



## Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежевыделенного штамма *B. pertussis* серовара 1.2.3

Зайцев Е.М.<sup>✉</sup>, Бажанова И.Г., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Озерецковская М.Н.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

**Цель работы** — разработка технологии изготовления бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) из свежевыделенного штамма *B. pertussis* серовара 1.2.3 и изучение ее протективной активности и безопасности в сравнении с препаратом из вакцинных штаммов.

**Материалы и методы.** Использовали штаммы *B. pertussis*: свежевыделенный штамм № 211, серовариант 1.2.3; вакцинные штаммы № 305, серовариант 1.2.0 и № 475а, серовариант 1.2.3. По оригинальной методике из супернатанта жидкой среды культивирования *B. pertussis* штамма № 211 получена БКВ и изучены ее протективные и токсические свойства.

**Результаты.** Исследования показали, что для получения БКВ, состоящей из антигенов свежевыделенного штамма, требуется использование обогащенных питательных сред при культивировании штамма и увеличение срока детоксикации комплекса протективных антигенов, выделенного из среды культивирования штамма. БКВ, полученная из свежевыделенного штамма, обладала протективными свойствами, в 1,7 раза превышающими протективные свойства БКВ, полученной из вакцинных штаммов, при отсутствии токсических свойств и низких сенсibilизирующих свойствах. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования свежевыделенного штамма № 211 для получения коклюшных вакцин.

**Ключевые слова:** штаммы *B. pertussis*; обогащенные питательные среды; культивирование; детоксикация; бесклеточная коклюшная вакцина; протективные свойства; лейкоцитозстимулирующая активность; гистаминсенсibilизирующая активность.

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Зайцев Е.М., Бажанова И.Г., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Озерецковская М.Н. Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежевыделенного штамма *B. pertussis* серовара 1.2.3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 134–139.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-134-139>

Поступила 25.11.2019

Принята в печать 12.01.2020

## Cell-free pertussis vaccine from antigens of freshly isolated strain of *B. pertussis* serotype 1.2.3

Evgeniy M. Zaitsev<sup>✉</sup>, Irina G. Bazhanova, Marina V. Britsina, Natalia U. Mertsalova, Mariya N. Ozeretskovskaya

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia

**Aim.** Development of technology for the manufacture of cell-free pertussis vaccine (CPV) from a freshly isolated strain of *B. pertussis* No. 211 serotype 1.2.3 and the study of its protective activity and safety in comparison with the preparation of vaccine strains.

**Materials and methods.** Following *B. pertussis* strains were used: freshly isolated strain No. 211, serotype 1.2.3; vaccine strains No. 305, serotype 1.2.0, and No. 475a, serotype 1.2.3. According to the original method, a CPV was obtained from the supernatant of the liquid culture medium of *B. pertussis* strain No. 211 and its protective and toxic properties were studied.

**Results.** Studies have shown that the use of enriched nutrient media for the cultivation of the strain and the increase in the duration of the the detoxification period of the protective antigen complex isolated from the culture medium are needed to obtain a CPV vaccine consisting of antigens of a freshly isolated strain. CPV obtained from the freshly isolated strain had protectivity 1.7 times higher compared to those of CPV obtained from vaccine strains, was nontoxic and had a low sensitizing properties. The results indicate that the freshly isolated strain No. 211 is a promising candidate for use in the development of pertussis vaccines.

**Keywords:** *B. pertussis* strains; enriched nutrient media; cultivation; detoxification; cell-free pertussis vaccine; protective properties; leukocytosis-stimulating activity; histamine-sensitizing activity.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Zaitsev E.M., Bazhanova I.G., Britsina M.V., Mertsalova N.U., Ozeretskovskaya M.N. Cell-free pertussis vaccine from antigens of freshly isolated strain of *B. pertussis* serotype 1.2.3. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 134–139. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-134-139>

Received 25 November 2019

Accepted 12 January 2020

## Введение

Коклюш — заболевание, вызываемое бактериями *Bordetella pertussis*, наиболее опасен для неиммунизированных младенцев [1, 2]. По данным ВОЗ, в 2016 г. заболеваемость на 100 тыс. детей в возрасте до 14 лет составляла 30,392. Вакцинация против коклюша, начавшаяся с 1940 г., резко снизила уровень заболеваемости, однако в последующие годы снова началось постепенное увеличение числа вспышек коклюша во всем мире, особенно в последнее десятилетие, несмотря на высокий уровень вакцинации населения [3–6].

Во многих странах мира проведено изучение генома *B. pertussis*, показавшее, что одной из причин продолжающегося эпидемического процесса коклюша является несоответствие генотипов вакцинных штаммов *B. pertussis* генотипам циркулирующих в настоящее время штаммов. Молекулярно-генетический анализ штаммов *B. pertussis* выявил аллельные варианты генов, кодирующих продукцию S1 субъединицы коклюшного токсина (*ptxA*), пертактина (*prn*), фимбриальных белков (*fim2* и *fim3*) и некоторых других факторов вирулентности.

Популяция циркулирующих штаммов *B. pertussis* в большинстве случаев имеет аллельный вариант *ptxP3* гена промотора коклюшного токсина и *ptxA1* аллель гена коклюшного токсина; доминируют штаммы, имеющие *prn2* и *prn3* аллели гена пертактина; отмечается тенденция к увеличению доли штаммов с *fim2-2* и *fim3B* аллелями фимбриальных генов. У вакцинных штаммов преобладают *ptxA2* и *ptxA4* аллели гена коклюшного токсина, аллель *ptxP1* промотора коклюшного токсина, *prn1* аллель гена пертактина, *fim2-1* и *fim3A* аллели генов фимбрий. Выделенные в 2006–2012 гг. в России изоляты содержали 14 генотипов, из которых 98,6% соответствовали новым невакцинным генотипам *ptxP3*, *fim3B*, *fim3A*, *prn2/prn4/prn3/prn9* — штаммы № 322 и № 329 и смешанным генотипам невакцинных *prn9* и вакцинных *ptxP2/fim3A* аллелей — штамм № 219; невакцинного *ptxP3/prn2* и вакцинного *fim3A* аллелей — штамм № 312. В 2013–2015 гг. штаммы *B. pertussis* № 329 и № 322 доминировали в России, вызывая тяжелые клинические формы коклюша [1].

Свежевыделенный штамм № 211, использованный в настоящей работе для изготовления коклюшной вакцины, был выделен от больного коклюшем ребенка в 2003 г. и характеризуется аллельным вариантом *ptxA1* гена коклюшного токсина, аллельным вариантом *ptxP3* гена промотора коклюшного токсина, аллельным вариантом *prn2* гена пертактина, аллельным вариантом *fim2-1* гена *fim2*, аллельным вариантом *fim3B* гена *fim3*. В вакцинном штамме № 305 ген *ptxA* характеризуется аллельным вариантом *ptxA2*, а в штамме № 475а — аллельным вариантом *ptxA4*; ген промотора коклюшного токсина — аллелем *ptxP1*; ген пертактина — аллельным вариантом *prn1*, гены фимбрий — аллельными вариантами *fim2-1* и *fim3A* для обоих штаммов [8].

Таким образом, циркулирующие в настоящее время штаммы содержат измененные последовательности генов коклюшного токсина, фимбрий и пертактина, отличающиеся от последовательностей в штаммах довакцинального периода. Изменения генома возбудителя коклюша ставят вопрос о необходимости создания вакцин нового поколения и замены старых вакцинных штаммов на новые [7]. В связи с этим актуальными являются отбор и характеристика свежевыделенных штаммов в качестве кандидатов для производства современных коклюшных вакцин. При этом важное значение имеет отбор штаммов, имеющих полный набор агглютиногенов: 1.2.3.

**Цель** исследования — разработка технологии изготовления бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) из свежевыделенного штамма *B. pertussis* № 211 серовара 1.2.3 и изучение ее протективной активности и безопасности в сравнении с препаратом из вакцинных штаммов.

## Материалы и методы

В опытах использованы мыши-гибриды F<sub>1</sub> массой 10–12 и 14–16 г.

Штамм *B. pertussis* № 211, серовариант 1.2.3 выделен у больного ребенка. Изучены вакцинные штаммы № 305, серовариант 1.2.0 и № 475а, серовариант 1.2.3 (селекционированный из штамма № 475).

Питательные среды:

- казеиново-угольный агар (КУА);
- агар Борде–Жангу с 20–30% крови человека;
- жидкая синтетическая питательная среда (ЖСС), содержащая аминокислоты, соли и витамины;
- жидкая полусинтетическая питательная среда (ЖПС) — модификация среды Коэна–Виллера с добавлением протеинового ингредиента (казеиновый гидролизат).

Проверку морфологических, серологических и культуральных свойств штамма проводили в соответствии с Методическими указаниями<sup>1</sup>. Для оценки серовара штаммов использовали сыворотки диагностические коклюшные к агглютиногенам 1.2.3 и паракклюшные к агглютиногену 14 адсорбированные, для реакции агглютинации — «Медгамал», серия 92, серия 78, сухие.

Для получения необходимого количества биомассы свежeweделенного штамма № 211 были апробированы 3 схемы культивирования. При схеме I микробные клетки культивировали в условиях, используемых для выращивания вакцинных штаммов. Штамм восстанавливали из сухого состояния на плотных средах Борде–Жангу с 20–25% крови человека (1-й пассаж). Культуры после бактериологического контроля на чистоту пересеивали на пробирки со средой КУА и выращивали в течение 16–18 ч (2-й пассаж), затем культуры выращивали в ЖСС с использованием шуттель-аппарата в течение 16–18 ч (динамическое культивирование, 3-й пассаж). На конечном этапе микробные клетки выращивали в ЖСС в стационарных условиях в течение 5 сут (4-й пассаж).

По схеме II 2-й пассаж культур проводили на среде КУА с 5% крови человека.

В соответствии со схемой III 2-й пассаж также проводили на среде КУА с 5% крови человека, а 3-й пассаж осуществляли в динамических условиях с использованием ЖПС. Четвертый пассаж заключался в культивировании в ЖСС в стационарных условиях.

Вирулентность свежeweделенных и вакцинных штаммов определяли на модели экспериментального менингоэнцефалита у мышей. Мышам вводили интрацеребрально три дозы культуры *B. pertussis* в объеме 0,03 мл с последующим учетом количества павших животных в течение 2 нед и расчетом LD<sub>50</sub>.

БКВ была получена по оригинальной методике из супернатанта жидкой среды культивирования *B. pertussis* штаммов № 211, 305 и 475a [9, 10].

Протективную активность БКВ исследовали на модели экспериментального менингоэнцефалита у мышей при интрацеребральном заражении

иммунизированных мышей вирулентной культурой штамма *B. pertussis* № 18323. Результаты учитывали в течение 2 нед после заражения<sup>2</sup>. Контрольных мышей заражали интрацеребрально двукратными дозами микробных взвесей культуры штамма *B. pertussis* № 18323 в объеме 0,03 мл с последующим наблюдением в течение 14 сут, учетом количества павших животных и расчетом LD<sub>50</sub>.

Лейкоцитозстимулирующую активность (ЛСА), токсичность и гистаминсенсibiliзирующие свойства препаратов проверяли в соответствии с правилами проведения доклинических исследований лекарственных средств [11].

LD<sub>50</sub> и МЗЕ/мл (международная защитная единица в 1 мл вакцины) рассчитывали по методу Вильсона и Вустера с использованием таблиц Национального института здоровья США.

## Результаты

Изучение морфологических, серологических и культуральных свойств штамма № 211 показало, что он отвечает требованиям, предъявляемым к гладкой форме (фаза 1) бактерий и может быть использован для производства коклюшных вакцин. Коклюшные бактерии штамма № 211 — неподвижные, грамтрицательные, овоидной формы мелкие палочки — располагались в мазках отдельно или парами. На среде Борде–Жангу колонии круглые, сероватого цвета, мелкие, блестящие, выпуклые. При постановке развернутой реакции агглютинации культура штамма № 211 с диагностическими коклюшными сыворотками к видовым агглютиногенам 1.2.3 проявляла активность в разведениях 1:1280, 1:160 и 1:640 соответственно, культура агглютинировалась коклюшной антибактериальной сывороткой.

Свежeweделенный штамм № 211 *B. pertussis* отличался высокими вирулентными свойствами (LD<sub>50</sub> ≤ 4,8 млн микробных клеток) и в 3,7 раза превышал вирулентность вакцинных штаммов (LD<sub>50</sub> = 18,2 ± 2,6 млн микробных клеток).

Важным этапом технологии изготовления БКВ является культивирование штаммов для получения биомассы, достаточной для выделения комплекса протективных антигенов. При выращивании на плотной среде КУА (схема I) свежeweделенный штамм давал скудный рост, а при дальнейшем культивировании в ЖСС накопление биомассы было недостаточным для выделения комплекса протективных антигенов (15,6 ± 0,5 МОЕ/мл). Использование схемы II позволило улучшить рост культур на плотной среде, однако выход биомассы оставался недостаточным (37,1 ± 3,8 МОЕ/мл). Для выделения комплекса протективных антигенов из надосадочной жидкости среды культивирования *B. pertussis*

<sup>1</sup> МУК 4.2.2317-08. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракклюшных и бронхисептикозных бактерий. М.; 2009.

<sup>2</sup> МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. М.; 1998.

выход биомассы, в соответствии с ранее полученными данными по изготовлению БКВ из вакцинных штаммов, должен быть не ниже 50 МОЕ/мл.

Наиболее высокий выход биомассы был отмечен при использовании схемы III — накопление биомассы было достаточным для выделения комплекса антигенов из надосадочной жидкости культуры и составляло  $68,7 \pm 4,6$  МОЕ/мл.

Одним из этапов технологии изготовления БКВ является детоксикация комплекса антигенов, выделенного из надосадочной жидкости среды культивирования штаммов. Результаты детоксикации оценивали на мышах в тесте по определению ЛСА, которая по требованиям ВОЗ не должна превышать 1 ЕД. На 1-м этапе исследований была использована методика, ранее отработанная при изготовлении БКВ из вакцинных штаммов, согласно которой детоксикацию антигенного комплекса *B. pertussis* проводили в течение 17 сут. ЛСА антигенного комплекса из штамма № 211 до детоксикации составляла  $10,2 \pm 2,4$  ЕД, а после детоксикации — 1,2 ЕД. В связи с этим был увеличен срок детоксикации комплекса до 19–21 сут. При детоксикации в течение 19 сут индекс ЛСА составлял 0,49 ЕД и практически не изменялся при дальнейшем увеличении срока детоксикации.

С использованием детоксицированных комплексов антигенов, выделенных из среды культивирования свежесыведенного и вакцинных штаммов, были приготовлены два варианта БКВ:

- БКВ1 содержала в 1 иммунизирующей дозе для человека 25 мкг белка антигенного комплекса свежесыведенного штамма *B. pertussis* № 211;
- БКВ2 содержала в 1 иммунизирующей дозе для человека 25 мкг (в соотношении 1:1) белка антигенных комплексов вакцинных штаммов *B. pertussis* № 305 и 475а.

Все исследованные варианты вакцин обладали выраженной защитной активностью (не менее 8 МЗЕ/мл) и соответствовали требованиям ВОЗ (таблица). Следует отметить, что протективная активность БКВ1 (17,1 МЗЕ/мл) в 1,7 раза превышала таковую у БКВ2 (10,2 МЗЕ/мл). Токсичность препаратов была исследована в тесте изменения массы тела мышей в дозе 25 мкг (рекомендуемой для человека). Все препараты были безвредны в испытываемой дозе (прибавка массы тела мышей по отношению к контролю составляла более 60%), что свидетельствует об отсутствии токсичности у испытываемых вакцин.

Получение мышами БКВ в дозах 25, 50 и 100 мкг не вызывало гибели животных после введения дигидрохлорида гистамина. Гистаминсенсibiliзирующая доза ( $ГСД_{50}$ ) была более 100 мкг.  $ГСД_{50}$  отраслевого стандартного образца токсичности (ОСО-5) коклюшных вакцин составляла 4,8 МОЕ/мл. Таким образом, в одной иммунизирующей дозе (25 мкг) БКВ содержится 0,25  $ГСД_{50}$ , что в 8,4 раза ниже, чем

### Генотипическая характеристика штаммов *B. pertussis* и биологические свойства бесклеточных коклюшных вакцин, изготовленных на их основе

#### Genetic characteristics of *B. pertussis* strains and biological properties of cell-free pertussis vaccines manufactured on their basis

Препарат БКВ (штаммы) CPV (strains)	Генетическая характеристика штаммов Genetic characteristics of the strains			Биологические свойства вакцин Biological properties of the vaccines			
				протективная активность protective activity		безопасность в тесте изменения массы тела мышей safety in the test of changes in the mice body weight	
	<i>fim 2, 3</i>	<i>ptxA/ptxP</i>	<i>prn</i>	в ЕД <sub>50</sub> , мл in ED <sub>50</sub> , ml	в МЗЕ/мл in IPU/ml	прирост массы, г weight gain, g	прирост, % по отношению к контролю (физиологический раствор ≥60%) weight gain, % relative to control (PBS ≥60%)
БКВ1 (свежесыведенный штамм № 211) CPV1 (211 strain freshly isolated)	<i>fim2-1</i> <i>fim3B</i>	<i>ptxA1/ptxP3</i>	<i>prn2</i>	0,021 (0,014–0,032)	17,1	3,0 ± 0,1	93,7
БКВ2 (вакцинные штаммы № 305, 475а) CPV2 (305, 475a vaccine strains)	<i>fim2-1</i> <i>fim3A</i>	<i>ptxA2/ptxP1</i> <i>ptxA4/ptxP1</i>	<i>prn1</i>	0,035 (0,021–0,041)	10,2	2,6 ± 0,1	81,2
Отраслевой стандартный образец иммуногенности (ОСО-3) Industry standard of immunogenicity				0,012 (0,009–0,019)			
Физиологический раствор PBS						3,2 ± 0,09	

в ОСО-5, содержащем в одной иммунизирующей дозе (10 МОЕ) 2,1 ГСД<sub>50</sub>. Полученные результаты свидетельствуют о низких сенсibiliзирующих свойствах БКВ из свежeweыделенного и вакцинных штаммов, соответствующих требованиям ВОЗ.

### Обсуждение

Для изготовления БКВ был использован штамм № 211, выделенный в 2003 г. от больного коклюшем ребенка, соответствующий по генотипическим характеристикам современной циркулирующей популяции возбудителя коклюша и, как большинство циркулирующих штаммов, отличающийся по генотипическим характеристикам от штаммов, используемых в производстве коклюшных вакцин. Одним из критериев отбора данного штамма как источника протективных антигенов для изготовления БКВ является его принадлежность по генотипу к штаммам *B. pertussis*, доминирующим в настоящее время в России и несущим промотор коклюшного токсина *ptxP3* и серовариант 1.2.3. Однако вирулентность штаммов определяется увеличением не только продукции коклюшного токсина, но и адгезивных свойств штаммов, о чем свидетельствует преимущество штамма № 211, серовар 1.2.3. Для решения поставленной задачи были разработаны оптимальные условия культивирования свежeweыделенного штамма и режим детоксикации комплекса протективных антигенов, оценена протективная активность и безопасность БКВ из антигенов этого штамма. Использование обогащенных питательных сред позволило получить достаточно высокий уровень выхода биомассы. При детоксикации комплекса антигенов из свежeweыделенного штамма в условиях, отработанных для вакцинных штаммов, ЛСА составляла 1,2 ЕД. Увеличение срока детоксикации до 19 дней позволило снизить ЛСА до 0,49 ЕД.

С использованием детоксицированных комплексов протективных антигенов, выделенных из среды культивирования свежeweыделенного и вакцинных штаммов, были приготовлены два варианта БКВ. Изучение протективных свойств полученных препаратов показало, что все исследованные варианты БКВ обладали выраженной защитной активностью (не менее 8 МЗЕ/мл), а также отсутствием токсических и сенсibiliзирующих свойств. При этом по содержанию МЗЕ/мл БКВ, изготовленная из комплекса антигенов свежeweыделенного штамма, в 1,7 раза превосходила БКВ, полученную из вакцинных штаммов, что свидетельствует о высокой протективной активности данной БКВ. Одной из возможных причин увеличения протективной активности является повышенная вирулентность штамма № 211, несущего новый аллельный вариант промотора гена *ptxP3*, связанного с повышенной продукцией коклюшного токсина и увеличением

адгезивных свойств, связанных с продукцией фимбрий 2 и 3 [3, 12].

Преимуществами штамма № 211 являются высокая вирулентность, в 3,7 раза превышающая вирулентность вакцинных штаммов, соответствие его генотипа циркулирующим в настоящее время в России штаммам *B. pertussis*, экспрессия полного набора агглютиногенов 1, 2 и 3, высокий выход биомассы при культивировании в жидкой питательной среде и повышенные протективные свойства полученной из него БКВ. Штамм № 211 депонирован в «Научном центре экспертизы средств медицинского применения» под № 317 от 15.09.2017. Получен патент № 2689903 «Свежeweыделенный штамм бактерий *Bordetella pertussis* — продуцент комплекса протективных антигенов для производства бесклеточной коклюшной вакцины». В целом полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования свежeweыделенного штамма № 211 для производства БКВ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Петрова М.С., Попова О.П., Алешкин В.А. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(4): 22-8. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-22-28>
2. Еженедельный эпидемиологический бюллетень. Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ — август 2015; 35. Available at: [https://www.who.int/immunization/policy/position\\_papers/pp\\_pertussis\\_august2015\\_ru.pdf](https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/pp_pertussis_august2015_ru.pdf)
3. Anselmo A., Buttinelli G., Ciammaruconi A., Midulla F., Nicolai A., Fortunato A., et al. Draft genome sequence of a *Bordetella pertussis* strain with the virulence-associated allelic variant *ptxP3*, isolated in Italy. *Genome Announc.* 2015; 3(5): e00944-15. DOI: <http://doi.org/10.1128/genomeA.00944-15>
4. Bailon H., León-Janampa N., Padilla C., Hozbor D. Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of *Bordetella pertussis* in Perú, 2012. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 422. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1700-2>
5. Carbonetti N.H., Wirsing von König C.H., Lan R., Jacob-Dubuisson F., Cotter P.A., Deora R., et al. Highlights of the 11<sup>th</sup> International *Bordetella* Symposium: from basic biology to vaccine development. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(11): 842-50. DOI: <http://doi.org/10.1128/CVI.00388-16>
6. van Gent M., Heuvelman C.J., van der Heide H.G., Hallander H.O., Advani A., Guiso N., et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 34(4): 821-30. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-014-2297-2>
7. Семин Е.Г., Синяшина М.Н., Медкова А.Ю., Каратаев Г.И. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа РТхР3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; (4): 33-41. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41>
8. Мазурова И.К., Борисова О.Ю., Комбарова С.Ю., Гадуа Н.Т., Агешкин В.А. Динамика изменчивости основных генов патогенности штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в Москве (1948–2005 гг.). *Молекулярная медицина*. 2008; (1): 40-5.

9. Зайцев Е.М., Бажанова И.Г., Брицина М.В. Протективная активность и безопасность бесклеточной коклюшной вакцины из вакцинных и свежесвищенного штамма *Bordetella pertussis*. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(2): 31-4.  
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-2-31-34>
10. Захарова Н.С., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г., Озерецковская М.Н., Зайцев Е.М. и др. Отечественная бесклеточная коклюшная вакцина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008; (1): 35-41.
11. Миронов А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты)*. Часть 2. М.: Гриф и К; 2012.
12. Bart M.L., van Gent M., van der Heide H.G., Boekhorst J., Hermans P., Parkhill J., et al. Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics*. 2010; 11: 627. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-627>
5. Carbonetti N.H., Wirsing von König C.H., Lan R., Jacob-Dubuisson F., Cotter P.A., Deora R., et al. Highlights of the 11<sup>th</sup> International *Bordetella* Symposium: from basic biology to vaccine development. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(11): 842-50.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/0014-8177-1128-CVI.00388-16>
6. van Gent M., Heuvelman C.J., van der Heide H.G., Hallander H.O., Advani A., Guiso N., et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 34(4): 821-30.  
DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-014-2297-2>
7. Semin E.G., Sinyashina M.N., Medkova A.Yu., Karataev G.I. Construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria of ptxp3 genotype. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; (4): 33-41.  
DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41> (in Russian)
8. Mazurova I.K., Borisova O.Yu., Kombarova S.Yu., Gadua N.T., Ageshkin V.A. Trends in the variability of major pathogenicity genes of *Bordetella pertussis* strains isolated from patients with pertussis in Moscow (1948–2005). *Molekulyarnaya meditsina*. 2008; (1): 40-5. (in Russian)
9. Zaytsev E.M., Bazhanova I.G., Britsina M.V. Protective activity and safety of acellular pertussis vaccine from vaccine and freshly isolated strain *Bordetella pertussis*. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2017; 16(2): 31-4.  
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-2-31-34> (in Russian)
10. Zakhharova N.S., Britsina M.V., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G., Ozeretskovskaya M.N., Zaytsev E.M., et al. Domestic acellular pertussis vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2008; (1): 35-41. (in Russian)
11. Mironov A.N. *Guidelines for Preclinical Studies of Drugs (Immunobiological Drugs)*. Part 2. Moscow: Griif i K; 2012. (in Russian)
12. Bart M.L., van Gent M., van der Heide H.G., Boekhorst J., Hermans P., Parkhill J., et al. Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics*. 2010; 11: 627.  
DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-627>

## REFERENCES

1. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Petrova M.S., Popova O.P., Aleshkin V.A., et al. Structure of population of strains of the *Bordetella pertussis* in the Russia. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2016; 15(4): 22-8.  
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-22-28> (in Russian)
2. Weekly Epidemiological Record (WER). WHO position paper on pertussis vaccines — August 2015. Available at: <https://www.who.int/wer/2015/wer9035.pdf>
3. Anselmo A., Buttinelli G., Ciammaruconi A., Midulla F., Nicolai A., Fortunato A., et al. Draft genome sequence of a *Bordetella pertussis* strain with the virulence-associated allelic variant ptxP3, isolated in Italy. *Genome Announc.* 2015; 3(5): e00944-15. DOI: <http://doi.org/10.1128/genomeA.00944-15>
4. Bailon H., León-Janampa N., Padilla C., Hozbor D. Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of *Bordetella pertussis* in Perú, 2012. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 422.  
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1700-2>

## Информация об авторах:

**Зайцев Евгений Михайлович**<sup>✉</sup> — д.м.н., зав. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>.  
E-mail: [pertussis@yandex.ru](mailto:pertussis@yandex.ru)

**Бажанова Ирина Глебовна** — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1404-1498>.  
E-mail: [ibajanowa@yandex.ru](mailto:ibajanowa@yandex.ru)

**Брицина Марина Васильевна** — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>.  
E-mail: [britsinamarina@yandex.ru](mailto:britsinamarina@yandex.ru)

**Мерцалова Наталия Устиновна** — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9072-2538>.  
E-mail: [n.mertzalova@yandex.ru](mailto:n.mertzalova@yandex.ru)

**Озерецковская Мария Николаевна** — к.м.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>.  
E-mail: [manja33@yandex.ru](mailto:manja33@yandex.ru)

**Участие авторов:** все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

## Information about the authors:

**Evgeniy M. Zaitsev**<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.  
ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>.  
E-mail: [pertussis@yandex.ru](mailto:pertussis@yandex.ru)

**Irina G. Bazhanova** — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1404-1498>.  
E-mail: [ibajanowa@yandex.ru](mailto:ibajanowa@yandex.ru)

**Marina V. Britsina** — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>.  
E-mail: [britsinamarina@yandex.ru](mailto:britsinamarina@yandex.ru)

**Natalia U. Mertsalova** — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9072-2538>.  
E-mail: [n.mertzalova@yandex.ru](mailto:n.mertzalova@yandex.ru)

**Mariya N. Ozeretskovskaya** — PhD (Med.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>.  
E-mail: [manja33@yandex.ru](mailto:manja33@yandex.ru)

**Contribution:** the authors contributed equally to this article.