



Чувствительность биопленок вакцинных и свежесыведенных штаммов *Bordetella pertussis* к антибиотикам

Зайцев Е.М.[✉], Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Цель. Изучение чувствительности биопленок вакцинных и свежесыведенных штаммов *Bordetella pertussis* к антибиотикам.

Материалы и методы. Использованы вакцинные и свежесыведенные штаммы *B. pertussis*. В качестве инокулята для получения биопленок использовали культуры штаммов, выращенные на плотной питательной среде. Интенсивность образования биопленок в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генцианвиолета. В опытах использовали антибиотики следующих групп: пенициллины (ампициллин), цефалоспорины (цефтриаксон), аминогликозиды (гентамицин), макролиды (эритромицин).

Результаты. Наиболее высокой устойчивостью к антибиотикам отличались вакцинный штамм № 305 и свежесыведенный штамм № 211, проявлявшие чувствительность только к эритромицину. Вакцинный штамм № 703 был чувствителен к гентамицину и ампициллину и проявлял резистентность к эритромицину и цефтриаксону. Вакцинный штамм № 475 был чувствителен ко всем испытанным антибиотикам. Штамм Tohama 1 был резистентен к ампициллину и чувствителен к остальным антибиотикам. Свежесыведенные штаммы № 178 и № 162 были устойчивы к цефтриаксону и чувствительны к гентамицину, эритромицину и ампициллину. Минимальные подавляющие концентрации использованных антибиотиков составляли 0,2–5 мкг/мл.

Заключение. Приведенные данные свидетельствуют о гетерогенности вакцинных и свежесыведенных штаммов *B. pertussis* по чувствительности к антибиотикам. Наибольшую активность проявлял эритромицин, подавлявший рост биопленок 6 из 7 штаммов. Наименее эффективным был цефтриаксон, подавлявший рост биопленок только 2 штаммов.

Ключевые слова: штаммы *Bordetella pertussis*; биопленки; чувствительность к антибиотикам.

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., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Чувствительность биопленок вакцинных и свежесыведенных штаммов *Bordetella pertussis* к антибиотикам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 529–534.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-3>

Поступила 22.10.2019
Принята в печать 30.06.2020

Sensitivity of biofilms of vaccine and freshly isolated *Bordetella pertussis* strains to antibiotics

Eugene M. Zaytsev[✉], Marina V. Britsina, Maria N. Ozeretskivskaya, Natalia U. Mertsalova, Irina G. Bazhanova

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. To study the sensitivity of biofilms of vaccine and freshly isolated strains of *Bordetella pertussis* to antibiotics.

Materials and methods. Vaccine and freshly isolated strains of *B. pertussis* were used. Cultures of strains grown on dense nutrient medium were used as inoculate for biofilms production. The intensity of biofilm formation in round-bottomed polystyrene 96-well plates was estimated by staining with 0.1% gentian-violet solution. The following antibiotics were used in experiments: penicillins (ampicillin), cephalosporins (ceftriaxone), aminoglycosides (gentamicin), macrolides (erythromycin).

Results. The highest resistance to antibiotics was demonstrated by the vaccine strain No. 305 and freshly isolated strain No. 211, sensitive only to erythromycin. Vaccine strain No. 703 was sensitive to gentamicin and ampicillin and showed resistance to erythromycin and ceftriaxone. Vaccine strain No. 475 was sensitive to all tested

antibiotics. The Tohama 1 strain was resistant to ampicillin and sensitive to other antibiotics. Freshly isolated strains No. 178 and No. 162 were resistant to ceftriaxone and sensitive to gentamicin, erythromycin and penicillin. Minimal inhibitory concentrations of tested antibiotics ranged from 0.2 µg/ml to 5.0 µg/ml.

Conclusion. These data indicate the heterogeneity of vaccine and freshly isolated strains of *B. pertussis* in sensitivity to antibiotics. The greatest activity was shown by erythromycin, which suppressed the growth of biofilms of 6 out of 7 strains. The least effective was ceftriaxone, which suppressed the growth of biofilms of only 2 strains.

Keywords: *Bordetella pertussis* strains; biofilms; antibiotic sensitivity.

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: Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Sensitivity of biofilms of vaccine and freshly isolated *Bordetella pertussis* strains to antibiotics. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 529–534. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-3>

Received 22 October 2019

Accepted 30 June 2020

Введение

Эпидемический процесс коклюшной инфекции, несмотря на высокий уровень противокклюшной вакцинации, продолжается во многих странах мира. Ежегодно в мире регистрируется около 50 млн случаев заболевания коклюшем, около 300 тыс. детей погибает от него [1, 2]. Одной из вероятных причин роста заболеваемости коклюшем являются мутации в генах возбудителя, кодирующих основные факторы вирулентности *Bordetella pertussis*, что привело к появлению циркулирующих штаммов, отличающихся повышенной вирулентностью [3].

Фармакотерапия больных коклюшем остается актуальной проблемой и включает назначение этиотропных, патогенетических и симптоматических препаратов. Ведущую роль в этиотропном лечении играют антибактериальные средства, прежде всего антибиотики. Наиболее эффективными принято считать антибиотики макролидного ряда: эритромицин, азитромицин, кларитромицин. Вместе с тем для лечения коклюша, в частности при неэффективности эритромицина, с успехом использовались и другие антибиотики (тетрациклинового ряда, пенициллины, аминогликозиды, цефалоспорины и др.) [4]. Главными условиями эффективности антибиотикотерапии коклюша являются правильный выбор антибиотика, его дозировка и длительность лечения. Чувствительность коклюшного микроба к антибиотикам в настоящее время оценивают в бульонных или агаровых культурах методами серийных разведений или с помощью диско-диффузионных методов. Однако в последние годы было установлено, что *B. pertussis*, как и другие виды бактерий, функционируют в виде биопленок на биотических и абиотических субстратах [5, 6]. Биопленочные формы бактерий отличаются от планктонных измененным спектром экспрессии генов и обладают повышенной устойчивостью к факторам внешней среды, в частности к антибиотикам. Установлено, что биопленки разных микроорганизмов могут быть в

100–1000 раз более устойчивы к антибиотикам, чем планктонные культуры [7]. Чувствительность биопленок *B. pertussis* к антибиотикам пока изучена недостаточно, по данной проблеме имеются лишь единичные публикации [8].

Цель работы заключалась в изучении чувствительности биопленок вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* к антибиотикам разных групп.

Материалы и методы

В опытах использовали две группы штаммов *B. pertussis*. Первую группу составили вакцинные штаммы, выделенные от больных коклюшем в 1950–1960-е гг., используемые в России для изготовления корпускулярных коклюшных вакцин: штамм № 475 (серовар 1.2.3), штамм № 305 (серовар 1.2.0), штамм № 703 (серовар 1.0.3), а также штамм Tohama 1 (серовар 1.2.0), выделенный в 1950-е гг. в Японии и широко использующийся в ряде стран при проведении генетических исследований и производстве коклюшных вакцин. Во вторую группу были включены штаммы, выделенные в РФ от больных коклюшем в 2001–2010 гг.: штамм № 178 (серовар 1.2.0), штамм № 162 (серовар 1.0.3) и штамм № 211 (серовар 1.2.3) [9]. В опытах использовали антибиотики групп пенициллинов (ампициллин), цефалоспоринов (цефтриаксон), аминогликозидов (гентамицин), макролидов (эритромицин).

В качестве инокулята для получения биопленок применяли ночные культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде «Бордетел-агар» (Питательная среда для культивирования и выделения коклюшного микроба сухая, ФБУН ГНЦ ПМБ). Для получения биопленок суспензию бактерий культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах («Nunc») в жидкой синтетической питательной среде в соответствии с ранее описанным методом [9]. Культуры штаммов в жидкой синтетической питательной среде в концентрации 1,25, 2,5

и 5,0 международных оптических единиц (МОЕ) в объеме 100 мкл вносили в лунки планшетов. После этого в лунки вносили по 100 мкл питательной среды, содержащей испытуемые антибиотики в концентрации 0,2, 1 и 5 мкг/мл. В контрольные пробы антибиотики не добавляли.

После окрашивания био пленок в планшетах 0,1% раствором генцианвиолета оценивали их интенсивность по отношению оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя био пленки к негативному контролю (ОП питательной среды = $0,048 \pm 0,003$). Выделяли следующие группы: плотные (ОП > 0,192), умеренные ($0,096 < \text{ОП} \leq 0,192$) био пленки, слабые/отсутствие био пленок ($\text{ОП} \leq 0,096$) [9].

Результаты оценивали по значениям минимальной подавляющей концентрации (МПК, мкг/мл), которую определяли как минимальную концентрацию антибиотиков, подавляющую рост био пленочных культур. Для достоверного обсчета результатов использовали 4 лунки на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину ОП опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по критерию Стьюдента [10].

Результаты

Результаты исследования чувствительности вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* к антибиотикам приведены в **таблице**. Для определения МПК антибиотиков необходимо было выбрать оптимальную стартовую посевную дозу микробных клеток.

Контрольные культуры исследованных штаммов различались по интенсивности образования био пленок в зависимости от посевной дозы. При посевной дозе 5 МОЕ 5 из 7 штаммов формировали плотные био пленки, а 2 штамма — умеренные. При посевной дозе 2,5 МОЕ плотные био пленки формировали 2 штамма, а 5 штаммов — умеренные. При дозе 1,25 МОЕ только 1 штамм формировал плотную био пленку, а остальные 6 — умеренные или слабые. В связи с этим чувствительность штаммов к антибиотикам оценивали при посевной дозе 5 МОЕ/мл. Вакцинный штамм Tohama 1 проявлял чувствительность к гентамицину и эритромицину с МПК 5 мкг/мл и цефтриаксону с МПК 1 мкг/мл. По отношению к ампициллину этот штамм был устойчивым с ростом умеренных био пленок с МПК 0,2 и 1 мкг/мл и слабых био пленок — с 5 мкг/мл. Вакцинный штамм № 475 был чувствительным к гентамицину с МПК 0,2 мкг/мл, а также к эритромицину, цефтриаксону и ампициллину с МПК 5 мкг/мл. Вакцинный штамм № 305 был чувствителен только к эритромицину с МПК 5 мкг/мл и устойчив к остальным трем антибиотикам. Вакцинный штамм № 703 был чувствительным к гентамицину и ампициллину с МПК 5 мкг/мл и устойчивым к эритромицину и цефтриаксону. Свежeweделенный штамм № 162 проявлял

чувствительность к гентамицину с МПК 1 мкг/мл, а к эритромицину и ампициллину — с МПК 5 мкг/мл. Свежeweделенный штамм № 178 был чувствителен к гентамицину, эритромицину и ампициллину с МПК 5 мкг/мл. К цефтриаксону штаммы № 162 и № 178 были устойчивы и формировали био пленки различной интенсивности — от умеренных до плотных — при всех использованных концентрациях антибиотика. Свежeweделенный штамм № 211 был чувствительным только к эритромицину с МПК 5 мкг/мл и проявлял устойчивость к гентамицину, цефтриаксону и ампициллину.

Обсуждение

Нами исследована чувствительность био пленок основных сероваров вакцинных и свежeweделенных штаммов коклюшного микроба к различным антибиотикам. В результате проведенных исследований были разработаны оптимальные условия оценки чувствительности био пленочных форм *B. pertussis* к антибиотикам разных групп. Интенсивность образования био пленок штаммами зависела от стартовой посевной дозы микробных клеток и концентрации антибиотиков. В качестве оптимальной посевной дозы микробных клеток была выбрана доза 5 МОЕ/мл, при использовании которой большинство штаммов формировали плотные био пленки при отсутствии в питательной среде антибиотиков.

Выявлены определенные различия между био пленками исследованных штаммов по чувствительности к антибиотикам. Наиболее высокой устойчивостью к антибиотикам отличались вакцинный штамм № 305 и свежeweделенный штамм № 211, проявлявшие чувствительность только к эритромицину. Вакцинный штамм № 703 был чувствителен к гентамицину и ампициллину и проявлял резистентность к эритромицину и цефтриаксону. Вакцинный штамм № 475 был чувствителен ко всем испытанным антибиотикам. Штамм Tohama 1 был резистентен к ампициллину и чувствителен к остальным антибиотикам. Свежeweделенные штаммы № 178 и № 162 были устойчивы к цефтриаксону и чувствительны к гентамицину, эритромицину и ампициллину. В доступной литературе имеются отдельные указания на возможность более высокой антибиотикорезистентности био пленок свежeweделенных штаммов коклюшного микроба по сравнению с вакцинными [8]. Полученные нами результаты указывают на отсутствие существенных различий между исследованными вакцинными и свежeweделенными штаммами по чувствительности к антибиотикам.

Полученные результаты указывают на гетерогенность исследованных нами вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* по чувствительности к антибиотикам. При этом высокая чувствительность штаммов к определенным антибиотикам сочеталась с резистентностью к антибиотикам дру-

Влияние антибиотиков на рост биопленок (ОП) разных штаммов *B. pertussis* при посевной дозе 5 МОЕ ($M \pm m$)
Effect of antibiotics on the growth of biofilms (OD values) of different of *B. pertussis* strains at a seeding dose of 5 IOU ($M \pm m$)

Доза антибиотика Dose of antibiotic	Штаммы <i>B. pertussis</i> / Strains of <i>B. pertussis</i>						
	вакцинные / vaccine				свежевыделенные / freshly isolated		
	Tohama 1	475	305	703	162	211	178
Контроль Control	Умеренная Moderate 0,097 ± 0,015	Плотная Dense 0,337 ± 0,96	Плотная Dense 0,248 ± 0,013	Умеренная Moderate 0,120 ± 0,010	Плотная Dense 0,257 ± 0,064	Плотная Dense 0,345 ± 0,082	Плотная Dense 0,222 ± 0,011
Гентамицин / Gentamicin							
5 мкг/мл 5 µg/ml	Нет No 0,096 ± 0,003	Нет No 0,064 ± 0,002	Слабая Weak 0,108 ± 0,004	Нет No 0,074 ± 0,005	Нет No 0,067 ± 0,001	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,002	Нет No 0,095 ± 0,007
1 мкг/мл 1 µg/ml	Умеренная Moderate 0,173 ± 0,008	Нет No 0,073 ± 0,005	Умеренная Moderate 0,172 ± 0,026	Умеренная Moderate 0,116 ± 0,009	Нет No 0,078 ± 0,004	Умеренная Moderate 0,140 ± 0,015	Умеренная Moderate 0,120 ± 0,012
0,2 мкг/мл 0.2 µg/ml	Плотная Dense 0,224 ± 0,020	Нет No 0,086 ± 0,003	Умеренная Moderate 0,180 ± 0,021	Умеренная Moderate 0,151 ± 0,003	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,016	Умеренная Moderate 0,147 ± 0,017	Умеренная Moderate 0,131 ± 0,013
Эритромицин / Erythromycin							
5 мкг/мл 5 µg/ml	Нет No 0,058 ± 0,006	Нет No 0,095 ± 0,004	Нет No 0,091 ± 0,003	Слабая Weak 0,100 ± 0,010	Нет No 0,071 ± 0,005	Нет No 0,057 ± 0,004	Нет No 0,081 ± 0,002
1 мкг/мл 1 µg/ml	Умеренная Moderate 0,117 ± 0,006	Умеренная Moderate 0,134 ± 0,007	Плотная Dense 0,216 ± 0,011	Слабая Weak 0,100 ± 0,004	Умеренная Moderate 0,154 ± 0,011	Умеренная Moderate 0,162 ± 0,005	Умеренная Moderate 0,174 ± 0,022
0,2 мкг/мл 0.2 µg/ml	Умеренная Moderate 0,152 ± 0,003	Умеренная Moderate 0,135 ± 0,003	Плотная Dense 0,256 ± 0,031	Умеренная Moderate 0,180 ± 0,009	Умеренная Moderate 0,175 ± 0,011	Умеренная Moderate 0,130 ± 0,010	Умеренная Moderate 0,144 ± 0,009
Цефтриаксон / Ceftriaxone							
5 мкг/мл 5 µg/ml	Нет No 0,089 ± 0,012	Нет No 0,081 ± 0,012	Умеренная Moderate 0,154 ± 0,012	Слабая Weak 0,101 ± 0,008	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,002	Слабая Weak 0,101 ± 0,009	Умеренная Moderate 0,124 ± 0,014
1 мкг/мл 1 µg/ml	Нет No 0,096 ± 0,026	Умеренная Moderate 0,158 ± 0,025	Умеренная Moderate 0,154 ± 0,012	Умеренная Moderate 0,154 ± 0,023	Плотная Dense 0,189 ± 0,025	Умеренная Moderate 0,127 ± 0,014	Умеренная Moderate 0,132 ± 0,002
0,2 мкг/мл 0.2 µg/ml	Умеренная Moderate 0,159 ± 0,026	Умеренная Moderate 0,171 ± 0,029	Умеренная Moderate 0,171 ± 0,027	Плотная Dense 0,214 ± 0,018	Плотная Dense 0,240 ± 0,041	Умеренная Moderate 0,126 ± 0,020	Умеренная Moderate 0,150 ± 0,010
Ампициллин / Ampicillin							
5 мкг/мл 5 µg/ml	Слабая Weak 0,100 ± 0,007	Нет No 0,051 ± 0,001	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,026	Нет No 0,055 ± 0,003	Нет No 0,056 ± 0,003	Умеренная Moderate 0,184 ± 0,060	Нет No 0,065 ± 0,002
1 мкг/мл 1 µg/ml	Умеренная Moderate 0,112 ± 0,004	Умеренная Moderate 0,185 ± 0,020	Умеренная Moderate 0,162 ± 0,009	Плотная Dense 0,202 ± 0,028	Умеренная Moderate 0,151 ± 0,049	Умеренная Moderate 0,170 ± 0,039	Умеренная Moderate 0,133 ± 0,017
0,2 мкг/мл 0.2 µg/ml	Умеренная Moderate 0,180 ± 0,021	Плотная Dense 0,219 ± 0,028	Плотная Dense 0,219 ± 0,023	Плотная Dense 0,228 ± 0,015	Плотная Dense 0,197 ± 0,039	Умеренная Moderate 0,187 ± 0,056	Умеренная Moderate 0,126 ± 0,026

Примечание. Различия между значениями ОП культур с отсутствием, слабыми, умеренными и плотными биопленками статистически достоверны ($p < 0,001$).

Note. Differences between the OD values for cultures with no, weak, moderate and dense biofilms are statistically significant ($p < 0.001$).

гих групп. Необходимо отметить высокие МПК антибиотиков для биопленок. МПК гентамицина составляла 0,2 мкг/мл для штамма № 475, 1 мкг/мл для штамма № 162 и 5 мкг/мл для штаммов Tohama 1, № 703 и № 178. МПК эритромицина и ампициллина составляли 5 мкг/мл для всех чувстви-

тельных к этим антибиотикам штаммов. МПК цефтриаксона для штаммов Tohama 1 и № 475 составляли 1 и 5 мкг/мл соответственно. В целом МПК использованных антибиотиков составляли от 0,2 до 5 мкг/мл. По данным литературы, МПК для планктонных культур коклюшного

микроба, определенные традиционными методами, составляют: эритромицин — 0,1–0,125 мкг/мл, ампициллин — 0,12–0,5 мкг/мл, гентамицин — 0,06–0,5 мкг/мл, цефтриаксон — 0,19 мкг/мл [11, 12]. Таким образом, биопленочные культуры *B. pertussis* отличаются более высокой устойчивостью к антибиотикам по сравнению с планктонными культурами.

Результаты проведенных исследований позволяют также сделать определенные выводы об эффективности исследованных антибиотиков по отношению к биопленочным культурам. Наибольшую активность проявлял эритромицин, подавлявший рост биопленок большинства исследованных штаммов. Только вакцинный штамм № 703 проявлял устойчивость к этому препарату. Эти результаты согласуются с данными других авторов о том, что эритромицин проявляет наиболее высокую активность *in vitro* по отношению к возбудителю коклюша [11, 13, 14]. К гентамицину были чувствительны 5 штаммов, а к ампициллину — 4 штамма. Наименее эффективным был цефтриаксон, подавлявший рост биопленок только 2 штаммов.

Механизмы повышенной устойчивости биопленок *B. pertussis* к антибиотикам до конца не изучены и могут быть связаны с рядом факторов, среди которых можно отметить особенности строения матрикса [5]. Полученные нами результаты указывают на целесообразность дальнейшего исследования чувствительности биопленок *B. pertussis* к антибиотикам и выяснения механизмов их высокой антибиотикорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kapil P., Merkel T.J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2019; 59: 72–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.03.006>
2. Barkoff A.M., He Q. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 19–33. https://doi.org/10.1007/5584_2019_402
3. 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.
4. 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. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
5. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
6. Dorji D., Ross M.G., Singh A.K., Ramsay J.P., Price P., Lee S. Immunogenicity and protective potential of *Bordetella pertussis* biofilm and its associated antigens in a murine model. *Cell Immunol.* 2019; 337: 42–7. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.006>
7. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011; 88(3): 99–109.

8. Dorji D., Graham R.M., Richmond P., Keil A., Mukkur T.K. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. *Biofouling.* 2016; 32(9): 1141–52. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1232715>
9. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Образование биопленок свежeweделенными и вакцинными штаммами *Bordetella pertussis* разных сероваров. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019; 96(5): 47–50. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-47-50>
10. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях.* Ленинград; 1962.
11. Борисова О.Ю., Алешкин А.В., Ивашишникова Г.А., Донских Е.Е., Постникова Е.А., Алешкин В.А. Чувствительность штаммов *Bordetella pertussis* к антибактериальным препаратам. *Детские инфекции.* 2013; 12(2): 46–50.
12. Lonnqvist E., Barkoff A.M., Mertsola J. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018; 14: 12–6. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.012>
13. Hua C.Z., Wang H.J., Zhang Z., Tao X.F., Li J.P., Mi Y.M., et al. *In vitro* activity and clinical efficacy of macrolides, cefeprozone-sulbactam and piperacillin/piperacillin-tazobactam against *Bordetella pertussis* and the clinical manifestations in pertussis patients due to these isolates: A single-centre study in Zhejiang Province, China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 18: 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.029>
14. Jakubů V., Zavadilová J., Fabiánová K., Urbášková P. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 2015; 64(1): 12–5.

REFERENCES

1. Kapil P., Merkel T.J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2019; 59: 72–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.03.006>
2. Barkoff A.M., He Q. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 19–33. https://doi.org/10.1007/5584_2019_402
3. 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 vaktsinoprofilaktika.* 2016; 15(4): 22–8. (in Russian)
4. 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. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
5. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
6. Dorji D., Ross M.G., Singh A.K., Ramsay J.P., Price P., Lee S. Immunogenicity and protective potential of *Bordetella pertussis* biofilm and its associated antigens in a murine model. *Cell Immunol.* 2019; 337: 42–7. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.006>
7. Romanova Yu.M., Gintsburg A.L. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2011; 88(3): 99–109. (in Russian)
8. Dorji D., Graham R.M., Richmond P., Keil A., Mukkur T.K. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. *Biofouling.* 2016; 32(9): 1141–52. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1232715>
9. Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. The biofilm formation of freshly

- isolated and vaccine strains of *Bordetella pertussis* of different serotypes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 96(5): 47–50.
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-47-50> (in Russian)
10. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad; 1962. (in Russian)
 11. Borisova O.Yu., Aleshkin A.V., Ivashinnikova G.A., Donskikh E.E., Postnikova E.A., Aleshkin V.A. Susceptibility of *Bordetella pertussis* strains to antibacterial preparations. *Det-skie infektsii*. 2013; 12(2): 46–50. (in Russian)
 12. Lonnqvist E., Barkoff A.M., Mertsola J. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018; 14: 12–6. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.012>
 13. Hua C.Z., Wang H.J., Zhang Z., Tao X.F., Li J.P., Mi Y.M., et al. *In vitro* activity and clinical efficacy of macrolides, cefoperazone-sulbactam and piperacillin/piperacillin-tazobactam against *Bordetella pertussis* and the clinical manifestations in pertussis patients due to these isolates: A single-centre study in Zhejiang Province, China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 18: 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.029>
 14. Jakubů V., Zavadilová J., Fabiánová K., Urbášková P. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2015; 64(1): 12–5.

Информация об авторах

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

Брицина Марина Васильевна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0002-3044-0790>.

Озеретковская Мария Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0001-9809-4217>.

Мерцалова Наталья Устиновна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0002-9072-2538>.

Бажанова Ирина Глебовна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0003-1404-1498>.

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

Information about the authors

Eugene M. Zaytsev[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0002-4813-9074>.
 E-mail: pertussis@yandex.ru

Marina V. Britsina — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0002-3044-0790>.

Maria N. Ozeretkovskaya — PhD (Med.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0001-9809-4217>.

Natalia U. Mertsalova — PhD (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0002-9072-2538>.

Irina G. Bazhanova — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.
 ORCID ID: <http://www.orcid.org/0000-0003-1404-1498>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.