

© Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Амичба А.А., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З., Джидарян А.А., Кубрава Д.Т., Конджария И.Г., Баркая В.С., Миквабия З.Я., Каратаев Г.И., 2020



## Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Macaca mulatta*

Медкова А.Ю.<sup>1,2</sup>, Синяшина Л.Н.<sup>1</sup>, Амичба А.А.<sup>3</sup>, Семин Е.Г.<sup>1</sup>, Шевцова З.В.<sup>3,4</sup>, Матуа А.З.<sup>3,4</sup>, Джидарян А.А.<sup>3</sup>, Кубрава Д.Т.<sup>3</sup>, Конджария И.Г.<sup>3,4</sup>, Баркая В.С.<sup>3</sup>, Миквабия З.Я.<sup>3</sup>, Каратаев Г.И.<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ, 121359, Москва, Россия;

<sup>3</sup>НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия;

<sup>4</sup>Абхазский государственный университет, 384904, Сухум, Абхазия

**Введение.** Рост заболеваемости коклюшем среди разных групп населения и несовершенство существующих профилактических препаратов требуют разработки новых безопасных вакцин, удобных для иммунизации детей раннего младенческого возраста, реиммунизации подростков и взрослых.

**Целью** настоящей работы является характеристика безопасности, иммуногенности и защитной активности сконструированных нами аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* 4МКС в тесте интраназального заражения иммунизированных обезьян *Macaca mulatta* вирулентными бактериями возбудителя коклюша.

**Материалы и методы.** Для иммунизации и экспериментальной инфекции использованы 5 половозрелых, клинически здоровых обезьян *Macaca mulatta* в возрасте 3–4 лет. Реиммунизацию проводили через 6 мес. В качестве контроля использовали 3 неиммунизированных животных того же возраста.

**Результаты.** Интраназальная однократная и повторная инокуляции аттенуированных бактерий *B. pertussis* не вызывали воспалительных процессов в носоглотке обезьян *Macaca mulatta* и изменений лабораторных показателей крови, наблюдаемых после экспериментальной инфекции нечеловекообразных приматов вирулентными бактериями. Не зарегистрировано увеличения количества общих IgE в сыворотке крови обезьян *Macaca mulatta* после однократной и двукратной иммунизации. Интраназальная иммунизация обезьян *Macaca mulatta* аттенуированными и вирулентными бактериями *B. pertussis* приводит к формированию защитной реакции организма на повторную инфекцию, проявляющейся в подавлении размножения бактерий, ускорении темпов их элиминации из носоглотки животных и развитии гуморального иммунного ответа на инфекцию. Развитие иммунитета к повторной коклюшной инфекции сопровождается выраженным бустерным эффектом.

**Обсуждение.** Представленные результаты указывают на общие механизмы формирования поствакцинального иммунитета в результате интраназальной вакцинации животных и постинфекционного противокклюшного иммунитета, обеспечивающих защиту от повторного инфицирования бактериями *B. pertussis* и развития клинических симптомов коклюша.

**Ключевые слова:** коклюш; живая вакцина интраназального применения; защитная активность; аттенуированные бактерии *Bordetella pertussis*; нечеловекообразные обезьяны.

**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:** Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Амичба А.А., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З., Джидарян А.А., Кубрава Д.Т., Конджария И.Г., Баркая В.С., Миквабия З.Я., Каратаев Г.И. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* на экспериментальной модели *Macaca mulatta*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 312–323.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3>

Поступила 12.06.2020

Принята в печать 08.07.2020

## Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model

Alisa Yu. Medkova<sup>1,2</sup>, Lyudmila N. Sinyashina<sup>1</sup>, Astanda A. Amichba<sup>3</sup>, Evgeniy G. Semin<sup>1</sup>,  
Zinaida V. Shevtsova<sup>3,4</sup>, Alisa Z. Matua<sup>3,4</sup>, Anush A. Djidaryan<sup>3</sup>, Dzhenni T. Kubrava<sup>3</sup>,  
Irina G. Kondzhariya<sup>3,4</sup>, Vladimir S. Barkaya<sup>3</sup>, Zurab Ya. Mikvabiya<sup>3</sup>, Gennadiy I. Karataev<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Central Clinical Hospital with a Polyclinic, Office of the President of the Russian Federation, 121359, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia;

<sup>4</sup>Abkhazian State University, 394904, Sukhumi, Abkhazia

**Introduction.** An increasing incidence of pertussis among different groups of population and shortcomings of the existing preventive solutions pinpoint urgency of development of new safe vaccines suitable for immunization of infants and for booster immunization of adolescents and adults.

**The purpose** of this study is evaluation of safety, immunogenicity and protective activity of the new constructed attenuated *Bordetella pertussis* bacteria 4MKS by infecting immunized *Macaca mulatta* monkeys intranasally with virulent bacteria of the pertussis pathogen.

**Materials and methods.** Five adult, clinically healthy *Macaca mulatta* monkeys aged 3–4 years were used for immunization and experimental infection. The re-immunization was performed in 6 months. Three non-immunized animals of the same age were used as controls.

**Results.** The intranasal single-dose inoculation and re-inoculation of attenuated *B. pertussis* bacteria did not cause any nasopharyngeal inflammation in the rhesus monkeys and any changes in the blood lab test values after the nonhuman primates had been infected with virulent bacteria. No elevation of total IgE was detected in blood serum of the *Macaca mulatta* monkeys after the single-dose and double-dose immunization. When the monkeys were intranasally immunized with attenuated and virulent *B. pertussis* bacteria, they developed a defensive reaction to re-infection, namely suppression of the bacterial growth, increased rates of elimination of bacteria from the animals' nasopharynxes and development of a humoral immune response to the infection. The development of immunity against pertussis re-infection is accompanied by a pronounced booster effect.

**Discussion.** The obtained results suggest common mechanisms of development both of post-vaccination immunity after intranasal vaccination of animals and infection-acquired immunity against pertussis. Both of them provide protection against re-infection with *B. pertussis* bacteria and prevent development of clinical symptoms of pertussis.

**Keywords:** *pertussis; live intranasal vaccine; protective activity; attenuated Bordetella pertussis bacteria; nonhuman primates.*

**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:** Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Amichba A.A., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Djidaryan A.A., Kubrava D.T., Kondzhariya I.G., Barkaya V.S., Mikvabiya Z.Ya., Karataev G.I. [Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated *Bordetella pertussis* bacteria on the *Macaca mulatta* model]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 312–323. (In Russ.).  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-3>

Received 12 June 2020  
Accepted 8 July 2020

## Введение

Несмотря на массовую противокклюшную вакцинацию, проводимую в разных странах с начала 1950-х гг., элиминации возбудителя коклюша среди населения не происходит. На фоне гиподиагностики коклюша ежегодно в мире регистрируется более 16 млн случаев заболевания разной степени тяжести, из которых около 200 тыс. заканчиваются летальным исходом [1]. В последнее десятилетие отмечается значительный рост числа лабораторно подтвержденных случаев коклюша среди подростков и взрослых [2, 3], распространение стертых форм заболевания, выявлены бессимптомные носительства бактерий *Bordetella pertussis* (BP) [2, 4, 5].

В США, где охват детей прививками с коклюшной вакциной (КВ) составляет 95%, с начала 2000-х гг. отмечен значительный рост заболеваемости коклюшем, приближающейся к довакцинному периоду [6, 7]. Растет заболеваемость в Италии и Англии [8, 9]. В России в 2018 г. зарегистрировано более чем 2-кратное увеличение числа случаев коклюша по сравнению с 2017 г. Тенденция роста заболеваемости сохранялась как в 2019 г., так и в начале 2000 г. [10]. В предыдущие годы рост заболеваемости регистрировали главным образом в Москве и Санкт-Петербурге, что связано, вероятно, с качеством диагностики [11].

Для профилактики коклюша в настоящее время используют вакцины, содержащие корпускулярный

коклюшный компонент (цельноклеточные КВ — ЦКВ) или бесклеточный коклюшный компонент (бесклеточные КВ — БКВ) в сочетании с инактивированными дифтерийным и столбнячным анатоксинами. Иногда ЦКВ или БКВ используют как моновакцины. Считается, что БКВ менее реактогенна, но прямые исследования на приматах показали, что она не обеспечивает антибактерийного иммунитета и не защищает животных от экспериментальной коклюшной инфекции [12]. На невысокую эффективность ревакцинации подростков и взрослых БКВ указывает ее сравнительное определение заболеваемости вакцинированной и невакцинированной популяций [13, 14].

Другим важным недостатком современных КВ является невысокая длительность сформированного иммунитета. Изучение эффективности КВ разного типа показало, что длительность поствакцинального иммунитета не превышает 5 лет. После перенесенного заболевания иммунитет сохраняется до 10–15 лет [15].

Все современные КВ вводятся детям старше 2 мес не менее 3 раз. Таким образом, полный цикл вакцинации завершается не раньше чем к 6-месячному возрасту ребенка, что сохраняет высокий риск в первые, самые опасные в отношении заболевания коклюшем, месяцы его жизни.

Рост заболеваемости коклюшем, в том числе среди старших детей и взрослого населения, привел к пониманию необходимости ревакцинации подростков и взрослых. Рассматривается необходимость вакцинации матерей и формирования «семейного иммунитета» [3, 4, 16, 17]. Для этих целей рекомендована только БКВ [4], которая, как упомянуто выше, не обеспечивает защиту детей и взрослых от заражения и распространения инфекции. Таким образом, приходится констатировать, что, несмотря на целесообразность ревакцинации подростков и взрослых, формирования семейного иммунитета, в настоящее время отсутствует вакцина для этих целей. ЦКВ не рекомендована ВОЗ к применению у взрослых, а современная БКВ, скорее всего, неэффективна. БКВ продемонстрировала свою эффективность и безопасность в качестве альтернативы ЦКВ для вакцинации младенцев. Такая вакцинация контролирует смертность и тяжесть заболевания детей младенческого, наиболее уязвимо-го для коклюша возраста. Однако, как и ЦКВ, она требует 3–4-кратной вакцинации и плохо защищает детей от инфицирования и заболевания при незавершенном цикле вакцинации.

В рамках доклинических исследований нами показаны безопасность интраназального введения аттенуированных бактерий *BP* 4MKS лабораторным животным и защитный эффект вакцинации мышей в отношении их внутримозгового и интраназального заражения вирулентными бактериями

*BP* [18]. Исследования последних лет продемонстрировали перспективность экспериментальной модели нечеловекообразных обезьян для изучения иммунобиологических характеристик возбудителя коклюша и иммуногенности КВ [19–23]. Показано, что экспериментальная инфекция обезьян приводит к развитию лабораторных показателей коклюшной инфекции, гиперемии носоглотки, длительной персистенции *BP* и нарастанию титра специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови животных. Исследования на павианах гамадрилах продемонстрировали возможность передачи инфекции от человека к обезьяне и между обезьянами [23].

**Целью** настоящей работы является характеристика безопасности, иммуногенности и защитной активности сконструированных нами аттенуированных бактерий *BP* 4MKS в тесте интраназального заражения иммунизированных обезьян *Macaaca mulatta* (макака резус; МР) вирулентными бактериями возбудителя коклюша.

## Материалы и методы

*BP* культивировали на твердых питательных средах КУА с добавлением 10% дефибринированной крови барана при 36°C. Аттенуированные *BP* 4MKS из назофарингеальных смывов высеивали на КУА, содержащую 200 мкг/мл стрептомицина.

Для определения серотипового состава культуры использовали сыворотки диагностические коклюшные к агглютиногенам бактерий *BP* 1, 2, 3 адсорбированные, для реакции агглютинации, сухие (ФГБУ НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи) в соответствии с рекомендациями производителя.

Иммунизацию и экспериментальное инфицирование проводили у 5 половозрелых, клинически здоровых МР в возрасте 3–4 лет. Реиммунизацию проводили через 6 мес. В качестве контроля использовали 3 неиммунизированных МР того же возраста. Работа с животными осуществлялась на базе Сухумского питомника обезьян (НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии). Использование животных соответствовало принципам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, а также требованиям отечественных нормативных документов.

Защитную активность аттенуированных бактерий определяли по сравнению динамики выведения вирулентных бактерий *BP* 475 из носоглотки вакцинированных и контрольных — неиммунизированных МР, развитию иммунологических реакций, а также клинических симптомов и лабораторных признаков коклюша.

Перед манипуляциями (иммунизацией, экспериментальной инфекцией, взятием назофарингеальных мазков) МР подвергали наркозу внутримышечным введением 0,03–0,04 мл золетила

(«Virbac», Франция) в концентрации 100 мг/мл (с премедикацией ксилазингидрохлоридом, 20 мг/мл). Экспериментальную инфекцию и вакцинацию ( $10^7$ – $10^{10}$  бактерий) осуществляли путем введения 0,5 мл суспензии вирулентных или аттенуированных бактерий в каждую ноздрю животного в положении лежа на спине.

Кровь на анализ у МР брали без наркоза с использованием «прижимных клеток».

Для выявления ДНК бактерий *BP* использован смыв назофарингеальных тампонов в 500 мкл физиологического раствора. После центрифугирования ДНК выделяли с помощью стандартной обработки раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией на магнитном сорбенте («Promega»). Идентификацию ДНК бактерий *BP* проводили с помощью разработанной нами тест-системы ПЦР в реальном времени [24, 25].

Определение специфических к коклюшному токсину и филаментозному гемагглютинуину IgG, IgM и неспецифических IgE в сыворотках крови МР после одно- и двукратной интраназальной вакцинации проводили с применением тест-систем «Ridascreen». Неспецифические IgE определяли с помощью тест-системы «Вектор-Бест».

Результаты проанализированы по тесту Стьюдента. Различия значимы при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

### Общее состояние МР и анализ крови после иммунизации и заражения вирулентными *BP* 475

Первая и повторная интраназальные иммунизации МР не привели к отклонениям от нормы в поведении, общем состоянии животных, формуле крови, количестве лейкоцитов и глюкозы, активности аспартат- и аланинаминотрансферазы, к возникновению воспалительных или других реакций в носоглотке (табл. 1).

Экспериментальная инфекция иммунизированных обезьян вирулентными бактериями *BP* через 12 мес после реиммунизации также не выявила отклонений измеренных параметров от нормы (табл. 1). При этом в контрольном эксперименте, при заражении нативных обезьян вирулентными бактериями, зарегистрированы достоверное увеличение количества лейкоцитов и снижение содержания глюкозы (табл. 1), наличие слизи и воспаления носоглотки на 3–10-е сутки инфекции. Кашля у контрольных и опытных обезьян не зарегистрировано.

Результаты измерений неспецифических IgE в сыворотке крови иммунизированных и инфицированных животных представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что из иммунизированных животных только у обезьяны 31883, а из контрольных

**Таблица 1.** Биохимический анализ крови МР после интраназальной иммунизации аттенуированными бактериями *BP* и экспериментальной инфекции вирулентными бактериями *BP* 475

**Table 1.** RMs' blood biochemistry after their intranasal immunization with attenuated *BP* bacteria and experimental infection with virulent *BP* 475 bacteria

Интраназальная инокуляция Intranasal inoculation	Дни Days	Аланинамино- трансфераза, Ед/мл Alanine aminotransferase, U/ml	Аспартатамино- трансфераза, Ед/мл Aspartate aminotransferase, U/ml	Глюкоза, Мм/л Glucose, Mm/l	Лейкоциты, $\times 10^3$ White blood cells, $\times 10^3$
Первая иммунизация First immunization	Фон Background	34,5 ± 4,4	36,5 ± 12,5	5,4 ± 1,1	10,1 ± 2,8
	3	38,8 ± 10,2	36,2 ± 10,4	4,7 ± 0,3	8,2 ± 1,9
	7	42,1 ± 6,1	33,1 ± 2,6	5,5 ± 0,5	9,8 ± 2,7
	14	46,1 ± 6,7	41,1 ± 10,6	4,7 ± 0,7	8,8 ± 2,3
Повторная иммунизация Re-immunization	Фон Background	39,1 ± 4,6	43,5 ± 11,5	4,4 ± 0,6	9,1 ± 2,6
	3	37,2 ± 3,9	38,2 ± 8,4	4,7 ± 0,4	7,2 ± 1,9
	7	40,0 ± 3,1	34,1 ± 5,6	5,3 ± 0,5	8,0 ± 3,1
	14	41,8 ± 4,0	39,1 ± 7,1	4,7 ± 0,4	8,3 ± 2,5
Инфекция бактериями <i>BP</i> 475 нативных обезьян Infection of native monkeys with <i>BP</i> 475 bacteria	Фон Background	42,2 ± 6,4	42,0 ± 6,5	6,2 ± 0,3	12,1 ± 1,4
	3	44,2 ± 4,9	39,2 ± 7,4	5,7 ± 0,7	17,8 ± 2,9
	7	40,4 ± 4,1	41,1 ± 5,5	4,4 ± 0,6*	19,3 ± 2,9*
	14	39,8 ± 3,8	40,1 ± 5,1	4,7 ± 0,4*	19,3 ± 2,9*

**Примечание.** \* $p < 0,05$  по сравнению с фоном.

**Note.** \* $p < 0.05$  as compared to the background.

**Таблица 2.** Значения IgE в сыворотке крови МР, вакцинированных и ревакцинированных аттенуированными бактериями *BP*

**Table 2.** Values of IgE in blood sera of RMs vaccinated and re-vaccinated with attenuated *BP* bacteria

День после инфекции Day after infection	Номер обезьяны Monkey identification number									
	31881	31882	31883	31901	31908	31926	31927	31843	31870	31888
Первая иммунизация First immunization										
Фон Background	320	250	66	680	678					
7	290	190	73	–	–					
14	285	220	56	845	693					
24	427	350	48	690	578					
64	469	191	53	662	750					
180	668	117	63	609	555					
Реиммунизация через 6 мес Re-immunization in 6 months										
Фон Background	668	117	63	609	555					
7	720	141	31	745	449					
14	518	187	43	722	458					
24	562	203	62	648	–					
64	669	177	47	393	524					
180	580	258	–	–	180					
Заражение вирулентными бактериями <i>BP</i> Infection with virulent <i>BP</i> bacteria										
Фон Background	219	22	45	58	55	656	48	559	376	257
7	73	13	15	45	32	732	37	635	281	201
14	48	13	17	10	14	651	25	759	351	224
28	43	7	9	23	9	515	52	569	390	356

ных — 31927 содержатся IgE в количестве, близком к значениям отрицательного контроля у человека (20–30 МЕ/мл). У всех обезьяны 31882 значения IgE варьируют от 117 до 350 ед., у остальных — 200–850 ед.

Не зарегистрировано регулярного увеличения количества IgE после их иммунизации и реиммунизации. Напротив, у обезьяны 31882 наблюдается тенденция к снижению количества IgE уже после реиммунизации, и у всех животных регистрируется значительное уменьшение числа IgE после заражения вирулентными бактериями *BP* 475.

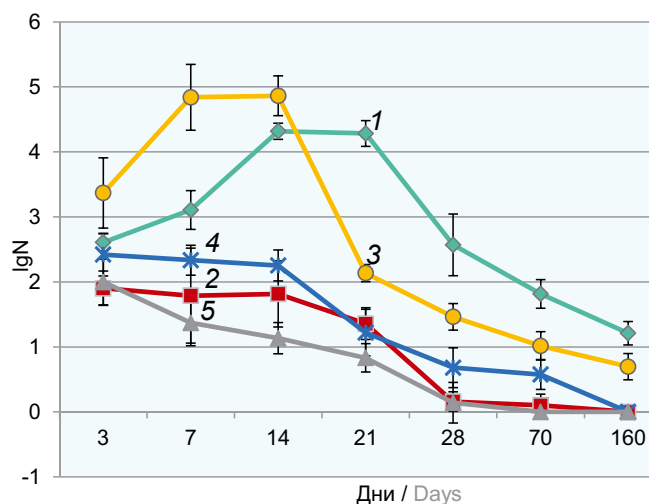
**Бактериальная нагрузка *BP* в носоглотке обезьян после иммунизации и заражения вирулентными *BP* 475**

Золотым стандартом для диагностики коклюша является бактериологический метод. Мы произво-

дили высеив материала смывов назофарингеальных тампонов, собранного с задней стенки носоглотки обезьян, на среду КУА с кровью, содержащую или не содержащую стрептомицин. Мазки брали через 1 ч после иммунизации или экспериментальной инфекции и далее в динамике через 3, 7, 10, 14 сут и т.д. Рост бактерий на среде КУА оценивали на 4–5-е сутки после посева. Выросшие колонии типировали с помощью специфических сывороток к агглютиногенам 1, 2 и 3. Рост бактерий *BP* на чашках удавалось регистрировать в течение первых 2 нед, в редких случаях — 3–4 нед после инокуляции. Дополнительную сложность представляло наличие посторонней микрофлоры, особенно при анализе материала на среде КУА без антибиотика. Поэтому, а также учитывая низкую эффективность метода бактериального посева, для диагностики коклюша и характеристики количества бактерий в

ротоносоглотке животных использован разработанный нами метод ПЦР в реальном времени.

На рис. 1 и 2 представлена динамика изменения количества геном-эквивалентов бактерий в условном миллилитре смыва назофарингеального тампона (аспирата) обезьян, однократно и двукратно инфицированных вирулентными и аттенуированными бактериями *BP*.

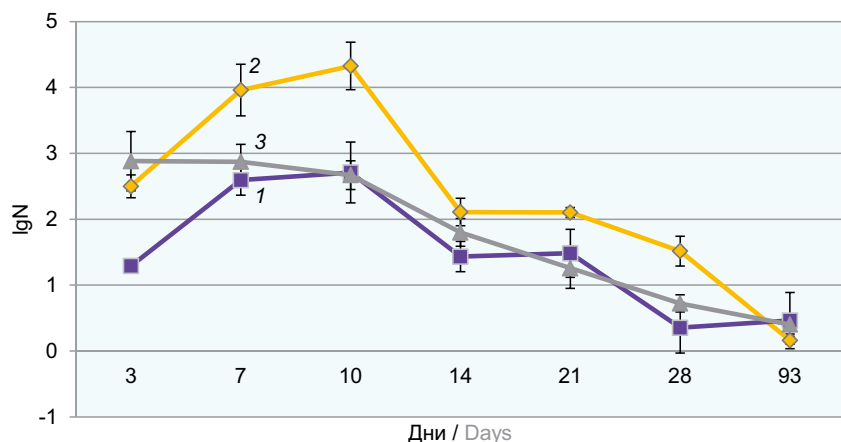


**Рис. 1.** Динамика изменения количества геном-эквивалентов бактерий *BP* в носоглотке МР после первого и повторного интраназального введения бактерий *BP*.

N — количество геном-эквивалентов бактерий *BP* в 1 мл назофарингеального аспирата. 1 — первое введение вирулентных бактерий *BP*; 2 — повторное введение вирулентных бактерий *BP*; 3 — первое введение аттенуированных бактерий *BP*; 4 — повторное введение аттенуированных бактерий *BP*; 5 — инфицирование вирулентными *BP* через 12 мес после введения аттенуированных бактерий *BP*.

**Fig. 1.** Changes in the number of *BP* genome-equivalents in the RMs' nasopharynx after the first and repeated intranasal vaccination with *BP* bacteria.

N — the number of *BP* genome-equivalents in 1 ml of the nasopharyngeal aspirate. 1 — the first vaccination with virulent *BP* bacteria; 2 — the repeated vaccination with virulent *BP* bacteria; 3 — the first vaccination with attenuated *BP* bacteria; 4 — the repeated vaccination with attenuated *BP* bacteria; 5 — the infection with virulent *BP* bacteria 12 months after the vaccination with attenuated *BP* bacteria.



**Рис. 2.** Динамика изменения количества геном-эквивалентов бактерий *BP* 18323 после 1-й и 2-й экспериментальной интраназальной инфекции МР.

1 — 1-я экспериментальная интраназальная инфекция в дозе  $10^7$  КОЕ; 2 — 1-я экспериментальная интраназальная инфекция в дозе  $10^9$  КОЕ; 3 — повторная экспериментальная инфекция *BP* 18323 в дозе  $10^9$ – $10^{10}$  КОЕ.

**Fig. 2.** Changes in the number of *BP* 18323 genome-equivalents after the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experimental intranasal infection of RMs.

1 — the 1<sup>st</sup> experimental intranasal infection at a dose of  $10^7$  CFU; 2 — the 1<sup>st</sup> experimental intranasal infection at a dose of  $10^9$  CFU; 3 — repeated experimental infection with *BP* 18323 at a dose of  $10^9$ – $10^{10}$  CFU.

Повторную инокуляцию аттенуированных бактерий *BP* проводили через 6 мес после 1-го введения, а экспериментальную инфекцию вирулентными бактериями *BP* — через 12 мес после реиммунизации.

Для прояснения зависимости картины элиминации от штамма бактерий и инфицирующей дозы проведено заражение половозрелых МР двумя дозами ( $10^7$  КОЕ и  $10^9$ – $10^{10}$  КОЕ) вирулентных бактерий *BP* 18323. Каждой из доз интраназально инфицировали по 3 МР. Повторно всех МР инфицировали одной дозой  $10^9$ – $10^{10}$  бактерий. Повторную экспериментальную инфекцию вирулентными *BP* 475 или *BP* 18323 проводили через 4–6 мес после 1-й инокуляции. На рис. 1 и 2 видно, что число бактерий в носоглотке МР достигает максимума через 7–14 дней после экспериментальной инфекции аттенуированными бактериями *BP* 4MKS ( $t_{max} = 7$ –14 дней), через 14–21 день после инфекции изогенными вирулентными бактериями *BP* 475 и через 7–10 дней после интраназальной инокуляции вирулентных бактерий *BP* 18323.

При посеве и ПЦР-анализе смывов назофарингеальных тампонов контрольных животных роста колоний и регистрации ДНК возбудителя коклюша не наблюдали.

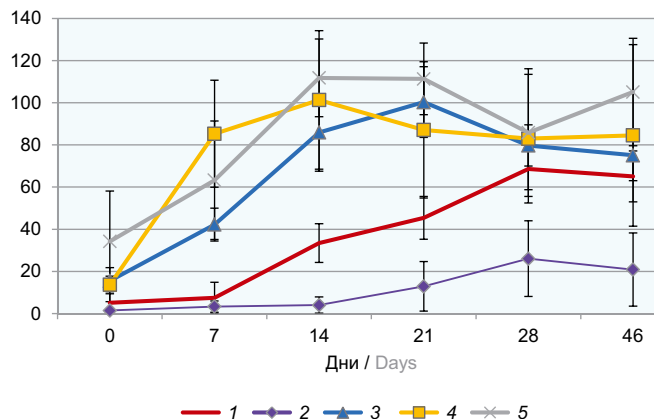
#### *Титр специфических IgG в сыворотке крови вакцинированных обезьян МР после интраназального инфицирования BP*

Все эксперименты, описанные в предыдущем разделе, сопровождались изучением динамики изменения уровня специфических IgG к *BP* в сыворотке крови инфицированных животных. При 1-й экспериментальной инфекции количество специфических IgG в сыворотке крови животных нарастало (рис. 3, 4) начиная с 10–14-го дня и достигало максимума к 28-му дню у обезьян, инфицированных вирулентными и аттенуированными бактериями *BP* 475, и к 35–48-му дню после инфекции *BP* 18323. После повторной инфекции бактериями *BP* 18323 IgG достигал максимального значения к 14-му дню после инокуляции бактерий любого штамма.



## Обсуждение

Доклинические исследования острой токсичности на крысах и мышатах, лейкоцитоз- и гистаминсенсibiliзирующей активности коклюшного токсина и весовой токсичности суспензии аттенуированных бактерий *BP* в классических экспериментах на линейных мышях, активности дермoneкротического эндотоксина и гипoaллергенности



**Рис. 3.** Динамика изменения количества IgG в сыворотке крови МР после 1-го и повторного интраназального введения им бактерий *BP*.

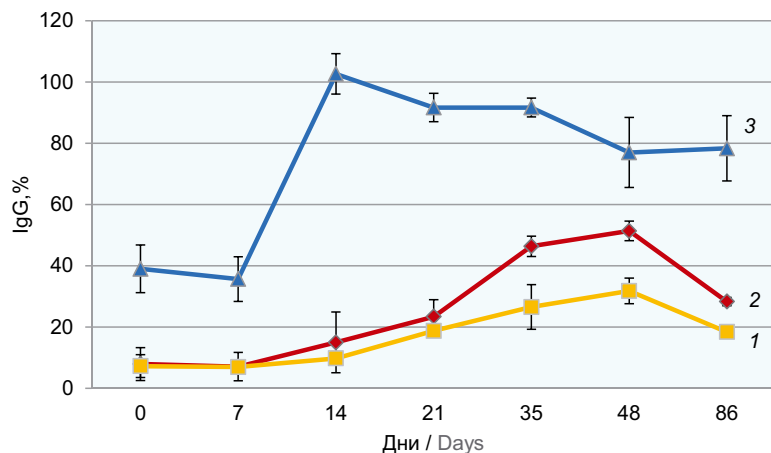
По оси ординат — относительное значение количества IgG (в %):  $OD_{C_+}/OD_I$ , где  $OD_{C_+}$  — значение оптической плотности положительного контроля,  $OD_I$  — оптическая плотность в лунке с исследуемой сывороткой.

1 — 1-е введение аттенуированных бактерий *BP*; 2 — 1-е введение вирулентных бактерий *BP*; 3 — инфицирование вирулентными бактериями *BP* через 12 мес после введения аттенуированных бактерий *BP*; 4 — повторное введение вирулентных бактерий *BP*; 5 — повторное введение аттенуированных бактерий *BP*.

**Fig. 3.** Changes in the IgG level in the RMs' blood serum after the 1<sup>st</sup> and repeated intranasal vaccination with *BP* bacteria.

On the vertical axis — the relative value of IgG levels (%):  $OD_{C_+}/OD_I$ , where  $OD_{C_+}$  — optical density of the positive control,  $OD_I$  — optical density in the well with the studied serum.

1 — the 1<sup>st</sup> vaccination with attenuated *BP* bacteria; 2 — the 1<sup>st</sup> vaccination with virulent *BP* bacteria; 3 — the infection with virulent *BP* bacteria 12 months after the vaccination with attenuated *BP* bacteria; 4 — the repeated vaccination with virulent *BP* bacteria; 5 — the repeated vaccination with attenuated *BP* bacteria.



**Рис. 4.** Динамика изменения относительного количества IgG в сыворотке крови МР после 1-й и повторной интраназальной инфекции животных бактериями *BP* 18323.

1 — 1-я экспериментальная интраназальная инфекция в дозе  $10^7$  КОЕ; 2 — 1-я экспериментальная интраназальная инфекция в дозе  $10^9$  КОЕ; 3 — повторная экспериментальная инфекция *BP* 18323 в дозе  $10^9$  КОЕ.

**Fig. 4.** Changes in the IgG relative levels in the RMs' blood serum after the 1<sup>st</sup> and repeated intranasal infection of the animals with *BP* 18323 bacteria.

1 — the 1<sup>st</sup> experimental intranasal infection at a dose of  $10^7$  CFU; 2 — the 1<sup>st</sup> experimental intranasal infection at a dose of  $10^9$  CFU; 3 — the repeated experimental infection with *BP* 18323 at a dose of  $10^9$  CFU.

в экспериментах на кроликах и морских свинках продемонстрировали безопасность интраназального применения сконструированной нами живой рекомбинантной коклюшной вакцины (ЖКВ) [18].

Исследования, проведенные нами на половозрелых нечеловекообразных приматах, показали, что экспериментальная интраназальная инфекция обезьян вирулентными бактериями *BP* приводит к развитию лабораторных признаков коклюшной инфекции у обезьян МР, павиан гамадрил, макак яванский и макак японский [22]. У неполовозрелых павианов анубисов развивался характерный для коклюша кашель [19]. Иммунизация павианов анубис ЖКВ на основе аттенуированных бактерий *BP* BPZE1 продемонстрировала ее безопасность и иммуногенность [21]. Эти результаты указывали на перспективность экспериментальной модели нечеловекообразных обезьян для изучения иммунологических характеристик возбудителя коклюша и иммуногенности коклюшных вакцин.

Представленные в настоящем исследовании результаты продемонстрировали отсутствие изменения показателей анализа крови и местных реакций у МР после интраназальной инокуляции аттенуированных бактерий *BP* в полном соответствии с экспериментами на мелких лабораторных животных. После первой и повторной вакцинации не зарегистрировано воспалительных процессов в носоглотке животных, наблюдаемых нами после экспериментальной инфекции вирулентными бактериями. Не отмечено увеличения количества общих IgE в сыворотке крови обезьян после вакцинации и ревакцинации. У всех иммунизированных животных регистрировалось снижение IgE после заражения вирулентными бактериями *BP* 475. Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами R. Li с соавт. [26], показавших, что интраназальная вакцинация мышей аттенуированными бактериями *BP* BPZE1 не только не вызывает аллергических реакций, но и защищает животных от экспериментального аллергического воспаления и снижает уровень IgE в сыворотке крови.

Следует отметить, что тест-система «IgE Ridascreen», предназначенная для работы с сыворотками крови человека, не выявляла IgE в сыворотке обезьян. Для регистрации IgE в сыворотке крови обезьян была использована тест-система «IgE Вектор-Бест». Эта система не применялась ранее для оценки IgE обезьян, поэтому полученные цифры не могут быть использованы для количественного определения, но пригодны для качественной оценки изменения содержания IgE после иммунизации животных.

Размножение вирулентных бактерий *BP* в носоглотке и их персистенция в организме человека являются важными характеристиками коклюшной инфекции. Согласно имеющимся в настоящее время данным иммунизация обезьян ЦКВ и аттенуированными бактериями, в отличие от БКВ, приводит к формированию мукозального иммунитета, препятствующего размножению вирулентных бактерий *BP* при их проникновении в организм человека и обезьяны. Представленные на рис. 1 и 2 графики демонстрируют схожую динамику размножения/эрадикации аттенуированных и вирулентных бактерий разных штаммов в рото-носоглотке МР. Отдельные геном-эквиваленты *BP* регистрируются в назофарингеальных изолятах с помощью ПЦР в реальном времени вплоть до 6 мес. Аналогичные результаты получены нами при обследовании выздоравливающих от коклюша детей разного возраста, у 15–20% которых возбудитель коклюша регистрировали с помощью ПЦР в реальном времени спустя 6 мес после постановки диагноза [27].

Схожая картина наблюдалась после повторной инокуляции аттенуированных и вирулентных бактерий обезьянам и после экспериментальной инфекции иммунизированных животных вирулентными бактериями. Кривые размножения/эрадикации после повторной инокуляции бактерий (рис. 1 и 2) не имеют качественных отличий, но принципиально отличаются от картины после 1-й инокуляции отсутствием накопления и значительно более быстрой эрадикацией бактерий. Например, к 28-му дню после повторной инфекции (иммунизации) бактерии не выявлялись или их удавалось зарегистрировать только в единичных копиях, тогда как в эти же сроки после 1-й инфекции число геном-эквивалентов бактерий *BP* могло составлять несколько десятков. Необходимо отметить, что чувствительность использованной нами тест-системы составляет 0,01–0,1 геном-эквивалента в 5 мкл раствора и определяется применением многокопийной последовательности *IS481* в качестве мишени амплификации [24, 25].

Для изучения зависимости динамики размножения бактерий и развития иммунного ответа от инфицирующей дозы и штамма бактерий наряду с изогенными вирулентными и аттенуированными

бактериями *BP* 475 и 4МКС использованы вирулентные бактерии *BP* 18323, применяемые для определения защитной активности ЦКВ. Бактерии вводили 3 МР по  $10^9$ – $10^{10}$  КОЕ, 3 МР — по  $10^7$  КОЕ. Количество бактерий и динамика размножения/эрадикации после экспериментальной инфекции МР, получивших  $10^9$  бактерий, не имели статистически значимых отличий от динамики при инфицировании животных другими штаммами *BP*. Измеренные нами значения  $t_{max}$  для *BP* 475, 18323 и 4МКС близки друг к другу и совпадают со значениями, приведенными в работе J.M. Warfel и соавт. [19] для бактерий *BP* D420, полученных при инфицировании детенышей павиана анубиса.

При инфицировании обезьян дозой  $10^7$  КОЕ бактерий *BP* на протяжении всего времени развития 1-й инфекции наблюдали достоверно меньшее количество геном-эквивалентов бактерий *BP* в носоглотке животных (рис. 2). Это обстоятельство было учтено нами при определении вакцинирующей дозы для клинических исследований ЖКВ на здоровых добровольцах, продолжающихся в настоящее время.

Следует отметить, что проведенные нами ранее исследования показали, что в процессе персистенции бактерий *BP* в организме обезьяны происходит изменение фазового состава популяции. Если в первые часы после инфекции подавляющее большинство бактерий *BP* находятся в вирулентном состоянии, характеризующемся нативной структурой оперона *bvgAS*, то в процессе развития инфекции гетерогенность популяции бактерий *BP* возрастает за счет увеличения доли авирулентных мутантов возбудителя коклюша, несущих инсерцию *IS481* в опероне *bvgAS* *BP*. В наибольшей степени процесс выражен после повторных инокуляций, когда количество инсерционных мутантов бактерий *BP* в персистирующей популяции может достигать 50% от числа зарегистрированных бактерий [28]. Это наблюдение указывает на возможный механизм формирования длительно персистирующих бактерий, обеспечивающих выживание патогена и его передачу новому хозяину.

На рис. 3 и 4 видно, что динамика изменения титра специфических IgG в сыворотке крови вакцинированных обезьян, экспериментально инфицированных вирулентными бактериями *BP*, близка к соответствующей кривой, полученной после повторного инфицирования МР, и значительно отличается от динамики IgG после 1-й экспериментальной инфекции вирулентными и аттенуированными бактериями. У всех реиммунизированных и инфицированных после иммунизации вирулентными бактериями *BP* животных количество антител быстро нарастало и достигало максимума к 10–14-му дню. Эти результаты полностью соответствуют результатам определения IgG после повторного заражения



вирулентными бактериями *BP* 475 и хорошо согласуются с приведенными выше результатами изучения динамики накопления бактерий в носоглотке инфицированных животных. Быстрое нарастание специфических антител после повторного контакта с инфекцией способствует подавлению размножения бактерий и их элиминации из носоглотки животных.

Схожая динамика выявлена нами при 2- и 3-кратных экспериментальных заражениях разных видов обезьян Старого Света вирулентными бактериями *BP*, в том числе в дозах  $10^{10}$ – $10^{11}$  КОЕ. Во всех случаях зарегистрированы выраженный бустер гуморального иммунного ответа и ускоренная элиминация возбудителя после повторного заражения [22]. Наличие бустерного эффекта повторной вакцинации при низких значениях и даже при отсутствии IgG у некоторых животных после 1-й вакцинации, а также ускоренная элиминация бактерий у всех животных после повторной вакцинации указывают на то, что даже однократная интраназальная вакцинация аттенуированными бактериями может оказаться достаточной для обеспечения защиты от экспериментальной инфекции.

Таким образом, экспериментальная интраназальная инфекция МР аттенуированными и вирулентными бактериями *BP* приводит к формированию защитной реакции организма, проявляющейся в подавлении размножения бактерий, ускорении темпов их элиминации из носоглотки животных и развитии гуморального иммунного ответа. Развитие гуморального, антительного ответа после повторной инфекции носит бустерный характер, независимо от штамма бактерий. Представленные результаты указывают на общие механизмы формирования поствакцинального иммунитета после интраназальной иммунизации животных ЖКВ и постинфекционного противокклюшного иммунитета, обеспечивающих защиту от повторного инфицирования бактериями *BP* и развития клинических симптомов коклюша. Представленные данные не противоречат результатам С. Lochт и соавт. [21], продемонстрировавшим наличие выраженного защитного эффекта в отношении экспериментальной инфекции вирулентными бактериями *BP* D420 у павианов анубисов, иммунизированных живыми аттенуированными бактериями *BP*. Менее выраженным защитным эффектом обладают инактивированные бактерии возбудителя (ЦКВ), в то время как БКВ не обеспечивала защиты от размножения бактерий после повторной инфекции [20, 21].

Отсутствие специфических для обезьян тест-систем иммуноферментного анализа (ИФА) значительно осложняет регистрацию коклюшных антител у этих животных. Если использованная нами тест-система ИФА IgG человека «Ridascreen» оказалась пригодной для регистрации IgG у МР, павиа-

нов гамадрилов, макак яванских и макак японских, то тест-система той же фирмы для IgA человека была совершенно не чувствительна к IgA обезьян. Нам удалось определить значения IgM на разных сроках экспериментальной коклюшной инфекции обезьян с помощью тест-системы ИФА IgM человека *BP* «Ridascreen», однако низкие абсолютные значения величин и большой разброс делают непродуктивным их обсуждение. Скорее всего, наблюдаемая картина объясняется недостаточной эффективностью коммерческой тест-системы на сыворотке обезьян. Полученные результаты указывают на необходимость конструирования тест-систем ИФА, специфичных для иммуноглобулинов нечеловекообразных обезьян, в процессе дальнейшего использования этих животных в качестве экспериментальной модели.

## Заключение

Интраназальная однократная и повторная инокуляции аттенуированных бактерий *BP* не вызывали воспалительных процессов в носоглотке МР и изменения лабораторных показателей крови, наблюдаемых после экспериментальной инфекции нечеловекообразных приматов вирулентными бактериями.

Не зарегистрировано повышения уровня общего IgE в сыворотке крови обезьян после и однократной и двукратной иммунизации.

Экспериментальная интраназальная инфекция МР аттенуированными и вирулентными бактериями *BP* приводит к формированию защитной реакции организма, проявляющейся в подавлении размножения бактерий, ускорении темпов их элиминации из носоглотки животных и развитии гуморального иммунного ответа. Развитие гуморального, антительного ответа после повторной инфекции носит бустерный характер, независимо от штамма бактерий.

Представленные результаты указывают на общие механизмы формирования поствакцинального иммунитета после интраназальной вакцинации животных и постинфекционного противокклюшного иммунитета, обеспечивающих защиту от повторного инфицирования бактериями *BP* и развития клинических симптомов коклюша.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pertussis vaccines: WHO position paper – September 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015; 90(35): 433-60.
2. Wood N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr. Respir. Rev.* 2008; 9(3): 201-11. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prrv.2008.05.010>
3. Wilely K.E., Zuo Y., Macartney K.K., McIntyre P. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine.* 2013; 31(4): 618-25. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.052>
4. Pinto M.V., Merkel T.J. Pertussis disease and transmission and host responses: insights from the baboon model of pertussis. *J. Infect.* 2017; 74(Suppl. 1): S114-9. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0163-4453\(17\)30201-3](http://doi.org/10.1016/S0163-4453(17)30201-3)

5. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Сияяшина Л.Н., Амелина И.П., Алексеев Я.И., Каратаев Г.И. и др. Распространенность стрептококков и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. *Детские инфекции*. 2010; 9(4): 19-22.
6. CDC. Pertussis epidemic – Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2012; 61(28): 517-22.
7. Rosewell A., Spokes P., Gilmour R.E. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull.* 2012; 23(9-10): 171-8. DOI: <http://doi.org/10.1071/NB12086>
8. Gonfiantini M.V., Carloni E., Gesualdo F., Pandolfi E., Agricola E., Rizzuto E., et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Euro Surveill.* 2014; 19(40): 20921. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.40.20921>
9. Health Protection report. Confirmed pertussis in England and Wales: data to end – November 2012. Available at: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140505162355/http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2012/news5112.htm>
10. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–октябрь 2018 г. М.; 2018.
11. Лобзин Ю.В., Харит С.М. Проблемы вакцинопрофилактики: краткая история, современное состояние и пути решения. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; (6): 30-7.
12. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(2): 787-92. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
13. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 449-86. DOI: <http://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
14. Chen Z., He Q. Immune persistence after pertussis vaccination. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(4): 744-56. DOI: <http://doi.org/10.1080/21645515.2016.1259780>
15. Guiso N., Njamkepo E., Vié le Sage F., Zepp F., Meyer C.U., Abitbol V., et al. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine.* 2007; 25(8): 1390-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.048>
16. Amirthalingam G., Andrews N., Campbell H., Ribeiro S., Kara E., Donegan K., et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet.* 2014; 384(9953): 1521-8. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60686-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60686-3)
17. Семин Е.Г., Сияяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа *ptxP3*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; (4): 33-41. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-4118>
18. Сияяшина Л.Н., Семин Е.Г., Медкова А.Ю., Сяндюкова Р.А., Каратаев Г.И. Доклиническое исследование токсичности и безопасности кандидатной живой коклюшной вакцины интраназального применения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(6): 98-108. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-98-108>
19. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* 2012; 80(4): 1530-6. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.06310-11>
20. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Comparison of three whole-cell pertussis vaccines in the baboon model of pertussis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 23(1): 47-54. DOI: <http://doi.org/10.1128/CI.00449-15>
21. Loch C., Papin J.F., Lecher S., Debrie A.S., Thalen M., Solovay K., et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *B. pertussis*. *J. Infect. Dis.* 2017; 216(1): 117-24. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
22. Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Сияяшина Л.Н., Шевцова З.В., Матуа А.З., Конджария И.Г. и др. Экспериментальный коклюш у обезьян. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; 68(8): 28-33.
23. Медкова А.Ю., Каратаев Г.И., Шевцова З.В., Матуа А.З., Семин Е.Г., Амичба А.А. и др. Эпизоотический очаг коклюша у обезьян вида *Papio gamadryas*. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(3): 103-11. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-3-103-111>
24. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Сияяшина Л.Н., Амелина И.П., Алексеев Я.И., Боковой Я.И. и др. Выявление инсерционных мутантов авирулентных bvg-мутантов *Bordetella pertussis* у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и практически здоровых людей. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010; (4): 27-31.
25. Bidet P., Liguori S., De Lauzanne A., Caro V., Lorrot M., Carol A., et al. Real-time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(11): 3636-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.01308-08>
26. Li R., Cheng C., Chong S.Z., Lim A.R., Goh Y.F., Loch C., et al. Attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 protects against allergic airway inflammation and contact dermatitis in mouse models. *Allergy.* 2012; 67(10): 1250-8. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02884.x>
27. Нестерова Ю.В., Медкова А.Ю., Бабаченко И.В., Семин Е.Г., Калисникова Е.Л., Сияяшина Л.Н. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(1): 17-24. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24>
28. Каратаев Г.И., Сияяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Семин Е.Г., Шевцова З.В., Матуа А.З. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. *Генетика*. 2016; 52(4): 422-30. DOI: <http://doi.org/10.7868/S0016675816030085>

#### REFERENCES

1. Pertussis vaccines: WHO position paper – September 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015; 90(35): 433-60.
2. Wood N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr. Respir Rev.* 2008; 9(3): 201-11. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prrv.2008.05.010>
3. Wiley K.E., Zuo Y., Macartney K.K., McIntyre P. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine.* 2013; 31(4): 618-25. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.052>
4. Pinto M.V., Merkel T.J. Pertussis disease and transmission and host responses: insights from the baboon model of pertussis. *J. Infect.* 2017; 74(Suppl. 1): S114-9. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0163-4453\(17\)30201-3](http://doi.org/10.1016/S0163-4453(17)30201-3)
5. Medkova A.Yu., Alyapkina Yu.S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., Alekseev Ya.I., Karataev G.I., et al. The prevalence of subclinical forms of pertussis and analysis of phase states of bacteria *Bordetella pertussis*. *Detskie infektsii*. 2010; 9(4): 19-22. (in Russian)
6. CDC. Pertussis epidemic – Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2012; 61(28): 517-22.
7. Rosewell A., Spokes P., Gilmour R.E. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull.* 2012; 23(9-10): 171-8. DOI: <http://doi.org/10.1071/NB12086>
8. Gonfiantini M.V., Carloni E., Gesualdo F., Pandolfi E., Agricola E., Rizzuto E., et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Euro Surveill.* 2014; 19(40): 20921. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.40.20921>
9. Health Protection report. Confirmed pertussis in England and Wales: data to end – November 2012. Available at: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140505162355/http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2012/news5112.htm>
10. The Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Infectious diseases in the Russian Federation in January–October 2018. Moscow; 2018. (in Russian)
11. Lobzin Yu.V., Kharit S.M. The problem of vaccination: a brief history, state-of-the-art, and ways of solution. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2014; (6): 30-7. (in Russian)
12. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(2): 787-92. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
13. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 449-86. DOI: <http://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
14. Chen Z., He Q. Immune persistence after pertussis vaccination.

- Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(4): 744-56.  
DOI: <http://doi.org/10.1080/21645515.2016.1259780>
15. Guiso N., Njamkepo E., Vié le Sage F., Zepp F., Meyer C.U., Abitbol V., et al. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine.* 2007; 25(8): 1390-7.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.048>
  16. Amirthalingam G., Andrews N., Campbell H., Ribeiro S., Kara E., Donegan K., et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet.* 2014; 384(9953): 1521-8. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60686-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60686-3)
  17. Semin E.G., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., Karataev G.I. Construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria PtxP3. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2018; (4): 33-41.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-4118> (In Russ.)
  18. Sinyashina L.N., Semin E.G., Medkova A.Yu., Syundyukova R.A., Karataev G.I. Pre-clinical toxicity study and safety assessment of candidate live pertussis vaccine for intranasal administration. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2018; 17(6): 98-108.  
DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-98-108> (in Russian)
  19. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* 2012; 80(4): 1530-6. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.06310-11>
  20. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Comparison of three whole-cell pertussis vaccines in the baboon model of pertussis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 23(1): 47-54.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/CAI.00449-15>
  21. Loch C., Papin J.F., Lecher S., Debrie A.S., Thalen M., Solovay K., et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *B. pertussis*. *J. Infect. Dis.* 2017; 216(1): 117-24.  
DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
  22. Kubrava D.T., Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Kondzhariya I.G., et al. Experimental whooping cough of nonhuman primate. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2013; 68(8): 28-33. (in Russian)
  23. Medkova A.Yu., Karataev G.I., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., Semin E.G., Amichba A.A., et al. Epizootic pertussis focus of hamadryad baboons. *Zhurnal infektologii.* 2015; 7(3): 103-11.  
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-3-103-111> (in Russian)
  24. Medkova A.Yu., Alyapkina Yu.S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., Alekseev G.I., Bokovoy Ya.I., et al. Detection of avirulent insertional *Bordetella pertussis* bvg-mutants in patients with pertussis and with upper respiratory tract infection and in seemingly healthy people. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2010; (4): 27-31. (in Russian)
  25. Bidet P., Liguori S., De Lauzanne A., Caro V., Lorrot M., Carol A., et al. Real-time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(11): 3636-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.01308-08>
  26. Li R., Cheng C., Chong S.Z., Lim A.R., Goh Y.F., Loch C., et al. Attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 protects against allergic airway inflammation and contact dermatitis in mouse models. *Allergy.* 2012; 67(10): 1250-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02884.x>
  27. Nesterova Yu.V., Medkova A.Yu., Babachenko I.V., Semin E.G., Kalisnikova E.L., Sinyashina L.N., et al. Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci. *Zhurnal infektologii.* 2019; 11(1): 17-24.  
DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24> (in Russian)
  28. Karataev G.I., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., Semin E.G., Shevtsova Z.V., Matua A.Z., et al. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent *Bordetella pertussis* bacteria. *Genetika.* 2016; 52(4): 422-30.  
DOI: <http://doi.org/10.7868/S0016675816030085> (in Russian)

#### Информация об авторах:

**Медкова Алиса Юрьевна** — к.м.н., с.н.с. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия; зав. инфекционным детским отделением ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» Уд Президента РФ, 121359, Москва, Россия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>.

**Синяшина Людмила Николаевна** — д.м.н., в.н.с. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия.  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1708-5453>.

**Амичба Астанда Арнольдовна** — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4986-1392>.

**Семин Евгений Григорьевич** — н.с. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия.  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6696-8362>.

**Шевцова Зинаида Всеволодовна** — д.м.н., г.н.с. лаб. вирусологии и иммунологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия; проф. каф. экспериментальной биологии и медицины Абхазского государственного университета, 384904, Сухум, Абхазия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6471-1608>.

**Матиа Алиса Зауровна** — к.б.н., зам. директора по научной работе, зав. лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия; доц. каф. экспериментальной биологии и медицины Абхазского государственного университета, 384904, Сухум, Абхазия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3275-0941>.

**Джидарян Ануш Ашотовна** — ст. лаборант лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8792-5289>.

**Кубрава Джени Тамазовна** — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН

#### Information about the authors:

**Alisa Yu. Medkova** — senior researcher, Laboratory of genetics of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia; Head, Department of paediatric infectious diseases, Central Clinical Hospital with a Polyclinic, Office of the President of the Russian Federation, 121359, Moscow, Russia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>.

**Lyudmila N. Sinyashina** — leading researcher, Laboratory of genetics of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia.  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1708-5453>.

**Astana A. Amichba** — junior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4986-1392>.

**Evgeniy G. Semin** — researcher, Laboratory of genetics of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia.  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1708-5453>.

**Zinaida V. Shevtsova** — D. Sci. (Med.), chief researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia; Prof., Department of experimental biology and medicine, Abkhazian State University, 394904, Sukhumi, Abkhazia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6471-1608>.

**Alisa Z. Matua** — PhD (Biol.), Deputy Director for science, Head, Laboratory of immunology and virology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia; Assoc. Prof., Department of experimental biology and medicine, Abkhazian State University, 394904, Sukhumi, Abkhazia.  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3275-0941>.

Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9104-4014>.

*Конджария Ирина Георгиевна* — к.б.н., с.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия; доц. каф. экспериментальной биологии и медицины Абхазского государственного университета, 384904, Сухум, Абхазия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3707-4874>.

*Миквабия Зураб Ясонович* — д.м.н., проф., директор НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, 384900, Сухум, Абхазия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>.

*Каратаев Геннадий Иванович*<sup>✉</sup> — д.б.н., в.н.с., рук. лаб. генетики бактерий ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия.

ORCID ID <http://orcid.org/0000-0001-8771-6092>.

E-mail: [karataevgi@rambler.ru](mailto:karataevgi@rambler.ru)

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

*Anush A. Djidaryan* — senior laboratory assistant, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8792-5289>.

*Dzhenni T. Kubrava* — junior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9104-4014>.

*Irina G. Kondzhariya* — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of virology and immunology, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia; Assoc. Prof., Department of experimental biology and medicine, Abkhazian State University, 394904, Sukhumi, Abkhazia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3707-4874>.

*Zurab Ya. Mikvabiya* — D. Sci. (Med.), Prof., director, Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, 384900, Sukhumi, Abkhazia;

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-6516>.

*Gennadiy I. Karataev*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of genetics of bacteria, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8771-6092>.

E-mail: [karataevgi@rambler.ru](mailto:karataevgi@rambler.ru)

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