

## КЛИНИКО–ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ *BORDETELLA PERTUSSIS* У КОНТАКТНЫХ ЛИЦ В СЕМЕЙНЫХ ОЧАГАХ

Ю.В. Нестерова<sup>1</sup>, А.Ю. Медкова<sup>2</sup>, И.В. Бабаченко<sup>1</sup>, Е.Г. Семин<sup>2</sup>, Е.Л. Калисникова<sup>1</sup>, Л.Н. Синяшина<sup>2</sup>, Г.И. Каратаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

### Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci

Yu.V. Nesterova<sup>1</sup>, A.Yu. Medkova<sup>2</sup>, I.V. Babachenko<sup>1</sup>, E.G. Semin<sup>2</sup>, E.L. Kalisnikova<sup>1</sup>, L.N. Sinyashina<sup>2</sup>, G.I. Karataev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup>National Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

#### Резюме

*Цель:* оценка длительности и частоты выявления ДНК *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах коклюша.

*Материалы и методы.* По контакту с больными детьми раннего возраста обследовано 116 лиц из 59 семейных очагов коклюша. ДНК *B. pertussis* в назофарингеальных мазках выявляли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), используя тест-систему, разработанную в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи (Москва). Бактериальную нагрузку и длительность выявления геном-эквивалентов (ГЭ) ДНК *B. pertussis* определяли в динамике через 1, 3 и 6 месяцев.

*Результаты.* Среди контактных лиц в семейных очагах взрослые составили 59,48 %, подростки и школьники – 10,35 % и 12,07 % соответственно. Кашель отсутствовал у 35,34 % контактных лиц, у 20,69 % отмечался редкий сухой кашель, у 24,14 % – сухой навязчивый и у 19,83 % – типичный приступообразный кашель. Ни у кого из контактных членов семей не был диагностирован коклюш, хотя у 64,66 % обследуемых лиц имелись клинические признаки заболевания, преимущественно его атипичной формы (у 44,83 %). Среди носителей *B. pertussis* взрослые составили 82,92 %, среди заболевших атипичными формами коклюша – 51,92 %.

При исследовании носоглоточных мазков методом ПЦР-РВ у 86,1 % контактных лиц выявили ДНК *B. pertussis*. Через 3 месяца у 90 % контактных продолжали выявлять ДНК в минимальном количестве –  $10^1$ – $10^2$  ГЭ/мл образце. Через 6 месяцев санацию *B. pertussis* регистрировали у 50 % обследованных. В 12,1 % исследованных образцов выявлены авирулентные формы возбудителя коклюша, сформированные в результате перемещения IS481 в оперон *bvgAS*.

*Заключение.* У 86,1 % контактных лиц в семейных очагах длительно (от 3 до 6 месяцев) отмечалось выявление из носоглотки генетических маркеров возбудителя коклюша, в том числе у 35,34 % обследованных при

#### Abstract

*Goal.* Evaluation of duration and frequency of *Bordetella pertussis* DNA detection in contact persons in family foci of whooping-cough.

*Materials and methods.* 116 persons from 59 family foci of pertussis were examined in contact with sick young children. The DNA of *B. pertussis* bacteria in nasopharyngeal swabs was detected by real-time PCR (PCR-RV) using a test system developed at Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Moscow). The bacterial load and the duration of the release of genomic equivalents (GE) of *B. pertussis* DNA were determined in dynamics at 1, 3 and 6 months.

*Results.* Among the contact persons in family foci, adults accounted for 59,48 %, adolescents and schoolchildren – 10,35 % and 12,07 % respectively. Cough was absent in 35,34 % of contact persons, 20,69 % had a rare dry cough, 24,14 % had a dry compulsive cough and 19,83 % had a typical cough. None of the contact family members were diagnosed with whooping cough, although 64.66 % of the patients had clinical signs of the disease, mainly its atypical form (44.83 %). Among the carriers of *B. pertussis* adults accounted for 82.92 %, among patients with atypical forms of whooping cough – 51.92 %. In the study of nasopharyngeal swabs using the PCR-RV method, it was found that 86.10 % of the contact persons detected DNA of *B. pertussis*. After 3 months in 90 % of the contacts, the DNA of pertussis causative agent was detected in a minimum amount of  $10^1$ – $10^2$  GE/ml in the sample. After 6 months, *B. pertussis* was sanitized in 50 % of the examined patients. 12.5 % of the samples identified avirulent forms of the causative agent of pertussis, formed as a result of movement of IS481 in operon *bvgAS*.

*The conclusion.* In 86.1 % of contact persons in family foci for a long time (from 3 to 6 months), detection of genetic markers of the causative agent of pertussis from the nasopharynx was noted, including 35.34 % of those examined in the absence of cough. This, along with the reported genetic mutation in operon *bvgAS* in 12.5 % of cases, can characterize the presence of persistence of *B. pertussis*, explaining its

отсутствии кашля. Это, наряду с зарегистрированной в 12,5% случаев генетической мутацией в опероне *bvgAS*, может характеризовать наличие персистенции *B. pertussis*, объясняя ее сохранение в циркуляции в условиях массовой вакцинопрофилактики.

**Ключевые слова:** коклюш, контактные гети и взрослые, ПЦР в режиме реального времени, персистенция.

## Введение

Коклюш продолжает лидировать в группе управляемых инфекционных заболеваний, несмотря на проводимую в мире массовую вакцинацию с начала 1950-х гг. [1]. В последние десятилетия отмечается значительный рост числа лабораторно подтвержденных случаев коклюша среди подростков и взрослых [2–4], распространение атипичных форм заболевания, установлено бессимптомное носительство бактерий *B. pertussis* [2, 5]. В США, где охват детского населения прививками достигает 95%, с начала 2000-х гг. отмечается рост заболеваемости коклюшем, приближающейся в настоящее время к довакцинальному периоду [6, 7]. Увеличилась заболеваемость в Италии и Англии [8, 9]. Отмечен рост числа регистрируемых случаев коклюша в Москве и Санкт-Петербурге на фоне гиподиагностики и сохранения общего уровня заболеваемости в России [10, 11]. В Российской Федерации (РФ) в 2015 г. зарегистрирован рост показателя заболеваемости коклюшем на 36,8%, с преобладанием детей в возрасте 7–14 лет (37,9%). В 2016 г. тенденция роста сохранилась с превышением показателя предыдущего года на 27,4% и среднескользящих показателей заболеваемости — в 1,4 раза (5,6 на 100 тыс. населения в 2016 г. против 4,0 в 2006–2015 гг.) [12, 13]. Доля взрослых в возрастной структуре зарегистрированных случаев заболевания минимальна. Согласно сведениям Роспотребнадзора (форма №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»), в РФ в 2016 г. зарегистрировано 8229 случаев коклюша, из которых только 300 случаев — у лиц 18 лет и старше; в 2017 г. из 5415 случаев коклюша только 217 случаев — у взрослых.

Клиническая и лабораторная гиподиагностика коклюша обусловлена как отсутствием преемственности между педиатрами и терапевтами, настороженности врачей в отношении коклюша у взрослых, так и недоступностью высокочувствительных методов ранней лабораторной диагностики [2], необходимой для выявления атипичных форм коклюша, широко распространенных в условиях высокого охвата детей профилактическими прививками. Для улучшения диагностики коклюша необходима стандартизация лабораторных методов, повышение их чувствительности и

*preservation in circulation in the conditions of mass vaccine prevention.*

**Key words:** whooping cough, contact, children and adults, real-time PCR, persistence.

специфичности при обследовании максимально большого числа пациентов и контактных лиц. Исследования, проведенные в 2006–2009 гг., показали, что выявление бактерий *B. pertussis* методом ПЦР существенно повышает лабораторную диагностику коклюша по сравнению с бактериологическим посевом на 13–30% [14, 15]. Чувствительность культурального метода составляет 15% при специфичности 100%, метода ПЦР — 45% и 85% соответственно [15]. С помощью ПЦР доказана возможность носительства возбудителя коклюша в различных фазовых состояниях вирулентности даже «практически здоровыми» подростками и взрослыми, особенно в семьях, где был диагностирован коклюш [5, 16].

Переход бактерий *B. pertussis* из вирулентной фазы в авирулентную (из I фазы в IV), вероятно, способствует персистенции возбудителя в иммунорезистентном организме. Экспрессия абсолютного большинства детерминант вирулентности бактерий *B. pertussis* контролируется на уровне транскрипции опероном *bvgAS*. Проведенные ранее исследования показали, что нарушение структуры оперона *bvgAS* за счет сайт-специфической интеграции IS-элементов 481 и 1002 приводит к переходу бактерий *B. pertussis* из вирулентного фазового состояния в авирулентное. Инсерционные *Bvg* мутанты *B. pertussis* не синтезируют факторы вирулентности и лишены поверхностных антигенов, взаимодействующих с антителами иммунного организма, способны «ускользнуть» от иммунного ответа и персистировать в организме человека. В авирулентном состоянии возбудитель коклюша лучше переносит воздействие факторов внешней среды и имеет преимущество в процессе аэрозольного распространения инфекции. Вероятно, для распространения инфекции наличие кашля не является необходимым условием, как было показано в экспериментах на обезьянах, когда передача возбудителя от особи к особи происходила в отсутствие типичного признака коклюша — спастического кашля [17]. Учитывая, что коклюш является исключительно антропонозным заболеванием, можно предположить, что именно среди взрослого населения и подростков формируется источник инфекции для наиболее уязвимой группы детей в возрасте до одного года и новорожденных, у которых коклюш протекает в наиболее тяжелых формах.

Нами разработана тест-система ПЦР-РВ, позволяющая обнаруживать единичные геном-эквиваленты (ГЭ) *B. pertussis* у больных на поздних сроках заболевания, у длительно кашляющих пациентов, переносящих коклюш в атипичных формах, и определять фазовый состав бактерий *B. pertussis* — долю инсерционных авирулентных  $Bvg^+$  мутантов в популяции [16, 18, 19].

**Цель исследования** — оценка длительности и частоты выявления ДНК *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах коклюша.

### Материалы и методы

Исследование проводили на базе Детского научно-клинического центра инфекционных болезней. По контакту с больными детьми с лабораторно подтвержденным коклюшем, госпитализированными в Детскую городскую клиническую больницу № 5 им. Н.Ф. Филатова (ДГКБ № 5 им. Н.Ф. Филатова) г. Санкт-Петербурга, были обследованы 116 контактировавших с ними родственников из 59 семейных очагов. Обследование лиц, контактировавших с больными, состояло в детальном сборе анамнеза, включая вакцинальный статус, визуальном осмотре носоглотки, измерении температуры тела, отборе материала для идентификации возбудителя коклюша.

Материал для выявления ДНК *B. pertussis* отбирали с задней стенки носоглотки через нижний носовой ход с помощью гибких назофарингеальных вельор-тампонов (СОРАН, Италия). Для выделения ДНК *B. pertussis* смывы с назофарингеальных тампонов центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин (центрифуга «Eppendorf», Германия). Осадок ресуспендировали в растворе фосфатного буфера, ДНК выделяли с использованием магнитного сорбента (Promega, США) [18]. ДНК с магнитного сорбента смывали в 200 мкл трис-ЭДТА буфера и

хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Бактериальную нагрузку в верхних дыхательных путях и длительность выявления *B. pertussis* у обследованных определяли методом ПЦР-РВ в динамике через 1, 3 и 6 месяцев от момента постановки диагноза больному ребенку в очаге с помощью разработанной нами тест-системы [18]. Для проведения качественной ПЦР использовали коммерческий набор «АмплиСенс @Bordetella multi-FL». Выявление инсерционных мутантов с помощью нестед-ПЦР проводили с праймерами и в условиях, описанных нами ранее [20]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010 и методов статистического анализа, принятых в биологии и медицине [21].

### Результаты и обсуждение

По контакту с 80 больными детьми с лабораторно подтвержденным коклюшем, получавшими лечение в ДГКБ № 5 им. Н.Ф. Филатова г. Санкт-Петербурга, было обследовано 116 контактных лиц в 59 семейных очагах. Возрастная структура контактных лиц представлена в таблице 1, из которой видно, что среди контактных достоверно преобладали взрослые старше 18 лет (59,5%). Школьники и подростки составили 22,4%. Доля детей раннего и дошкольного возраста составляла 18,1%.

Привитыми в анамнезе были 102 человека, не привитыми — 13 детей в возрасте 2–10 лет, 1 ребенок не закончил тур вакцинации. При сборе анамнеза и осмотре было установлено, что у 35,3% контактных лиц кашель отсутствовал, у 19,8% человек отмечался типичный приступообразный, спазматический кашель, а 44,8% обследованных жаловались на сухой кашель (табл. 2). Никому из контактных членов семьи диагноз «Коклюш» выставлен не был, хотя клинические признаки заболевания регистрировали у 64,7% обследованных лиц, в том числе его типичной формы — у 19,8%.

Таблица 1

**Возрастная структура обследованных контактных лиц в семейных очагах**

Возрастные группы	№ группы	Возраст	Абс. количество	% от общего числа обследованных	P
Взрослые	1	18 лет и старше	69	59,5	1–2,1–3, 1–4 <0,05, 1–5 <0,01
Подростки	2	13–17 лет	12	10,4	>0,05
Школьники	3	7–12 лет	14	12,1	>0,05
Дошкольники	4	3–6 лет	16	13,8	>0,05
Дети раннего возраста	5	Менее 2 лет	5	4,3	>0,05

Клиническая характеристика контактных лиц в семейных очагах коклюша

Характер кашля	№ группы	Абс. количество контактных	% от общего числа контактных	Средний возраст обследованных (в годах)	Вакцинальный статус
Типичный приступообразный (спазматический)	1	23	19,8	14,6±2,62*	Привиты по возрасту – 13 чел; не привиты – 9 чел; не закончен тур вакцинации – 1 чел.
Сухой навязчивый	2	28	24,1	24,1±2,81	Привиты по возрасту – 26 чел; не привиты – 2 чел.
Сухой редкий	3	24	20,7	22,2±3,54	Привиты по возрасту – 22 чел.; не привиты – 2 чел.
Отсутствие кашля	4	41	35,3	32,4±2,25**	Привиты по возрасту – 41 чел.

\* P1 – 2 < 0,05; \*\*P1 – 4 < 0,001.

Обращают на себя внимание достоверные различия в возрасте обследованных контактных лиц при анализе в зависимости от наличия и характера кашля (см. табл. 2), что потребовало уточнения возрастной структуры обследованных в каждой из подгрупп. Распределение контактных лиц в зависимости от характера кашля и возраста представлено на рисунке 1.

Из рисунка 1 видно, что в группе лиц, у которых отсутствовал кашель, абсолютно доминировали взрослые (82,9%) и не встречались дети первых 2 лет жизни. Среди контактных с атипичной формой коклюша, у которых длительно сохранялся сухой кашель, взрослые составляли 51,9%, школьники и подростки – 32,7%. Из 23 контактных с характерным приступообразным кашлем, которые переносили типичные формы коклюша, преимущественно легкой степени тяжести, взрослые и дети 3–6 лет встречались с одинаковой частотой (в 34,8% случаев – каждый третий). Среди обследованных контактных лиц этой группы отмечалось

максимальное количество непривитых детей раннего и дошкольного возраста (см. табл. 2).

При первичном исследовании носоглоточных мазков методом ПЦР-РВ у 86,1% контактных лиц выявили ДНК бактерий *B. pertussis*. Количество и динамика выявления ДНК в мазках из носоглотки у контактных лиц представлены на рисунках 2 и 3.

Анализ количества ДНК возбудителя коклюша у контактных лиц показал, что отрицательные результаты чаще выявляли у взрослых и подростков, чем у детей (14,6% против 8,3%,  $p > 0,05$ ). Количество ДНК у контактных было на уровне десятков – сотен ГЭ ( $10^{1-2}$  ГЭ/мл) у 58,3% детей и у 49,3% взрослых. Средние и высокие количества возбудителя у детей выявлялись в 33,3%, у взрослых – в 36,8% случаев ( $p > 0,05$ ). Это соответствовало клинической картине, так как взрослые и дети дошкольного возраста с одинаковой частотой встречались среди контактных лиц, переболевших за период наблюдения недиагностированными типичными формами коклюша (см. рис. 1).



Рис. 1. Распределение контактных лиц в зависимости от характера кашля и возраста

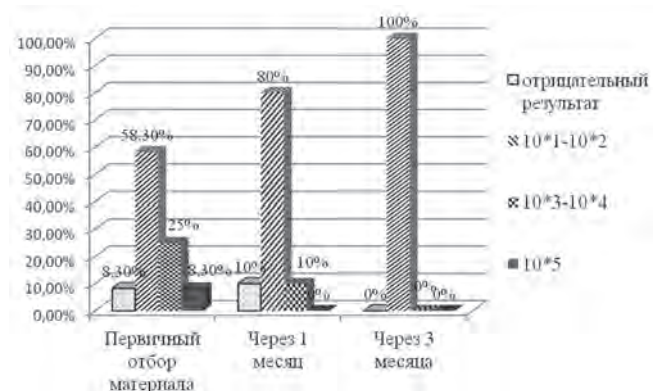
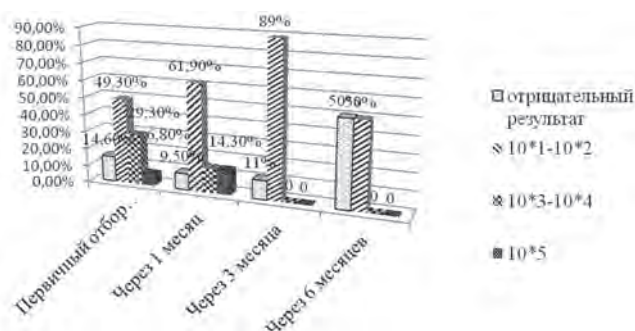
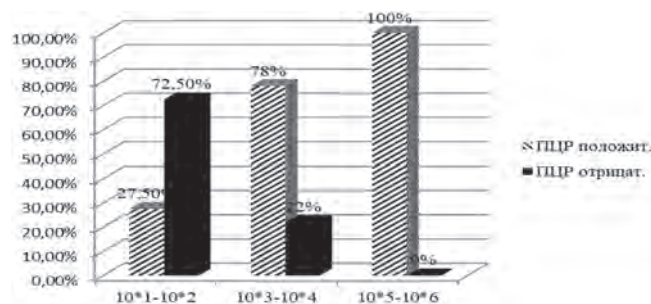


Рис. 2. Динамика выявления *Bordetella pertussis* (ГЭ/мл) у контактных детей из семейных очагов коклюша





**Рис. 3.** Динамика выявления *Bordetella pertussis* (ГЭ/мл) у контактных взрослых и подростков из семейных очагов коклюша



**Рис. 4.** Частота положительных результатов качественной ПЦР (в %) в зависимости от количества ДНК возбудителя (в ГЭ /мл)

При повторном обследовании наблюдаемых через 1 и 3 месяца динамика выявления ДНК *B. pertussis* была однонаправленной у детей и взрослых с существенным доминированием низких количеств генетического материала возбудителя коклюша ( $10^1 - 10^2$  ГЭ/мл) у 80% и 100% детей, а также у 61,9% и 89% взрослых. Через 6 мес. у половины обследованных взрослых ДНК не выявляли, а у остальных число ГЭ не превышало сотни копий (см. рис. 3).

Сопоставляя количество выделяемых ГЭ ДНК *B. pertussis* у больных и контактных разного возраста, мы выявили существенно меньшие их количества у контактных, по сравнению с больными.

На рисунке 4 представлены результаты сравнительного исследования 94 мазков с задней стенки носоглотки больных коклюшем и контактных из семейных очагов с помощью коммерческой и разработанной нами тест-системы. Исследование показало, что у лиц с высокой бактериальной нагрузкой ( $10^5 - 10^6$  ГЭ/мл) качественная ПЦР выявляет ДНК *B. pertussis* в 100% случаев, при нагрузке  $10^3 - 10^4$  коп/мл – в 78%, при низкой бактериальной нагрузке – лишь в 27,5% случаев.

В таблицах 3 и 4 представлены результаты анализа сравнительной эффективности использованных тест-систем для выявления ДНК возбудителя коклюша с помощью таблиц сопряженности и оценки хи-квадрата.

Проведенный анализ доказал достоверно большую эффективность разработанной нами тест-системы, особенно при выявлении возбудителя у контактных бессимптомных носителей *B. pertussis*, подростков и взрослых, для которых характерна низкая бактериальная нагрузка.

В предыдущих исследованиях мы уже демонстрировали высокую диагностическую эффективность разработанной нами тест-системы ПЦР-РВ. Это достигается тем, что в качестве специфической мишени для выявления ДНК *B. pertussis* выбрана повторяющаяся последовательность IS481, присутствующая в 238 копиях в хромосоме возбудителя коклюша. Именно столь высокая копияность ДНК-мишени обуславливает высокую чувствительность при регистрации ГЭ ДНК *B. pertussis*. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет менее 0,1 ГЭ ДНК *B. pertussis*. [19]. Аналогичные результаты описаны в работе Knorr L.

Таблица 3

**Распределение больных и контактных из семейных очагов коклюша в зависимости от возрастной группы при наличии положительных результатов количественного (2) и качественного (1) методов ПЦР-РВ**

ПЦР	Больные дети	Больные подростки	Контактные дети	Контактные подростки	Контактные взрослые	Итого
1	59	4	1	0	2	66
Row%	89,39	6,06%	1,52%	0,00%	3,03%	—
2	64	14	4	2	10	94
Row%	68,09	14,89%	4,26%	2,13%	10,64%	

**Оценка сопряженности количественного и качественного ПЦР у больных и контактных в семейных очагах с применением метода Хи-квадрат**

	Chi-square	df	p
Pearson Chi-square	10,30782	df = 4	p = ,03555
M-L Chi-square	11,68396	df = 4	p = ,01986

et al, декларирующей чувствительность метода ПЦР — РВ на уровне 0,01 ГЭ [22]. В настоящем исследовании показана значимость применения разработанной тест-системы для обследования контактных лиц в очагах коклюшной инфекции, среди которых много взрослых — бессимптомных носителей возбудителя и больных атипичными формами заболевания.

Длительное выявление генетических маркеров возбудителя коклюша при исследовании динамики бактериальной нагрузки в носоглотке контактирующих с больными членов их семей, как бессимптомных носителей, так и заболевших в период наблюдения типичными и атипичными формами коклюша, позволило нам предпринять исследования структуры популяции персистирующих бактерий на разных стадиях развития инфекционного процесса и бактерионосительства.

Проведенные нами ранее исследования показали, что количество мутантов у больных с острой формой коклюша на ранних стадиях заболевания, а также на первой неделе после экспериментальной инфекции мышей и обезьян минимально и составляет около  $10^{-5}$  от общего числа бактерий [19, 20, 23]. В процессе развития инфекции на фоне уменьшения общего числа регистрируемых бактерий, происходит нарастание доли *Bvg*-мутантов, сформированных в результате сайт-специфической интеграции IS 481 в оперон *bvgAS*, что приводит к увеличению числа авирулентных бактерий *B. pertussis* и изменению фазового состава популяции.

Настоящая работа позволяет характеризовать длительность персистенции возбудителя коклюша в семейных очагах у лиц, контактировавших с больными детьми, как «практически здоровых», так и кашляющих членов семей, а также дать предварительную характеристику фазового состава популяции бактерий, персистирующих в носоглотке обследованных детей и взрослых.

Исходя из предыдущего опыта, для анализа отбирали препараты, содержащие не менее  $10^2 - 10^3$  ГЭ/мл. Порог минимального числа ГЭ в образце обусловлен предельной чувствительностью метода определения специфической мишени, сформированной в результате интеграции IS481 в оперон *bvgAS*. По результатам титрования клонированной последовательности он составляет несколько

копий. То есть чувствительность регистрации инсерционного мутанта не превышает 3–5 копий в 5 мкл образца, тогда как ГЭ *B. pertussis* составляет менее 0,1 ГЭ из-за большой копийности последовательности IS481.

Нами обследовано 24 образца, удовлетворяющих сформулированным условиям, — содержащих от 3 до 5 копий ГЭ в 5 мкл раствора. Для того чтобы понизить порог выявления искомого события интеграции, нами использован метод нестед — ПЦР, описанный нами ранее при анализе популяций бактерий, выделенных от макак, резус [20] и позволяющий, как правило, повысить чувствительность выявления минимальных количеств ДНК-мишени. Нестед — ПЦР 24 отобранных образцов и последующее сиквенирование полученных продуктов амплификации позволило выявить 3 образца ДНК, содержащей интеграцию IS481 в опероне *bvgAS* (12,5%). 2 образца получены от взрослых (22 лет и 35 лет) и одного привитого по возрасту ребенка 4 лет. У всех троих кашель отсутствовал в течение всего периода наблюдения, то есть они являлись бессимптомными носителями *B. pertussis*, генетические маркеры которых выделялись в низких концентрациях ( $10^2 - 10^3$  ГЭ/мл).

Частота выявления генетических изменений в ДНК *B. pertussis* контактных лиц составила 12,5%.

### Заключение

На фоне высокого охвата детей профилактическими прививками против коклюша основными источниками заражения младенцев бактериями *B. pertussis* являются взрослые и подростки. У 86,1% контактных лиц в семейных очагах длительно — от 3 до 6 месяцев (срок наблюдения) наблюдалось выявление из носоглотки возбудителя коклюша, в том числе у 35,34% при полном отсутствии кашля. Это показывает необходимость более тщательного наблюдения за контактными лицами, независимо от возраста и вакцинального статуса. Особенностью современного течения коклюша являются изменение возрастной структуры с ростом доли взрослых и подростков, у которых чаще развиваются легкие или атипичные формы заболевания, протекающие без типичных приступов спазматического кашля, но с длительным сухим редким или навязчивым покашливанием.

Установленное нами длительное выявление ДНК *B. pertussis* у контактных членов семьи, в том числе бессимптомных носителей, а также наличие авирулентных форм возбудителя коклюша, сформированных в результате перемещения IS481 в оперон *bvgAS*, которые могут представлять собой длительно персистирующие бактерии, позволяет объяснить поддержание циркуляции возбудителя даже в условиях массовой вакцинопрофилактики. Способность авирулентных форм передаваться новому хозяину, переходить в вирулентную форму возбудителя и вызывать заболевание у неиммунных детей и взрослых, а также уровень эпидемиологической значимости носителей *B. pertussis* требуют пристального внимания и дальнейшего изучения. Полученные данные подтверждают более широкое, чем принято считать, распространение возбудителя коклюша и его циркуляции на фоне массовой вакцинации. Важным фактором, повышающим диагностические возможности клиницистов, является широкое и повсеместное внедрение высокочувствительных методов ранней диагностики с помощью современных тест-систем, способствующих выявлению минимального количества возбудителя. Частота и сроки выделения генетического материала *B. pertussis* у контактных лиц подтверждают необходимость проведения дальнейших исследований по изучению атипичных форм коклюша, особенно у взрослых и подростков, участвующих в эпидемическом процессе поддержания циркуляции возбудителя коклюша и способствующих сохранению заболеваемости младенцев и детей раннего возраста, сохраняющих риск тяжелого течения и неблагоприятных исходов. Все вышеперечисленные факторы диктуют необходимость введения в Национальный календарь прививок в России максимально ранней вакцинации младенцев и ревакцинации подростков и взрослых, прежде всего вакцинами, обеспечивающими противобактериальный иммунитет. Расширение возможностей календаря прививок позволит не только уменьшить число тяжелых форм коклюша с развитием осложнений, но и значительно снизить циркуляцию возбудителя.

#### Литература

1. Чуприна, Р.П. Иммунопрофилактика и заболеваемость коклюшем. Настоящее и будущее / Р.П. Чуприна, Н.А. Озерецковский, И.А. Алексеева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2014. — №6 (79). — С. 89–99.
2. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(2):326-82.
3. Wood N, McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev.* 2008; 9(3):201-11.
4. Бабаченко, И.В. Коклюш у детей / И.В. Бабаченко. — М: Комментарий, 2014. — 176 с.
5. Медкова, А.Ю. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis* / А.Ю. Медкова [и др]. // Детские инфекции. — 2010. — № 4. — С.19–22.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis epidemic — Washington, 2012. *MMWR.* 2012; 61(28):517-22.
7. Rosewell A, Spokes PJ, Gilmour RE. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull.* 2012; 23(10):171-8.
8. Gonfiantini MV, Carloni E, Gesualdo F, et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Euro Surveill.* 2014; 19(40):20921.
9. Laboratory-confirmed pertussis in England and Wales: data to end — October 2014. *Health Protection Report.* 2014; 8(47): 2-5. Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/387812/hpr4714.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/387812/hpr4714.pdf)
10. Иозефович, О.В. Распространённость коклюша у длительно кашляющих детей 6-17 лет, привитых в раннем возрасте АКДС вакциной / О.В. Иозефович [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2012. — №5(66). С.56-59.
11. Лобзин, Ю.В. Проблемы вакцинопрофилактики: краткая история, современное состояние и пути решения / Ю.В. Лобзин, С.М. Харит // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. — 2014. — № 6. — С. 30–37.
12. Миндлина, А.Я. О необходимости совершенствования тактики иммунопрофилактики коклюша / А.Я. Миндлина, Р.В. Полибин // Пульмонология. — 2016. — № 5. — С. 560–569.
13. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году», 26 мая 2017 г. — <http://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/0b3/gosudarstvennyy-doklad-2016.pdf>
14. Van der Zee A, Schellekens JFP, Mooi FR. Laboratory diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(4):1005-1026.
15. Kline J.M., Lewis W.D., Smith E.A., Tracy L.R., Moerschel S.K. Pertussis: A Reemerging Infection. *American Family Physician.* 2013; 88(8): 507-514.
16. Медкова, А.Ю. Выявление инсерционных мутантов авирулентных *bvg*-мутантов *Bordetella pertussis* у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и практически здоровых людей / А.Ю. Медкова и [др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2010. — № 4. — С. 9–13.
17. Медкова, А.Ю. Эпизоотический очаг коклюша у обезьян вида *Paroia gamadyas* / А.Ю. Медкова [и др.] // Журнал инфектологии. — 2015. — Т. 7, № 3. — С. 103–111.
18. Патент № 2506316 Российская Федерация. Способ диагностики коклюша и определения авирулентных мутантов возбудителя и диагностический набор / Каратаев Г.И., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю.; опубл. 10.02.2014.
19. Медкова, А.Ю. Инсерционная инактивация оперона вирулентности бактерий *Bordetella pertussis* в диагностике типичных и атипичных форм коклюша: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.Ю. Медкова. — М.: 2013. — 27 с.
20. Каратаев, Г. И. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis* / Г. И. Каратаев [и др.] // Генетика. — 2016. — Т. 52, № 3. — С. 1–9.
21. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Практика, 1999. — 459 с
22. Knorr L, Fox JD, Tilley PA, Ahmed-Bentley J. Evaluation of real-time PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection // *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 62. doi: 10.1186/1471-2334-6-62
23. Медкова А.Ю. Накопление авирулентных инсерционных *Bvg*-мутантов *Bordetella pertussis* при экспериментальной инфекции лабораторных мышей / А.Ю. Медкова

[и др.] // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. — 2013. — № 4. — С. 22–25.

#### References

1. Chuprinina R.P., Ozereckovskij N.A., Alekseeva I.A. Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika. 2014; 6(79):89-99 (in Russian).
2. Mattoo S., Cherry J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(2):326-82.
3. Wood N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. Paediatr Respir Rev. 2008; 9(3):201-11.
4. Babachenko, I.V. Whooping cough in children. / I.V Babachenko. M: Kommentarii, 2014. — 176 (in Russian).
5. Medkova A.Yu., Alyapkina Yu.S., Sinyashina L.N., et al. Detskie infekcii. 2010; 4: 19-22 (in Russian).
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis epidemic — Washington, 2012. MMWR. 2012; 61(28):517-22.
7. Rosewell A, Spokes PJ, Gilmour RE. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. NSW Public Health Bull. 2012; 23(10):171-8.
8. Gonfiantini MV, Carloni E, Gesualdo F, et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. Euro Surveill. 2014; 19(40):20921.
9. Laboratory-confirmed pertussis in England and Wales: data to end — October 2014. Health Protection Report. 2014; 8(47): 2-5. Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/387812/hpr4714.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/387812/hpr4714.pdf)
10. Iozefovich O.V., Harit S.M., Kaplina S.P., et al. Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika. 2012; 5(66): 56-59 (in Russian).
11. Lobzin Yu.V., Harit S.M. Epidemiologiya i infekcionnye bolezni. Aktual'nye voprosy. 2014; 6: 30-37 (in Russian).
12. Mindlina A.Ya., Polibin R.V. Pul'monologiya. 2016; 5: 560-569 (in Russian).
13. State report "On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2016", May 26, 2017 (in Russian) <http://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/0b3/gosudarstvennyy-doklad-2016.pdf>
14. Van der Zee A, Schellekens JFP, Mooi FR. Laboratory diagnosis of Pertussis. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(4):1005-1026.
15. Kline J.M., Lewis W.D., Smith E.A., Tracy L.R., Moerschel S.K. Pertussis: A Reemerging Infection. American Family Physician. 2013; 88(8): 507-514.
16. Medkova, A. Yu., Alyapkina, Yu. S., Sinyashina, L. N., et al. Molekulyarnaya genetika, mикrобиология i virusologiya. 2010; 4: 9-13 (in Russian).
17. Medkova A.Yu., Karataev G.I., Shevcova Z.V., et al. Zhurnal infektologii. 2015; 7(3): 103-111 (in Russian).
18. Karataev G.I., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu. inventors. Sposob diagnostiki koklyusha i opredeleniya avirulentnykh mutantov vzbuditelya i diagnosticheskij nabor. Russian Federation patent RU 2506316; 2014 Feb 10 (in Russian).
19. Medkova A.Yu. Insercionnaya inaktivaciya operona virulentnosti bakterij *Bordetella pertussis* v diagnostike tipichnyh i atipichnyh form koklyusha [Insertional inactivation of *Bordetella pertussis* virulence regulatory operon in the diagnosis of typical and atypical forms of pertussis] [abstract of dissertation]. Moscow (Russia): Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Health Ministry of the Russian Federation; 2013: 27 p (in Russian).
20. G.I. Karataev, L. N. Sinyashina, A. Yu. Medkova, et al. Insertional Inactivation of Virulence Operon in Population of Persistent *Bordetella pertussis* Bacteria. Russian Journal of Genetics. 2016; 52 (4): 370–377 (in Russian).
21. Glantz S.A. Medical and biological statistics. Moscow: Praktika, 1999. 459 p. (in Russian).
22. Knorr L, Fox JD, Tilley PA, Ahmed-Bentley J. Evaluation of real-time PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection // BMC Infect Dis. 2006; 6: 62. doi: 10.1186/1471-2334-6-62
23. Medkova, A.Yu., Sinyashina, L.N., Rumyantseva, Yu. P., et al., Mol. Genet. Microbiol. Virusol. 2013; 28 (4): 156–161 (in Russian).

#### Авторский коллектив:

*Нестерова Юлия Васильевна* — заведующая отделением специфической профилактики инфекционных болезней и иммунодефицитных состояний Детского научно-клинического центра инфекционных болезней; тел.: 8(812)346-31-24, e-mail: [neste.julia@mail.ru](mailto:neste.julia@mail.ru)

*Медкова Алиса Юрьевна* — научный сотрудник лаборатории генетики бактерий Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, к.м.н.; тел.: 8 (499)193-61-90, e-mail: [baburida@yandex.ru](mailto:baburida@yandex.ru)

*Бабаченко Ирина Владимировна* — ведущий научный сотрудник, руководитель отдела респираторных (капельных) инфекций Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)234-29-87, e-mail: [babachenko-doc@mail.ru](mailto:babachenko-doc@mail.ru)

*Сёмин Евгений Григорьевич* — научный сотрудник лаборатории генетики бактерий Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи; тел.: 8 (499)193-61-90, e-mail: [recitar@mail.ru](mailto:recitar@mail.ru)

*Калисникова Екатерина Леонидовна* — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории медицинской микробиологии Детского научно-клинического центра инфекционных болезней; тел.: 8(812)234-07-40; e-mail: [katrinsp2006@yandex.ru](mailto:katrinsp2006@yandex.ru)

*Синяшина Людмила Николаевна* — ведущий научный сотрудник лаборатории генетики бактерий Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, д.м.н.; тел.: 8(499)193-61-90, e-mail: [vasilissa7777@yandex.ru](mailto:vasilissa7777@yandex.ru)

*Каратаев Геннадий Иванович* — ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории генетики бактерий Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, д.б.н.; тел.: 8(499)193-61-90, e-mail: [karataevgi@rambler.ru](mailto:karataevgi@rambler.ru)