* with Limited Genome Variation Associated with Pertussis Resurgence in China / K. Yao, J. Deng, X. Ma [et al.] // Expert Review of Vaccines. – 2020. – Vol. 19. – № 11. – P. 1093–1099.
249. Yao, S.M. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Bordetella Pertussis* in Taiwan Prompted by a Case of Pertussis in a Paediatric Patient / S.M. Yao, G.J. Liaw, Y.Y. Chen [et al.] // Journal of Medical Microbiology. – 2008. – Vol. 57. – Pt.12. – Pp.1577–1580.
250. Zarei, S. Short term reactogenicity of a triple Diphtheria-Tetanus-Whole cell pertussis vaccine in Iranian infants / S. Zarei, M. Jeddi-Tehrani, H. Zeraati [et al.] // Iranian Journal of Public Health. – 2009. – Vol. 38. – № 1. – P.100–111.
251. Zhang, J. Macrolide Susceptibility and Molecular Characteristics of *Bordetella Pertussis* / J. Zhang, D. Zhang, X. Wang, X. Wei, H. Li // Journal of International Medical Research. – 2022. – Vol. 50. – № 2: e03000605221078782.
252. Zhang, Q. High-Resolution Melting Analysis for the Detection of Two Erythromycin-Resistant *Bordetella Pertussis* Strains Carried by Healthy Schoolchildren in China / Q. Zhang, M. Li, L. Wang, T. Xin, Q.He // Clinical Microbiology and Infection. – 2013. – Vol.19. – № 6. – P.260–262.
253. Zhang, S. Complete genome sequence of *Bordetella pertussis* CS, a Chinese pertussis vaccine strain / S. Zhang, Y. Xu, Z. Zhou [et al.] // Journal of bacteriology. – 2011. – Vol. 193. – № 15. – Pp.4017-4018.
254. Zomer, A. *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines / A. Zomer, N. Otsuka, Y. Hiramatsu [et al.] // Microbial genomics. – 2018. – Vol. 4. – № 5:e000180.