

В. Л. Колодкина, В. С. Мартынов

АЛГОРИТМ ВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РОДА *BORDETELLA* И РЕЗУЛЬТАТЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск

Проведена видовая дифференциация возбудителей рода *Bordetella* в носоглоточных мазках пациентов с подозрением на коклюш с использованием разработанных нами ПЦР в реальном времени: дуплексной TaqMan ПЦР, направленной на выявление *B. pertussis* и *B. parapertussis*, с праймерами к мишеням IS481, IS1001, BP0026 и GAPDH гена человека, и двух моноплексных TaqMan ПЦР, направленных на выявление *B. holmesii* и *B. bronchiseptica* с праймерами к мишеням hIS1001 и flaA. При исследовании 3130 носоглоточных мазков *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. holmesii* были выявлены в 29,5 %, 0,9 % и 0,4 % образцов соответственно. Разработанный алгоритм на основе трех TaqMan ПЦР оказался полезным инструментом в молекулярной диагностике коклюша. Его использование позволило установить коциркуляцию разных видов рода *Bordetella*, доминирование в циркуляции *B. pertussis*, низкий уровень циркуляции *B. parapertussis*, *B. holmesii* и отсутствие в циркуляции *B. bronchiseptica* в Республике Беларусь.

Ключевые слова: *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, ПЦР реального времени, коклюш.

V. L. Kolodkina, V. S. Martynov

THE ALGORITHM FOR SPECIES DIFFERENTIATION OF BORDETELLA GENUS PATHOGENS AND THE RESULTS OF ITS USE IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Species-specific differentiation of *Bordetella* pathogens in nasopharyngeal swabs of patients with suspected whooping cough was carried out using developed by us real-time PCR: duplex TaqMan PCR aimed for detecting *B. pertussis* and *B. parapertussis*, with primers targeting IS481, IS1001, BP0026 and GAPDH as the human internal control and two singleplex TaqMan PCR aimed for detecting *B. holmesii* and *B. bronchiseptica* with primers targeting hIS1001 and flaA specific genes.

Among the 3130 throat swab analyzed, *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. holmesii* were detected in 29.5 %, 0.9 % and 0.4 % of samples respectively. The developed algorithm proved to be a useful molecular-genetic diagnostic tool for whooping cough, established cocirculation of different species of *Bordetella* genus and demonstrated the predominance of *B. pertussis*, low rate of *B. parapertussis* and *B. holmesii* and the absence of *B. bronchiseptica* in the circulation in the Republic of Belarus.

Key words: *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, real-time PCR, whooping cough.

Коклюш – это острое респираторное заболевание, управляемое средствами специфической вакцинопрофилактики, которое вызывается *Bordetella pertussis* [1]. Младенцы младше 6 месяцев подвержены более высокому риску тяжелого заболевания, госпитализации и даже летального исхода [2]. Коклюш у подростков и взрослых, как правило, протекает с менее выраженными симптомами [3], но по-прежнему вызывает особую обеспокоенность в связи с сопутствующим риском распространения инфекции.

Несмотря на высокий охват вакцинацией, коклюш остается одной из наиболее распространенных среди

вакциноуправляемых инфекций во всем мире, в том числе и в Республике Беларусь. Эпидемические циклы отмечаются в ряде стран каждые 3–5 лет, и до сих пор вакцинация не оказала на это существенного влияния [4].

Помимо *B. pertussis*, с респираторной инфекцией у людей связаны еще три представителя рода *Bordetella*: *B. parapertussis*, *B. holmesii* и, в меньшей степени, *B. bronchiseptica* [5]. Эти виды *Bordetella* могут вызывать респираторные заболевания с неспецифическими симптомами, а также симптомами, похожими на симптомы, вызванные *B. pertussis*, но более

легкими [6]. Вакцины против коклюша не обеспечивают перекрестную защиту от других видов *Bordetella* [7] и их роль в эпидемиологии коклюшной инфекции остается не ясной. Нельзя исключить, что одной из возможных причин возрождения коклюша, имеющего место во всем мире в последние годы, является замена *B. pertussis* другими видами *Bordetella* [8].

Все это подчеркивает необходимость использования точных методов диагностики, позволяющих установить этиологический агент заболевания. Дифференциация *B. pertussis* от других видов *Bordetella* при респираторных заболеваниях имеет решающее значение для определения реальной заболеваемости коклюшем и установления распространенности других микробов, что позволит оценить их вклад в эпидемиологию коклюша. Более того, точная идентификация этиологического агента необходима для определения тактики лечения заболевших антибиотиками, использования антибиотиков для контактных лиц, поскольку их применение в случаях с *B. parapertussis* и *B. holmesii* до сих пор не ясно, а также важна и для оценки эффективности вакцин, поскольку ошибочный диагноз может привести к неправильной интерпретации при оценке эффективности вакцинации [9].

С диагностической целью используются ряд методов, такие как бактериологический, серологический и полимеразная цепная реакция (ПЦР) [10]. Бактериологический метод, несмотря на высокую специфичность, обладает низкой чувствительностью и занимает семь и более дней для получения окончательного результата [11]. Серологические тесты помогают в диагностике и несмотря на более высокую чувствительность в сравнении с бактериологическим методом, обеспечивают только ретроспективную диагностику инфекции, так как основываются главным образом на нарастании титров антител в парных сыворотках [12].

С целью преодоления этих ограничений разработаны ПЦР как высокочувствительные и быстрые методы диагностики [13, 14]. При этом в качестве мишеней чаще всего используются сегменты инсерционных последовательностей (IS), особенно IS481 и IS1001 для *B. pertussis* и *B. parapertussis* соответственно. ПЦР с использованием этих мишеней чувствительны, потому что IS элементы присутствуют в большом количестве копий в бактериальных геномах, но они не являются видоспецифичными. Так, IS481 обнаружен у *B. pertussis* в количестве от 50 до 200 копий на геном, у *B. holmesii* – от 8 до 10 копий на геном и у некоторых штаммов *B. bronchiseptica* – в количестве менее 5 копий на геном [13]. Также IS1001 выявлен у *B. parapertussis* – около 20 копий на геном и у некоторых *B. bronchiseptica* – в количестве от 1 до 7 копий на геном [14]. В связи с этим IS481 и IS1001 могут использоваться в качестве мишеней для скрининга клинического материала, но необходимо также использование видоспецифических мишеней для *B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, повышающих специфичность ПЦР.

Цель исследования – выявить и оценить распространенность различных представителей рода *Bordetella* среди пациентов с подозрением на коклюш на основе проведения комплексного диагностического протокола, основанного на ПЦР реального времени, для обнаружения и идентификации *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* и *B. bronchiseptica*.

Материалы и методы

Материалом для исследования в ПЦР явились 3130 носоглоточных мазков пациентов с подозрением на коклюшную инфекцию, поступивших в лабораторию с мая 2017 г. по сентябрь 2020 г.

ДНК экстрагировали из смывов с клинических образцов с использованием набора QIAamp DNAm mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Экстракцию ДНК проводили в соответствии с руководством производителя, используя 100 мкл образца при каждой экстракции.

ПЦР для выявления ДНК *B. pertussis* и *B. parapertussis*. Мультиплексную TaqMan ПЦР для выявления ДНК *B. pertussis* и *B. parapertussis* проводили в формате двух дуплексных реакций. Согласно этой схеме амплификация проводилась параллельно в двух пробирках. В одной пробирке проходила реакция к мишеням IS481 и IS1001, во второй пробирке – к мишеням BP0026 (тиолазному гену) и гену человека GAPDH. Состав амплификационной смеси и праймеры к мишеням использовали такие же, как описано ранее [15]. Реакцию проводили с использованием амплификатора CFX96 Real-Time System (BioRad) в объеме 25 мкл в 96 луночной плашке или пробирках. Условия амплификации были следующие: предденатурация 5 мин при 95 °C с последующими 45 циклами, включающими денатурацию при 95 °C в течение 10 сек, и элонгацию при 60 °C в течение 1 мин. Оценка велась по уровню флюоресценции и значению Ct. Образцы со значениями Ct от 38,5 до 42,0 учитывались как *Bordetella* spp. и как негативные если значение Ct было 42,0 и более.

Для детекции *B. holmesii* в клиническом материале использовали TaqMan ПЦР, направленную на выявление гена hIS1001. Фрагмент гена hIS1001 длиной 92 н.п. амплифицировали с использованием разработанного нами набора праймеров и зонда: 5´TTGAGCTCATCGCGCATCAGATA3´, 5´AACCTCGATCCGTGCCAATCGGA3´, FAM-TTGGCCTGGAGCAACTCGTCCAA-BHQ1. Амплификация проводилась в объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей праймеры и зонд в концентрации 200 нмоль, 65 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2,5 mM MgCl₂, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Твин, 1 % ДМСО, 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеотид трифосфата, 2,5 единиц Taq полимеразы (ПраймТех) и 5 мкл экстракта ДНК из клинических мазков с использованием амплификатора CFX96 (BioRad) в 96 луночной плашке либо отдельных пробирках объемом 0,2 мл. Режим амплификации включал предденатурацию при 95 °C в течение 5 минут, с последующими 50 циклами, состоящими из стадии денатурации при 95 °C в течение 10 секунд

и стадии элонгации при 60°C в течение 1 минуты. Образцы со значениями Ct равными 50,0 и более учитывались как негативные.

Для детекции *B. bronchiseptica* в клиническом материале использовали TaqMan ПЦР, направленную на выявление гена *flaA*. Фрагмент гена *flaA* длиной 97 н.п. амплифицировали в TaqMan ПЦР с использованием разработанного нами набора праймеров и зонда 5'CGCAGGAACATGCCSTTTGCCGC3' 5'TTGCTGGAT-TACGGCAGGTT3', FAM-CCGCACATTTCCGAACCTCACTT-BHQ1 в концентрации праймеров и зонда 200 нмоль. Режим и анализ продукта амплификации были аналогичные как при выявлении фрагмента гена *hIS1001*.

Секвенирование фрагмента гена *hIS1001*, специфичного для *B. holmesii*, проводили на обеих цепях ДНК с использованием праймеров, предложенных L. E. Pittet с соавт., 2014 [12]. Количество ДНК в пробе определяли, сопоставляя интенсивность флуоресценции с ДНК-маркером, содержащим известное количество ДНК. Реакцию секвенирования выполняли с BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя. Электрофорез и анализ продуктов сиквенс-реакции проводили на автоматическом генетическом анализаторе Applied Biosystems® 3500 (Thermo Fisher Scientific).

Результаты и обсуждение

Проведен ретроспективный анализ 2530 носоглоточных мазков пациентов с подозрением на коклюш, поступивших в лабораторию в период с 26 мая 2017 года по 31 декабря 2019 года и исследованных ранее в дуплексной ПЦР на наличие ДНК *B. pertussis* и *B. parapertussis* (таблица).

В 1721 пробе из 2530 сигнал амплификации отсутствовал на мишени IS481, BP0026, IS1001 и присутствовал только на мишень гена человека GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), который использовался в качестве контроля анализа качества выделения ДНК и проверки наличия ингибирования реакции. Эти пробы считались отрицательными на наличие ДНК *B. pertussis* и *B. parapertussis* и составили 68,0 % от общего числа. Положительными на наличие ДНК *B. pertussis* были 562 пробы (22,2 %), так как сигнал продуцировался в двух каналах: на мишень IS481 и вторую специфическую только для *B. pertussis* мишень BP0026, находящуюся внутри гена тиолазы. Двадцать одна проба из 2530 (0,83 %) была положи-

тельная на наличие ДНК *B. parapertussis*, так как сигнал продуцировался только в канале IS1001. Двести двадцать шесть проб (8,9 %) были положительными только на мишень IS481 и отрицательными на мишени BP0026 и IS1001, что не исключает возможность наличия ДНК других видов *Bordetella*. Все 226 проб были исследованы в разработанных моноплексных TaqMan ПЦР для индикации *B. holmesii* и *B. bronchiseptica*. Выявлено 8 проб позитивных на наличие ДНК *B. holmesii*, что составило 3,5 %. Позитивных проб на наличие ДНК *B. bronchiseptica* не было выявлено. Оставшиеся 218 образцов, позитивных на мишень IS481, не были идентифицированы на уровне вида и были интерпретированы как инфекция, вызванная *Bordetella* spp. В четырех случаях, идентифицированных как *Bordetella* spp., диагноз коклюша был подтвержден методом ИФА при определении в сыворотке крови антител класса G к коклюшному токсину, т. е. они были вызваны *B. pertussis*. Таким образом из всех 788 проб, позитивных на мишень IS481, *B. pertussis* составила 71,8 %, *B. holmesii* – 1,0 %, не идентифицированные на уровне вида составили 27,2 %.

Иной подход в исследовании клинического материала пациентов с подозрением на коклюш проведен в 2020 году. Все образцы клинического материала исследовались параллельно в дуплексной ПЦР на выявление *B. pertussis* и *B. parapertussis*, и в двух моноплексных ПЦР на выявление *B. holmesii* и *B. bronchiseptica*. Согласно такому алгоритму был проведен анализ 600 носоглоточных мазков, среди которых 393 (65,5 %) были негативными на мишень IS481 или IS1001. ПЦР с использованием мишени BP0026 подтвердила инфекцию, вызванную *B. pertussis*, в 135 образцах (22,5 % среди всех исследованных), с использованием мишени IS1001 идентифицирована *B. parapertussis* в 6 образцах (1,0 %), в одном из них имела место коинфекция с *B. pertussis*. С использованием мишени *hIS1001* идентифицирована *B. holmesii* в 6 образцах (1,0 %) и 60 образцов (10,0 %) были интерпретированы как инфекция, вызванная *Bordetella* spp. Среди 6 выявленных при использовании этого алгоритма *B. holmesii* только 2 были выявлены среди мазков, позитивных на мишень IS481, что составило 1,0 % из всех мазков позитивных на *Bordetella* spp. (199), что соответствует результатам при алгоритме исследования на *B. holmesii* мазков за 2017–2019 гг. В двух случаях выявлена коинфекция *B. holmesii*

Таблица. Результаты исследования клинического материала от пациентов с подозрением на коклюш в дуплексной TaqMan ПЦР, 2017–2019 гг.

	Количество исследований	в том числе позитивные в дуплексной TaqMan ПЦР		
		к мишени IS481	к мишени BP0026	к мишени IS1001
Позитивные на <i>B. pertussis</i>	562	562	562	0
Позитивные на <i>B. parapertussis</i>	21	0	0	21
Позитивные на <i>Bordetella</i> spp	226	226	0	0
Негативные на три мишени в ПЦР	1721	0	0	0
ИТОГО	2530	788	562	21

и *B. pertussis* и в двух пробах, отрицательных на мишень IS481, выявлена ДНК *B. holmesii*. Ни в одном из анализируемых мазков *B. bronchiseptica* не была выявлена. Среди 393 проб, негативных на мишень IS481 или IS1001, в 49 случаях диагноз коклюша был подтвержден методом ИФА при определении в сыворотке крови антител класса G к коклюшному токсину.

Чтобы подтвердить результаты обнаружения *B. holmesii* все 14 проб, положительных в TaqMan ПЦР на мишень hIS1001, проанализированы путем секвенирования продукта амплификации. Проверка программой BLAST секвенированного ампликона и сравнение его нуклеотидной последовательности с последовательностью типового штамма *B. holmesii* ATCC 51541 подтвердила принадлежность фрагмента ДНК к геному *B. holmesii* (рисунок 1).

Оценка вклада *B. bronchiseptica* и *B. holmesii* в заболеваемость коклюшеподобными инфекциями в Республике Беларусь проведена на основе исследований клинического материала за весь период с мая 2017 по сентябрь 2020 года, что включало результаты ПЦР для 3130 носоглоточных мазков и результаты ИФА доступных сывороток крови ($n = 728$), в которых была подтверждена инфекция коклюша при определении антител класса G к коклюшному токсину (концентрация превышала диагностический титр 100 МЕ/мл). Число позитивных сывороток составило 228. В четырех случаях им соответствовали мазки, позитивные на *Bordetella* spp., в 224 – мазки полностью отрицательные в ПЦР. С учетом результатов исследования доступных сывороток среди 3130 анализируемых мазков отрицательные на *Bordetella* spp. составили 60,4 % (1890 из 3130 мазков). Чаще выявлялись *B. pertussis*,

доля которых составила 29,5 % (925 из 3130). *B. parapertussis* выявлена в 0,9 % мазков (27 из 3130), *B. holmesii* – в 0,4 % мазков (14 из 3130). *B. bronchiseptica* не была выявлена. Среди 3130 мазков 274 (8,8 %) остались не идентифицированными на уровне вида и интерпретировались как инфекция, вызванная *Bordetella* spp. в результате низкого содержания ДНК (значение Ct = 38,5 до 42,0).

Анализ сезонного распределения положительных образцов показал более высокую заболеваемость в летние месяцы (июнь-август) ($n = 748$) и в январе-декабре ($n = 523$), что составило 70 % положительных образцов (рисунок 2). Среди положительных образцов наиболее часто, в 78,9 % и 67,7 % соответственно изолировалась *B. pertussis*. *B. parapertussis* и *B. holmesii* изолировались как в период высокой, так и низкой заболеваемости коклюшем. *B. holmesii* выявлялась как в весенние месяцы (7 образцов), так в летние (4 образца), зимние месяцы (2 образца) и осенние месяцы (1 образец), что позволяет предположить, что *B. parapertussis* и *B. holmesii* могут коциркулировать с *B. pertussis*.

Анализ возрастного распределения положительных образцов показал следующее. Медиана возраста пациентов составила 6 лет (интерквартильный диапазон от 2 до 10) и возраст варьировал от 12 дней до 75 лет. *B. pertussis* изолировалась во всех возрастных группах (рисунок 3). *B. parapertussis* была выявлена в возрастных группах детей 0–14 лет. *B. holmesii* была выявлена во всех возрастных группах за исключением взрослых 20 лет и старше.

Алгоритм исследования носоглоточных мазков с использованием разработанных дуплексной TaqMan

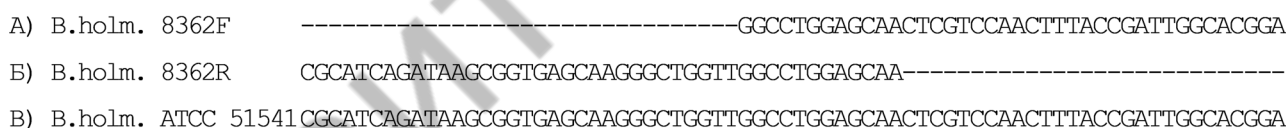


Рисунок 1. Нуклеотидные последовательности ампликона клинического образца № 8362, полученные в результате секвенирования с использованием прямого (А) и обратного (Б) праймеров, выравнены относительно последовательности гена hIS1001 типового штамма *B. holmesii* ATCC 51541 (GenBank accession no. AY786982.1) (В). Подчеркиванием обозначены последовательности праймеров

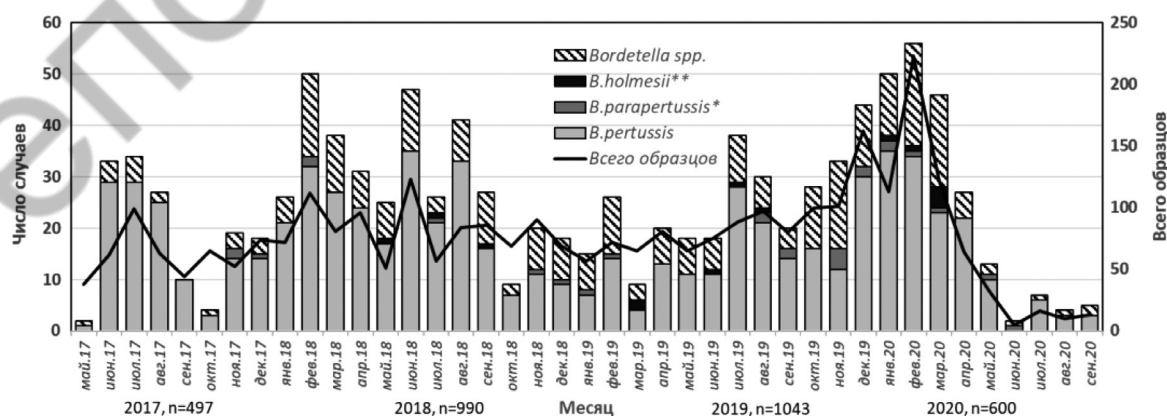


Рисунок 2. Сезонное распределение молекулярно-генетически подтвержденных случаев коклюша по этиологическому агенту ($n = 3130$), включая одну коинфекцию *B. parapertussis* и *B. pertussis* (*) и две коинфекции *B. holmesii* и *B. pertussis* (**)

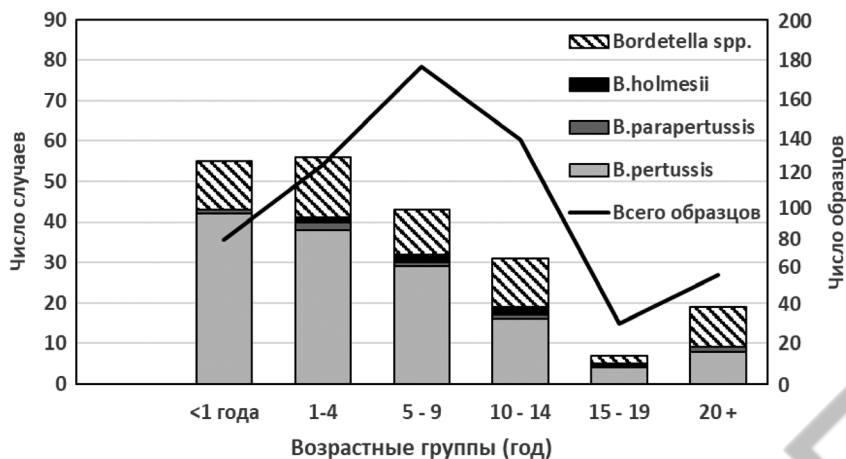


Рисунок 3. Возрастное распределение молекулярно-генетически подтвержденных случаев и доля *Bordetella* spp. (n = 3130). Включены одна коинфекция *B. parapertussis* и *B. pertussis* (*) и две коинфекции *B. holmesii* и *B. pertussis* (**)

ПЦР для выявления *B. pertussis* и *B. parapertussis* и двух моноплексных TaqMan ПЦР для выявления *B. holmesii* и *B. bronchiseptica* позволяет идентифицировать четыре вида *Bordetella*, вызывающих заболевание у человека среди известных девяти представителей рода.

Выявление инфекции, вызванной *B. parapertussis*, *B. holmesii*, *B. bronchiseptica* является значимым, поскольку указывает на то, что действительно есть коклюшеподобные заболевания и это, в свою очередь, может повлиять на эпидемиологический надзор за *B. pertussis*, как с точки зрения мониторинга эффективности вакцины, так и с точки зрения выбора вариантов лечения для человека. Возможна также коинфекция *B. pertussis* и *B. holmesii*, поскольку положительный результат в ПЦР реального времени на мишень IS481 и hIS1001 не обязательно указывает на моноинфекцию *B. holmesii*. Поэтому в дуплексной TaqMan ПЦР использовалась мишень VP0026 к тирозинному гену, которая специфична для выявления *B. pertussis*. Но поскольку одна копия этого гена присутствует в геноме *B. pertussis* и, кроме того, низкая бактериальная нагрузка *B. pertussis* во время инфекции может способствовать ложноотрицательным результатам на присутствие *B. pertussis*, т. е. однозначно нельзя исключить коинфекцию. В этом случае инфекция коклюша может быть подтверждена исследованием сыворотки крови в ИФА с определением антител класса G к коклюшному токсину. Уровень антител в концентрации 100 МЕ/мл и выше подтверждает диагноз коклюша, а, следовательно, и наличие коинфекции.

Использование комплексного диагностического алгоритма для исследования 3130 носоглоточных мазков пациентов с подозрением на коклюш за 3-х летний период наблюдения (с мая 2017 г. по сентябрь 2020 г.) показало, что преобладающим видом являлась *B. pertussis*, затем следовали *B. parapertussis* и *B. holmesii*. *B. bronchiseptica* выявлена не была.

На сегодняшний день опубликовано мало европейских исследований, изучающих инфекции, вызванные

другими видами рода *Bordetella*, кроме *B. pertussis*. Ретроспективные исследования, проведенные в четырех европейских странах в период с 1992 по 2012 год, выявили *B. pertussis* и *B. parapertussis* соответственно в 82,6–97,0 % и 0,0–17,4 % положительных образцах [16–18]. Ни в одном из этих исследований не сообщалось об инфекциях, вызванных *B. holmesii*. Однако недавние ретроспективные исследования с 2013 по 2016 год выявили *B. holmesii* в 1,1–4,1 % положительных проб и *B. parapertussis* в 0,3–8,2 % положительных образцов [19, 20]. Кроме того, исследование, выполненное во Франции, показало очень высокую распространенность *B. holmesii*, до 20 %, среди подростков и взрослых с симптомами коклюша [21]. Наши результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о коциркуляции *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, а также о коинфекции *B. holmesii* с *B. pertussis* и не согласуются в отношении *B. holmesii* [27].

Одним из недостатков данного исследования является отсутствие идентификации на уровне вида 8,8 % положительных образцов только на мишень IS481. Однако, эти образцы носоглоточных мазков, интерпретированные как инфекция, вызванная *Bordetella* spp., вероятнее всего, соответствуют *B. pertussis*, поскольку, несмотря на их отрицательные результаты на специфическую мишень VP0026 для *B. pertussis*, из-за низкой бактериальной нагрузки, они также были отрицательными в двух моноплексных ПЦР с использованием специфических мишеней для выявления *B. holmesii* и *B. bronchiseptica*, предусмотренной диагностическим алгоритмом.

Проведенное исследование продемонстрировало низкий уровень циркуляции других видов *Bordetella*, исключая *B. pertussis*, и отсутствие *B. bronchiseptica* в Республике Беларусь. За весь период наблюдения среди 3130 образцов носоглоточных мазков выявлено 27 образцов, содержащих ДНК *B. parapertussis*, и 14 ДНК *B. holmesii*, что соответствует соответственно 0,9 % и 0,4 % от всех исследованных образцов, 1,1 %

и 0,6 % от 2430 случаев коклюша, зарегистрированных в Республике Беларусь за этот период.

Таким образом, использование диагностического алгоритма повысило точность молекулярно-генетической диагностики коклюша в Республике Беларусь. Оценена заболеваемость, обусловленная различными видами рода *Bordetella*. Согласно полученным данным циркуляция *B. parapertussis*, *B. holmesii* является незначительной и не связана с сезонным подъемом *B. pertussis*. Несмотря на то, что, в соответствии с полученными данными, *B. parapertussis*, *B. holmesii* не вносят существенный вклад в бремя заболеваемости коклюшем, важно отслеживать эпидемиологические характеристики этих видов для проведения надлежащего эпидемиологического надзора за заболеваемостью коклюшем в Республике Беларусь.

Литература

1. *Mattoo, S., Cherry J. D.* Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies // *Clinical microbiology reviews*. – 2005. – Т. 18, № 2. – С. 326–382.
2. *Centers for Disease Control and Prevention.* 2015. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases, 13th ed. Public Health Foundation, Washington, DC.
3. *Barlow, R. S., Reynolds L. E., Cieslak P. R., Sullivan A. D.* Vaccinated children and adolescents with pertussis infections experience reduced illness severity and duration, Oregon, 2010–2012 // *Clin. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 58(11). – P. 1523–9. – <https://doi.org/10.1093/cid/ciu156> PMID: 24633685.
4. *Bouchez, V., Guiso N.* *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough // *Pathogens and disease*. – 2015. – Т. 73, № 7.
5. *Mattoo, S., Foreman-Wykert A. K., Cotter P. A., Miller J. F.* Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis // *Front. Biosci.* – 2001. – Т. 6, № 1.
6. *Cherry, J. D., Seaton B. L.* Patterns of *Bordetella parapertussis* respiratory illnesses: 2008–2010 // *Clinical infectious diseases*. – 2012. – Т. 54, № 4. – С. 534–537. – <https://doi.org/10.1093/cid/cir860> PMID: 22156857.
7. *Zhang, X., Weyrich L. S., Lavine J. S., Karanikas A. T., Harvill E. T.* Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination // *Emerging infectious diseases*. – 2012. – Т. 18, № 11. – С. 1771. – <https://doi.org/10.3201/eid1811.111544> PMID: 23092514
8. *Pittet, L. F., Emonet S., François P., Bonetti E.-J., Schrenzel J., Hug M., Altwegg M., Siegrist C. A., Posfay-Barbe K. M.* Diagnosis of whooping cough in Switzerland: differentiating *Bordetella pertussis* from *Bordetella holmesii* by polymerase chain reaction // *PLoS One*. – 2014. – № 9. – P. e88936. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088936>.
9. *Pittet, L. F., Posfay-Barbe K. M.* *Bordetella holmesii*: still emerging and elusive 20 years on // *Emerging Infections*. – 2016. – № 10. – С. 239–254.
10. *van der Zee, A., Schellekens J. F. P., Mooi F. R.* Laboratory diagnosis of pertussis. *Clin Microbiol Rev.* – 2015. – № 28. – P. 1005–1026. – <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-15>.
11. *Muller, F. M., Hoppe J. E., Wirsing von Konig C. H.* Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997 // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 2435–2443.
12. *Kerr, J. R., Matthews, R. C.* *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 19. – P. 77–88.

13. *Reischl, U., Lehn N., Sanden G. N., Loeffelholz M. J.* Real-Time PCR Assay Targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and Molecular Basis for Detecting *Bordetella holmesii* // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – Т. 39, № 5. – С. 1963–1966. – <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1963-1966.2001> PMID: 11326023.
14. *Tatti, K. M., Sparks K. N., Boney K. O., Tondella M. L.* Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens // *Journal of clinical microbiology*. – 2011. – Т. 49, № 12. – С. 4059–4066. – <https://doi.org/10.1128/JCM.00601-11> PMID: 21940464.
15. *Kolodkina, V., Martynov V., Babenko A.* Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* // *Iran J. Microbiol.* – 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 140–148.
16. *Diagnosis of whooping cough in Switzerland: differentiating *Bordetella pertussis* from *Bordetella holmesii* by polymerase chain reaction / L. F. Pittet [et al.] // PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. e88936.
17. *Antila, M. et al.* *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis // *Journal of medical microbiology*. – 2006. – Т. 55, № 8. – С. 1043–1051.
18. *Van den Bossche, D. et al.* Prevalence of *Bordetella holmesii* and *Bordetella bronchiseptica* in respiratory tract samples from Belgian patients with pertussis-like symptoms by sensitive culture method and mass spectrometry // *Acta Clinica Belgica*. – 2013. – Т. 68, № 5. – С. 341–348.
19. *Martini, H. et al.* Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four target real-time PCR // *PLoS One*. – 2017. – Т. 12, № 4. – С. e0175587.
20. *Mir-Cros, A. et al.* Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain // *Emerging infectious diseases*. – 2017. – Т. 23, № 11. – С. 1856.
20. *Njamkepo, E. et al.* Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis // *Journal of clinical microbiology*. – 2011. – Т. 49, № 12. – С. 4347–4348.
21. *Rodgers, L., Martin S. W., Cohn A., Budd J., Marcon M., Terranella A., Mandal S., Salamon D., Leber A., Tondella M. L., Tatti K., Spicer K., Emanuel A., Koch E., McGlone L., Pawloski L., Lemaile-Williams M., Tucker N., Iyer R., Clark T. A., Diorio M.* Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* – Ohio, 2010–2011 // *Clin. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 56. – P. 322–331. – <https://doi.org/10.1093/cid/cis888>.

References

1. *Mattoo, S., Cherry J. D.* Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies // *Clinical microbiology reviews*. – 2005. – Т. 18, № 2. – С. 326–382.
2. *Centers for Disease Control and Prevention.* 2015. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases, 13th ed. Public Health Foundation, Washington, DC.
3. *Barlow, R. S., Reynolds L. E., Cieslak P. R., Sullivan A. D.* Vaccinated children and adolescents with pertussis infections experience reduced illness severity and duration, Oregon, 2010–2012 // *Clin. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 58(11). – P. 1523–9. – <https://doi.org/10.1093/cid/ciu156> PMID: 24633685
4. *Bouchez, V., Guiso N.* *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough // *Pathogens and disease*. – 2015. – Т. 73, № 7.
5. *Mattoo, S., Foreman-Wykert A. K., Cotter P. A., Miller J. F.* Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis // *Front. Biosci.* – 2001. – Т. 6, № 1.

6. Cherry, J. D., Seaton B. L. Patterns of *Bordetella pertussis* respiratory illnesses: 2008–2010 // *Clinical infectious diseases*. – 2012. – Т. 54, № 4. – С. 534–537. – <https://doi.org/10.1093/cid/cir860> PMID: 22156857
7. Zhang, X., Weyrich L. S., Lavine J. S., Karanikas A. T., Harvill E. T. Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination // *Emerging infectious diseases*. – 2012. – Т. 18, № 11. – С. 1771. – <https://doi.org/10.3201/eid1811.111544> PMID: 23092514
8. Pittet, L. F., Emonet S., Francois P., Bonetti E.-J., Schrenzel J., Hug M., Altwegg M., Siegrist C.-A., Posfay-Barbe K. M. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: differentiating *Bordetella pertussis* from *Bordetella holmesii* by polymerase chain reaction // *PLoS One*. – 2014. – № 9. – P. e88936. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088936>.
9. Pittet, L. F., Posfay-Barbe K. M. *Bordetella holmesii*: still emerging and elusive 20 years on // *Emerging Infections*. – 2016. – № 10. – С. 239–254.
10. van der Zee, A., Schellekens J. F. P., Mooi F. R. Laboratory diagnosis of pertussis. *Clin Microbiol Rev*. – 2015. – № 28. – P. 1005–1026. – <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-15>.
11. Muller, F. M., Hoppe J. E., Wirsing von Konig C. H. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997 // *J Clin Microbiol*. – 1997. – Vol. 35. – P. 2435–2443.
12. Kerr, J. R., Matthews R. C. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. – 2000. – Vol. 19. – P. 77–88.
13. Reischl, U., Lehn N., Sanden G. N., Loeffelholz M. J. Real-Time PCR Assay Targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and Molecular Basis for Detecting *Bordetella holmesii* // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – Т. 39, № 5. – С. 1963–1966. – <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1963-1966.2001> PMID: 11326023.
14. Tatti, K. M., Sparks K. N., Boney K. O., Tondella M. L. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens // *Journal of clinical microbiology*. – 2011. – Т. 49, № 12. – С. 4059–4066. – <https://doi.org/10.1128/JCM.00601-11> PMID: 21940464
15. Kolodkina, V., Martynov V., Babenko A. Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* // *Iran J. Microbiol*. – 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 140–148.
16. *Diagnosis* of whooping cough in Switzerland: differentiating *Bordetella pertussis* from *Bordetella holmesii* by polymerase chain reaction / L. F. Pittet [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. e88936.
17. Antila, M. et al. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis // *Journal of medical microbiology*. – 2006. – Т. 55, № 8. – С. 1043–1051.
18. Van den Bossche, D. et al. Prevalence of *Bordetella holmesii* and *Bordetella bronchiseptica* in respiratory tract samples from Belgian patients with pertussis-like symptoms by sensitive culture method and mass spectrometry // *Acta Clinica Belgica*. – 2013. – Т. 68, № 5. – С. 341–348.
19. Martini, H. et al. Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four target real-time PCR // *PLoS One*. – 2017. – Т. 12, № 4. – С. e0175587.
215. Mir-Cros, A. et al. Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain // *Emerging infectious diseases*. – 2017. – Т. 23, № 11. – С. 1856.
20. Njamkepo, E. et al. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis // *Journal of clinical microbiology*. – 2011. – Т. 49, № 12. – С. 4347–4348.
21. Rodgers, L., Martin S. W., Cohn A., Budd J., Marcon M., Terranella A., Mandal S., Salamon D., Leber A., Tondella M. L., Tatti K., Spicer K., Emanuel A., Koch E., McGlone L., Pawloski L., Lemaile-Williams M., Tucker N., Iyer R., Clark T. A., Diorio M. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*–Ohio, 2010–2011 // *Clin Infect Dis*. – 2013. – Vol. 56. – P. 322–331. – <https://doi.org/10.1093/cid/cis888>.

Поступила 12.03.2021 г.