

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**Харківський національний медичний університет**

# ***ГЕМОФІЛЬНІ БАКТЕРІЇ***

***Методичні вказівки для студентів II–III курсів  
спеціальності "Медицина", "Стоматологія"  
освітньо-кваліфікаційного рівня "Магістр"***

Затверджено  
вченою радою ХНМУ.  
Протокол № 2 від 21.02.2019.

**Харків**  
**ХНМУ**  
**2019**

Гемофільні бактерії : метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія" для студентів II–III курсів за спеціальністю "Медицина", "Стоматологія" освітньо-кваліфікаційного рівня "Магістр" / упоряд. Т. М. Замазій, Н. І. Коваленко. – Харків : ХНМУ, 2019. – 40 с.

Упорядники Т. М. Замазій  
Н. І. Коваленко

**Тема:** Лабораторна діагностика гемофільної інфекції.

**Кількість годин:** 1.

**Обґрунтування теми**

У групу гемофільних бактерій об'єднані грамнегативні бактерії, які здатні рости тільки на збагачених поживних середовищах, які містять цілісну або лізовану кров або її похідні як фактори росту. У назві роду *Haemophilus* відображена залежність цих бактерій від крові при рості на штучних поживних середовищах. Багато мікроорганізмів цього роду в нормі мешкають на слизових оболонках дихальних шляхів людини.

До теперішнього часу відомо 9 видів гемофілів, що викликають інфекції у людини (*табл. 1*).

**Таблиця 1**

**Види роду *Haemophilus*, виділені у людини і тварин**

Виділені види	
у людини	у тварин
<i>H. influenzae</i>	<i>H. paragallinarum</i> (домашня птиця)
<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. haemoglobinophilus</i> (собаки)
<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. felis</i> (кішки)
<i>H. parahaemolyticus</i>	<i>H. parasuis</i> (свині)
<i>H. aphrophilus</i>	<i>H. paracuniculus</i> (кролі)
<i>H. paraphrophilus</i>	
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	
<i>H. ducreyi</i>	
<i>H. segnis</i>	

Найбільш важливими патогенами для людини є *H. influenzae*, переважно типу b, яка обумовлює інфекції з респіраторним механізмом ураження, а також збудник м'якого шанкру *H. ducreyi*.

*H. influenzae* вперше була ідентифікована як патоген Р. Кохом (R. Koch) у 1883 р., який описував грамнегативні дрібні палички у гної від хворих на кон'юнктивіт. У 1892 р. Р. Пфейффер (R. Pfeiffer) виділив *H. influenzae* у чистих культурах з мокротиння хворих на грип (*influenza*). Незважаючи на те, що пізніше була встановлена вірусна етіологія грипу, за бактеріями збереглася початкова видова назва.

Щорічно у світі реєструється близько 3 млн випадків гемофільної інфекції, з них близько 400–500 тис. закінчується летальним результатом. Гемофільна інфекція характеризується важким перебігом і високою летальністю серед дітей раннього віку (до 60 %) у країнах, що розвиваються, частотою неврологічних ускладнень до 25–35 %. Частота захворювань цієї етіології у дітей до 5 років в різних країнах сягає показників від 25,5 до 130,0 на 100 000 дітей. Економічні збитки внаслідок витрат на лікування одного хворого досягають 22–56 тис. доларів США.

Гемофільна інфекція (НіВ-інфекція), що викликається *Haemophilus influenzae* типу b (НіВ), є однією з найважливіших причин захворюваності і смертності серед хвороб, які можуть управлятися засобами імунoproфілактики. Результати вивчення НіВ-інфекції у багатьох країнах і на різних континентах показали, що ця інфекція є актуальною проблемою охорони здоров'я майже повсюдно. У даний час накопичилося достатньо даних, які свідчать про те, що НіВ-інфекція має широке розповсюдження і обумовлює високий рівень ряду актуальних захворювань, серед яких найбільш частими є менінгіт, сепсис, епіглотит і пневмонія.

Особливу проблему становить зростаюча частота антибіотикорезистентності *H. influenzae*. Гемофільна паличка типу b є одним із лідерів серед бактерій за стійкістю навіть до сучасних антибіотиків. Етіотропна терапія НіВ-менінгіту часто не ефективна і пов'язана зі зменшенням чутливості гемофільної палички до 50–60 % відомим і новим антибіотиків. Різноманітність клінічних форм, з одного боку, і зростаюча резистентність до антибіотиків, з іншого, роблять дуже складною проблему діагностики і лікування цієї інфекції.

Актуальність проблеми визначається ще й широким розповсюдженням бактеріоносійства *H. influenzae* типу b до 11,3–20,8 % серед дітей у віці до 5 років.

В умовах, що склалися, надійним методом захисту дітей від НіВ-інфекції є специфічна імунoproфілактика. Кількість держав-членів ВООЗ, що використовують вакцину проти гемофільної інфекції в рамках їх рутинних розширених програм імунізації, зростає, але до сих пір існує проблема збільшення рівня охоплення імунізацією у країнах, що використовують вакцини у даний час, і впровадження вакцини у країнах, де ще не виконується програма імунізації.

#### **Мета:**

- загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою хвороб, спричинених гемофільними бактеріями;

- конкретна:

- а) знати:

- правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

- б) вміти:

1. Підготувати робоче місце.
2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.

3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на інфекцію, обумовлену гемофільними бактеріями.

4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на гемофільну інфекцію.

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення гемофільних бактерій.

6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

**Матеріальне та методичне забезпечення теми:** музейні мікропрепарати, бланки направлень, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

### Зміст заняття

**Морфологічні та тинкторіальні властивості.** Гемофіли – це дрібні грамнегативні сферичні ( $1 \times 0,3$  мкм), овоїдні або паличкоподібні бактерії, іноді утворюють пари, короткі ланцюжки або нитки (рис. 1). Ця властивість мікроорганізмів називається плеоморфізмом. Морфологія цих бактерій залежить від віку чистої культури або типу поживного середовища. Гемофільні бактерії нерухомі, спор не утворюють, мають пілі (фімбрії).

Утворення капсули є непостійною ознакою. Наявність капсули має велике клінічне значення, оскільки вона є основним чинником вірулентності. Більшість інвазивних інфекцій викликається штамми *H. influenzae* типу b (Hib). Капсула Hib складається з полірибозилрибітолфосфату (ПРФ), тобто містить як мономер пентозу (рибозу) на відміну від інших типів, що містять гексози, що, ймовірно, і визначає більш високу вірулентність. Безкапсульні штами позначаються як такі, що не типуються.



Рис. 1. Морфологія *H. influenzae*

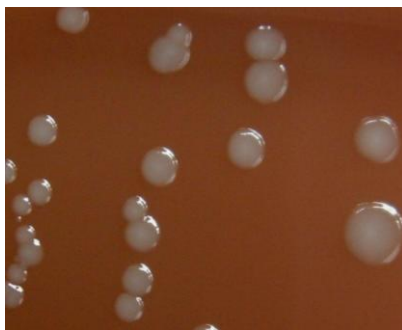
**Культуральні властивості.** Гемофільні бактерії є факультативними анаеробами, однак краще ростуть в аеробних умовах. Практично всі види потребують готові фактори росту, які є в крові (звідси назва роду "Haemophilus" – "люблячі кров"): термостабільний Х-фактор (протопорфірин ІХ у складі гематину або геміну), а також термолабільний V-фактор (нікотинамідаденіндинуклеотид – НАД). Це пов'язано з тим, що гемофіли не здатні синтезувати гем, який входить до складу ферментів дихального ланцюга, та/або НАД, який є кофактором окисно-відновних ферментів. Од-

нак у нативній баранячій і людській крові знаходяться ферменти (НАДазі), що руйнують V фактор. Тому V-залежні види гемофілів погано або зовсім не ростуть на кров'яному агарі (КА), приготованому на основі баранячої або людської крові. Потреба бактерій у факторах X і V є важливим критерієм для внутрішньовидової ідентифікації *H. influenzae* (рис. 2).

Для культивування гемофільних бактерій використовують шоколадний агар – поживне середовище коричневого кольору, яке отримують шляхом прогрівання кров'яного агару при 80 °С протягом 15 хв. Унаслідок прогрівання відбувається гемоліз і вивільнення із еритроцитів геміна і НАД. Оптимальна температура росту бактерій – 35–37 °С. Колонії з'являються через 36–48 год. Для *H. influenzae* характерна здатність до утворення R-, S-колоній. Слизові, більші (3–4 мм в діаметрі), райдужні S-форми колоній характерні для капсульних штамів (рис. 3). Слабко вірулентні безкапсульні варіанти гемофільних бактерій утворюють R-колонії – дрібніші (1 мм в діаметрі), дрібнозернисті, з нерівним краєм.



**Рис. 2.** Ріст *H. influenzae* у присутності X і V факторів



**Рис. 3.** Колонії *H. influenzae* на шоколадному агарі

Для гемофільних бактерій характерний "феномен кормушки" або «феномен сателіта» (рис. 4), який проявляється у їх здатності рости на кров'яному агарі навколо колоній стафілококів або інших бактерій, які продукують НАД або викликають  $\alpha$ -гемоліз. Для власне гемофільних паличок здатність викликати гемоліз не характерна. Таким чином, дрібні райдужні колонії гемофільних бактерій можуть бути виявлені на кров'яному агарі у зоні гемолізу, утвореній *S. aureus*.

Ідентифікація гемофільних паличок заснована на їх потребі до факторів росту та деяких біохімічних тестах.

**Ферментативні властивості.** Гемофільні бактерії – хемоорганотрофи. Утилізують глюкозу до кислоти, відновлюють нітрати до нітритів, інші вуглеводи ферментують погано. *H. influenzae* має 8 біоварів залежно від їх здатності продукувати індол, уреазу, орнітин декарбоксилазу. Крім

того, вид *H. influenzae* містить біовар aegyptius. Каталазна та оксидазна активність у різних видів гемофільних бактерій – варіабельна ознака.

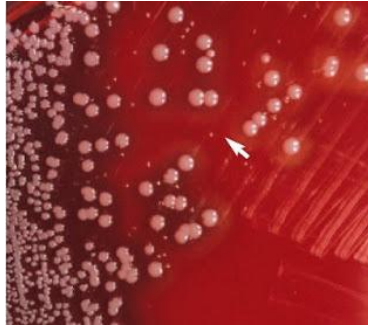


Рис. 4. "Феномен сателіта"

**Антигенні властивості.** *H. influenzae* має соматичний О-антиген і капсульний полісахаридний К-антиген. Розрізняють 6 серотипів *H. influenzae* (a, b, c, d, e, f) залежно від особливостей будови капсульного антигену. Серотипування виділених капсульних штамів проводять на основі сироваток до певних типів. Безкапсульні штами позначають як ті, що не типуються, і для їхньої характеристики використовують біотипування, запропоноване М. Kilian.

**Фактори патогенності.** Основним фактором вірулентності *H. influenzae* є капсула, яка захищає бактерії від фагоцитозу, забезпечує виживання бактерій в організмі та сприяє розповсюдженню інфекції.

Капсульовані штами *H. influenzae* підрозділяються на 6 серотипів залежно від антигенних властивостей капсули: a, b, c, d, e, f. Наявність капсули має велике клінічне значення, оскільки вона є основним чинником вірулентності. Продукція протективних специфічних антитіл при інфекційному процесі, носійстві або вакцинації відбувається саме проти антигенів полісахаридної оболонки. Більшість інвазивних інфекцій викликається штамми *H. influenzae* типу b (Hib). Капсула Hib складається з полірибозилрибітолфосфату (PRP), що визначає більш високу вірулентність мікроорганізму порівняно з іншими капсульними типами, оскільки захищає мікроорганізм від фагоцитозу, опсонізації і комплемент-опосередкованого лізису.

З серотипом "b" (Hib) пов'язують розвиток важких форм хвороби, що обґрунтовує виділення деякими авторами самостійного варіанту (автономного) "Hib-інфекції". Серотип Hib від інших збудників відрізняється 8 генами, які контролюють утворення фімбрій, що забезпечують посилення адгезії на слизових оболонках і одночасно реалізацію пенетраційних властивостей мікроба, чим пояснюється здатність його проникати у кровоносне русло, викликаючи септичний варіант патології.

Гемофільні палички можуть продукувати IgA-протеазу, здатну інактивувати секреторні антитіла. Пілі й IgA-протеази збудника належить провідна роль у прикріпленні мікроорганізмів до епітелію респіраторного тракту та його колонізації.

ЛПС зовнішньої мембрани відіграють роль ендотоксину, беручи участь також у процесах адгезії та інвазії гемофільної палички. Ендотоксин може також викликати параліч вій миготливого епітелію респіраторного тракту людини та сприяє мікробній колонізації верхніх дихальних шляхів.

**Резистентність.** Бактерії малостійкі у навколишньому середовищі: швидко гинуть, знаходячись поза організмом людини. Гемофіли досить чутливі до нагрівання і звичайних дезінфікуючих засобів. У *H. influenzae* виявлена здатність до продукції β-лактамаз, що обумовлює їх високу стійкість до деяких β-лактамних антибіотиків.

**Епідеміологія.** *H. influenzae* патогенна тільки для людини.

Джерело гемофільної інфекції – людина, хвора або носій. Безкапсульні маловірулентні штами здатні у нормі колонізувати слизові оболонки верхніх дихальних шляхів здорових дітей (близько 60–90 %) та дорослих (близько 35 %), штами *H. influenzae* типу b, що мають капсулу, виділяються з носоглотки у 2 % безсимптомних носіїв. Тривалість носійства вельми варіабельна – від кількох днів до місяців, часто відрізняється стійкістю, незважаючи на використання різних антибіотиків, і не залежить від рівня гуморального імунітету. Відзначено взаємозв'язок частоти носійства від скупченості у дитячих колективах, від періоду і процесу переформування груп у дитячих колективах.

Штами *H. Influenzae*, що не типуються, часто колонізують нижні дихальні шляхи (НДП) у пацієнтів, які страждають на хронічні обструктивні захворювання легенів і муковісцидоз.

Колонізація слизових оболонок штамами, що не типуються, являє динамічний процес, у якому "нові" штами періодично заміняють "старі". Діти, у яких виявляються штами *H. Influenzae*, що не типуються, на першому році життя, мають більш високий ризик розвитку гострого середнього отиту. Існує прямий зв'язок між колонізацією такими штамами і кількістю епізодів середнього отиту.

Провідний механізм ураження гемофільною інфекцією – респіраторний, шлях передачі – повітряно-крапельний (при кашлі, розмові, чиханні). Можливе ураження при контакті з інфікованим матеріалом, як від безсимптомних носіїв, так і від хворих. Однак у дітей першого року життя має місце і контактний механізм. Найбільш сприйнятливий вік – від декількох місяців до року, хоча найвищий рівень ураження – від 6 міс до одного року. Виникнення інфекції можливо і у більш старших дітей (до 5 років), і навіть у дорослих, коли гемофільна інфекція розвивається на несприятливому фоні (важка вроджена патологія, онкопатологія, імунодефіцити різного генезу, неєвропейські контингенти та ін.).



Контагіозність збудника невелика, у зв'язку з чим захворювання не носить епідемічного характеру. Бактерії локалізуються на слизовій носоглотки, і більшість носіїв не мають жодних клінічних проявів та можуть поширювати інфекцію повітряно-крапельним шляхом. Тільки у незначній кількості осіб, які контактували зі збудником, у подальшому розвиваються клінічні прояви хвороби. Саме носії є важливим джерелом поширення збудника.

*H. influenzae* викликає велику кількість різних інфекцій, у тому числі тих, що загрожують життю пацієнтів. У цілому всі інфекції, зумовлені гемофільною паличкою, можна поділити на 2 типи: інвазивні та неінвазивні (табл. 2).

При "інвазивних" формах інфекції, спричинених Hib, збудник виявляється у рідинах і тканинах організму, стерильних у нормальних умовах (кров, спинномозкова, перитонеальна і плевральна рідини тощо). До "неінвазивних" форм відноситься небактерійна "пневмонія" (за відсутності збудника у крові), гострий середній отит, кон'юнктивіт та ін.

**Таблиця 2**

**Інфекційні захворювання, спричинені *H. influenzae***

Інфекції	Вікова група	Штами
Інвазивні: менінгіт епіглотит пневмонія септичний артрит остеомиєліт целюліт бактеріємія	90 % – діти до 4 років; 10 % – діти старшого віку і дорослі	90 % – тип b; 10 % – ті, що не типуються; 1 % – типи e і f
Сепсис	Новонароджені, породіллі	> 90 % – ті, що не типуються
Неінвазивні: середній отит синусит кон'юнктивіт загострення хронічного бронхіту	Діти і дорослі	> 90 % – ті, що не типуються

Неінвазивні інфекції виникають у процесі поширення мікроорганізмів по слизовій оболонці дихальних шляхів. Гострий синусит, гострий середній отит і загострення хронічного бронхіту, як правило, є ускладненнями вірусних інфекцій, які знижують місцевий імунітет і порушують мукоциліарний кліренс.

Більшість неінвазивних інфекцій викликається штамми, що не типуються, для яких наявність протеїну P2 зовнішньої мембрани є основним фактором вірулентності. У патогенезі пневмонії важливу роль відіграють протеаза, що руйнує IgA1, і ціліютоксин.

Інвазивні інфекції, особливо менінгіт та епіглотит, переважно викликаються штамми Hib і мають гематогенне походження. Капсула типу b, що складається з ПРФ, є найбільш важливим фактором вірулентності,

оскільки захищає мікроорганізм від фагоцитозу, опсонізації і комплементосередкованого лізису. Низька частота розвитку інвазивних інфекцій у дітей перших двох місяців життя обумовлена наявністю материнських антитіл до ПРФ. Із ростом популяції людей, що володіють антитілами до ПРФ, зменшується і частота інвазивних інфекцій.

Найбільш частими формами гемофільної інфекції є ГРЗ, включаючи запалення легенів, бронхіт і менінгіт. Інші форми – гнійний целюліт (запалення жирової клітковини) обличчя, епіглотит (запалення надгортанника), артрит (запалення суглобів) і сепсис зустрічаються рідше.

Гемофільна інфекція є причиною від 35 до 50 % усіх гнійних бактеріальних менінгітів у дітей у віці до 5 років. Інфекція погано піддається лікуванню, оскільки гемофільна паличка рекордно стійка до антибіотиків. З цієї причини навіть своєчасне лікування сучасними антибіотиками часто виявляється безрезультатним.

Найбільш схильні до гемофільної інфекції діти віком від 2 міс до 6 років. Однак менінгіти та септицемії, обумовлені *H. influenzae* типу b, частіше зустрічаються серед дітей від 6 міс до 2 років. Пневмонії, синусити та інші інфекції дихальних шляхів можуть бути і серед людей похилого віку, пацієнтів з хронічною легеневою патологією, зі зниженим імунітетом, а також у тих, що курять.

**Патогенез і клінічна картина.** *H. influenzae* проникає в організм через слизову носоглотки. Значною мірою цьому сприяє повторний (багаторазовий) контакт із активним джерелом інфекції, що особливо характерно для дітей перших двох років життя. Як правило, таке проникнення в організм призводить до персистенції збудника, який на слизовій оболонці повинен розмножитися до повноцінної "інфектдозы". Потім процес переходить у маніфестну форму. Особливо обтяжуючу роль, що забезпечує цей процес, відіграє супутня інфекція (часто вірусна) й імунодефіцитні стани різного генезу.

Мають також значення інвазивні властивості збудника, що особливо характерно для "Hib". Все це в сукупності забезпечує збудників можливістю подолання захисних механізмів і потрапляння мікроорганізму в кров. Якщо звичайні, менш інвазивні серовари в основному викликають локалізовані прояви (синусити, отити, бронхіти, пневмонії, целюліт тощо), то "Hib", проникаючи в кров, призводить до генералізації інфекції з розвитком сепсису, менінгіту, артритів. Подолавши гематоенцефалічний бар'єр, збудник проникає у субарахноїдальний простір і розмножується в оболонках мозку і судинах речовини мозку, викликаючи підвищення внутрішньочерепного тиску, порушення кровообігу, гіпоксію і, врешті-решт, формування вогнищ запалення у ЦНС.

У патогенезі інфекції відзначені деякі особливості формування специфічного імунітету. У зв'язку з вираженою здатністю Hib пригнічувати

фагоцитоз, відбувається гальмування формування гуморального імунітету через слабку відповідь Т-хелперів. Гальмується і формування місцевого імунітету, зважаючи на малу продукції IgA. Така слабка імунна реакція на інфекцію зберігається і надалі, що відбивається у малій виразності бустер-ефекту в наростанні антитіл на повторну інвазію збудника. Досить складний механізм активізації комплементу при гемофільній інфекції як через антиген-вплив (альтернативний шлях), так і через антитіло-вплив (класичний варіант). Крім того, відомо, що капсульні гемофільні збудники здатні виділяти протеазоподібні ферменти, які руйнують антитіла, що ще більше посилює неповноцінність гуморального імунітету.

Безкапсульні варіанти гемофільних бактерій часто залишаються у вхідних воротах інфекції, не викликаючи симптомів захворювання (безсимптомне носійство). У людей зі зниженим імунітетом вони здатні проникати у підслизовий шар та за допомогою ендотоксину викликати місцеві гнійно-запальні захворювання – середні отити (ураження середнього вуха), синусити (запалення додаткових пазух носа), ларинготрехеїти, бронхіти, пневмонії.

Найважчою з "інвазивних" форм гемофільної інфекції і при цьому найбільш дослідженою формою інфекції є гнійний бактеріальний менінгіт. Виявлення та діагностика інших форм інфекції гемофільної природи вкрай ускладнені. Екологічною нішею для *Nib* у макроорганізмі служить слизова оболонка носоглотки. Встановлено, що з вхідних воріт інфекції збудник здатний поширюватися лімфо- і гематогенним шляхами в інші органи і тканини. Саме високою здатністю до інвазії можна пояснити надзвичайно різноманітні за локалізацією та характером ускладнення, що виникають навіть при гострих респіраторних інфекціях гемофільної етіології, які реєструються у 54,9 % хворих.

За даними всесвітньої статистики, гемофільна інфекція займає одне з перших місць серед причин дитячої смертності.

Інкубаційний період при цій інфекції встановити важко через особливості інфікування і перехід від фази персистування у клінічну (інвазивну) форму. Адгезія мікроба на слизовій оболонці, подолання місцевого імунітету і фагоцитозу призводять до локальних форм хвороби (синусити, отити, бронхіти, пневмонії, целюліт). Із проникненням у кров формуються варіанти хвороби, що відображають генералізацію інфекції: сепсис, менінгіт, артрити. Можна сперечатися щодо належності пневмонії і целюліту до локальних форм, оскільки при них можлива генералізація інфекції, та й нерідко вони спостерігаються у поєднанні з іншими варіантами, що відображають поліорганистність, яка вважається особливістю сепсису. Серед усіх форм у порядку їх тяжкості і частоти реєстрації на перше місце необхідно віднести гнійний менінгіт, потім пневмонію, септицемію, целюліт, епіглотит, артрити, перикардит і згадані раніше місцеві ураження: синусити, отит.

*Менінгіт.* За даними ВООЗ, менінгіт складає близько 50 % (від 12 до 73 %) серед усіх випадків інвазивних форм гемофільної інфекції типу b. Захворюваність на менінгіт має спорадичний характер, не відрізняється сезонними або циклічними підйомами і не має спалахів. До впровадження масової вакцинації захворюваність на менінгіт гемофільної етіології становила у середньому 18 випадків (від 2 до 60) на 100 тис. дітей у віці до 5 років на рік. Навіть при своєчасній діагностиці і правильному лікуванні смертність від гемофільного менінгіту становить близько 5 %. Найбільший тягар менінгітів, обумовлених гемофільною паличкою типу b, несуть діти вікової групи від 4 до 18 міс життя, а також люди похилого віку старше 65 років. Діти віком до 3 міс і старше 6 років на це захворювання страждають рідко. У вихрих у віці старше 10 років частіше за все виявляються обтяжливі чинники: анатомічні (травми черепа, назальна лікворея, *spina bifida* та ін.) або імунологічні (дефіцити компонентів системи комплементу та інші види імунодефіцитів). У 15–30 % перехворілих зберігаються стійкі залишкові явища у вигляді нейросенсорної приглухуватості, розлади мови, розумової відсталості, затримки розвитку.

Захворювання характеризується як гострим, так і поступовим розвитком, і починається з помірних явищ ураження носоглотки, супроводжується головним болем, підвищенням температури і появою менінгеальних знаків із частим судорожним синдромом, а в подальшому і вогнищевими проявами (III, VI, VII пари черепно-мозкових нервів). Слід особливо відзначити принципову можливість поєднання різних варіантів гемофільної патології. Так, менінгіт часто поєднується з пневмоніями, артритами, розладом шлунково-кишкового тракту у вигляді помірної діареї.

Інтоксикація найбільш виражена на тлі гіпертермії, часто супроводжується блюванням. У деяких випадках, коли менінгіт розвивається на тлі пневмонії, бронхіту, отиту, менінгеальна симптоматика розвивається інтенсивно, проте інтоксикація наростає повільно. Захворювання при пізній діагностиці і наявності фонової патології (вроджені хвороби, онкопатологія, імунодефіцит) дає найвищі показники летальності – до 10–15 %.

У тих випадках, коли менінгіт розвивається як прояв загальної септицемії, часто виникає інфекційно-токсичний шок з наявністю, як правило, геморагічного висипу, що вкрай ускладнює верифікацію патології.

При люмбальній пункції рідина каламутна, іноді з зеленуватим відтінком при відносно невисокому тиску, а нерідко витікає краплями, що говорить про переважання важкого запалення на тлі слабкої ліквородукції. Реєструється навіть гіпотензія у субарахноїдальному просторі. Серед важких наслідків перенесеного менінгіту потрібно відзначити: зниження слуху, іноді до глухоти, зниження зору, формування гіпертензійного синдрому з результатом у гідроцефалію, тетра- і гемінерези, можливу декортикацію.

Особливістю гемофільного менінгіту є млявий, торпідний або хвилеподібний перебіг з повільною санацією ліквору, що завершується інвалідизуючими наслідками.

Рідше зустрічається *гемофільний сепсис*. Найбільш вразливим контингентом вважаються діти другого півріччя. Захворювання розвивається на тлі важкої вродженої патології, при первинному і вторинному імунodefіцитах. Результат несприятливий внаслідок фонової патології.

*Гемофільна пневмонія* – друга за частотою клінічна форма. За варіантами вона може бути осередковою або частковою, при цьому дуже часто (2/3 випадків) поєднується з плевритом, перикардитом, іноді з менінгітом. Перебіг пневмоній затяжний з тривалим збереженням фізикальних даних.

У документах ВООЗ наголошується, що в середньому на 1 випадок менінгіту, викликаного *Hib*, у дітей у віці до 5 років припадає 5–10 випадків гострої пневмонії зазначеної етіології. У Європі захворюваність на гемофільну пневмонію до початку введення вакцинації становила у середньому 150–300 випадків на 100 тис. дітей до 5-річного віку на рік, тобто у 10–20 разів більше, ніж захворюваність на менінгіт: на частку цього збудника припала майже третина бактеріальних пневмоній. Можна відзначити тяжкість перебігу і значну кількість ускладнень при пневмоніях гемофільної етіології (у 58,3 % хворих) у вигляді перикардиту, менінгіту та емпієми плеври, що потребує плевректомії, причому найбільша кількість хворих спостерігалася у віці 2–8 років.

*Епіглотит*. Гостре запалення надгортанника і гортані з обструкцією дихальних шляхів – одна з найважчих інфекцій, викликаних *Hib*. Іноді він може виникати при септицемії. Як правило, підвищення температури гостре, відзначаються виражена інтоксикація і швидко прогресуючі явища крупа з асфіксією.

На епіглотит частіше хворіють діти 2–7 років життя. Смертність складає 5–10 %, причиною смерті завжди є вчасно не усунена обструкція дихальних шляхів.

*Артрит і остеомієліт*. У довакцинальній епісї гемофільна паличка типу *b* була провідним збудником гнійного артрити у дітей молодше 2 років. Всього ж на гнійний артрит припадає близько 8 % інвазивних інфекцій, викликаних цим мікроорганізмом. Гнійний артрит часто поєднується з менінгітом.

*Флегмона*. Найчастішою локалізацією флегмони, обумовленої гемофільною інфекцією типу *b*, є голова і шия. Більшість випадків припадає на перші 2 роки життя.

*Прихована бактеріємія*. У більшості дітей з бактеріємією, спричиноюю *Hib*, вогнища інфекції виявити не вдається і єдиним початковим проявом хвороби служить лихоманка. Така ситуація зазвичай зустрічається у дітей молодше 2 років. До введення специфічної вакцинації гемофільна паличка типу *b* була другою за частотою причиною прихованої бактеріємії,

поступаючись тільки *S. pneumoniae*. Бактеріємія, викликана Hib, у 30–80 % випадків ускладнюється вторинними вогнищами інфекції, включаючи менінгіт.

*Перикардит.* Класичними проявами Hib перикардиту є інтоксикація, лихоманка і дихальна недостатність у дитини за відсутності змін у легенях. Перикардит нерідко супроводжує пневмонію і менінгіт. Іноді ураження перикарда розвивається на тлі антибактеріальної терапії.

*Інфекції новонароджених.* В останні роки у новонароджених почастішали випадки бактеріємії і менінгіту гемофільної етіології. Інфекція проявляється раннім сепсисом – більш ніж у 80 % дітей він розвивається на першому тижні життя. Не виключено внутрішньоутробне зараження майбутньої дитини, оскільки цю форму інфекційної патології часто супроводжує недоношеність, мала вага при народженні, а також ускладнення у матері (передчасне відходження навколоплідних вод, хоріоамніоніт).

*Інші інвазивні інфекції.* У рідкісних випадках бактеріємія призводить до появи таких вторинних вогнищ інфекції, як ендодальміт, глосит, увулїт, тиреоїдит, ендокардит, абсцес легенів, епідидимїт, перитонїт, абсцес черевної порожнини, ураження печінки і жовчних шляхів, абсцес головного мозку.

*Діагноз і диференційний діагноз.* Гемофільна патологія характеризується спорадичністю, хоча деякі дослідники вважають за можливе активізацію її у зимовий час. Відсутність різко виражених епідемічних підйомів ускладнює діагностику. При верифікації особливо важких форм потрібно пам'ятати про те, що при важкій фоновій патології у дітей (рідко у дорослих) гемофільна інфекція по суті маніфестує ущербність імунного статусу хворих.

До етіологічної розшифровки гемофільної інфекції потрібно визнати найбільш важливим для верифікації діагнозу факт контакту з хворим із встановленим діагнозом цього захворювання, розвиток найбільш частой форми – менінгіту на тлі отиту, синуситу, бронхіту, прогресуючий, часто хвилеподібний перебіг інфекції, тривале збереження менінгеальних знаків з ознаками ураження черепно-мозкових нервів, повільна санація ліквору. Ці особливості неспецифічні, однак чим частіше вони виявляються, тим більше вони повинні насторожувати клініциста, тим більше, якщо крім зазначених вище "малих" форм розвивається пневмонія, септицемія. Важливе значення має і "схильність" гемофільної інфекції до фоновій патології й імунодефіцитів різного генезу.

У крові при цій інфекції відзначається лейкоцитоз, нейтрофіліоз і зрушення вліво у формулі. Однак зустрічається форма й індивідуальної картини крові. Плеоцитоз (підвищений вміст клітинних елементів у цереброспінальній рідині) у лікворі коливається від 300 до 900 у 1 мкл, характер його нейтрофільний, іноді змішаний склад або навіть із переважанням лімфоцитів, що пояснюється рано розпочатою антибактеріальною терапією до проведення дослідження.

**Імунітет.** Протягом перших 3–6 міс життя діти захищені від інфекції материнськими IgG, тому в цьому віці захворювання зустрічаються дуже рідко. Частіше хворіють діти від 6 місяців до 2 років. Відомо, що до 5–6 років у сироватці крові багатьох дітей, навіть у неімунізованих і неперехворілих, є природні набуті протективні антитіла проти капсульного антигену *H. influenzae* типу b.

**Мікробіологічна діагностика.** Для підтвердження етіології захворювання і визначення чутливості виділеного збудника до антимікробних препаратів обов'язковим є мікробіологічне дослідження.

У зв'язку з тим, що гемофільна паличка викликає широкий спектр інфекцій, для мікробіологічного дослідження може направлятися різний клінічний матеріал. Найбільшу діагностичну цінність мають дослідження стерильних у нормі біологічних рідин: крові, плевральної, перикардіальної, синовіальної і спинномозкової рідини (СМР).

Основною умовою для доказу етіологічної ролі *H. influenzae* у розвитку інфекції НДШ є попередження контамінації клінічного матеріалу мікрофлорою ВДШ. Для цього бажано використовувати методики, що дозволяють уникати контакту з мікрофлорою ВДШ (bronхоальвеолярний лаваж, бронхоскопія із "захищеними" щітками).

Взяття матеріалу у пацієнтів з епіглотитом (мазок з надгортанника) має обмежену діагностичну значимість і може становити велику загрозу для життя пацієнта (ризик розвитку ларингоспазму). Тому це дослідження має проводитися тільки за наявності умов для надання екстреної допомоги по збереженню прохідності дихальних шляхів.

Недоцільне мікробіологічне дослідження назофарингеальних мазків. Навіть позитивні культури мають сумнівну діагностичну цінність у зв'язку з високою частотою носійства гемофільної палички здоровими дітьми і дорослими.

У зв'язку з тим, що гемофільна паличка відрізняється низькою життєздатністю у зовнішньому середовищі, рекомендується використовувати транспортні середовища і негайно (не пізніше 2 год) доставляти матеріал у клінічну лабораторію.

Мікроскопічне дослідження малоінформативне, однак його застосовують при гнійному менінгіті (мазки з цереброспінальної рідини, забарвлені за Грамом).

Для прискореної діагностики і диференціації гемофільної палички від інших збудників менінгіту використовують серологічні тести з метою виявлення капсульного антигену. При високій концентрації збудника у досліджуваному матеріалі можлива також постановка "тесту набухання капсули".

Головним методом діагностики захворювань, викликаних Ніб, залишається культуральний – посів крові, спинномозкової рідини й іншого матеріалу, виділеного з вогнищ інфекції (суглобовий, перикардіальної рідини, гною). *Бактеріологічний* метод заснований на посіві на шоколадний,

кров'яний агар або на агар з серцево-мозковою витяжкою та інкубації протягом 24–48 год. Оскільки збудник дуже вимогливий до умов культивування, посів проводять відразу при отриманні матеріалу на адекватні середовища, що забезпечують ріст збудника. У біологічних рідинах (сироватці, сечі, синовіальній рідині, спинномозковій рідині) можна виявити капсульний полісахарид НіВ. Для цього найчастіше застосовують такі методи: РІФ, зустрічний імуоелектрофорез, латекс-аглоутинацію і реакцію коагулінації зі стафілококовим протеїном А. Досліджують біохімічні властивості. Антигени бактерій виявляють за допомогою РП в агарі. *H. influenzae* диференціюють від інших близькоспоріднених грамнегативних паличок за їх потребою у X- та V-факторах росту, відсутності гемолізу на кров'яному агарі та інших тестах.

Оскільки класичні бактеріологічні методи (посів зразків) навіть в умовах ідеального застосування здатні забезпечити етіологічну розшифровку не більше 40–50 % випадків бактеріального менінгіту, необхідно їх доповнення некультуральними методами, за допомогою яких можна забезпечити розшифровку до 60–80 % (при застосуванні реакції латекс-аглоутинації) і до 80–90 % (при полімеразній ланцюговій реакції).

**Профілактика.** Єдиним надійним засобом специфічної профілактики захворювань, викликаних НіВ, є активна імунізація. Для створення штучного набутого активного імунітету проти *H. influenzae* типу b використовують субкорпускулярну вакцину, яка має очищений капсульний антиген. Однак зважаючи на низьку імуногенність цього препарату його призначають дітям старше 1,5 років. Використання вакцини не захищає від носійства гемофільних паличок.

На теперішній час застосовуються такі вакцини проти гемофільної інфекції:

1. Акт-ХІВ (кон'югована моновалентна вакцина, що містить капсульний полісахарид НіВ, кон'югований із білком правцевого анатоксину).

2. Хіберікс (моновалентна вакцина, що містить очищений капсульний полісахарид, виділений зі штаму *H. influenzae* типу b і кон'югований з правцевим анатоксином).

3. Комбіновані вакцини:

- а) пентаксим (дифтерійна, правцева, коклюшна, поліомієлітна і гемофільна вакцина, що містить анатоксин дифтерійний, анатоксин правцевий, анатоксин кашлюку, гемаглютинін філаментозний коклюшний, вірус поліомієліту 1-, 2-, 3-го типу інактивованій, капсульний полісахарид НіВ);

- в) інфанрікс Гекса (дифтерійна, правцева, коклюшна, поліомієлітна, гемофільна вакцини і вакцина проти гепатиту В, що містить анатоксин дифтерійний, анатоксин правцевий, анатоксин кашлюку, гемаглютинін філаментозний, НВ<sub>s</sub>-протеїн, який є основним поверхневим антигеном вірусу гепатиту В (НВ<sub>s</sub>Ag), поліомієліту вірус інактивованій 1-, 2-, 3-го типу, капсульний полісахарид НіВ).



Усі вакцини вводяться внутрішньом'язово у стегно або верхню частину плеча. Вакцини Акт-ХІВ або Хіберікс можуть вводитися одночасно з вакцинами АКДС, гепатиту В і поліомієлітною вакциною у різні частини тіла. Існує три схеми застосування ХІВ-вакцини залежно від віку, в якому починається курс щеплень. З огляду на високий рівень вікової захворюваності на гемофільну інфекцію типу b у перші роки життя, рекомендується вакцинувати всіх дітей, починаючи з 2–3 міс життя.

Пасивна імунізація за допомогою донорських сироваткових препаратів, які мають високі концентрації ІgМ, може бути призначена дітям зі слабкою імунною відповіддю на вакцину та з імунодефіцитом.

*Неспецифічна профілактика.* Госпіталізація хворого здійснюється за клінічними показаннями. Хворі з менінгітом або підозрою на менінгіт негайно госпіталізуються в інфекційну лікарню або спеціалізовані відділення і бокси. Хворі з пневмонією та іншими клінічними формами захворювання гемофільної етіології госпіталізуються залежно від тяжкості захворювання. Вони можуть лікуватися вдома, якщо у сім'ї або квартирі відсутні інші діти молодше 5 років, за умови регулярного медичного спостереження.

Здорові діти і дорослі, що були в контакті, не ізолюються і не розмежовуються. Хворі з легкими формами хвороби сануються і тільки потім допускаються у колектив. У дитячих установах (діти до 5 років), де були зареєстровані випадки гемофільної інфекції, контактні здорові діти протягом 10 днів не переводяться в інші групи, так само як і відсутні на момент контакту протягом цього терміну не приймаються у колектив. Хіміопрфілактика інфекції не знайшла поширення.

*Лікування.* Антибактеріальна терапія. Препарати вибору: цефалоспорини III покоління (цефтріаксон, цефотаксим), β-лактамі антибіотики з інгібіторами β-лактамази.

В антибактеріальній терапії зберігає свої позиції ампіцилін у добовій дозі 200–400 мг/кг/добу дітям і 6 г/добу дорослим. При торпідному перебігу клінічний досвід говорить про ефективність його поєднання з левоміцетином сукцинатом по 100 мл/кг/добу і 4 г/добу дорослим внутрішньовенно через 6 год.

Є дані про доцільність використання фторхінолонів (ципрофлоксацин), амоксициклава. Останні роки дещо знизилася використання ко-тримоксазолу (бісептол) через досить високу стійкість до нього збудника (до 40 %). У лікуванні "місцевих" форм використовуються еритроміцин, сумамед тощо.

### ***Практичні навички з теми.***

1. Визначення морфотинкторіальних і культуральних властивостей гемофільних бактерій.

### ***Алгоритми лабораторної роботи***

**Алгоритм "Схема мікробіологічного дослідження".**

Перший день

• Первинний посів клінічного матеріалу на шоколадний агар, КА, двофазне середовище.

- Пряма мікроскопія забарвленого мазка.
- При необхідності (у СМР) визначення Ніб-антигену в ЛА.

Другий день

• Відбір підозрілих колоній, їх вивчення і пересів на чашку Петрі з шоколадним агаром. Посів проводять методом сектору.

- Мікроскопія забарвленого мазка.

Третій день

- Визначення каталазної активності.
- Визначення цитохромсидазної активності.
- Посів на чашку Петрі для визначення потреб у Х- і V-факторах.
- Визначення β-галактозидазної активності (попередній аналіз).
- Посів для визначення чутливості до ампіциліну і β-лактамази

(з нітроцефіном).

Четвертий день

- Аналіз потреб у Х- і V-факторах.
- Аналіз β-галактозидазної активності.
- Відповідь про наявність *H. influenzae*.
- Визначення чутливості до ампіциліну і наявності β-лактамази.
- Постановка проби на індолоутворення.
- Визначення наявності уреаз.
- Визначення наявності орнітиндекарбоксілази.

П'ятий день

- Визначення біотипу *H. influenzae*.

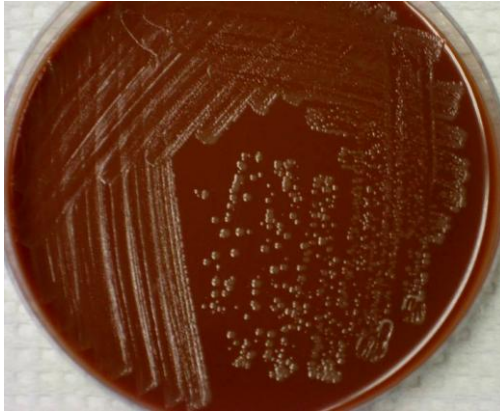
**Алгоритм** «Хід мікробіологічного дослідження матеріалу за підозри на гемофільну інфекцію».

*H. influenzae* відрізняється високою примхливістю при культивуванні на штучних поживних середовищах. Обов'язковою умовою для їх росту є наявність у середовищі Х і V факторів.

На КА, приготованому на основі кінської або кролячої крові, гемофільні палички можуть рости у вигляді дрібних точкових колоній. Виняток становить КА, що містить нативні баранячі або людські еритроцити, у зв'язку з присутністю в них ферментів, що інактивують V фактор. Тому КА не підходить для виділення *H. influenzae*.

Для поліпшення виділення *H. influenzae* з клінічного матеріалу рекомендується використовувати шоколадний агар або селективний агар для гемофілів.

*Шоколадний агар* (рис. 4) готується додаванням крові до збагаченої агарової основи, що має температуру близько 80 °С, для того щоб зруйнувати еритроцити і вивільнити Х і V фактори. При цьому слід уникати надмірного і/або тривалого нагрівання для попередження інактивації термолабільного V фактора. Для поліпшення ростових властивостей живильного середовища рекомендується в охолоджений до температури 45–50 °С шоколадний агар додавати НАД до отримання кінцевої концентрації 15 мкг/мл.



**Рис. 4.** Ріст *H. influenzae* на шоколадному агарі

Комерційні готові чашки з шоколадним агаром (bioMerieux, BBL) зазвичай містять суміш геміну (X фактор) і "коктейль" ростових факторів, доданих до основи – гонококового агару.

Гонококовий агар містить пептони, кукурудзяний крохмаль, моно- і діосновні фосфатні буфери, хлорид натрію й агар. Ростові фактори містять НАД (V фактор), вітаміни (B1, B12), цистеїн, глютамін і глюкозу.

Ряд компаній пропонує готові добавки, що містять перераховані ростові фактори: PolyVitex (bioMerieux), IsoVitalex (BBL) і Supplement B (Difco Laboratories).

Недоліком шоколадного агару є неможливість спостерігати гемолітичні властивості гемофілів, які дозволяють диференціювати *H. haemolyticus* і *H. parahaemolyticus* від *H. influenzae* і *H. parainfluenzae*.

*Селективний агар для виділення бактерій роду Haemophilus.* Для селективного виділення гемофілів з клінічного матеріалу НДП можуть бути використані поживні середовища, що містять бацитрацин. Висока концентрація цього антибіотика пригнічує ріст більшості інших мікроорганізмів, які є представниками мікрофлори дихальних шляхів (стафілококи, мікрококи і стрептококи), що дозволяє отримати ріст гемофільної палички з сильно контамінованого клінічного матеріалу. Крім готових комерційних середовищ, що містять антибіотик, у клінічних лабораторіях можливе приготування і використання шоколадного агару з бацитрацином у концентрації 300 мкг/мл.

Замість антибіотиквмісних середовищ при виділенні гемофільної палички з контамінованого матеріалу (наприклад, мокротиння) можуть бути використані комерційні диски з бацитрацином (10 ОД). Природно стійкі до бацитрацину гемофілії будуть рости навколо диска.

*Селективне середовище для виділення та диференціювання H. influenzae і H. parainfluenzae (Taylor D.C. та ін.).* Воно складається з гемін- і НАД-збагаченого серцево-мозкового агару, сахарози (10 мг/мл), індикатора – фенолового червоного (100 мкг/мл) і бацитрацину (300 мкг/мл). На цьому середовищі колонії *H. parainfluenzae* мають жовте забарвлення у зв'язку з їх здатністю продукувати кислоту із сахарози, а колонії *H. influenzae* – безбарвні, тому що не ферментують сахарозу. Недолік даного середовища полягає у неможливості спостерігати гемолітичні властивості гемофілів.

*Умови інкубації H. influenzae.* Оптимальними умовами інкубації *H. influenzae* є волога атмосфера з підвищеним вмістом CO<sub>2</sub> (5–10 %) і температура 35–37 °С. Подібні умови можуть бути створені у CO<sub>2</sub>-термостаті або при інкубації чашок в ексикаторі із запаленою свічкою. У результаті горіння свічки зменшується концентрація кисню і підвищується рівень CO<sub>2</sub>, досягаючи 3 %.

*Виділення H. influenzae з клінічного матеріалу.*

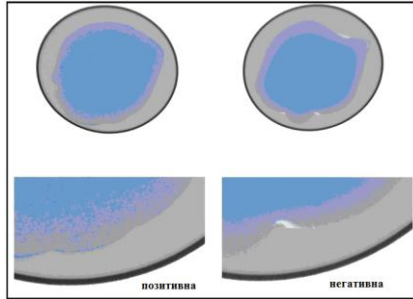
Забарвлення клінічного матеріалу за Грамом і метиленовим синім. Попередній діагноз інфекції, викликаной *H. influenzae*, може бути встановлений на основі дослідження мазка клінічного матеріалу, пофарбованого за Грамом і/або метиленовим синім.

При фарбуванні за Грамом бактерії роду *Haemophilus* виглядають як дрібні, блідо пофарбовані грамнегативні палички, іноді формують тонкі філаменти. Невеликі розміри, клітинний поліморфізм і недостатнє фарбування сафраніном можуть істотно ускладнювати виявлення гемофільної палички. Тому деякі автори пропонують поряд із забарвленням за Грамом проводити забарвлення метиленовим синім. У цьому випадку мікроорганізми мають синій колір на сіро-блакитному тлі.

Негативні результати мікроскопії не виключають можливості гемофільної інфекції, оскільки у клінічному матеріалі може бути присутня недостатня кількість мікроорганізмів (роздільна здатність світлової мікроскопії становить 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> бактеріальних клітин в 1 мл). Тому обов'язкове культуральне бактеріологічне дослідження.

*Виявлення капсульного антигену Hib.* Для швидкої діагностики інфекцій, викликаних *H. influenzae* типу b, розроблені імунологічні методики виявлення капсульного антигену в спинномозковій рідині, крові, плевральній рідині і сечі: латекс-аглотинація (ЛА) (рис. 5), коагулінація зі стафілококовим протеїном А (КоА), зустрічний імуноелектрофорез (ЗІЕФ) та імуоферментний аналіз (ІФА).

Найбільшого поширення набули ЛА і КоА із зразками спинномозкової рідини. Антитіла (IgG) проти капсульного антигену Hib наносять на частинки латексу (ЛА) або на стафілококові клітини (КоА) у якості "носія". При взаємодії антигену, що міститься у клінічному матеріалі, зі специфічними антитілами менш ніж через 10 хв утворюються видимі пластівці.

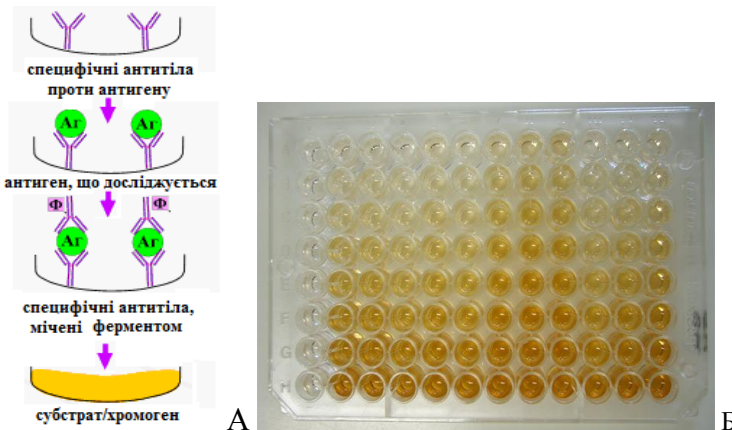


**Рис. 5.** Латекс-аглотинація

Тести можуть бути хибнопозитивними, якщо дитина була недавно щеплена Нів вакциною (протягом 21 дня після імунізації). Крім того, можуть спостерігатися неспецифічні хибнопозитивні результати при деяких захворюваннях, не пов'язаних з гемофільною паличкою.

Однак жодне з перерахованих досліджень не може замінити культуральне дослідження, яке залишається "золотим стандартом" мікробіологічної діагностики.

Для виявлення капсульного антигену використовують твердофазний ІФА. Реакція проводиться на пластикових планшетах з лунками, у яких знаходяться специфічні антитіла. Матеріал, що досліджується, вносять у лунку. Для визначення антигену додають специфічну сироватку з антитілами, міченими ферментом, а потім субстрат/хромоген для фермента. Кожного разу при додаванні компоненту з лунок видаляють незв'язані компоненти шляхом промивання. При позитивній реакції змінюється колір хромогену (рис. 6).



**Рис. 6.** Імуноферментний аналіз: А – схема реакцій; Б – облік результатів

*Дослідження спинномозкової рідини.* При надходженні зразка СМР необхідно невідкладно почати дослідження або зберігати матеріал у термостаті при температурі 35–37 °С або в крайньому випадку при кімнатній температурі не більше 30 хв. Зразки СМР не повинні зберігатися у холодильнику!

Тривале зберігання зразків може привести до загибелі бактерій і хибнонегативних результатів (за винятком тесту на визначення антигенів!).

Для збільшення концентрації мікроорганізмів рекомендується центрифугувати спинномозкову рідину (не менше 1 мл зразка клінічного матеріалу 5–15 хв при 1500–3000 об/хв). Надосадову рідину слід асептично перенести у стерильну пробірку, після чого ретельно перемішати отриманий осад за допомогою багаторазового піпетування.

Дослідження спинномозкової рідини включає наступні діагностичні тести:

1. Забарвлення осаду за Грамом і/або метиленовим синім. Для цього на поверхню стерильного предметного скла наноситься крапля осаду, після висихання якої додається друга крапля, що дозволяє збільшити кількість бактеріальних клітин у мазку. Не слід розподіляти осад по великій поверхні, оскільки це зменшує ймовірність виявлення мікроорганізмів, що знаходяться у матеріалі в невеликій кількості.

2. Визначення антигену Ніб у надосадовій рідині. Деякі автори вважають, що визначення антигенів є більш чутливим тестом, ніж культуральне дослідження у пацієнтів, які отримували антибіотики до забору СМР.

3. Бактеріологічне дослідження осаду. Проводиться посів декількох крапель осаду спинномозкової рідини на поверхню чашок із шоколадним і кров'яним агаром, а також у двофазне або рідке середовище. Чашки інкубують при температурі 35–37 °С в атмосфері з 5–10 % CO<sub>2</sub>.

Інші біологічні рідини (синовіальна, перикардіальна, плевральна) фарбують за Грамом і досліджують культуральним методом.

*Дослідження крові.* Зразки крові, вміщені у флакони з двофазним або рідким середовищем, інкубують протягом 18–24 год при температурі 35–37 °С. Через слабкий ріст гемофільної палички у рідкому середовищі виражене помутніння середовища може бути відсутнім. Тому рекомендується проводити "сліпе" субкультивування або приготування і фарбування мазка через 6–12 год після початку інкубації з флакона без видимого росту. Перевага віддається субкультивуванню, оскільки роздільна здатність світлової мікроскопії (10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> КУО/мл) незначно перевершує щільність, при якій стає видимим ріст у флаконі (10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> КУО/мл).

Для субкультивування в умовах асептики забирається кілька крапель попередньо ретельно перемішаного середовища і розподіляється по поверхні шоколадного агару. Чашки інкубують при температурі 35–37 °С і 5–10 % CO<sub>2</sub> протягом 24–48 год.

Після проміжного субкультивування слід продовжити інкубацію флаконів. Через 24 год інкубації незалежно від відсутності або наявності каламутності у флаконі слід приготувати мазок.

Якщо є видиме помутніння середовища навіть при негативному мазку або позитивний мазок за відсутності каламутності, то слід субкультивувати матеріал на шоколадному агарі і КА.

*Дослідження матеріалів, що містять мікробні асоціації* (мокротиння, матеріал із середнього вуха і пазух носа тощо). Перед посівом отриманого клінічного матеріалу рекомендується проводити мікроскопічне дослідження забарвлених мазків. Це дозволяє отримати попередні дані про можливі збудники.

Для поліпшення виділення гемофільної палички рекомендується використовувати середовища, що містять бацитрацин (300 мкг/мл) або диски з бацитрацином (10 ОД), або сапонінобацитрацинові диски.

*Ідентифікація Haemophilus influenzae.*

Після інкубації протягом 24 год. колонії *H. influenzae* на шоколадному агарі можуть мати такі форми:

– капсульні штами формують слизові, круглі, соковиті, сіруватого кольору, іррадіовальні (дають райдужне забарвлення) у світлі колонії діаметром до 2 мм; штами з менш вираженою капсулою утворюють напівпрозорі, круглі, гладкі, неіррадіовальні колонії;

– безкапсульні штами утворюють дрібні, непрозорі, неіррадіовальні колонії з нерівними краями.

Для чистої культури гемофільної палички характерна наявність специфічного "мишачого" запаху.

*H. influenzae* має цитохромоксидазну і каталазну активність і потребує X і V факторів, що є однією з основних якостей, які відрізняють їх від інших представників роду гемофілів.

Потреба *H. influenzae* у зазначених факторах визначається за допомогою смужок або дисків з X і V факторами. За їх відсутності можна скористатися тестом із сапоніном або визначенням здатності до сателітного росту (метод "годівниць").

*Тест із сапоніном* базується на здатності сапоніну лізувати еритроцити. Сапонін призводить до вивільнення X і V факторів, які знаходяться в еритроцитах, що забезпечує ріст гемофільної палички.

Диск із сапоніном поміщують на поверхню 5 % КА, інокульованого випробуваною культурою (суспензією у фізіологічному розчині хлориду натрію). Результати тесту враховують через 24–48 год інкубації при температурі 35–37 °C і 5–10 % CO<sub>2</sub>.

Ріст колоній навколо дисків із сапоніном і його відсутність поза зоною гемолізу служить диференціальною ознакою належності досліджуваного мікроорганізму до роду *Haemophilus*.

*Тест на здатність до сателітного росту (метод "годівниць")*. Принцип методу "годівниць" аналогічний описаному вище методу дисків із сапоніном. Поверхню 5 % КА інокують суспензією тестованої культури у фізіологічному розчині хлориду натрію, після чого наносять дві паралельні лінії гемолітичного штаму *S. aureus* (відстань між лініями – 5–6 мм). Після інкубації при температурі 35–37 °C в атмосфері з підвищеним (5–10 %

вмістом CO<sub>2</sub> протягом 18–24 год ріст колоній (у вигляді валика) у зоні гемолізу, викликаного *S. aureus*, вказує на приналежність досліджуваного мікроорганізму до *Haemophilus* spp. (рис. 7).

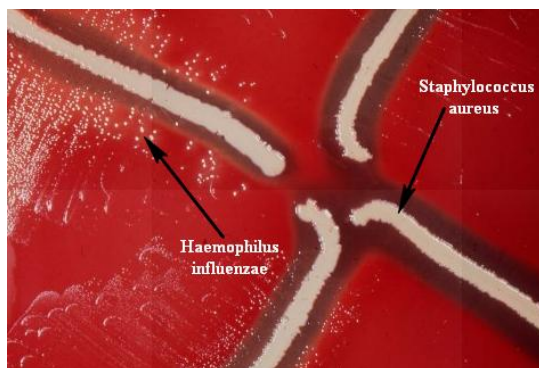


Рис. 7. "Феномен сателіта"

**Визначення β-галактозидази.** Важливим діагностичним тестом для ідентифікації *H. influenzae* є тест на наявність β-галактозидазної активності. Гемофільна паличка не володіє цим ферментом. Таким чином, на підставі даного тесту вона може бути диференційована від інших видів гемофілів, які потребують X і V факторів.

Залежність гемофілів від факторів росту, а також інші властивості наведені в табл. 3.

Таблиця 3

Диференційно-діагностичні властивості роду *Haemophilus*

Вид	Потреби у		Каталаза	Оксидаза	ONPG	Гемоліз*	Утворення кислоти з			
	X і V факторів	CO <sub>2</sub>					гл	сх	лз	мн
<i>H. influenzae</i>	X, V	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>H. influenzae</i> біовар <i>aegypticus</i>	X, V	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	X, V	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	V	-	в	+	+	-	+	+	-	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	V	-	+	+	в	+	+	+	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	г	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>H. paraphrophilus</i>	V	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>H. segnis</i>	V	-	в	-	в	-	ср	ср	-	-
<i>H. ducreyi</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Примітка:** гл – глюкоза; сх – сахароза; лз – лактоза; мн – маноза; ONPG – тест на β-галактозидазу; г – для первинної ізоляції потребує гемін; ср – слабка реакція; в – ознака варіоус. \* – на кінській крові.



Біотипування *H. influenzae*. М. Кіліан (M. Kilian), який вивчав таксономію роду *Haemophilus*, запропонував використовувати ряд біохімічних тестів для біотипування *H. influenzae*. На підставі тестів на продукцію індолу, уреазну і орнітиндекарбоксилазну активність виділяють 8 ютипів *H. influenzae* (табл. 4).

Таблиця 4

**Біотипування *H. influenzae***

Біотип	Індол	Уреаза	ОДК*
<i>H. influenzae</i> I	+	+	+
<i>H. influenzae</i> II	+	+	-
<i>H. influenzae</i> III	-	+	-
<i>H. influenzae</i> IV	-	+	+
<i>H. influenzae</i> V	+	-	+
<i>H. influenzae</i> VI	-	-	+
<i>H. influenzae</i> VII	+	-	-
<i>H. influenzae</i> VIII	-	-	-

\* Орнітиндекарбоксилаза.

Біотипування гемофільної палички має лише епідеміологічне значення. Різні біотипи мають зв'язок із певними типами інфекцій. Наприклад, за даними ряду досліджень, переважна кількість менінгітів викликається біотипом I (93,1 %), тоді як на біотипи II і IV припадає відповідно 4,6 і 2,3 %. Більшість штамів *Hib* належить до біотипів I, а штами, які не типуються, – до біотипів II і III.

У ряді досліджень відзначена також асоціація біотипів II і III з кон'юнктивітом. Біотип IV частіше викликає інфекції в акушерській та гінекологічній практиці, перинатальні та неонатальні інфекційні захворювання.

*Тест на визначення уреазни.* Приготовану *ex tempore* суміш реактивів А і Б розливають у вузькі пробірки по 0,1 мл і вносять кілька крапель густої суспензії досліджуваної культури *H. influenzae* у живильному бульйоні. Пробірки поміщають у термостат при температурі 35–37°C. Попередній облік можливий через 30 хв.

При позитивній реакції середовище набуває малиново-червоного забарвлення, при негативній - колір не змінюється (рис. 8). Облік негативної реакції можливий тільки після 24 год інкубації.

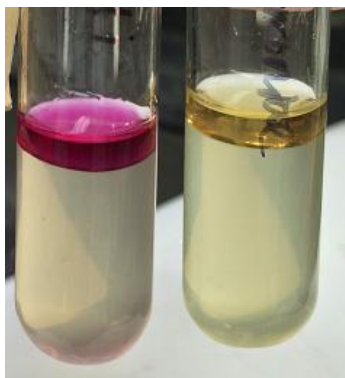
*Тест на визначення індолоутворення.* Для визначення здатності бактерій утворювати індол необхідно використовувати середовища, що містять триптофан. Інкують при температурі 35–37 °C протягом 18–24 год. При позитивному результаті з'являється рожеве забарвлення (рис. 9).

*Тест на наявність орнітиндекарбоксилази.* При визначенні орнітиндекарбоксилази використовуються диски з орнітином (СІБ, bioMerieux, VBL). Диск поміщають у пробірку з 0,3–0,5 мл фізіологічного розчину і додають кілька крапель добової бульйонної культури *H. influenzae*, після чого

заливають стерильним вазеліновим маслом і інкубують протягом 18–24 год при температурі 35–37 °С.



**Рис. 8.** Тест на визначення уреазы



**Рис. 9.** Тест на визначення індолоутворення

При позитивному результаті з'являється синє або інтенсивне зелене забарвлення (рис. 10).



**Рис. 10.** Тест на орнітиндекарбоксилазу

**Алгоритм "Визначення чутливості *H. influenzae* до антибіотиків".**

Вибір антибіотиків, які слід використовувати при тестуванні *H. influenzae*, залежить від спектра активності, частоти набутої антибіотикорезистентності у регіоні, локалізації і ступеня тяжкості перебігу інфекційного захворювання та набору антибактеріальних препаратів у формулярі установи охорони здоров'я.

Потенційну активність щодо *H. influenzae* мають такі антибіотики: амінопеніциліни (ампіцилін, амоксицилін), уреїдодопеніциліни (піперацилін), інгібіторозахищені пеніциліни (амоксицилін/клавуланат, ампіцилін/суль-

бактам, піперацилін/тазобактам, тикарцилін/клавуланат), цефалоспорини II (цефуроксим, цефаклор), III (цефтріаксон, цефотаксим, цефоперазон) і IV (цефепім, цефпіром) поколінь, карбапенеми, макроліди (азитроміцин, кларитроміцин), тетрацикліни (тетрациклін, доксициклін), фторхінолони (ципрофлоксацин, офлоксацин, ефлоксацин, левофлоксацин), рифампіцин, хлорамфенікол, ко-тримоксазол.

Незважаючи на те, що пеніцилін, аміноглікозиди, еритроміцин можуть проявляти помірну *in vitro* активність щодо *H. influenzae*, терапія цими антибіотиками не може привести до мікробіологічної або клінічної ефективності у ході лікування.

Найбільш значущою з клінічної точки зору є проблема резистентності гемофільної палички до амінопеніциліну за рахунок продукції  $\beta$ -лактамаз. Такі мікроорганізми зазвичай чутливі до інгібіторозахищених пеніцилінів і цефалоспоринів, а для швидкого виявлення продукції  $\beta$ -лактамаз досить провести тест з нітроцефіном.

В останні роки описані штами *H. influenzae*, стійкість яких до ампіциліну пов'язана зі зміною мішені дії  $\beta$ -лактамних антибіотиків (пеніцилін-зв'язуючих білків) або зниженням проникності зовнішньої клітинної стінки. Ці штами отримали назву  $\beta$ -лактамазонегативні ампіцилінорезистентні (БЛНАР) і вважаються нечутливими до інгібіторозахищених пеніцилінів і таких цефалоспоринів, як цефаклор, цефуроксим, цефіксим, цефтибутен.

БЛНАР штами *H. influenzae* зустрічаються дуже рідко (в середньому у 0,2 % випадків) і не мають суттєвого клінічного значення.

Відповідно до міжнародних рекомендацій для виявлення ампіциліно-резистентності у гемофільної палички у рутинній лабораторній практиці достатньо визначення чутливості до ампіциліну диско-дифузійним методом і тесту на продукцію  $\beta$ -лактамаз з нітроцефіном.

Ці два тести дозволяють поділити штами на ампіциліночутливі, бета-лактамазопродукуючі ампіцилінорезистентні (чутливі до інгібіторозахищених пеніцилінів і цефалоспоринів II-IV поколінь) і БЛНАР, які слід розцінювати як резистентні до інгібіторозахищених пеніцилінів і деяких цефалоспоринів. Причому тестування з диском, що містить інгібіторозахищені пеніциліни, наприклад амоксицилін/клавуланат, не дозволяє відрізнити БЛНАР від ампіциліночутливих штамів *H. influenzae*.

Визначення чутливості гемофільної палички до макролідів (азитроміцину, кларитроміцину) є невирішеною проблемою в усьому світі, що пов'язано з широким діапазоном одержуваних значень і мономодальним розподілом штамів у популяції. Тому підрозділ штамів на категорії чутливості за даними досліджень *in vitro* завжди носить суб'єктивний характер і значно піддається впливу мінімальних відмінностей у методиці і умовах тестування.

До теперішнього часу не отримано клінічних штамів *H. influenzae*, стійких до цефалоспоринів III-IV поколінь, карбапенемів і фторхінолонів.

У даний час більшість дослідників при визначенні чутливості мікроорганізмів до антибіотиків керується стандартами Національного комітету з клінічних лабораторних стандартів США (National Committee on Clinical Laboratory Standards – NCCLS). Внаслідок цього основні дослідження чутливості гемофільної палички до антибіотиків проводяться відповідно до цих рекомендацій.

Згідно з рекомендаціями NCCLS для визначення чутливості гемофільної палички необхідно використовувати середовище НТМ (Haemophilus Test Medium – середовище для тестування гемофілів), яке містить усі необхідні для гемофілів чинники росту. НТМ є агар Мюллера–Хінтона з додаванням дріжджового екстракту і факторів X і V.

Середовище НТМ випускається компанією "Unipath" у вигляді НТМ-основи і добавок. Однак її можна приготувати і в лабораторії на основі агару Мюллера–Хінтона.

*Визначення чутливості диско-дифузійним методом.* Процедура визначення чутливості гемофільної палички до антибіотиків аналогічна тестуванню "невередливих" мікроорганізмів і має лише кілька особливостей.

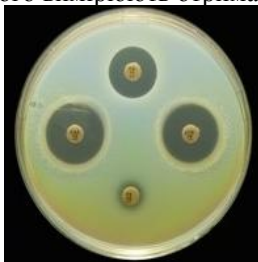
1. Для приготування інюкуляту суспендують колонії добової культури *Haemophilus* spp., що виростає на чашці з шоколадним агаром, у живильному бульйоні (наприклад, бульйоні Мюллера–Хінтона) або стерильному фізіологічному розчині.

Щільність інюкуляту повинна відповідати стандарту мутності 0,5 за МакФарландом ( $1,5 \times 10^8$  КУО/мл).

Інокуляцію чашок з НТМ агаром необхідно проводити протягом 15 хв після приготування інюкуляту. Для інюкуляції використовують стерильні ватні тампони. Тампон занурюють у пробірку з суспензією, віджимають надлишок інюкуляту об стінки пробірки і наносять на поверхню агару штрихами у 3 напрямках під кутом  $60^\circ$ , не вносячи додаткової кількості суспензії.

2. Внаслідок великих зон пригнічення росту гемофільної палички навколо дисків з антибіотиками на чашку діаметром 90–100 мм не слід поміщати більше 4 дисків з антибіотиками.

3. Чашки інкубують при температурі  $35^\circ\text{C}$  в атмосфері з підвищеним вмістом  $\text{CO}_2$  (5–10 %) в ексикаторі або  $\text{CO}_2$ -інкубаторі протягом 16–18 год, після чого вимірюють отримані зони пригнічення росту (рис. 11).



**Рис. 11.** Визначення чутливості диско-дифузійним методом

Зона пригнічення росту вимірюється за допомогою лінійки або каліпера. Причому необхідно вимірювати її діаметр (не радіус!). Кінцевою точкою вважається відстань, у зоні якої немає росту мікроорганізмів. За величиною зони затримки росту навколо дисків інтерпретують отримані результати.

4. Для інтерпретації результатів визначення чутливості гемофільної палички до антибіотиків використовують специфічні критерії, відмінні від критеріїв інтерпретації результатів визначення чутливості "невередливих" мікроорганізмів (табл. 5).

**Таблиця 5**

**Критерії інтерпретації чутливості гемофільної палички  
диско-дифузним методом на НТМ агарі (NCCLS, 2016)**

Антибіотик	Діаметр зони пригнічення росту, мм		
	резистентний	помірно резистентний	чутливий
Ампіцилін (10 мкг)	≤ 18	19–21	≥ 22
Амоксицилін/клавуланат (20/10 мкг)	≤ 19	–	≥ 20
Меропенем (10 мкг)	–*	–*	≥ 20
Іміпенем (10 мкг)	–*	–*	≥ 16
Триметоприм/сульфаметоксазол (1,25/23,75 мкг)	≤ 10	11–15	≥ 16
Цефотаксим (30 мкг)	–	–	≥ 26
Цефтріаксон (30 мкг)	–*	–*	≥ 26
Цефтазидим (30 мкг)	–*	–*	≥ 26
Хлорамфенікол (30 мкг)	≤ 25	26–28	≥ 29
Азитроміцин (15 мкг)	–*	–*	≥ 12
Кларитроміцин (15 мкг)	≤ 10	11–12	≥ 13
Тетрациклін (30 мкг)	≤ 25	26–28	≥ 29
Ципрофлоксацин (5 мкг)	–*	–*	≥ 21

\* Резистентні штами не виділені.

Контроль якості визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків проводять шляхом тестування контрольних штамів. Як контроль використовують штами Американської колекції типових культур (АТСС), що відрізняються генетичною стабільністю і добре вивченими фенотиповими характеристиками (табл. 6).

Для контролю якості при визначенні чутливості гемофілів на НТМ агарі використовуються штами *H. influenzae* АТСС 49247 і *E. coli* АТСС 35218 (при тестуванні інгібіторозахищених пеніцилінів). Методика постановки й обліку відповідає методиці роботи з випробуванним штамом. Результати оцінюються за критеріями, викладеними в табл. 6.

Кожна серія чашок при постановці чутливості повинна перевірятися на їх придатність для росту. Для цього використовується контрольний штам *H. influenzae* АТСС 10211, з добової культури якого готують мікробну суспензію, відповідну за каламутністю 0,5 за МакФарландом. З отриманої

мікробної суспензії готують серію послідовних розведень 1 : 10. Потім на приготовані чашки з середовищем НТМ висівають по 0,1 мл суспензії -5, -6, -7 розведень. При хороших поживних властивостях агар повинен відзначитися ростом мікроорганізмів з -6 і -7 розведень.

**Таблиця 6**

**Допустимі діапазони значень діаметрів зон затримки росту для контрольних штамів *H. influenzae* ATCC 49247 і *E. coli* ATCC 35218 (NCCLS, 2016)**

Антибіотик	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>E. coli</i> ATCC 35218
Ампіцилін (10 мкг)	13–21	–
Амоксицилін/клавуланат (20/10 мкг)	15–23	18–22
Триметоприм/сульфаметоксазол (1,25/23,75 мкг)	24–32	–
Меропенем (10 мкг)	20–28	–
Іміпенем (10 мкг)	21–29	–
Цефотаксим (30 мкг)	31–39	–
Цефтріаксон (30 мкг)	31–39	–
Хлорамфенікол (30 мкг)	31–40	–
Азитроміцин (15 мкг)	13–21	–
Кларитроміцин (15 мкг)	11–17	–
Тетрациклін (30 мкг)	14–22	–
Ципрофлоксацин (5 мкг)	34–42	–

*Визначення мінімальної концентрації, що пригнічує. Метод серійних розведень у бульйоні.*

*Макрометод.* Метод серійних розведень у бульйоні (макрометод) дозволяє визначити МПК без значних матеріальних витрат. Тестування невеликої кількості штамів у рутинній практиці доцільно виконувати макрометодом.

Матеріали:

1) стерильний НТМ бульйон; можна використовувати готовий комерційний НТМ бульйон або приготований у лабораторії на основі стерильного бульйону Мюллера–Хінтона зі стабілізованим катіонним складом (за іонами Са<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>) з додаванням тих же компонентів, що і у НТМ агарі;

2) субстанції антибіотиків з відомою активністю;

3) стерильні пробірки розміром 13 × 100 або 14 × 140 мм;

4) стерильні піпетки;

5) дозуючі піпетки зі стерильними наконечниками;

6) стандарт каламутності 0,5 за МакФарландом.

*Процедура.* Тестування проводиться в об'ємі 1 мл кожного розведення антибіотика з кінцевою концентрацією *H. influenzae* приблизно 5 × 10<sup>5</sup> КУО/мл.

*Приготування серійних розведень антибіотика.* Серійні розведення антибіотика готуються зі "стартового" розчину на НТМ бульйоні (табл. 7),

який потім розливається по 0,5 мл у кожну пробірку. У подальшому при внесенні бульйонної культури *H. influenzae*, що тестується, концентрація антибіотика зменшується у 2 рази. Кількість пробірок визначається необхідним діапазоном розведень антибіотика і збільшується на дві для постановки "негативного контролю" і "контролю росту".

**Таблиця 7**

Антибіотики, що тестуються, і діапазон розведень

Антибіотик	Діапазон розведень, мг/л	Стартова концентрація, мг/л
Ампіцилін	0,016–16	32
Амоксицилін/клавуланат	0,032/0,016–32/16	64/32
Триметоприм/сульфаметоксазол	0,032/0,608–32/608	64/1216
Меропенем	0,004–4	8
Іміпенем	0,016–16	32
Цефтріаксон або цефотаксим, або цефтазидим	0,008–8	16
Хлорамфенікол	0,064–64	128
Азитроміцин	0,032–32	64
Кларитроміцин	0,064–64	128
Тетрациклін	0,064–64	128
Ципрофлоксацин	0,004–4	8

Базовий розчин антибіотика готується із записі хімічно чистої субстанції препарату шляхом розчинення її у розрахованій кількості розчинника для отримання концентрації, що перевищує стартову концентрацію антибіотика у 100 разів (наприклад, 3200 мг/л для ампіциліну).

**NB.** Неприпустимо використання лікувальних препаратів замість субстанцій!

Стартовий розчин антибіотика готується шляхом додавання 0,1 мл базового розчину антибіотика до 9,9 мл НТМ бульйону, 0,5 мл якого переносять мікропіпеткою зі стерильним наконечником у першу пробірку, що містить 0,5 мл бульйону. Ретельно перемішують і новим стерильним наконечником переносять 0,5 мл розчину антибіотика у бульйоні в другу пробірку, що містила спочатку 0,5 мл бульйону.

Цю процедуру повторюють, поки не буде приготований весь необхідний ряд розведень. З останньої пробірки 0,5 мл бульйону видаляють. Таким чином, виходить ряд пробірок з розчинами антибіотиків у кількості 0,5 мл, концентрація яких відрізняється у сусідніх пробірках у 2 рази. Одночасно готуються ряди серійних розведень антибіотика для тестування контрольних штамів гемофільної і кишкової паличок.

*Приготування інокуляту.* Для приготування інокуляту використовують добову культуру гемофільної палички на шоколадному агарі. Колонії *H. influenzae* суспендують у стерильному 0,9 % розчині натрію хлориду до каламутності, еквівалентній 0,5 за стандартом МакФарланда.

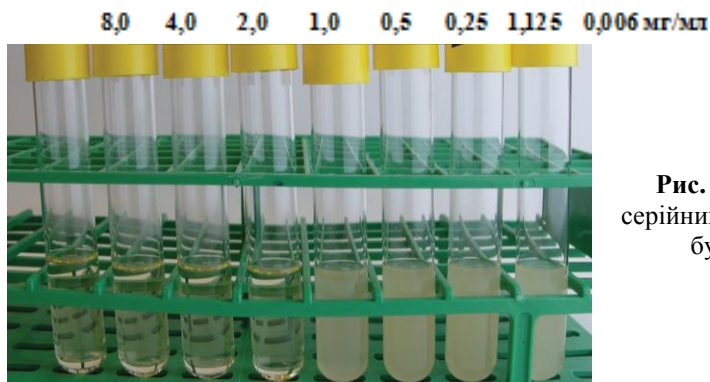
Подальше розведення цієї суспензії у 100 разів готується на НТМ бульйоні, після чого концентрація гемофільної палички становитиме приблизно  $10^6$  КУО/мл. По 0,5 мл інокуляту вносять у кожну пробірку, що містить 0,5 мл відповідного розведення антибіотика, і у 2 пробірки з 0,5 мл НТМ бульйону без антибіотика ("негативний контроль" і "контроль росту").

Кінцева концентрація *H. influenzae* у кожній пробірці досягне необхідної – приблизно  $5 \times 10^5$  КУО/мл. Інокулят повинен бути внесений у пробірки з розведеннями антибіотика не пізніше 30 хв з моменту його приготування.

**Інкубація.** Пробірки зі штамами, що тестуються, крім пробірки "негативний контроль", інкубують у звичайній атмосфері при температурі 35 °С 20–24 год. Пробірка "негативний контроль" поміщається у холодильник (температура 4 °С), де зберігається до обліку результатів.

**Облік результатів.** Для визначення наявності росту гемофільної палички пробірки з посівами проглядають у прохідному світлі. Ріст культури у присутності антибіотика порівнюється з референтною пробіркою ("негативний контроль"), що містить вихідний інокулят і що зберігалася у холодильнику. МПК визначається за найменшою концентрацією антибіотика, яка пригнічує видимий ріст *H. influenzae* (рис. 12).

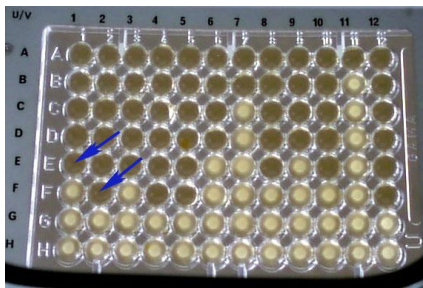
**Мікрометод.** У разі необхідності визначення МПК у 8 і більше штамів доцільно використовувати мікрометод. Він дозволяє тестувати одночасно велику кількість штамів до кількох антибіотиків.



**Рис. 12.** Метод серійних розведень у бульйоні

Тестування проводиться в об'ємі 0,1 мл (0,05 мл НТМ бульйону і 0,05 мл інокуляту), що дозволяє значно скоротити кількість витратних матеріалів. Методика не має відмінностей від макрометоду, за винятком об'єму, але потребує додаткового оснащення лабораторії багатоканальними піпетками, мікротитровальними плашками (з круглим або конічним дном) із стерильними кришками, спеціальним пристроєм з непрямим підсвічуванням для обліку результатів (рис. 13).





**Рис. 13.** Мікрометод визначення чутливості *H. influenzae* до антибіотиків

Ріст мікрофлори у присутності антибіотика порівнюється з ростом культури в осередку без антибіотика.

Кожне тестування штамів супроводжується внутрішнім контролем з використанням контрольних штамів *H. influenzae* ATCC 49247 і *E. coli* ATCC 35218.

**Метод Е-тестів.** Е-тест являє собою пластикову смужку розміром 5x50 мм з нанесеним градієнтом концентрації антибіотика (0,002–32, 0,016–256 або 0,063–1024 мг/л в залежності від препарату). Метод заснований на дифузії антибіотиків в агар, що створює градієнт концентрації антибіотика в агарі. Зона затримки росту має форму еліпса, розміри якого збільшуються від меншої концентрації антибіотика на смужці до більшої.

Матеріали:

- 1) НТМ агар, приготований у лабораторії, або комерційні готові чашки з агаром;
- 2) смужки Е-тестів з антибіотиками;
- 3) стерильний бульйон Мюллера–Хінтона;
- 4) стандартні стерильні тампони;
- 5) стандарт каламутності 0,5 за МакФарландом.

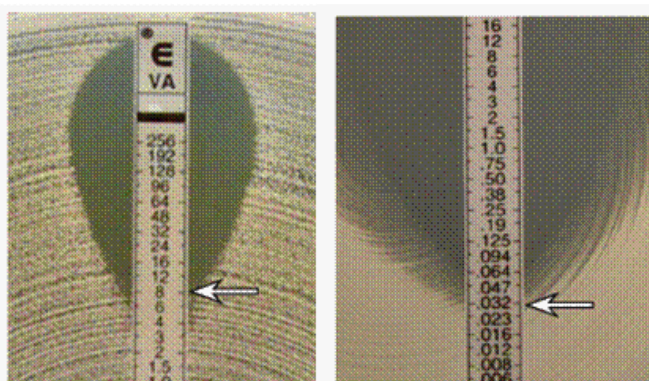
**Процедура приготування** НТМ агару і нанесення культури аналогічна такій при диско-дифузійному методі. Поверхня мікробного газону повинна бути сухою, для чого Е-тести наносять не раніше, ніж через 15 хв від моменту нанесення інокуляту. Смужки Е-тестів поміщаються на поверхню агару пластиковою поверхнею з відмітками градієнта концентрації догори. На чашку діаметром 90 мм наносять не більше 2 смужок. Посіви інкубують протягом 20–24 год при температурі 35 °С у атмосфері з підвищеним вмістом CO<sub>2</sub>.

**Облік результатів.** Результати слід враховувати тільки при наявності суцільного щільного газону культури. Якщо ріст слабкий, необхідно продовжити інкубацію. У разі "розрідженого" росту газону тестування потрібно повторити, перевіривши якість агару та інокуляту. Результати враховуються у відбитому світлі і/або під лупою, щоб добре розглянути край росту. Враховується зона повного пригнічення росту. Величина МПК визначається тим значенням концентрації, на рівні якої еліпс перетинається зі шкалою смужки (рис. 14).

*Інтерпретація.* Метод Е-тестів визначає МПК, виходячи з безперервного градієнта концентрації, включаючи значення між дворазовими розведеннями. Для визначення категорії чутливості отримані значення слід округлити до найближчих значень дворазових розведень. Наприклад:

1) для чутливих штамів значення МПК ампіциліну 10 мг/л; методом Е-тестів отримана МПК 0,064 мг/мл, результат інтерпретується як чутливий;

2) МПК помірно резистентних штамів – 2 мг/л; методом Е-тестів визначена МПК 1,5 мг/л, результат інтерпретується як помірно резистентний.



**Рис. 14.** Е-тест

Критерії інтерпретації результатів визначення чутливості до деяких антибіотиків методом розведень і Е-тестів наведені в *табл. 8*.

**Таблиця 8**

**Критерії інтерпретації чутливості *H. influenzae* методом розведень і Е-тестів (NCCLS, 2016)**

Антибіотик	Діаметр зони пригнічення росту, мм		
	резистентний	помірно резистентний	чутливий
Ампіцилін	$\geq 4$	2	$\leq 1$
Амоксицилін/клавуланат	$\geq 4/2$	-	$\leq 2/1$
Триметоприм/сульфаметоксазол	$\geq 4$	1	$\leq 0,5$
Цефтриаксон або цефотаксим, або цефтазидим	—*	—*	$\leq 2$
Меропенем	—*	—*	$\leq 0,5$
Іміпенем	—*	—*	$\leq 4$
Хлорамфенікол	$\geq 8$	4	$\leq 2$
Азитроміцин	—	—*	$\leq 4$
Кларитроміцин	$\geq 32$	16	$\leq 8$
Тетрациклін	$\geq 8$	4	$\leq 2$
Ципрофлоксацин	—*	—*	$\leq 1$

\* Резистентних штамів не виділено.

*Контроль якості.* Використовуються штами *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766 (при тестуванні карбапенемів) та *E. coli* ATCC 35218 (при тестуванні інгібіторзащищених пеніцилінів). Методика постановки і обліку відповідає методиці роботи з випробуванням штамом. Результати інтерпретуються за наведеними нижче критеріями (табл. 9).

**Таблиця 9**

**Допустимі діапазони значень МПК для контрольних штамів  
(NCCLS, 2016)**

Антибіотик	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	<i>E. coli</i> ATCC 35218
Ампіцилін	2-8	-	-
Амоксицилін/клавуланат	2/1–16/8	-	4/2–16/8
Триметоприм/сульфаметоксазол	0,03-0,25	-	-
Меропенем	-	0,03–0,12	-
Іміпенем	-	0,25–1	-
Хлорамфенікол	0,25–1	-	-
Цефотаксим	0,12–0,5	-	-
Цефтріаксон	0,06–0,25	-	-
Азитроміцин	1–4	-	-
Кларитроміцин	4–16	-	-
Тетрациклін	4–32	-	-
Ципрофлоксацин	0,004-0,03	-	-

**Алгоритм "Тест на здатність до продукції каталази".**

Каталаза – це фермент, що перетворює пероксид водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) на воду і кисень. Хімічно каталаза є гемопротеїном, подібним за структурою до гемоглобіну, за винятком того, що містить тривалентне залізо, а не двовалентне.

Реагенти та матеріали:

1. 3 % розчин перекису водню (зберігати у флаконі з темного скла у холодильнику).

2. Добова культура досліджуваного мікроорганізму.

Контроль якості: позитивний контроль – агарових культур *S. aureus* (ATCC 25923), негативний контроль – агарових культур *S. pyogenes* (ATCC 12344).

*Методика.* На предметному склі добова агарова культура мікроорганізму суспендується у краплі 3 % розчину перекису водню. Бульбашки різної інтенсивності з'являються відразу або через 3–5 с (рис. 15).

Не слід використовувати для тестування культури старіше 24 год, оскільки фермент присутній тільки в живих мікроорганізмів, і можуть бути отримані помилково негативні результати. Деякі мікроорганізми мають інші ферменти, що руйнують перекис водню. Тому маленькі бульбашки в невеликій кількості, що з'являються через 20–30 с, не розглядаються як позитивний тест.



**Рис. 15.** Тест на здатність до продукції каталази

Крім того, каталаза присутня в еритроцитах, тому може спостерігатися хибнопозитивний результат при заборі колоній із середовища, що містить кров.

**Алгоритм "Ідентифікація *H. influenzae* з використанням X і V факторів".**

Потреба гемофілів у X і/або V факторах може бути визначена при використанні смужок або дисків, імпрегнованих X, V і XV факторами. При розміщенні на поверхні середовища дисків із відповідними факторами вони легко дифундують у живильне середовище навколо дисків. Після інкубації потреба оцінюється в залежності від характеру росту досліджуваного мікроорганізму навколо дисків.

Матеріали:

1) смужки або диски з фільтрувального паперу, насичені X і V факторами (BBL, Oxoid);

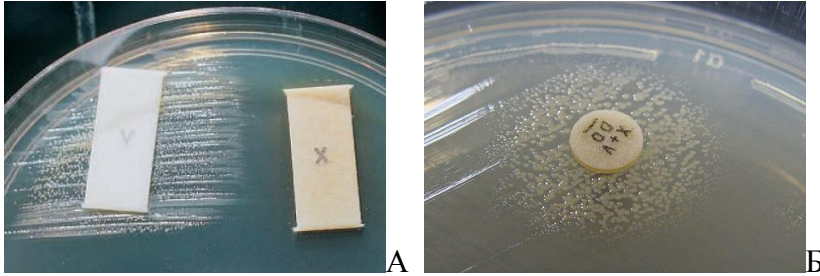
2) живильне середовище, що не містить X і V фактори (триптиказо-соевий агар, серцево-мозковий агар);

3) серцево-мозковий живильний бульйон.

Контроль якості: *H. parainfluenzae* – потребує V фактор, *H. influenzae* – потребує X і V фактори.

**Методика.** Приготувати легку суспензію чистої добової культури досліджуваного мікроорганізму у живильному бульйоні. Необхідно уникати перенесення разом з колоніями гемівмісного середовища, що може привести до помилкових результатів. За допомогою стерильного тампона інокулювати поверхню живильного середовища приготованою суспензією. Помістити на поверхню агару диски або смужки, що містять X, V і XV чинники, на відстань 2–см один від одного. Інкубувати 18–24 год при температурі 35–37 °C у атмосфері з 5–10 % CO<sub>2</sub>.

Облік характеру росту проводиться візуально. Наявність росту мікроорганізму тільки навколо дисків з X і XV або V і XV факторами вказує на потребу відповідно у X або V факторі. Ріст тільки навколо диска з XV факторами характерний для гемофілів, які потребують обидва фактори (наприклад, *H. influenzae*) (рис. 16).



**Рис. 16.** Ріст гемофільних бактерій (А) і *H. influenzae* (Б) у присутності X і V факторів

**Алгоритм "Тест на визначення продукції β-лактамаз".**

Бета-лактамази – ферменти, що руйнують β-лактамні антибіотики. Продукція β-лактамаз є основним механізмом стійкості до амінопеніцилінів і деяких цефалоспоринів у штамів *H. influenzae*. Розроблено кілька методів визначення продукції β-лактамаз. Найбільш поширений – хромогенний метод з використанням дисків з нітроцефіном.

Принцип методу базується на тому, що β-лактамази гідролізують аміновий зв'язок у β-лактамному кільці нітроцефіну, у результаті чого відбувається видима неозброєним оком зміна кольору.

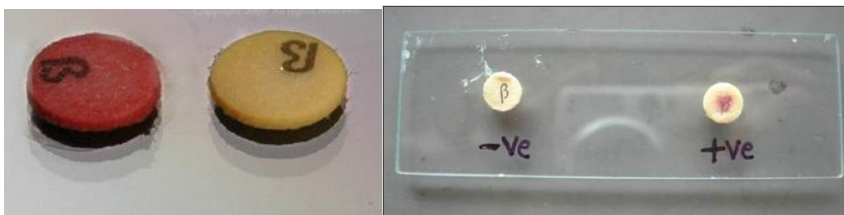
Матеріали:

- 1) диски з цефіназою (BBL);
- 2) стерильна дистильована вода;
- 3) скляні предметні скельця або чашки Петрі;
- 4) стерильні піпетки;
- 5) стерильні дерев'яні палички-аплікатори або петлі.

Процедура:

- 1) помістити необхідну кількість дисків на чисте предметне скло або на чашку Петрі;
- 2) змочити кожен диск 1 краплею стерильної дистильованої води;
- 3) за допомогою стерильної петлі або палички-аплікатора нанести кілька ізольованих, морфологічно подібних колоній на поверхню диска; слід використовувати чисту добову культуру на шоколадному агарі;
- 4) спостерігати зміну кольору; позитивні результати з'являються протягом 15 с – 5 хв; за відсутності зміни кольору протягом 5 хв тест вважається негативним.

Інтерпретація тесту: позитивний – утворення червоного забарвлення диска у місці нанесення культури досліджуваного мікроорганізму, негативний – відсутність зміни кольору (рис. 17).



**Рис. 17.** Тест на визначення продукції  $\beta$ -лактамаз

Контроль якості: позитивний контроль – *S. aureus* ATCC 29213, негативний контроль – *H. influenzae* ATCC 10211.

"Робочі" контрольні штами слід зберігати на скошеному триптиказосоевому (*S. aureus*) і шоколадному агарі (*H. influenzae*) при температурі 2–8 °С до 1 міс. Перед тестуванням слід субкультивувати штами на чашці з КА і шоколадним агаром. Контроль якості слід проводити щодня і при тестуванні кожного нового лота дисків.

**Термінологія:**

Родина: *Pasteurellaceae*.

Рід: *Haemophilus*.

Вид: *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. ducreyi*.

**Запитання для контролю знань**

1. Морфологія і біологічні властивості гемофільних бактерій. Класифікація. Антигенна структура. Стійкість до чинників навколишнього середовища.
2. Значення гемофільних бактерій у патології людини. Основи патогенезу, клінічні форми. Імунітет.
3. Правила взяття матеріалу, доставка його до лабораторії. Лабораторна діагностика інфекцій, викликаних гемофільними бактеріями.
4. Специфічна профілактика та лікування інфекцій, викликаних гемофільними бактеріями.

**Тестові завдання**

**1.** Відомо, що для гемофільних бактерій характерний "феномен кормушки". Феномен пов'язаний з:

- A. Потребою гемофільних бактерій у високій концентрації вуглекислоти.
- B. Ростом гемофільних бактерій навколо колоній інших бактерій, які продукують НАД або викликають  $\alpha$ -гемоліз.
- C. Додаванням до середовища лінкоміцину.
- D. Додаванням до середовища вітамінів групи B.
- E. Ростом гемофільних бактерій у присутності малих концентрацій  $\text{CO}_2$ .

2. Назвіть провідний фактор патогенності гемофільних бактерій:
- A. Екзотоксин.
  - B. Ендотоксин.
  - C. Капсула.
  - D. Ферменти агресії.
  - E. Vi-антиген.
3. Яке середовище доцільніше використати для виділення гемофільних бактерій?
- A. МПА, МПБ.
  - B. Середовище Левентейна–Іенсена.
  - C. Шоколадний або кров'яний агар.
  - D. Казеїново-вугільний агар, казеїново-дріжджовий агар.
  - E. Сироватковий агар.
4. До бак. лабораторії надійшов патологічний матеріал від пацієнта з підозрою на пневмонію гемофільної етіології. Який метод мікробіологічного дослідження слід використати?
- A. Мікроскопічний.
  - B. Бактеріологічний.
  - C. Мікроскопічний і бактеріологічний.
  - D. Бактеріологічний і серологічний.
  - E. Біологічний і серологічний.
5. До бак. лабораторії надійшов патологічний матеріал від пацієнта з підозрою на гнійний менінгіт. При мікроскопії виявлені мікроорганізми, схожі на гемофільні бактерії. Які морфологічні властивості для них характерні?
- A. Грампозитивні палички з потовщеннями на кінцях, розташовані в мазках у вигляді римських цифр V і X, нерухомі.
  - B. Грампозитивні палички, розташовані у вигляді ланцюжка, нерухомі.
  - C. Грамнегативні палички хаотично розташовані, перитрихи.
  - D. Грамнегативні палички, розташовані короткими ланцюжками.
  - E. Грамнегативні сферичні, овоїдні або паличкоподібні бактерії, нерухомі.

## Література

### Основна

1. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студ. вищ. мед. навч. закл. / за ред. В. П. Широбокова. – 2-е вид. – Вінниця : Нова книга, 2011. – 952 с.

### Додаткова

1. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике : пособие для врачей / А. Г. Чучалин, А. И. Синкопальников, Р. С. Козлов и др. – Москва, 2010. – 106 с.

2. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae* : метод. рекомендации Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) ; Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии. – Москва, 2000. – 17 с.

3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник по дисциплине "Микробиология, вирусология и иммунология" для студентов учреждений высш. проф. образования / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 480 с.

4. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований : учеб. пособие / под ред. А. С. Лабинской, Л. П. Блинковой, А. С. Ещиной. – Москва : ОАО «Издательство медицина», 2005. – 600 с.

5. Эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа b : метод. рекомендации ; Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва, 2010. – 41 с.

6. USML Step 1. Lecture notes. – New York, 2018. – 2568 p.

7. Murray P. R. Manual of Clinical Microbiology. – 8<sup>th</sup> Ed. / P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller. – Washington : ASM Press, 2015. – 848 p.

8. Ananthanarayan. Textbook of Microbiology. – 9<sup>th</sup> Ed. / Ananthanarayan, Paniker. – Orient Blackswan, 2013. – 657 p.

9. Greenwood D. Medical Microbiology, 18th Ed. with studentconsult online access / D. Greenwood, R. C. B. Slake, M. Barer, L. Irving. – Churchill Livingstone, 2012. – 794 p.

10. Конспект лекцій.



*Навчальне видання*

## ***ГЕМОФІЛЬНІ БАКТЕРІЇ***

*Методичні вказівки для студентів II–III курсів  
спеціальності "Медицина", "Стоматологія"  
освітньо-кваліфікаційного рівня "Магістр"*

Упорядники      Замазій Тетяна Миколаївна  
                         Коваленко Наталія Іллівна

Відповідальний за випуск    Т. М. Замазій



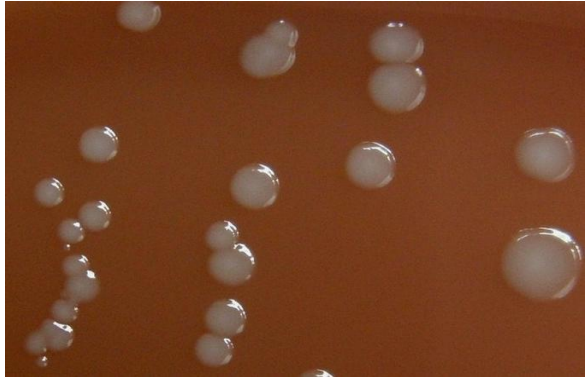
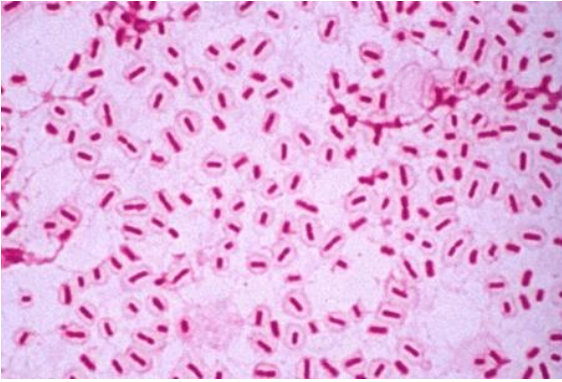
Редактор М. В. Тарасенко  
Комп'ютерна верстка О. Ю. Лавриненко  
Комп'ютерний набір Т. М. Замазій

Формат А5. Ум. друк. арк.2,5. Зам. № 19-33701.

---

**Редакційно-видавничий відділ  
ХНМУ, пр. Науки, 4, м. Харків, 61022  
izdatknmurio@gmail.com**

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавництв, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції серії ДК № 3242 від 18.07.2008 р.



## ***ГЕМОФІЛЬНІ БАКТЕРІЇ***

***Методичні вказівки  
для студентів II–III курсів  
спеціальності "Медицина", "Стоматологія"  
освітньо-кваліфікаційного рівня "Магістр"***