

Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России

О.Ю. Борисова¹ (olgborisova@mail.ru), Н.Т. Гадуа¹ (8nati@mail.ru),
А.С. Пименова (alena85@mail.ru)¹, М.С. Петрова¹ (gabrich@mail.ru),
О.П. Попова¹ (gabrich@mail.ru), В.А. Алешкин¹ (gabrich@mail.ru),
Л.И. Кафарская² (likmed@mail.ru), Е.Е. Донских² (k531005@yandex.ru),
Е.В. Юсуф³ (Epid_fgu3@xmao.su), Н.А. Остапенко³,
Т.И. Москвина⁴ (sane@chel.surnet.ru), Т.А. Щербакова⁴

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, Москва

²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России, Москва

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе–Югре» г. Ханты-Мансийск

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области», г. Челябинск

Резюме

Цель исследования – изучение с помощью мультилокусного антигенного сиквенс-типирования особенностей состава популяции *B. pertussis*, циркулирующей на территории России, в динамике эпидемического процесса коклюшной инфекции.

Материалы и методы. В работе изучено 573 штамма *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в 1948 – 2015 годах. Генотипирование штаммов проводили по схеме MAST2 на основе секвенирования фрагментов генов *ptxP-fim3-prn*. Результаты секвенирования обрабатывали в программе ChromasLite, идентификацию аллелей и сиквенс-типов осуществляли по EMBL/GenBank.

Результаты. Показано, что за более чем 50-летний период плановой иммунизации детского населения в клональном составе популяции штаммов возбудителя коклюша произошли существенные изменения. Формирование популяции штаммов *B. pertussis* шло по пути последовательной смены штаммов вакцинных генотипов на штаммы новых невакцинных генотипов. Современная популяция возбудителя коклюша представлена штаммами генотипа 322 и 329, обладающими высокой вирулентностью и вызывающими тяжелое клиническое течение болезни.

Ключевые слова: *Bordetella pertussis*, мультилокусное сиквенс-типирование, генотип, популяция

Structure of Population of Strains of the *Bordetella pertussis* in the Russia

O.Yu. Borisova^{1,2} (olgborisova@mail.ru), N.T. Gadya¹ (8nati@mail.ru), A.S. Pimenova¹ (alena85@mail.ru), M.S. Petrova¹ (gabrich@mail.ru), O.P. Popova¹ (gabrich@mail.ru), V.A. Aleshkin¹ (gabrich@mail.ru), L.I. Kafarskia² (likmed@mail.ru), E.E. Donskikh² (k531005@yandex.ru), E.V. Usuf³ (Epid_fgu3@xmao.su), N.A. Ostapenko³, T.I. Moskvina⁴, T.A. Tcherbakova⁴

¹ «G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology» of Federal service on customers' rights protection and human well-being surveillance, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Federal Budgetary Healthcare Facility «Center of hygiene and epidemiology in Khanty-Mansiysk the autonomous district Yugra» of Federal service on customers' rights protection and human well-being surveillance Khanty-Mansiysk; Russia;

⁴ Federal Budgetary Healthcare Facility «Center of hygiene and epidemiology in region» of Federal service on customers' rights protection and human well-being surveillance Chelybinsk, Russia

Abstract

Relevance. Despite more than 50 years of successful experience with pertussis immunization, pertussis remains an important public health problem. WHO estimated 16 million people worldwide are infected per year, a significant number of whom are children under 1 year of age. In the last 10 years a significant increase in the incidence of whooping cough has been observed in many countries with a high immunization coverage level. In Russia, specific prevention of whooping cough, is held since 1959. Specific prevention of whooping cough has led to considerable improvement of an epidemiological situation and has shown its social and economic importance for maintenance of sanitary and epidemiologic wellbeing on this infection in Russia.

Goal. Study the structure of population *B. pertussis* circulating in Russia in dynamics of whooping cough epidemic process.

Materials and methods Studied 573 *B. pertussis* strains allocated from patients with whooping cough in 1948 - 2015 used multilocus

sequence typing (MAST). Isolates divided in five groups: 1948 – 1969 – 37 strains, isolated in the vaccination period and the first ten years of mass childhood immunization; 1970 – 1989 – 63 strains; 1990 – 2005 – 203 strains (from G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology collection); 2006 – 2012 – 185 strains; 2013 – 2015 – 85 strains.

Genotyping of strains was carried out according to the scheme MAST2 on the basis of a sequence of fragments of genes of *ptxP-fim3-prn*. Results of sequencing-typing were computed in the *CromasLite* program, identification of alleles and sequencing types carried out on *EMBL/GenBank*.

Results. Formation of population of *B.pertussis* strains during more than 50 years went on the way of consecutive change of vaccinal genotype strains with strains of new nonvaccinal genotypes.

Conclusions. Modern population of the causative agent of whooping cough is presented by the strains of genotype 322 and 329 possessing high virulence and causing heavier clinical course of disease.

Keywords: *Bordetella pertussis*, multilocus sequence typing, genotype, population

Введение

Коклюш – высококонтагиозное антропонозное воздушно-капельное инфекционное заболевание. Несмотря на более чем 50-летнюю успешную практику массовой иммунизации детского населения, коклюш остается важной проблемой здравоохранения во всем мире. По данным ВОЗ, ежегодно на земном шаре заболевают коклюшем около 60 млн человек, значительное количество из которых составляют дети в возрасте до 1 года (www.who.int/ru). В последние 10 лет растет заболеваемость коклюшем в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками – Австрия, Норвегия, Польша, Нидерланды, Великобритания, Австралия и США [1 – 8].

Специфическая профилактика коклюша, проводимая в нашей стране с 1959 года, коренным образом изменила характер течения эпидемического процесса коклюшной инфекции, привела к значительному улучшению эпидемиологической обстановки и показала социально-экономическую значимость вакцинопрофилактики для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции в России [9, 10].

Заболеваемость коклюшем в стране за последние 3 года регистрируется на уровне 3,1 – 3,23 на 100 тыс. населения. Вместе с тем, в 2015 году заболеваемость коклюшем увеличилась на 35,3% по сравнению с 2014 годом (4,42 против 3,27 в 2014 г.). Зарегистрировано 6447 случаев коклюша, в том числе у детей до 17 лет – 6225 случаев. Наиболее высокая заболеваемость отмечается в Ярославской области, г. Санкт-Петербурге, Липецкой, Астраханской областях и республике Адыгея. Заболеваемость регистрируется как у непривитых, так и привитых детей. Кроме того, наряду с высокой заболеваемостью детей в возрасте до года, одной из особенностей эпидемического процесса коклюшной инфекции является увеличение заболеваемости среди школьников 6 – 10 лет – 43,1% от числа всех заболевших [<http://rospotrebнадзор.ru/>].

Многочисленные исследования, проводимые, как отечественными, так и зарубежными исследователями в более чем в 40 странах мира, показали, что возбудитель коклюша (его фенотипические и генотипические свойства) подвержен изменчиво-

сти, которая формируется на фоне длительной массовой иммунизации [1 – 22]. К настоящему времени штаммовый SN-полиморфизм (SNP) *B. pertussis* описан в 16 генах, кодирующих поверхностные белки, в том числе и в генах, детерминирующих основные факторы адгезии, колонизации и патогенности. Установлено, что штаммы с новыми невакцинными аллельными вариантами генов основных факторов патогенности постепенно вытесняют штаммы со старыми вакцинными аллелями этих генов.

Для мониторинга за возбудителем коклюша в последние шесть лет применяется метод мультилокусного антигенного сиквенс-типирования (MAST), основанного на секвенировании фрагментов основных протективных антигенов возбудителя. Этот метод позволяет выявлять генетические различия и оценивать клональный состав циркулирующей популяции возбудителя коклюша [1, 4, 6, 7, 13, 14, 17, 19 – 21]. Были последовательно разработаны две схемы MAST-типирования: MAST1 – основана на изучении генов *prn-ptxP-tcfA*, кодирующих пертактин, фактор колонизации трахеи и промоторную *ptxP* область коклюшного токсина, и MAST2 – направлена на исследование фрагментов генов *ptxP-fim3-prn*, кодирующих промоторную *ptxP* область коклюшного токсина, фимбриальный *Fim3* белок и пертактин [6]. Причем MAST-типирование по схеме MAST2 позволяет идентифицировать гены, кодирующие детерминанты, которые входят в состав бесклеточных коклюшных вакцин. Наряду с этим, нашими предыдущими исследованиями было показано [13, 14, 17], что применение схемы MAST1 не позволяет выявлять в достаточной степени гетерогенность популяции, что необходимо для точной характеристики штаммов методом MAST. Было установлено, что схема MAST2 является оптимальной для характеристики штаммов *B. pertussis*, циркулирующих на территории России. Поэтому, учитывая многочисленные данные зарубежных исследователей, а также результаты наших многолетних предыдущих исследований об изменчивости возбудителя коклюша, большое значение на современном этапе развития эпидпроцесса коклюшной инфекции приобретает наблюдение за биологическими свойствами штаммов *B. pertussis*, измене-

ния которых могут оказывать влияние на течение эпидемического и инфекционного процессов.

Цель данного исследования – изучение с помощью мультилокусного антигенного сиквенс-типорирования по схеме MAST2 особенностей состава популяции штаммов *B. pertussis*, циркулирующей на территории России, в динамике эпидемического процесса коклюшной инфекции.

Материалы и методы

Штаммы. В работе изучено 573 штамма *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России в 1948 – 2015 годах. Все штаммы *B. pertussis* были распределены по пяти временным периодам выделения:

- I. 1948 – 1969 гг. – 37 штаммов, выделенных в допрививочный период и первые десять лет проведения массовой иммунизации детского населения;
- II. 1970 – 1989 гг. – 63 штамма;
- III. 1990 – 2005 гг. – 203 штамма (из коллекции ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора);
- IV. 2006 – 2012 гг. – 185 штаммов;
- V 2013 – 2015 гг. – 85 штаммов.

В исследовании также включены три вакцинных штамма, используемых для производства АКДС-вакцины (из коллекции ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России). Микробиологическую характеристику штаммов *B. pertussis* осуществляли путем изучения их морфологических, тинкториальных и культуральных свойств.

Генотипирование штаммов проводили по схеме MAST2 для *B. pertussis* на основе секвенирования фрагментов генов *ptxP-fim3-prn*, кодирующих промоторную *ptxP* область коклюшного токсина, фимбриальный *Fim3* белок и пертактин [6].

Результаты секвенирования, полученные в формате хроматограммы, обрабатывали в программе ChromasLite, идентификацию аллелей и сиквенс-типов осуществляли по международной базе данных EMBL/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>): *ptxP1* (FN252323.1), *ptxP2* (FN252322.1), *ptxP3* (FN252324.1), *prn1* (AJ011091.1), *prn2* (AJ011092.1), *prn9* (AJ315611.1), *prn3* (AJ011093.1), *fim3A* (X51543), *fim3A** (AY464179), *fim3B* (AY464180).

Результаты и обсуждение

В рамках работы Референс центра по мониторингу возбудителей коклюша и дифтерии в ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора проводится многолетний мониторинг молекулярно-генетических свойств штаммов *B. pertussis*, циркулирующих на территории России. Данные наших предыдущих исследований интегрированы в представленный анализ с целью проследить динамику изменений, происходящих в популяции

штаммов возбудителя коклюша на территории России.

Исследование показало, что в динамике эпидемического процесса коклюшной инфекции на территории России циркулировали штаммы девятнадцати (генотипирование по MAST2) генотипов: 111, 211, 219, 123, 121, 113, 132, 341, 342, 122, 221, 319, 112, 311, 329, 312, 323, 224 и 322, большинство из которых зарегистрированы с конца 1990-х годов (рис. 1).

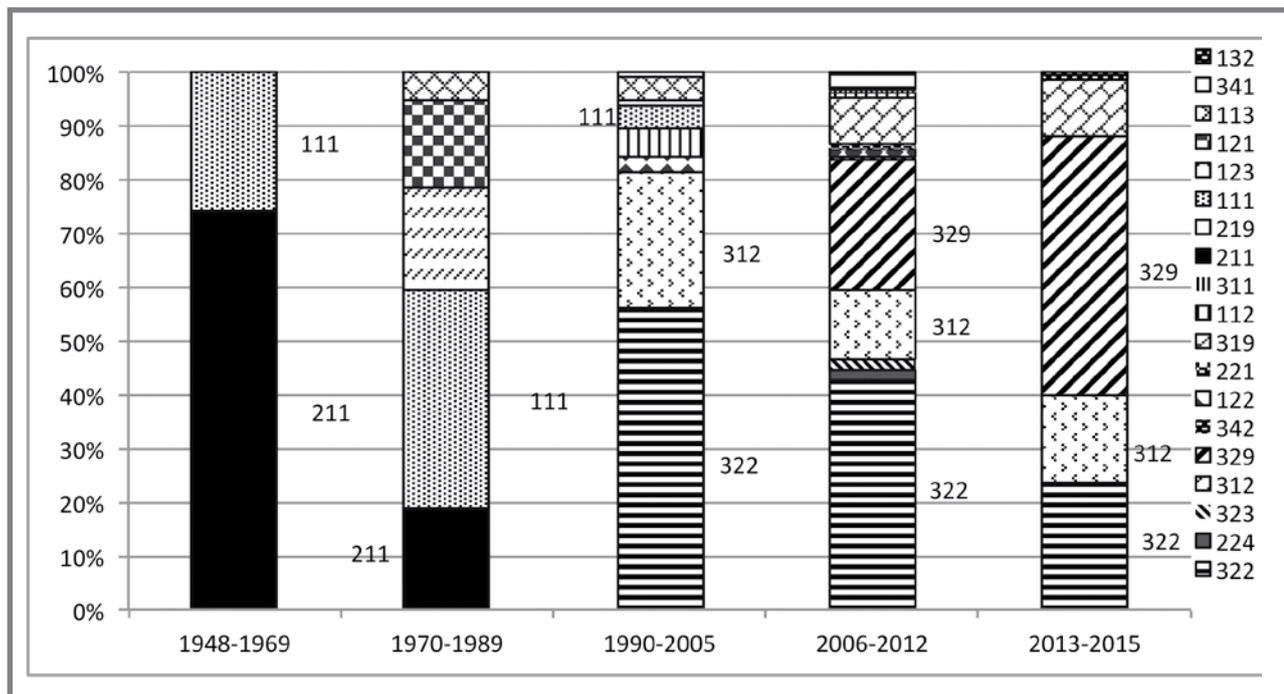
В допрививочный период и первые десять лет проведения массовой иммунизации детского населения (1948 – 1969 гг.) выявлены штаммы двух генотипов – 211 и 111, несущих вакцинные *ptxP1/ptxP2* аллельные варианты промотора *ptxP*, вакцинный *fim3A* аллель фимбриального гена *fim3* и вакцинный *prn1* аллель гена пертактина. Из них большинство (74,1%) штаммов *B. pertussis* принадлежали к вакцинному генотипу 211 и 25,9% штаммов – к вакцинному генотипу 111. Используемые для производства АКДС-вакцины штаммы *B. pertussis* – 305 и 267, выделенные в 1950-х годах, и штамм 475, выделенный в 1960-х годах, также относятся к одному вакцинному генотипу 111.

В 1970 – 1989 годы количество выявленных MAST2 генотипов увеличилось до пяти – 211, 111, 123, 121 и 113. Из них большинство штаммов (40,5%) по-прежнему имели вакцинный 111 генотип. Также в этот период выявлены штаммы генотипов 123 (18,9% штаммов), 121 (16,2% штаммов) и 113 (5,4% штаммов). Данные генотипы характеризуются аллельными комбинациями генов *ptxP-fim3-prn* *ptxP1/fim3B/prn3*, *ptxP1/fim3B/prn1* и *ptxP1/fim3A/prn3*, соответственно. Из них *ptxP1*, *fim3A* и *prn1* аллели являются вакцинными, а *fim3B* и *prn3* – невакцинными аллелями этих генов, то есть можно говорить о начале формирования гетерогенной популяции возбудителя коклюша с комбинацией новых невакцинных аллельных вариантов генов.

В 1990 – 2005 годы выявлены MAST2 штаммы *B. pertussis* восьми генотипов – 341, 112, 113, 123, 111, 122, 312 и 322. Из них 341 генотип несет невакцинные *ptxP3/fim3A** и вакцинный *prn1* аллели, генотип 312 – невакцинные *ptxP3/prn2* и вакцинный *fim3A* аллели, а генотип 322 – все невакцинные *ptxP3/fim3B/prn2* аллели. Доминирующее положение в популяции штаммов *B. pertussis* заняли штаммы двух новых невакцинных генотипов – 322 (59,3% штаммов) и 312 (26,37% штаммов) на фоне снижения частоты встречаемости штаммов со старыми генотипами 111 и 112. Так же обнаружены единичные штаммы *B. pertussis* других новых генотипов – 123, 121, 113 и 341.

Среди изученных штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2006 – 2012 годах, установлено MAST2 14 различных генотипов – 322, 224, 323, 312, 329, 342, 122, 221, 319, 112, 311, 211, 219 и 111, то есть отмечается выраженная генетическая вариабельность популяционной структуры возбудите-

Рисунок 1.
Распространение штаммов *B. pertussis* разных генотипов в различные периоды эпидемического процесса коклюшной инфекции



ля коклюша. Из них большинство (98,6% штаммов) принадлежат к новым невакцинным генотипам. Так, генотипы 322, 323, 329 и 342 несут невакцинный *ptxP3* аллель промотора *ptxP*, невакцинные *fim3B* и *fim3A** аллели гена *fim3* и невакцинные *prn2/prn4/prn3/prn9* аллели гена *prn*; генотип 319 – сочетание невакцинных *ptxP3/prn9* и вакцинный *fim3A* аллели, генотип 219 – невакцинный *prn9* и вакцинные *ptxP2/fim3A* аллели, генотип 312 – невакцинные *ptxP3/prn2* и вакцинный *fim3A* аллели, генотип 221 – невакцинный *fim3B* и вакцинные *ptxP2/prn1* аллели, генотип 112 – невакцинный *prn2* и вакцинные *fim3A/ptxP1* аллели, генотип 311 – невакцинный *ptxP3* и вакцинные *fim3A/prn1* аллели и генотип 224 – вакцинный *ptxP2* и невакцинные *fim3B/prn4* аллели. Причем популяция штаммов *B. pertussis* в основном была представлена штаммами генотипа 322. Так же выделено 24,32% штаммов *B. pertussis* нового генотипа 329 и 12,8% штаммов генотипа 312, в единичном проценте генотипы – 219, 211, 311, 111, 112, 221, 122, 342 и 323.

Среди изученных штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2013 – 2015 годах, выявлено MAST2 пять генотипов – 322, 312, 319, 329 и 132. Из них большинство штаммов возбудителя коклюша по-прежнему имеют невакцинные генотипы – 329 и 322 (48,2 и 23,5% соответственно). Кроме того, видно, что по сравнению с предыдущим периодом частота выделения штаммов генотипа 329 увеличивается и штаммов генотипа 322 – сокращается.

При изучении вирулентности штаммов *B. pertussis* было установлено [16], что штаммы генотипов 322 и 329 обладают высокой степенью

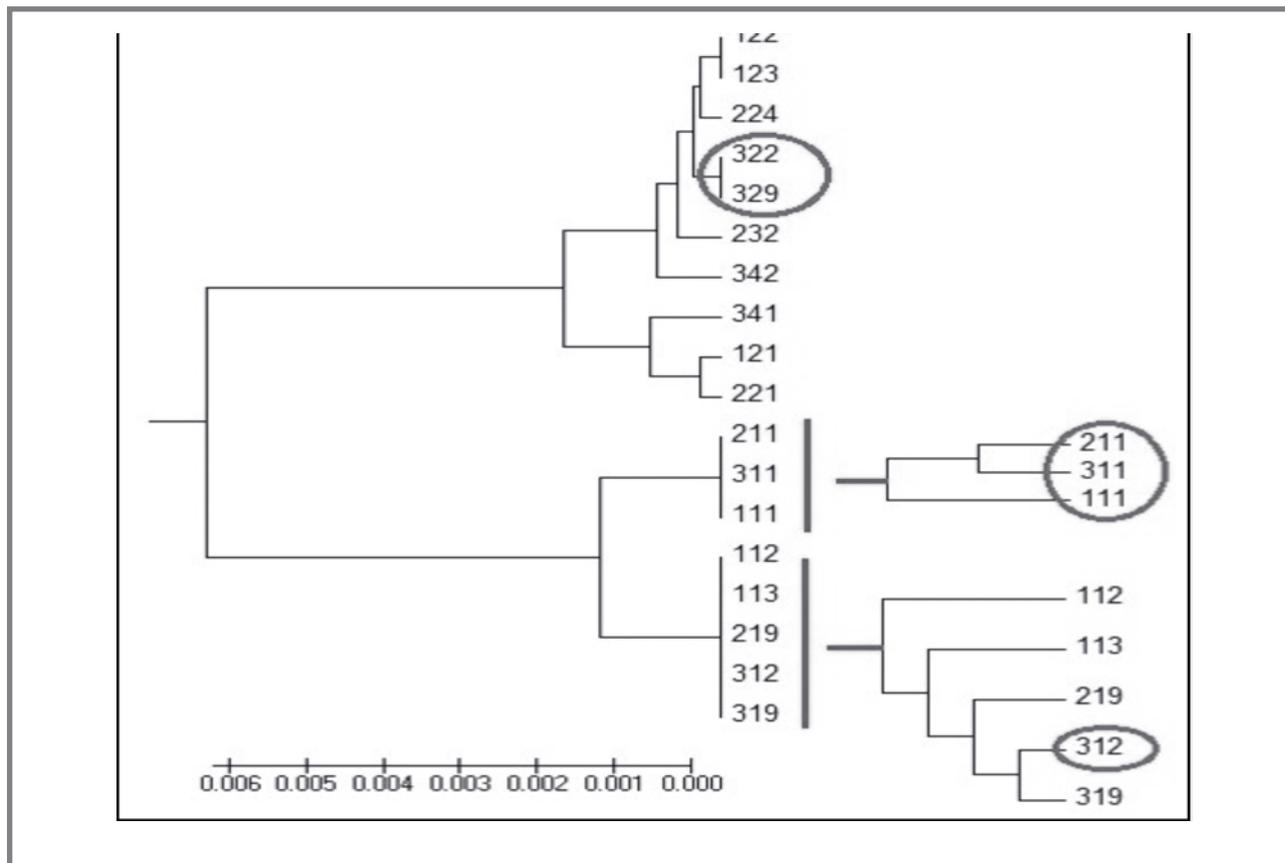
вирулентности. Данный факт подтвержден, проведенным на базе ИКБ № 1 г. Москвы клинико-микробиологическим сопоставлением тяжести клинического течения коклюша [22] и генотипа циркулирующих штаммов *B. pertussis*: генотипы 322 и особенно 329 вызывают тяжелые клинические формы коклюша.

В результате филогенетического анализа штаммов *B. pertussis* различных генотипов установлено, что штаммы старых вакцинных генотипов 211 и 111 относятся к одной из самых близких к общему предку клональных групп (рис. 2). В то время как все доминирующие в последние годы штаммы современных генотипов 322 и 329, принадлежат к новой клональной группе и являются близкородственными. Мультипараметрический анализ показал, что штаммы генотипа 111 являются базисом для формирования практически всего дерева популяции, однако наиболее перспективным последующим этапом развития возбудителя стало формирование штаммов генотипов 121 и 312, при этом штаммы генотипа 121 стали скорее промежуточным звеном и послужили основой к формированию современной клональной группы штаммов генотипа 322. Учитывая близкородственную связь штаммов генотипа 322 и 329 между собой и быстрый рост удельного веса штаммов генотипа 329 можно предположить, что данное направление развития является наиболее перспективным для популяции возбудителя коклюша, что подтверждается исследованиями последних лет.

Интересным является тот факт, что штаммы генотипа 322 появились в популяции возбудителя коклюша на территории России еще в начале

Рисунок 2.

Филогенетическое дерево, построенное методом UPGMA для штаммов *B. pertussis* различных генотипов (MAST2)



2000-х годов, а штаммы генотипа 329 были впервые зарегистрированы только в 2010 году и в последние годы увеличивают свой удельный вес.

Штаммы генотипов 322 и 329 имеют различие в генетической структуре гена *prn*, кодирующего адгезин *B. pertussis* – белок пертактин, являющийся нефимбриальным поверхностно расположенным антигеном возбудителя коклюша [23 – 26]. Патогенность пертактина определяется тем, что он, наряду с филаментозным гемагглютинином и В-комплексом коклюшного токсина, принимает участие в прикреплении микробов к чувствительным клеткам и инвазии их в клетки хозяина, включая реснитчатый эпителий и альвеолярные макрофаги. Показано [23 - 26], что белок пертактин является протективным антигеном, который индуцирует образование специфических антител и, таким образом, защищает от заражения вирулентными штаммами *B. pertussis*, а добавление пертактина в бесклеточные коклюшные вакцины повышает их эффективность. Невакцинные *prn2* и *prn9* аллели гена, кодирующего пертактин, отличаются от вакцинного *prn1* аллеля значимыми мутациями в двух положениях – V279G и A278F. Кроме того, последовательность нуклеотидов *prn2* аллеля характеризуется одним дополнительным фрагментом в 15 п.н. в 1 области гена, а *prn9* аллель имеет еще более увеличенную на 30 п.н. последовательность и, следовательно, более удлиненный Prn-белок.

Данные изменения в *prn2* и *prn9* аллелях произошли в 1 и 2 областях единого конформационного эпитопа Prn-белка, которые являются иммуногенными и участвуют в формировании В-клеточного иммунного ответа. Поэтому произошедшие изменения оказывают существенное влияние на процесс формирования иммунного ответа [23, 26].

Исследования по изучению особенностей структуры основных генов патогенности *B. pertussis* проводятся в более чем 40 странах мира на четырех континентах [1 – 5, 7, 19 – 21]. Такие масштабные исследования в Европейском регионе инициированы в 2001 году в рамках работы европейской группы EUpertlabnet в связи с ростом заболеваемости коклюшем во многих странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками. Было установлено, что смена циркулирующих штаммов *B. pertussis* со старыми вакцинными аллелями основных генов патогенности, характерными для штаммов, входящих цельноклеточные и бесклеточные вакцины, на штаммы с новыми невакцинными аллелями этих генов носит глобальный (общемировой) характер.

Различия между вакцинными и циркулирующими штаммами *B. pertussis* и совершенствование диагностики могут отражаться и на подъеме заболеваемости коклюшем.

Наиболее выраженные изменения в штаммовом составе происходят в странах, использующих

с 1990-х годов в программах вакцинации бесклеточные вакцины. Было показано, что в циркулирующих популяциях штаммов *B. pertussis* преобладают (89 – 95%) штаммы невакцинных генотипов – 312 и 322. Причем увеличение в популяции штаммов *B. pertussis* с новыми невакцинными аллелями основных генов патогенности отмечается с 1995 года, когда в большинстве стран для вакцинации стали применять бесклеточные вакцины. Кроме того, к настоящему времени в некоторых из этих стран среди циркулирующих штаммов стали регистрировать такие, у которых отсутствует пертактин (так называемые пертактин-дефицитные штаммы), входящий в состав 3 – 5 компонентных бесклеточных вакцинных препаратов. И в последние три года удельный вес пертактин-дефицитных штаммов варьирует в пределах от 4 до 78% [27, 28]. Вместе с тем, в странах, где для вакцинации используют цельноклеточные вакцины, например, Польша и Китай, до сих пор регистрируется преобладание штаммов *B. pertussis* со старыми вакцинными аллелями основных генов патогенности [7, 8]. Такие данные свидетельствуют о том, что состав вакцины может отражаться на популяционной структуре штаммов возбудителя коклюша. Это подтверждается и результатами последних исследований по

сравнению полноразмерных геномов штаммов *B. pertussis* допрививочного периода и современных [8], показавшими необратимость эволюционных процессов изменчивости основных детерминант патогенности штаммов *B. pertussis*, и то, что нуклеотидный полиморфизм в генах вирулентности может быть адаптацией возбудителя под селективным давлением иммунизации. Таким образом, результаты проведенного генотипирования показали, что за более чем 50-летний период массовой иммунизации детского населения в популяции штаммов возбудителя коклюша произошли существенные изменения клонального состава.

Выводы

1. Формирование популяции штаммов *B. pertussis* происходит путем последовательной смены штаммов вакцинных генотипов на штаммы новых невакцинных генотипов, что свидетельствует о расширении адаптационных возможностей возбудителя.
2. Современная популяция возбудителя коклюша представлена штаммами генотипа 322 и 329, обладающими высокой вирулентностью и вызывающими тяжелые клинические формы коклюша.

Литература

1. Advani A., Van der Heide H.G.J., Hallander H.O., Mooi F.R. Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage. *J. of Microbiological Methods*. 2009; 78: 297 – 301.
2. Brinig M.M., Cummings C.A., Sanden G.N. Significant gene order and expression differences in *B. pertussis* despite limited gene content variation. *J. of Bacteriology*. 2006; 188 (7): 2375 – 2382.
3. Cassidy P., Sanden G., Heuvelman K., Mooi F., Bisgard K. M., Popovic T. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935 – 1999. *J. Infect. Dis.* 2000; 182: 1402 – 1408.
4. King A., van Gorkom T., van der Heide H., Advani A., van der Lee S. Changes in the genomic content of circulating *B. pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genomics*. 2010; 11: 64.
5. Mooi F.R., van Loo I.H.M., van Gent M., He Q., Heuvelman C.J., Bart M.J. et al. *Bordetella pertussis* with increased pertussis toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 1206 – 1213.
6. Mooi F.R. *Bordetella pertussis* and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen. *J. Infection, genetics and evolution*. 2009; 2: 1 – 14.
7. Schmidtke A., Boney K.O., Martin S.W., Skoff T.H., Tondella M.L., Tatti K.M. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935 – 2009. *J. Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18 (8): 1248 – 1255.
8. Xu Y., Grondahl-Yli-Hannuksila K., Tan Y., Felg L., Kallonen T. et al. Whole-genome sequencing reveal the effect of vaccination on the evolution of *Bordetella pertussis*. *Sci. Rep.* 2015; 5: 12888.
9. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическое благополучие населения России. *Журн. микробиол.* 2012; 1: 42 – 51.
10. Селезнева Т.С., Титова Н.С., Заргарьянц А.И., Максимова Н.М., Маркина С.С. Влияние вакцинопрофилактики на эпидемический процесс управляемых инфекций в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2002; 2: 6 – 11.
11. Чистякова Г.Г., Борисова О.Ю., Лыткина И.Н., Мазурова И.К., Комбарова С.Ю., Петрова М.С. и др. Особенности эпидемического процесса коклюшной инфекции в Москве на современном этапе. *Журн. микробиол.* 2005; 5: 35 – 40.
12. Алешкин В.А., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Мазурова И.К. Особенности генотипической изменчивости штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России. *Бюллетень ВШНЦ СО РАМН*. 2012; 5 (87): 177 – 183.
13. Борисова О.Ю., Мазурова И.К., Ивашинникова Г.А., Гадуа Н.Т., Рудакова И.А., Салова Н.Я. и др. Характеристика штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в г. Москве, с помощью мультилокусного секвенирования. *Журнал микробиол.* 2012; 2: 28 – 34.
14. Борисова О.Ю., Мазурова И.К., Ивашинникова Г.А., Гадуа Н.Т., Рудакова И.А., Салова Н.Я. и др. Генетическая характеристика штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России. *Медицинский альманах*. 2012; 2 (21): 30 – 34.
15. Курова Н.Н. Молекулярно-биологическая характеристика *Bordetella pertussis*, циркулирующих в период подъема заболеваемости, и совершенствование лабораторной диагностики коклюша: Автореф. дис. ... к-та мед. наук. С.-Петербург; 2004.
16. Шинкарев А.С., Мерцалова Н.Х., Мазурова И.К., Борисова О.Ю., Захарова Н.С., Озерецковская М.Н. и др. Современные штаммы *Bordetella pertussis*: молекулярная и иммунобиологическая характеристика. *Журн. микробиол.* 2007; 4: 20 – 25.
17. Ивашинникова Г.А., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Рудакова И.А., Мазурова И.К. Применение метода мультилокусного секвенирования для наблюдения за циркулирующими штаммами *B. pertussis*. *Здоровье населения и среда обитания*. 2012; 9: 28 – 30.
18. Kourova N., Njamkepo E., Brun D. Monitoring of *Bordetella* isolates circulating in Saint Petersburg, Russia between 2001 and 2009. *Res. Microbiol.* 2010; 161 (10): 810 – 815.
19. Litt D.J., Neal S.E., Fry N.K. Changes in Genetic Diversity of the *Bordetella parapertussis* Population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (3): 680 – 688.
20. van Amersfoort S.C.M., Schouls L.M., van der Heide H.G.J., Advani A., Hallander H.O., Bondeson K. et al. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 2837 – 2843.
21. van Loo I.H.M., Heuvelman K.J., King A.J., Mooi F.R. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J. Clin. Microbiology*. 2002; 40: 1994 – 2001.
22. Попова О.П., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Грачева Н.М., Абрамова Е.Н., Пименова А.С., Гадуа Н.Т. Клинико-микробиологические сопоставления при коклюше у детей в современных условиях. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19 (5): 13 – 18.
23. Emsley P., Charles I.G., Fairweather N.F., Isaacs of the N.W. Structure *Bordetella pertussis* virulence factor P 69 pertactin. *Nature*. 1996; 381: 90 – 92.
24. Hellwing S.M., Rodriguez M.E., Berbers G.A., van de Wilkel J.G., Mooi F.R. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J. Infect. Dis.* 2004; 189 (2): 354.
25. Leininger E., Ewanowich C.A., Bhargava A., Peppeler M.S., Kenimer J.G., Brennan M.J. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesions pertactin and filamentous hemagglutinin. *J. Infect. Immunity*. 1992; 60: 2380 – 2385.

26. M kinen J., Berbers G., Mooi F.R., Viljanen M.K., Arvilommi H., Mertsola J. Bordetella pertussis protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? J. Infect. Dis. 2003; 187 (8): 1200 – 1205.
27. Martin S.W., Pawloski L., Williams M., Weening K., DeBolt C., Qin X. et al. Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. Clin. Infectious Dis. 2015; 60: 223 – 227.
28. Pawloski L.C., Queenan A.M., Cassidy P.K., Lynch A.S., Harrison M.J., Shang W. et al. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in United States. Clin. And Vaccine Immunology: CVI. 2014; 21: 119 – 125.

References

1. Advani A., Van der Heide H.G.J., Hallander H.O., Mooi F.R. Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage. J. of Microbiological Methods. 2009; 78: 297 – 301.
2. Brinig M.M., Cummings C.A., Sanden G.N. Significant gene order and expression differences in *B. pertussis* despite limited gene content variation. J. of Bacteriology. 2006; 188 (7): 2375 – 2382.
3. Cassidy P., Sanden G., Heuvelman K., Mooi F., Bisgard K. M., Popovic T. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935 – 1999. J. Infect. Dis. 2000; 182: 1402 – 1408.
4. King A., van Gorkom T., van der Heide H., Advani A., van der Lee S. Changes in the genomic content of circulating *B. pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? BMC Genomics. 2010; 11: 64.
5. Mooi F.R., van Loo I.H.M., van Gent M., He Q., Heuvelman C.J., Bart M.J. et al. *Bordetella pertussis* with increased pertussis toxin production associated with pertussis resurgence. Emerg. Infect. Dis. 2009; 15: 1206 – 1213.
6. Mooi F.R. Bordetella pertussis and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen. J. Infection, genetics and evolution. 2009; 2: 1 – 14.
7. Schmidtke A., Boney K.O., Martin S.W., Skoff T.H., Tondella M.L., Tatti K.M. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935 – 2009. J. Emerg. Infect. Dis. 2012; 18 (8): 1248 – 1255.
8. Xu Y., Grondahl-Yli-Hannuksila K., Tan Y., Felg L., Kallonen T. et al. Whole-genome sequencing reveal the effect of vaccination on the evolution of *Bordetella pertussis*. Sci. Rep. 2015; 5: 12888.
9. Onishchenko G.G. Epidemiological welfare of the population of Russia. Zhurnal mikrobiologii. [J. Microbiology]. 2012; 1: 42 – 51 (in Russian).
10. Selezneva T.S., Titova N.S., Zargaryants A.I., Maksimova N.M., Markina S.S. Effect of vaccination on the epidemic process of vaccine-preventable diseases in the Russian Federation. Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni. [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2002; 2: 6 – 11 (in Russian).
11. Chistyakova G.G., Borisova O.Yu., Lytkina I.N., Mazurova I.K., Kombarova S.Yu., Petrova M.S. et al. Features of epidemic process of pertussis infection in Moscow at the present stage Zhurn. mikrobiol. [J. Microbiology]. 2005; 5: 35 – 40 (in Russian).
12. Aleshkin V.A., Borisova O.Yu., Gadua N.T., Mazurova I.K. Features of genotypic variability of strains of *B. pertussis*, isolated from patients with pertussis in Russia. Byulleten VSNTs SO RAMN. [Bulletin of the East-Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]. 2012; 5 (87): 177 – 183 (in Russian).
13. Borisova O.Yu., Mazurova I.K., Ivashinnikova G.A., Gadua N.T., Rudakova I.A., Salova N.Ya. et al. Feature strains *Bordetella pertussis*, isolated from patients with pertussis in Moscow, using multilocus sequencing. Zhurnal mikrobiol. [J. Microbiology]. 2012; 2: 28 – 34 (in Russian).
14. Borisova O.Yu., Mazurova I.K., Ivashinnikova G.A., Gadua N.T., Rudakova I.A., Salova N.Ya. et al. Genetic characterization of strains of *Bordetella pertussis*, isolated from patients with pertussis in Russia. Meditsinskiy almanakh. [Medical almanac]. 2012; 2 (21): 30 – 34 (in Russian).
15. Kurova N.N. Molecular-biological characteristic *Bordetella pertussis*, circulating between the incidence of recovery and the improvement of laboratory diagnosis of pertussis:: Doctorate of med. sci. diss.. Sankt Petersburg; 2004 (in Russian).
16. Shinkarev A.S., Mertsalova N.U., Mazurova I.K., Borisova O.Yu., Zakharova N.S., Ozeretskoykaya M.N. et al. Modern strains of *Bordetella pertussis*: molecular and immunological characteristics. Zhurn. mikrobiol. [J. Microbiology]. 2007; 4: 20 – 25 (in Russian).
17. Ivashinnikova G.A., Borisova O.Yu., Gadua N.T., Rudakova I.A., Mazurova I.K.. Application of multilocus sequencing to monitor the circulating strains of *B. pertussis*. Zdroroye naseleniya i sreda obitaniya. [Public health and environment]. 2012; 9: 28 – 30 (in Russian).
18. Kourova N., Njamkepo E, Brun D, et al. Monitoring of Bordetella isolates circulating in Saint Petersburg, Russia between 2001 and 2009. Res. Microbiol. 2010; 161 (10): 810 – 815.
19. Litt D.J., Neal S.E., Fry N.K. Changes in Genetic Diversity of the Bordetella parapertussis Population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. J. Clin. Microbiol. 2009; 47 (3): 680 – 688.
20. van Amersfoorth S.C.M., Schouls L.M., van der Heide H.G.J., Advani A., Hallander H.O., Bondeson K. et al. Analysis of *Bordetella pertussis* Populations in European countries with different vaccination policies. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 2837 – 2843.
21. van Loo I.H.M., Heuvelman K.J., King A.J., Mooi F.R. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. J. Clin. Microbiology. 2002; 40: 1994 – 2001.
22. Popova O.P., Borisova O.Y., Petrova M.S., Gracheva N.M., Abramova E.N., Pimenova A.S., Gadua N.T. The clinical and microbiological comparison of whooping cough in children today. Epidemiologia i infektsionnyye bolezni. [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2014; 19 (5): 13 – 18.
23. Emsley P., Charles I.G., Fairweather N.F., Isaacs of the N.W. Structure *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. Nature. 1996; 381: 90 – 92.
24. Hellwing S.M., Rodriguez M.E., Berbers G.A., van de Wilkel J.G, Mooi F.R. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. J. Infect. Dis. 2004; 189 (2): 354.
25. Leininger E., Ewanowich C.A., Bhargava A., Peppler M.S., Kenimer J.G., Brennan M.J. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesions pertactin and filamentous hemagglutinin. J. Infect. Immunity. 1992; 60: 2380 – 2385.
26. M kinen J., Berbers G., Mooi F.R., Viljanen M.K., Arvilommi H., Mertsola J. Bordetella pertussis protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? J. Infect. Dis. 2003; 187 (8): 1200 – 1205.
27. Martin S.W., Pawloski L., Williams M., Weening K., DeBolt C., Qin X. et al. Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. Clin. Infectious Dis. 2015; 60: 223 – 227.
28. Pawloski L.C., Queenan A.M., Cassidy P.K., Lynch A.S., Harrison M.J., Shang W. et al. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in United States. Clin. And Vaccine Immunology: CVI. 2014; 21: 119 – 125.