



Иммунобиологические свойства циркулирующих штаммов *Bordetella pertussis*: кандидатные штаммы для изготовления коклюшных вакцин

И.А. Алексеева^{1,✉} , Д.Н. Лепихова¹ , О.Ю. Борисова² , А.С. Пименова² ,
И.Ю. Андриевская² , И.В. Ибрагимхалилова¹ 

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Адмирала Макарова, д. 10, Москва, 125212, Российская Федерация

✉ Алексеева Ирина Андреевна; Alekseeval@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Одна из причин роста заболеваемости коклюшем заключается в адаптации патогена к имеющемуся коллективному иммунитету, сформированному в условиях вакцинопрофилактики заболевания. Мониторинг иммунобиологических свойств штаммов *Bordetella pertussis* необходим для прослеживания изменений адаптивного потенциала патогена в ответ на вакцинацию.

ЦЕЛЬ. Сопоставление иммунобиологических свойств выделенных изолятов циркулирующих штаммов *Bordetella pertussis* и производственных штаммов, используемых для изготовления цельноклеточной коклюшной вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследовании использованы 9 изолятов современных циркулирующих штаммов *B. pertussis*, выделенных от пациентов с коклюшем в 2016–2020 гг. Из штаммов изготовлены экспериментальные серии цельноклеточной коклюшной вакцины. Серии оценивали по следующим параметрам: серологические свойства и антигенная структура (серотипы); гемагглютинирующая, гемолитическая и дермонекротическая активности; вирулентность; остаточная токсичность и защитная активность. В исследовании использовали аутбредных и инбредных мышей линии F1 (C57Bl/6J×CBA). Бактериальную культуру оценивали по морфологическим и культуральным свойствам. Экспериментальные данные сопоставляли с требованиями к производственным штаммам, изложенным в МУК 4.2.2317-08 (Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Из 9 изолятов циркулирующих штаммов *B. pertussis* выделены штаммы 16-16 и 33-18, которые соответствуют требованиям к производственным штаммам. Анализ результатов оценки защитной активности штаммов 25-16, 37-18 и 2-20 указал на целесообразность дополнительного подтверждения данного показателя из-за ограниченности опытного материала. Четыре штамма 31(2)-17, 28(1)-18, 25-16, 2-20 *B. pertussis* не проявили требуемой защитной активности (<8 МЕ/мл).

ВЫВОДЫ. Свойства изолятов 16-16 и 33-18 *B. pertussis* соответствуют всем требованиям к производственным штаммам. Исследованные штаммы имеют современный генотип и перспективны с точки зрения их практического использования в качестве кандидатов для замены устаревших производственных штаммов *B. pertussis* при изготовлении коклюшных вакцин.

Ключевые слова: *Bordetella pertussis*; коклюш; серотип; распространенность; вирулентность; цельноклеточная коклюшная вакцина; вакцинация; генотип; геном; циркулирующие штаммы

Для цитирования: Алексеева И.А., Лепихова Д.Н., Борисова О.Ю., Пименова А.С., Андриевская И.Ю., Ибрагимхалилова И.В. Иммунобиологические свойства циркулирующих штаммов *Bordetella pertussis*: кандидатные штаммы для изготовления коклюшных вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(4):428–437. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-4-428-437>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Immunobiological properties of circulating *Bordetella pertussis* strains: Candidate strains for production of pertussis vaccines

Irina A. Alekseeva¹, Darya N. Lepikhova¹, Olga Yu. Borisova²,
Alena S. Pimenova², Irina Yu. Andrievskaya², Ilkhamya V. Ibragimkhalilova¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow 125212, Russian Federation

✉ Irina A. Alekseeva; Alekseeval@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. One of the reasons for increased pertussis cases is the pathogen adapting to the existing collective immunity formed under conditions of vaccine prophylaxis. Monitoring immunobiological properties of *Bordetella pertussis* strains is necessary to track changes in the pathogen adaptive potential triggered by vaccination.

AIM. This study aimed to compare immunobiological properties of isolated circulating *Bordetella pertussis* strains and strains used to produce whole-cell pertussis vaccine.

MATERIALS AND METHODS. The study used nine isolates of modern circulating strains of *B. pertussis*. Experimental series of whole-cell pertussis vaccine was made using strains isolated from the patients with pertussis in 2016–2020. The series was evaluated by the following parameters: serological properties and antigenic structure (serotypes); haemagglutinating, haemolytic, and dermonecrotic effect; virulence; residual toxicity and protective properties. The study used outbred and inbred F1 mice (C57Bl/6J×CBA) and evaluated morphological and cultural properties of the bacteria. Experimental data were compared with the requirements for production strains set out in the local guidelines MUK 4.2.2317-08 (Selection, testing and storage of production strains of pertussis, parapertussis and bronchisepticosis bacteria).

RESULTS. Strains 16-16 and 33-18 were obtained from nine isolates of circulating *B. pertussis* strains meeting the requirements for production strains. The assessment results of protective activity for strains 25-16, 37-18, and 2-20 were analysed and showed the necessity of further confirming this value due to the limited experimental material. Four *B. pertussis* strains, 31(2)-17, 28(1)-18, 25-16, and 2-20, did not show the required protective activity (<8 IU/mL).

CONCLUSIONS. The properties of isolates 16-16 and 33-18 of *B. pertussis* meet all the requirements for production strains. The test strains have a modern genotype and are prospectively applicable as candidates for replacing obsolete *B. pertussis* strains in production of pertussis vaccines.

Keywords: *Bordetella pertussis*; pertussis; serotype; incidence; virulence; whole-cell pertussis vaccine; vaccination; genotype; genome; circulating strains

For citation: Alekseeva I.A., Lepikhova D.N., Borisova O.Yu., Pimenova A.S., Andrievskaya I.Yu., Ibragimkhalilova I.V. Immunobiological properties of circulating *Bordetella pertussis* strains: Candidate strains for production of pertussis vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(4):428–437. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-4-428-437>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш – высококонтагиозная острая респираторная инфекция, вызываемая бактерией *Bordetella pertussis*, исторически была основной причиной детской смертности во всем мире [1, 2]. В 40–50-х годах XX века применение цельноклеточной коклюшной вакцины (ЦКВ) в развитых странах практически привело к искоренению коклюша. Реактогенность ЦКВ, выражающаяся в болезненности места инъекции, раздражительности и повышении температуры тела, послужила стимулом для разработки и внедрения бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) как менее реактогенного и более стандартизованного препарата. Однако препараты БКВ не оправдали связанных с их применением надежд. Заболеваемость коклюшем возросла на фоне широкого охвата населения прививками БКВ; стали регистрировать эпидемии [3, 4]. По мнению ряда ученых [5–8], существует тесная связь между использованием БКВ и возрождением коклюша, что порождает важные вопросы эффективности БКВ и их способности контролировать заболеваемость.

Выделяют несколько основных причин роста заболеваемости коклюшем. Естественная инфекция и вакцины индуцируют различные виды иммунитета. Естественная инфекция и ЦКВ индуцируют Т-клеточный ответ со смещением к Th1/Th17, а БКВ – со смещением к Th2/Th17 [9]. Такое различие вносит вклад в более короткую продолжительность иммунитета и снижение защиты от инфекции при использовании БКВ по сравнению с ЦКВ. Так, введение БКВ не защищало иммунизированных обезьян-бабуинов от колонизации *B. pertussis*, что позволило носителям передавать бактерии неинфицированным особям [10].

Изменение иммунитета хозяина и общей эпидемиологической ситуации оказывают влияние на популяцию *B. pertussis*. F.R. Mooi с соавт. утверждали, что популяция *B. pertussis* развивается под давлением коллективного иммунитета, вызванного БКВ, и что адаптация патогена к имеющемуся уровню иммунитета является одной из причин возрождения коклюша [6]. Адаптацию бактериальных клеток

B. pertussis к поствакцинальному иммунитету отмечали и ранее при использовании ЦКВ, но при переходе к использованию БКВ адаптация значительно ускорилась. Адаптация популяции *B. pertussis* происходит посредством мутаций в промоторных областях генов и областях генома, кодирующих антигены, которые входят также в состав БКВ. Мониторинг циркулирующих штаммов позволил выявить штаммы *B. pertussis* с мутациями в генах, кодирующих защитные антигены, что вносит вклад в уклонение патогена от иммунной системы [7, 8, 11–16]. Помимо расхождения состава нуклеотидов в генах (возникновение аллелей одного гена) циркулирующих штаммов и штаммов, входящих в состав БКВ, уклонение от иммунного ответа, вызванного вакциной, может быть связано с полной остановкой экспрессии антигенов. Такое явление наблюдалось для пертактина, белка внешней мембраны, который способствует адгезии *B. pertussis* к эпителиальным клеткам хозяина [4, 17]. Учитывая возникающие отличия в структуре генов, кодирующих защитные антигены циркулирующих и вакцинных штаммов, крайне важно своевременно обнаруживать снижение эффективности коклюшных вакцин. Таким образом, мониторинг изменений иммунобиологических свойств штаммов *B. pertussis*, которые обуславливают дальнейшую адаптацию возбудителя в ответ на вакцинацию [18], представляет собой современный инструмент контроля эффективности вакцинопрофилактики.

Цель работы – сопоставление иммунобиологических свойств выделенных изолятов циркулирующих штаммов *Bordetella pertussis* и производственных штаммов, используемых для изготовления цельноклеточной коклюшной вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Штаммы. В исследовании использовались изоляты современных циркулирующих штаммов *Bordetella pertussis* 16-16, 31(2)-17, 28(1)-18, 25-16, 33-18, 37-18, 30-18, 1-20, 2-20, выделенные от детей с коклюшем. Штаммы хранятся в Государственной коллекции патогенных

микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Иммунобиологические свойства штаммов исследовали, используя серии вакцин, полученные из каждого штамма. Серии вакцин были изготовлены в соответствии с регламентом производства коклюшной вакцины № 136-69.

Сыворотки. Серотиповой состав штаммов и их способность экспрессировать свойственные им агглютиногены (фимбрии) определяли с использованием сывороток коклюшных к агглютиногенам 1, 2, 3, адсорбированных для реакции агглютинации сухих (АО «НПО Микроген», Россия).

Питательная среда. Штаммы *B. pertussis* культивировали на питательной среде КУА (АО «НПО Микроген», Россия). В среду добавляли кровь барана до финальной концентрации 10%.

Стандартные образцы. Для оценки защитной (иммуногенной) и гистаминсенсibiliзирующей активностей использовали следующие стандартные образцы: фармакопейный стандартный образец (ФСО) иммуногенной активности коклюшной вакцины ФСО.3.2.00089¹; ФСО.3.2.00087 гистаминсенсibiliзирующей активности коклюшной вакцины²; ФСО.3.1.00086 мутности бактериальных взвесей 5 МЕ³.

Экспериментальные животные. Испытания проводили на аутбредных мышах самцах и самках с массой тела 15±1 г; на инбредных мышах самцах и самках линии F1 (C57Bl/6J×CBA) с массой тела 11±1 г; 4-дневных аутбредных мышах. Линия инбредных мышей была выбрана с учетом ее чувствительности к действию коклюшного токсина. Животные поступали из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России и находились в виварии при стандартных условиях с неограниченным доступом к пище и воде. Температура и относительная влажность в помещении вивария составляла 20–24 °C и 45–65% соответственно. Наблюдение за животными заключалось в ежедневном посещении и внесении записей о состоянии животных

в листах регистрации опытов. При оценке защитной активности штаммов *B. pertussis* регистрировали падеж животных. При оценке специфической токсичности измеряли массу тела мышей. При определении дермонекротического токсина измеряли величину геморрагического некроза, сформировавшегося в месте введения коклюшной суспензии. Эвтаназию вышедших из опыта животных проводили посредством подачи углекислого газа в специальной установке, обеспечивающей гуманное умерщвление животных. Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Протокол № 13 от 11.08.2025). Все исследования проводили в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях⁴; принципами Международного совета медицинских научных обществ (CIOMS)⁵; Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях⁶; ГОСТ 33216-2014⁷; Решением ЕЭК от 03.11.2016 № 81⁸, Рекомендациями Коллегии ЕЭК от 14.11.2023 № 33⁹; ОФС.1.7.2.0005.15¹⁰ и ФС.3.3.1.0010.15¹¹.

Методы

Изготовленные коклюшные вакцины оценивались по следующим показателям: серологические свойства и антигенная структура (серотипы); гемагглютинирующая, гемолитическая, дермонекротическая активности; вирулентность; остаточная токсичность (тест изменения массы тела мышей); гистаминсенсibiliзирующая активность (ГСА) и защитные свойства. Помимо этого, бактериальная культура *B. pertussis* оценивалась по морфологическим и культуральным свойствам.

¹ ФСО.3.2.00089 Иммуногенная активность вакцины для профилактики коклюша цельноклеточной.

² ФСО.3.2.00087 Стандартный образец гистаминсенсibiliзирующей активности коклюшной вакцины.

³ ФСО.3.1.00086 Стандартный образец мутности бактериальных взвесей 5 МЕ.

⁴ https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf

⁵ <https://cioms.ch/>

⁶ European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg; 1986. <https://norecopa.no/media/2iydns5h/ets-123-original.pdf>

⁷ ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

⁸ Решение ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

⁹ Рекомендации Коллегии ЕЭК от 14.11.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

¹⁰ ОФС.1.7.2.0005.15 Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹¹ ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Исследование изолятов циркулирующих штаммов проводили согласно МУК 4.2.2317-08¹². Для оценки соответствия изолятов циркулирующих штаммов требованиям, предъявляемым к производственным штаммам, из каждого штамма была изготовлена ЦКВ.

Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Office 2016. Данные по защитной активности обрабатывали путем расчета среднегеометрических значений показателей. Показатель специфической безопасности выражали относительной величиной (%), которую рассчитывали как отношение прироста массы тела вакцинированных животных к приросту массы тела животных контрольной группы. Содержание агглютиногенов соответствовало последнему разведению коклюшной вакцины или титру, при котором проходит реакция со специфической сывороткой на 3 креста; ГСА выражали величиной индекса, который рассчитывали как отношение ГСД_{50ФСО} к ГСД_{50вакцины}. ГСД_{50ФСО} обозначает дозу ФСО.3.2.00087 гистаминсенсibiliзирующей активности коклюшной вакцины, соответствующей гибели 50% иммунизированных животных после введения гистамина. ГСД_{50вакцины} обозначает дозу вакцины, соответствующую гибели 50% иммунизированных животных после введения гистамина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генотипическая характеристика исследуемых производственных и циркулирующих штаммов *B. pertussis* впервые представлена О.Ю. Борисовой с соавт. [19]. В *таблице 1* при-

веден результат дополнительного анализа ранее полученных данных, который демонстрирует, что генотипы производственных штаммов значительно отличаются по спектру аллельных вариантов защитных антигенов от генотипов циркулирующих штаммов. Так, общими для некоторых штаммов являются *ptxA1*, *ptxB2* и *fim3-1*, тогда как исследуемые штаммы различаются по другим аллелям генов, кодирующих защитные антигены *ptxC*, *ptxP*, *prn* и *fim2* (*табл. 1*).

В соответствии с МУК 4.2.2317-08¹³, циркулирующие штаммы *B. pertussis* исследовали по следующим показателям: «Морфология», «Культуральные свойства», «Серологические свойства», «Антигенная структура (серотипы)», «Гемагглютинирующая и гемолитическая активность», «Дермонекротическая активность», «Вирулентность», «Токсичность (остаточная токсичность)», «Защитные свойства».

По **морфологическим и культуральным** свойствам бактерии выделенных штаммов соответствовали требованиям к производственным штаммам. Такие свойства характерны для гладкой S-формы (фаза I) бактерий *B. pertussis*. Другие иммунобиологические свойства циркулирующих штаммов представлены в *таблице 2*.

Серотиповой состав. Оценка антигенной структуры показала, что подавляющее большинство штаммов *B. pertussis* имели серотиповой состав 1.0.3; все выделенные штаммы активно экспрессировали свойственные им фимбрии. Культуры агглютинировались соответствующими адсорбированными типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3

Таблица 1. Генотипическая характеристика производственных и циркулирующих штаммов *Bordetella pertussis*
Table 1. Genotypic profile of production and *Bordetella pertussis* circulating strains

Штаммы <i>B. pertussis</i> <i>B. pertussis</i> strains	Аллельные варианты генов / <i>Allele gene variants</i>						
	<i>ptxA</i> ^a	<i>ptxB</i> ^b	<i>ptxC</i> ^c	<i>ptxP</i> ^d	<i>Prn</i> ^e	<i>fim2</i> ^f	<i>fim3</i> ^g
Производственные <i>Production strains</i>	<i>ptxA1</i> <i>ptxA2</i> <i>ptxA4</i>	<i>ptxB1</i> <i>ptxB2</i>	<i>ptxC1</i>	<i>ptxP1</i> <i>ptxP2</i>	<i>prn1</i>	<i>fim2-1</i>	<i>fim3-1</i>
Циркулирующие <i>Circulating strains</i>	<i>ptxA1</i>	<i>ptxB2</i>	<i>ptxC2</i>	<i>ptxP3</i>	<i>prn2</i> <i>prn9</i>	<i>fim2-2</i>	<i>fim3-1</i> <i>fim3-2</i>

Таблица составлена авторами по данным О.Ю. Борисовой с соавт. [19] с дополнениями / The table was prepared by the authors using data of O.Y. Borisova et al. [19] with additions

^a *ptxA* – аллель гена коклюшного токсина, кодирующий S1-субъединицу / pertussis toxin gene allele encoding the S1 subunit.

^b *ptxB* – аллель гена коклюшного токсина, кодирующий S2-субъединицу / pertussis toxin gene allele encoding the S2 subunit.

^c *ptxC* – аллель гена коклюшного токсина, кодирующий S3-субъединицу / pertussis toxin gene allele encoding the S3 subunit.

^d *ptxP* – аллель гена промотора коклюшного токсина / pertussis toxin promoter gene allele.

^e *prn* – аллель гена пертактина / pertactin gene allele.

^f *fim2* – аллель гена фимбриального белка 2 фимбрии / fimbria 2 gene allele.

^g *fim3* – аллель гена фимбриального белка 3 фимбрии / fimbria 3 gene allele.

¹² МУК 4.2.2317-08 Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. М.; 2009.

¹³ Там же.

Таблица 2. Иммунобиологические свойства изолятов циркулирующих штаммов
 Table 2. Immunobiological properties of isolates of circulating strains

Штамм, № <i>Strain, No.</i>	Агглютиногены (фимбри), титр <i>Agglutinogens (fimbriae), titre</i>	Гемагглютинирующая активность, млрд <i>Haemagglutinating activity, billion</i>	Вирулентность, млн мкр. клеток <i>Virulence, million microb. cells</i>	Специфическая безопасность, % <i>Specific safety, %</i>	Гистаминсенситизирующая активность, индекс <i>Histamine-sensitizing activity, index</i>	Защитная активность, МЕ/мл <i>Potency, IU/mL</i>
16-16	1f. 1:5120–1:10240 2f. не выявлен / <i>not detected</i> 3f. 1:5120–1:10240	10–20 (3+)	1,903	66,7–96,0	0,49	10,5
31(2)-17	1f. 1:2560–1:5120 2f. не выявлен / <i>not detected</i> 3f. 1:5120–1:10240	20 (3+)	0,617	75,7–96,0	0,28	4,7
28(1)-18	1f. 1:2560–1:5120 2f. не выявлен / <i>not detected</i> 3f. 1:5120–1:10240	20 (3+)	3,623	67,8–76,0	0,63	5,1
25-16	1f. 1:2560–1:5120 2f. не выявлен / <i>not detected</i> 3f. 1:5120	5 (3+)	2,626	67,7–90,7	0,73	12,5
33-18	1f. 1:2560–1:5120 2f. 1:2560–1:5120 3f. не выявлен / <i>not detected</i>	5 (3+)	1,274	69,7–99,7	0,52	10,4
37-18	1f. 1:5120 2f. 1:2560 3f. не выявлен / <i>not detected</i>	10 (3+)	0,851	67,3–99,6	0,37	8,7
30-18	1f. н/о / <i>n/d</i> 2f. н/о / <i>n/d</i> 3f. не выявлен / <i>not detected</i>	5 (3+)	1,940	62,4–96,6	0,71	6,7
1-20	1f. 1:2560 2f. не выявлен / <i>not detected</i> 3f. 1:2560	0,313 (3+)	н/о <i>n/d</i>	69,1–95,1	н/о <i>n/d</i>	5,3
2-20	1f. 1:2560 2f. не выявлен / <i>not detected</i> 3f. 1:5120	0,313 (3+)	2,626	62,5–99,6	н/о <i>n/d</i>	7,5

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. 1f – фактор 1; 2f – фактор 2; 3f – фактор 3; н/о – не определяли; мкр. клетки – микробные клетки; МЕ – международные единицы.

Note. 1f, factor 1; 2f, factor 2; 3f, factor 3; n/d – not determined; microb. cells, microbial cells; IU, international units.

при разведении сыворотки $\geq 1:2560$. В соответствии с нормативными требованиями разведение сыворотки должно составлять не менее 1:1280. Производственные штаммы имеют серотиповой состав 1.2.3, 1.2.0 и 1.0.3. Среди циркулирующих штаммов отсутствовали бактерии, экспрессирующие одновременно фимбри 2 и 3, то есть серотип 1.2.3 не выявлен. Таким образом, 6 из 8 циркулирующих штаммов имели серотиповой состав 1.0.3, а остальные два штамма – 1.2.0.

Гемагглютинирующая активность. Все штаммы *B. pertussis* обладали гемагглютинирующей активностью и агглютинировали эритроциты барана на 3 креста (3+). В соответствии с нормативными требованиями коклюшная суспензия мутностью 10 МЕ должна агглютинировать эритроциты барана на 2 креста

(2+). По гемагглютинирующей активности можно выделить активные штаммы. Штаммы 16-16, 31(2)-17, 28(1)-18, 37-18 давали агглютинацию на 3+ в концентрации 10–20 млрд/мл, а штаммы 25-16, 33-18, 30-18 – в концентрации 5 млрд/мл. Наибольшую активность проявили штаммы 1-20 и 2-20; агглютинация на 3+ в разведении 0,313 млрд/мл.

Гемолитическая активность. Все штаммы проявили гемолитическую активность. Единичные колонии бактериальных клеток *B. pertussis* в тонком слое среды Борде – Жангу были окружены зоной гемолиза.

Дермонекротическая активность была подтверждена при подкожном введении культуры 4-дневным аутбредным мышам. В месте введения живой культуры в концентрации 20 млрд/мл образовывался геморрагический

некроз, что соответствовало нормативным требованиям к производственным штаммам *B. pertussis*.

Вирулентность. Культура *B. pertussis* должна быть вирулентной для мышей. При внутримозговом заражении значение LD₅₀ не должно превышать 25 млн микробных клеток (мкр. клеток)¹⁴. Циркулирующие штаммы проявили высокую вирулентность, поскольку значения LD₅₀ составляли от 3,623 до 0,851 млн мкр. клеток.

Остаточная токсичность штаммов обусловлена присутствием в вакцине остаточного количества не полностью обезвреженного коклюшного токсина и присутствием липополисахарида. Показатель определяли в рекомендованном ВОЗ тесте по изменению массы тела мышей и оценке ГСА. Остаточную токсичность оценивали на протяжении всего срока годности вакцины (1 год). В начале срока хранения вакцины значение показателя специфической токсичности, отражающего остаточную токсичность препарата, находилось практически на самом низком допустимом уровне. В соответствии с требованиями МУК 4.2.2317-08¹⁵ значение показателя должно быть ≥60%. Однако к концу срока годности значения показателя практически у всех циркулирующих штаммов возросли до ≥90%, что указывало на эффективную детоксикацию коклюшного токсина и пролонгированное действие формальдегида, добавляемого в вакцину для нейтрализации токсинов бактериальных клеток *B. pertussis*. Данное наблюдение указывает на то, что для получения менее реактогенной АКДС-вакцины для сведения с дифтерийным и столбнячным компонентами следует использовать коклюшную суспензию, которая находилась максимально долго (желательно в течение всего срока годности, 1 год) в условиях детоксикации коклюшных токсинов [20]. Добавление формальдегида и особенность его действия необходимо учитывать для получения более безопасного препарата коклюшной вакцины [20].

Защитная активность. Оценка защитной активности коклюшных вакцин, изготовленных из изолятов циркулирующих штаммов, показывает, что 2 штамма, 16-16 и 33-18 *B. pertussis*, обладают выраженной защитной активностью (табл. 2). Это соответствует нормативному требованию, согласно которому защитная активность должна быть ≥8 МЕ/мл. Полученные результаты по оценке защитной активности штаммов 25-16, 37-18, и 2-20 *B. pertussis* нуждаются в подтверждении из-за ограниченности опытного материала.

Остальные четыре штамма обладают слабой защитной активностью (<8 МЕ/мл).

Таким образом, сопоставление иммунобиологических свойств изолятов циркулирующих штаммов *B. pertussis* на соответствие нормативным требованиям к производственным штаммам показывает, что все девять изученных штаммов обладают набором свойств, характерных для S-формы бактерий. Все выделенные штаммы активно экспрессируют агглютиногены (фимбрии) и обладают гемагглютинирующей, гемолитической, гистаминсенсibiliзирующей, дермонекротической активностями, выраженной вирулентностью и низкой остаточной токсичностью (на момент окончания срока хранения). Два из девяти изученных штаммов продемонстрировали требуемую защитную активность.

Выраженные различия между производственными и циркулирующими штаммами были выявлены при изучении их генотипического разнообразия. Полученные авторами более ранние данные [19] согласуются с данными зарубежных источников и указывают на то, что аллели генов пертактина *prn2*, коклюшного токсина *ptxA1* и промотора коклюшного токсина *ptxP3* являются доминирующими [7, 21]. Циркулирующие бактерии *B. pertussis*, несущие эти аллели, могут иметь преимущества в популяции лиц, вакцинированных БКВ с устаревшими вакцинными штаммами в своем составе. Данный фактор может влиять на вакцины, снижая их эффективность.

В настоящее время бактерии *B. pertussis*, несущие аллель *ptxP3*, считают причиной эпидемий во всем мире. В конце 80-х годов XX века были впервые обнаружены штаммы с аллелем *ptxP3*, которые теперь встречаются повсеместно. В ряде стран мира частота встречаемости таких штаммов составляет >90%, что ведет к замещению популяции *B. pertussis* с аллелем *ptxP1* [22–24]. Данным штаммам свойственна устойчивость к антибиотикам группы макролидов [12]. Кроме того, штаммы с аллелем *ptxP3* продуцируют в 1,6 раза больше коклюшного токсина, чем штаммы с аллелем *ptxP1* [25].

Более интенсивная продукция коклюшного токсина штаммами *B. pertussis* с аллелем *ptxP3* по сравнению с *ptxP1* объясняет их быстрое глобальное распространение. Коклюшный токсин играет центральную роль в подавлении врожденной и приобретенной формы иммунного ответа [26]. Повышенная продукция коклюшного токсина, с одной стороны, задерживает эффективный иммунный ответ, усиливая

¹⁴ МУК 4.2.2317-08 Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. М.; 2009.

¹⁵ Там же.

передачу возбудителя и, следовательно, приспособленность патогена. Повышенная продукция коклюшного токсина, с другой стороны, может быть выгодной для возбудителя, поскольку организм вынужден вырабатывать более высокие уровни специфических антител для нейтрализации токсина. Коклюшный токсин вызывает патологический лейкоцитоз, связанный с повышенной смертностью младенцев из-за развития легочной гипертензии [27]. Таким образом, распространение штаммов *B. pertussis* с аллелем *ptxP3* может привести к увеличению заболеваемости коклюшем и смертности, в пользу чего есть доказательства высокой вирулентности подобных штаммов [25, 28].

Таким образом, ранее высказанное мнение о том, что рост заболеваемости коклюшем обусловлен в основном ослаблением иммунитета, является недостаточно полным. После введения вакцинации были отмечены значительные изменения в популяциях *B. pertussis*, что предполагает адаптацию патогенов в возобновлении и поддержании коклюша. Адаптация заключается в антигенной дивергенции с вакцинными штаммами и повышенной выработке коклюшного токсина. Антигенная дивергенция влияет на формирование Т-клеток памяти и способность антител эффективно распознавать антиген.

Более высокие уровни коклюшного токсина могут усилить подавление иммунного ответа в организме. По-видимому, эта адаптация *B. pertussis* привела к сокращению периода эффективного действия коклюшных вакцин и ускорению ослабления иммунитета [6]. Таким образом, вакцины, в состав которых входят устаревшие вакцинные штаммы, не могут эффективно защищать население от современных циркулирующих штаммов *B. pertussis*, результатом чего является рост заболеваемости коклюшем и возникновение эпидемий. Например, в Российской Федерации показатель заболеваемости коклюшем составил 36,2 на 100 тыс. населения в 2023 г., что в 16,4 раза выше аналогичного показателя 2022 г.¹⁶ [29].

Анализ результатов исследований антигенного полиморфизма клинических изолятов указывает на целесообразность периодической

замены производственных штаммов на штаммы, которые преобладают в настоящее время в популяции [6, 30]. В документе «Стратегия развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 г.»¹⁷ подчеркивается необходимость создания, поддержания и пополнения банка производственных штаммов микроорганизмов с целью обеспечения российских производителей иммунобиологических препаратов образцами производственных штаммов. Два выделенных штамма, 16-16 и 33-18 *B. pertussis*, имеют современный геном и соответствуют нормативным требованиям к производственным коклюшным штаммам (МУК 4.2.2317-08¹⁸). Данные штаммы могут рассматриваться в качестве кандидатных для введения в состав российской ЦКВ в целях замены устаревших производственных штаммов и могут быть использованы при производстве БКВ.

Мониторинг циркулирующих штаммов *B. pertussis* важен для выявления спектра генетических изменений, влияющих на адаптацию патогена в условиях вакцинопрофилактики [18]. Перманентная эволюция генома бактерий *B. pertussis* актуализирует применение комплексного подхода с включением анализа характеристик вакцин, результатов мониторинга циркулирующих штаммов и взаимодействий между ними для решения проблемы роста заболеваемости коклюшем.

Выводы

1. Проведен анализ иммунобиологических свойств выделенных в 2016–2020 гг. изолятов циркулирующих штаммов *B. pertussis* и производственных штаммов, используемых для изготовления цельноклеточной коклюшной вакцины.
2. Анализ иммунобиологических свойств циркулирующих штаммов *B. pertussis* показывает, что изоляты 16-16 и 33-18 соответствуют всем требованиям к производственным штаммам, изложенным в МУК 4.2.2317-08. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий.
3. Штаммы 16-16 и 33-18 *B. pertussis* обладают современным генотипом и перспективны

¹⁶ Информационное письмо Роспотребнадзора от 06.02.2024 № 02/1860-2024-27 «Об организации проведения внешнего контроля качества исследований по диагностике дифтерии и коклюша в 2024 году в Дальневосточном и Уральском федеральных округах».

Данные Референс-центра по мониторингу за коклюшем и дифтерией в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора по анализу формы № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях».

О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. М.: Роспотребнадзор; 2022.

¹⁷ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 18.09.2020 № 2390-р «Об утверждении Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 года».

¹⁸ МУК 4.2.2317-08 Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. М.; 2009.

с точки зрения их практического использования в качестве кандидатов для замены устаревших производственных штаммов при изготовлении коклюшных вакцин.

4. Учитывая, что под давлением коллективного иммунитета постоянно происходит адаптация *B. pertussis* к имеющемуся уров-

ню иммунитета, актуальным представляется регулярное проведение мониторинга генотипов и иммунобиологических свойств циркулирующих штаммов *B. pertussis* с целью своевременной замены в профилактических препаратах устаревших штаммов на современные.

Литература/References

1. Бабаченко ИВ, Нестерова ЮВ, Чернышова ЮЮ и др. Клинико-эпидемиологические аспекты коклюша у детей в условиях массовой вакцинопрофилактики. *Журнал инфектологии*. 2019;11(2):88–96. Babachenko IV, Nesterova YuV, Chernyshova YuYu, et al. Clinical-epidemiological aspects of whooping cough in children in conditions of mass vaccinoprophylactics. *Journal Infectology*. 2019;11(2):88–96 (In Russ.). <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-2-88-96>
2. Краснов ВВ, Ильяненокв КФ, Павлович ЛР, Кузмичева МВ. Коклюш у детей первого года жизни. *Детские инфекции*. 2018;17(1):12–7. Krasnov VV, Ilyanenkov KF, Pavlovich LR, Kuzmicheva MV. Pertussis in infants. *Children Infections*. 2018;17(1):12–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2018-17-1-12-17>
3. Esposito S, Stefanelli P, Fry NK, et al. Pertussis prevention: Reasons for resurgence, and differences in the current acellular pertussis vaccines. *Front Immunol*. 2019;10:1344. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01344>
4. Mir-Cros A, Moreno-Mingorance A, Martín-Gómez MT, et al. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* with unusual mechanism of pertactin disruption, Spain, 1986–2018. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(5):967–76. <https://doi.org/10.3201/eid2805.211958>
5. Burns DL, Meade BD, Messonnier NE. Pertussis resurgence: Perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge. *J Infect Dis*. 2014;209(Suppl 1):S32–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit491>
6. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE. Pertussis resurgence: Waning immunity and pathogen adaptation – two sides of the same coin. *Epidemiol Infect*. 2014;142(4):685–94. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000071>
7. Zomer A, Otsuka N, Hiramatsu Y, et al. *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. *Microb Genom*. 2018;4(5):e000180. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000180>
8. Mir-Cros A, Moreno-Mingorance A, Martín-Gómez MT, et al. Population dynamics and antigenic drift of *Bordetella pertussis* following whole cell vaccine replacement, Barcelona, Spain, 1986–2015. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):1711–20. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1694395>
9. Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, et al. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: Towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003264. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003264>
10. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314688110>
11. Борисова ОЮ, Гадуа НТ, Пименова АС и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(4):22–8. Borisova OYu, Gadua NT, Pimenova AS, et al. Structure of population of strains of the *Bordetella pertussis* in the Russia. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(4):22–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-22-28>
12. Koide K, Yao SM, Chiang C-S, et al. Genotyping and macrolide-resistant mutation of *Bordetella pertussis* in East and South-East Asia. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022;31:263–9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.10.007>
13. Barkoff AM, Mertsola J, Pierard D, et al. Surveillance of circulating *Bordetella pertussis* strains in Europe during 1998 to 2015. *J Clin Microbiol*. 2018;56(5):e01998-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01998-17>
14. Moosa F, du Plessis M, Weigand MR, et al. Genomic characterization of *Bordetella pertussis* in South Africa, 2015–2019. *Microb Genom*. 2023;9(12):001162. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001162>
15. Fu P, Zhou J, Yang C, et al. Molecular evolution and increasing macrolide resistance of *Bordetella pertussis*, Shanghai, China, 2016–2022. *Emerg Infect Dis*. 2023;30(1):29–38. <https://doi.org/10.3201/eid3001.221588>
16. Weigand MR, Williams MM, Peng Y, et al. Genomic survey of *Bordetella pertussis* diversity, United States, 2000–2013. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(4):780–3. <https://doi.org/10.3201/eid2504.180812>
17. Ma L, Caulfield A, Dewan KK, Harvill ET. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis*, vaccine-driven evolution, and re-emergence of pertussis. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(6):1561–6. <https://doi.org/10.3201/eid2706.203850>
18. Belcher T, Preston A. *Bordetella pertussis* evolution in the (functional) genomics era. *Pathog Dis*. 2015;73(8):ftv064. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv064>
19. Борисова ОЮ, Андриевская ИЮ, Пименова АС и др. Генотипическая характеристика штаммов *Bordetella pertussis* – кандидатов для получения коклюшно-го компонента вакцинных препаратов (сообщение 1). *Вестник РГМУ*. 2024;(2):4–9. Borisova OYu, Andrievskaya IYu, Pimenova AS, et al. Genotypic characteristics of *Bordetella pertussis*, candidate strains for production of pertussis component of vaccines (statement I). *Bulletin of RSMU*. 2024;(2):4–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2024.017>
20. Алексеева ИА, Лепихова ДН, Борисова ОЮ и др. Влияние условий хранения цельноклеточной коклюшной вакцины на ее токсичность: исследование на аутбредных мышах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(1):111–20. Alekseeva IA, Lepikhova DN, Borisova OYu, et al. Influence of storage conditions on the toxicity of whole-cell pertussis vaccine in outbred mice. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(1):111–20 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-1-111-120>
21. Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N, et al. Significant decrease in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(4):699–701. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161575>
22. Kallonen T, Mertsola J, Mooi FR, He Q. Rapid detection of the recently emerged *Bordetella pertussis* strains with the

- ptxP3 pertussis toxin promoter allele by real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(9):E377–9.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.04000.x>
23. Petersen RF, Dalby T, Dragsted DM, et al. Temporal trends in *Bordetella pertussis* populations, Denmark, 1949–2010. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(5):767–74.
<https://doi.org/10.3201/eid1805.110812>
 24. Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, et al. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935–2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1248–55.
<https://doi.org/10.3201/eid1808.120082>
 25. Mooi FR, van Loo IHM, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1206–13.
<https://doi.org/10.3201/eid1508.081511>
 26. Carbonetti NH. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.* 2010;5(3):455–69.
<https://doi.org/10.2217/fmb.09.133>
 27. Pierce C, Klein N, Peters M. Is leukocytosis a predictor of mortality in severe pertussis infection? *Intensive Care Med.* 2000;26(10):1512–4.
<https://doi.org/10.1007/s001340000587>
 28. Advani A, Gustafsson L, Carlsson R-M, Donnelly D. Clinical outcome of pertussis in Sweden: association with pulsed-field gel electrophoresis profiles and serotype. *APMIS.* 2007;115(6):736–42.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_628.x
 29. Басов АА, Высочанская СО, Цвиркун ОВ и др. Критерии оценки эпидемиологической ситуации по коклюшу в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2024;23(1):4–13. Basov AA, Vysochanskaya SO, Tsvirkun OV, et al. Criteria for assessing the epidemiological situation of pertussis in Russian Federation. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2024;23(1):4–13 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-1-4-13>
 30. Chodorowska M, Kuklinska D. Restrykcyjna analiza DNA pałeczek *Bordetella pertussis* wyizolowanych od chorych na krztusiec w 1968 roku i w latach 1995–98 oraz szczepow *B. pertussis* stosowanych do produkcji krajowej szczepionki przeciwkrztuscowej. *Med Dośw Mikrobiol.* 2001;52(2):111–7 (In Polish).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.А. Алексеева** – формулирование цели работы, анализ и систематизация данных научной литературы, анализ и интерпретация результатов исследования, написание и редактирование текста рукописи; **Д.Н. Лепихова** – проведение экспериментов, сбор и анализ данных научной литературы, редактирование текста рукописи; **О.Ю. Борисова** – планирование исследования, сбор и анализ данных научной литературы, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование текста рукописи; **А.С. Пименова** – проведение экспериментов, анализ и интерпретация результатов исследования; редактирование текста рукописи; **И.Ю. Андриевская, И.В. Ибрагимхалилова** – проведение экспериментов, сбор и анализ данных научной литературы, работа с иллюстративным материалом.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол № 13 от 11.08.2025).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.A. Alekseeva** formulated research goals and objectives, analysed and systematised scientific literature data, analysed and interpreted research results, drafted and edited the manuscript text. **D.N. Lepikhova** conducted experimental research, collected and analysed scientific literature data, and edited the manuscript. **O.Yu. Borisova** planned the research, generalised experimental data, analysed and interpreted the results, analysed and generalised scientific literature data, and edited the manuscript. **A.S. Pimenova** conducted experiments, analysed and interpreted research results, and edited the manuscript. **I.Yu. Andrievskaya, I.V. Ibragimkhalilova** conducted experiments, collected and analysed scientific literature data, and worked with graphic material.

Ethics approval. Local Ethics committee of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products approved the study under Meeting minutes No. 13 of 11 August 2025.

Об авторах / Authors

Алексеева Ирина Андреевна, д-р мед. наук / **Irina A. Alekseeva**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5586-2933>

Лепихова Дарья Николаевна / **Darya N. Lepikhova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-4061-8892>

Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, проф. / **Olga Yu. Borisova**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>

Пименова Алена Сергеевна, канд. мед. наук / **Alena S. Pimenova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>

Андриевская Ирина Юрьевна / **Irina Yu. Andrievskaya**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2997-942X>

Ибрагимхалилова Ильхамья Вейсаловна, канд. биол. наук / **Ilkhamya V. Ibragimkhalilova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-8002-2407>

Поступила 11.07.2025

После доработки 17.09.2025

Принята к публикации 12.12.2025

Received 11 July 2025

Revised 17 September 2025

Accepted 12 December 2025