

***ЗБУДНИКИ ПОВІТРЯНО-КРАПЛИННИХ
БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ.
ЗБУДНИКИ КОКЛЮШУ.***

***Методичні вказівки
для студентів II-III курсів спеціальності
«Медицина», «Педіатрія» і «Стоматологія»
освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр»***

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Харківський національний медичний університет

**Збудники повітряно-краплинних
бактеріальних інфекцій.
Збудники коклюшу**

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

Затверджено Вченою радою ХНМУ.
Протокол № 10 від 21.11. 2019.

**Харків
ХНМУ
2019**

Збудники повітряно-краплинних бактеріальних інфекцій. Збудники коклюшу : метод. вказ. для студентів-магістрів II–III курсів спеціальності "Медицина", "Педіатрія" і "Стоматологія" освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр»/ упоряд. Т. М. Замазій, Н. І. Коваленко. – Харків : ХНМУ, 2019. – 48 с.

Упорядники Т.М. Замазій,
Н.І. Коваленко.

Тема: Лабораторна діагностика коклюшу

Кількість годин: 1.

Обґрунтування теми:

Коклюш – гостре інфекційне захворювання дихальних шляхів, основний симптом якого – напади судомного кашлю. Збудник коклюшу *Bordetella pertussis* був виділений у 1906 р. Ж. Борде і О. Жангу. У 1937 р. був відкритий збудник паракоклюшу *Bordetella parapertussis*.

Сприйнятливість до коклюшу висока: індекс контагіозності становить до 70–100 % у нещеплених дітей першого року життя, особливо новонароджених і недоношених. У віковій структурі більшість хворих становлять школярі 7–14 років – до 50 %, діти 3–6 років – до 25 %, найменшу частку – діти у віці 1–2 роки – 11 % і діти до 1 року – 14 %. Нерідкі захворювання серед дорослих. За спостереженнями, проведеними в осередках, частота захворювань дорослих становить до 24%.

Після перенесеного коклюшу в умовах високого охоплення дітей щепленнями і низького рівня циркуляції збудників стійкий імунітет зберігається протягом 20–30 років, після чого можливі повторні випадки захворювання.

Летальність у даний час низька, проте, ризик її зберігається у новонароджених і недоношених дітей, а також хворих з вродженими інфекціями.

Мета:

– загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою коклюшу;

– 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 коклюш.

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

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення збудників коклюшу.

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

Існує вісім видів роду *Bordetella*. Найважливіший збудник коклюшу людини – *B. pertussis*. *B. parapertussis* може періодично викликати коклюшоподібний синдром у людини. *B. bronchiseptica* та *B. holmesii* – рідкісні збудники людини, що викликають коклюшоподібний синдром. *B. bronchiseptica* виділяється від багатьох тварин і є причиною коклюшу у собак. Інші види *B. hinzii* і *B. trematum*, які рідко спричиняють сепсис у людини. *B. avium* викликає респіраторні захворювання у птахів, а *B. petrii* – екологічний ізолят.

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Бордетели мають форму овоїдної палички (коко-бактерії), розміром $0,2\text{--}0,5 \times 1\text{--}1,2$ мкм (*B. parapertussis* трохи більша – $0,6 \times 2$ мкм), містяться в мазках поодинокі, інколи попарно (рис. 1). Спор не утворюють, продукують капсулу, нерухливі, грамнегативні, утворюють пілі.

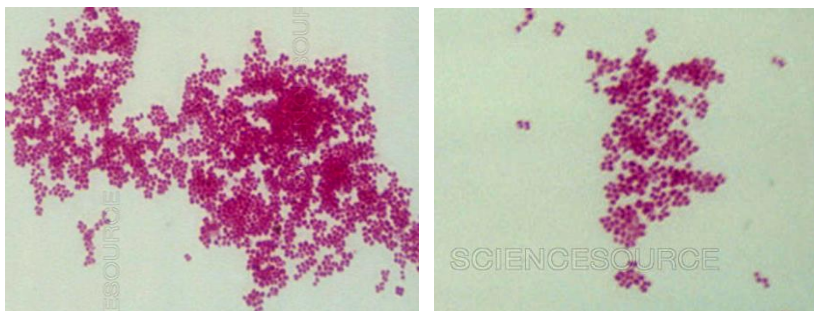


Рис. 1. Морфологія *B. pertussis* і *B. parapertussis*

Культуральні властивості. Бордетели - облігатні аероби, належать до гемофільних бактерій. Оптимальними умовами росту є температура $35\text{--}36$ °С, рН $6,8\text{--}7,4$, підвищена вологість і вміст CO_2 .

B. pertussis вибаглива до поживних середовищ і не росте на МПА і МПБ. Для їх розвитку в середовищі обов'язково повинні бути три амінокислоти: пролін, цистеїн, глютамінова кислота. Крім того, в процесі життєдіяльності бордетел у поживному середовищі накопичуються метаболіти (сульфіди, ненасичені жирні кислоти, перекисні сполуки), здатні пригнічувати ріст. Тому поживні середовища для культивування бордетел містять речовини з високою адсорбційною здатністю (кров, альбумін, активоване вугілля).

Для первинного виділення культури *B. pertussis* використовують середовища Борде-Жангу (картопляно-гліцеринний агар з кров'ю) і казеїново-вугільний агар (КВА). Для пригнічення сторонньої мікрофлори до середовищ додають антибіотики пеніцилін або цефалексин.

Колонії з'являються через 3–4 доби, дрібні (до 1–4 мм у діаметрі), гладенькі, блискучі, прозорі, куполоподібні, з металічним блиском, схожі на краплі ртуті або половинки перлин, в'язкої консистенції (рис. 2, 3). Навколо колоній всі бордетели утворюють зону слабого гемолізу.

B. parapertussis і *B. bronchiseptica* не вибагливі до поживних середовищ, ростуть на МПБ, МПА, казеїново-вугільному агарі і середовищі Борде–Жангу. Колонії *B. parapertussis* за зовнішнім виглядом майже не відрізняються від колоній *B. pertussis*, але більші і з'являються через 2–3 доби (рис. 2). Крім того, на казеїново-вугільному агарі *B. parapertussis* спричинюють появу буро-коричневого забарвлення і потемніння середовища за рахунок виділення тирозинази, яка розщеплює амінокислоту тирозин (ця амінокислота завжди міститься у білках) з утворенням продуктів відповідного кольору. Колонії *B. bronchiseptica* з'являються через 1–2 доби, вони подібні до колоній інших бордетел, але більш плоскі з піднятим центром. Під час стереоскопічної мікроскопії видно вузький промінь світла ("хвостик", "промінець"), що відходить від центра колонії бордетел (відбивається поверхнею колонії).

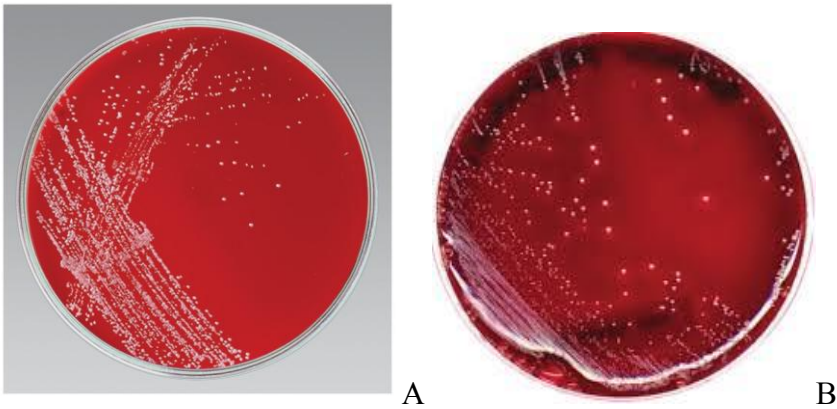


Рис. 2. Колонії *B. pertussis* (А)
і *B. parapertussis* (В) на середовищі Борде–Жангу

Ферментативні властивості. Бордетели мають низьку ферментативну активність (табл. 1). Вони не ферментують вуглеводи, не розріджують желатин, не утворюють індол і H_2S . *B. pertussis* ферментативно найменш активна (позитивний тест на оксидазу). *B. parapertussis* продукує ферменти тирозиназу і уреазу і не утворює оксидази. Тирозиназа каталізує продукцію пігментів із тирозину, що міститься у поживних середовищах, та спричиняє їх потемніння. Найбільш активна *B. bronchiseptica*: продукує уреазу, оксидазу, утилізує цитрати, відновлює нітрати до нітритів.



Рис. 3. Колонії *B. pertussis* на казеїново-вугільному агарі

Таблиця 1

Диференційні ознаки видів роду *Bordetella*

Види	Оксидаза	Уреаза	Тирозиназа	Нітрати до нітритів	Утилізація цитратів
<i>B. pertussis</i>	+	–	–	–	–
<i>B. parapertussis</i>	–	+	+	–	–
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	–	+	+

Антигенні властивості. В антигенному відношенні неоднорідні. У бордетел виділяють родові, видові і типоспецифічні антигени. Антиген, який зумовлює утворення аглютининів (аглютиноген), складається з декількох компонентів. Вони названі факторами і позначаються цифрами від 1 до 16 (табл. 2). Фактор 7 є родовим, *B. pertussis* містить фактор 1, *B. parapertussis* – 14, *B. bronchiseptica* – фактор 12, інші зустрічаються у різних комбінаціях; для збудника коклюшу це фактори 2, 3, 4, 5, 6, для паракашлюку – 8, 9, 10. Реакція аглютинації з адсорбованими факторними сироватками дає змогу диференціювати види бордетел і визначати їх антигенні варіанти.

Таблиця 2

Аглютиногени бордетел

Види	Загальнородові	Видові	Внутрішньовидові (штамові)
<i>B. pertussis</i>	7	1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 16
<i>B. parapertussis</i>		14	8, 9, 10
<i>B. bronchiseptica</i>		12	8, 9, 10, 11

Залежно від наявності у бактерій аглютиногенів 2 і 3 виділяють чотири серотипи *B. pertussis*: 1.2.0; 1.0.3; 1.2.3; 1.0.0. Поняття про аглютиноген тісно пов'язане з фімбріями (Fim). У геномі всіх *B. pertussis* є гени *fim2* і *fim3*, тобто теоретично будь-який штам може продукувати аглютиногени 2 і / або 3. Фімбрії належать до складу деяких безклітинних кашлюкових

вакцин. Сиротипіювання *B. pertussis* засноване на аглютинації бактеріальних клітин монофакторними сироватками, тобто антитілами до аглютиногенів, або моноклональними антитілами до фімбріальних антигенів у реакції аглютинації на склі і у мікропланшеті.

Фактори патогенності:

✓ *поверхневі антигени* (філаментозний гемаглютинин, пертактин і протективні аглютиногени) – фактори адгезії; для бордетел характерний тропізм до циліарного (від новолат. *cilia* – ворсинки) епітелію дихальних шляхів.

Філаментозний гемаглютинин – поверхневий білок, який бере участь у адгезії, має протективні властивості. Належить до складу безклітинних кашлюкових вакцин. На відміну від токсину гемаглютинин не є суто специфічним для *B. pertussis*, він міститься також у *B. parapertussis*, може давати перехресні реакції з *H. influenzae*, *C. pneumoniae* та низкою інших бактерій.

Пертактин – білок зовнішньої мембрани, належить до системи адгезинів, що продукуються бактеріями під час потрапляння до людського організму. Має захисні властивості, належить до складу деяких безклітинних коклюшних вакцин.

✓ *термолабільний екзотоксин* (коклюшний токсин, лімфоцитозстимулюючий або гістамінсенсibiliзуючий фактор) – головний фактор патогенності *B. pertussis*, уражає нервову і судинну систему, подібний до дифтерійного екзотоксину, має системний вплив (гематологічне і імуносупресивне). Це екзотоксин, білок з молекулярною масою 117 000 Да, що складається з двох функціональних частин (А і В) і п'яти структурних субодиниць (S1-S5): фрагмент А (відповідає субодиниці S1) має ферментативну активність, пригнічує клітинну аденілатциклазу. Ділянка В (складається з субодиниць S2-S5) відповідає за приєднання токсину до рецепторів клітин-мішеней. Токсин має високу імуногенність, в інактивованій формі належить до складу всіх безклітинних кашлюкових вакцин. Визначення антитіл до коклюшного токсину методом ІФА застосовується для діагностики коклюшу та контролю ефективності вакцинації.

✓ ендотоксин проявляє сенсibiliзуючу і загальнотоксичну дію;

✓ термолабільний дермонекротичний токсин спричиняє некроз тканин, стимулює формування гіперчутливості до гістаміну, серотоніну, що може призвести до анафілактичного шоку;

✓ трахеальний цитотоксин призводить до місцевих ушкоджень, руйнує миготливий епітелій. Трахеальний цитотоксин – фрагмент пептидоглікану клітинної стінки. Має різні біологічні властивості: пірогенність, ад'ювантна, артритогенність, стимуляція продукції ІЛ-1. *In vitro* токсин вражає трахеальні епітеліальні клітини і призводить до ціліостазу. При цьому порушується мукоциліарний кліренс – перша лінія захисту і створюються умови для персистенції інфекції;

- ✓ капсула пригнічує фагоцитоз;
- ✓ ферменти агресії: гіалуронідаза, плазмокоагулаза, лецитиназа;
- ✓ аденилатциклаза-гемолізін (комплекс екзоферменту аденилатциклази, яка каталізує утворення цАМФ, з токсином – гемолізином, поряд з кашлюковим токсином обумовлює розвиток характерного судомного (спазматичного) кашлю). Токсин – основний фактор патогенності, діючий на початковому етапі інфекції, крім того з ним пов'язують захисні властивості комплексу;

- ✓ ліпополісахарид: до його складу належать два ліпіди: А і Х. З Х-фракцією пов'язана біологічна активність ліпополісахариду. Він має множинні функції, у тому числі вираженою імуногенністю; з ним пов'язують реактогенність клітинної вакцини.

Усі вищезгадані фактори є у свіжовиділених штамів коклюшного мікробу. Однак при зберіганні на штучних поживних середовищах проявляється мінливість збудника. Установлено, що в процесі сапрофітизації коклюшний мікроб проходить чотири фази: свіжовиділений мікроб (гладкий штам), що володіє високими вірулентними й імуногенними властивостями, належить до першої фази. У процесі переходу до четвертої фази поступово втрачається імуногенність, вірулентність, змінюються культурально-біологічні властивості.

Резистентність. Бордетели не стійкі у навколишньому середовищі, вони чутливі до ультрафіолетових променів, дезінфекційних засобів у звичайних концентраціях. При температурі 56–60 °С гинуть через 10–15 хв., але останнім часом виділяються штами, які витримують цю температуру протягом 30–40 хв. У висушеному мокротинні вони гинуть через декілька годин, чутливі до низької температури, малочутливі до антибіотиків, стійкі до пеніциліну.

Епідеміологія. Коклюш і паракклюш – антропонозні інфекції.

Резервуаром і джерелом інфекції є тільки людина (хворі типовими і атиповими формами коклюшу, а також здорові бактеріоносії). Найбільш небезпечним джерелом інфекції є діти, хворі на коклюш і паракклюш, у перші 2 тижні захворювання. Бордетела може також передаватися на останньому етапі інкубаційного періоду коклюшу, коли ознаки ще не виражені. Носійство збудників у дітей молодшого віку спостерігається дуже рідко, у дітей віком 3–10 років – у 1–2 % і не перевищує 14 днів.

Джерелом коклюшоподібного захворювання, спричиненого *B. bronchiseptica*, можуть бути свійські і дикі тварини, серед яких виникають епізоотії (свині, кролики, собаки, кішки, шури тощо). Вважають, що *B. bronchiseptica* може належати до складу нормальної мікрофлори дихальних шляхів людини.

Передача збудника відбувається у катаральній стадії і стадії судомного кашлю повітряно-краплинним шляхом (при кашлі, чханні, розмові).

До інфекції сприйнятливі люди будь-якого віку, але найбільше – діти віком від 1 до 10 років. Хворіють діти віком і до 1 року, що пов'язують з недостатністю материнського імунітету і можливою відсутністю трансплацентарної передачі специфічних антитіл. Можливо, і серед дорослих коклюш трапляється частіше, але не виявляється через те, що його перебіг не супроводжується судомою. Захворюваність після контакту досягає 90 % серед неімунізованих осіб.

Патогенез. Вхідними воротами є слизова верхніх дихальних шляхів. Коклюшні мікроби поширюються бронхогенним шляхом, досягаючи бронхіол і альвеол. Бактеріємія для хворих на кашлюк не характерна.

Коклюшні мікроби прикріплюються до клітин миготливого епітелію, де вони розмножуються на поверхні слизової оболонки, не проникаючи в кровотік. На місці проникнення збудника розвивається запальний процес, пригнічується діяльність війкового апарату клітин епітелію і збільшується секреція слизу. Надалі розвивається виразка епітелію дихальних шляхів і локальний некроз. Патологічний процес найбільш виражений у бронхах і бронхіолах, менш виражені зміни розвиваються у трахеї, гортані і носоглотці.

Зруйнований епітелій дихальних шляхів створює велику загрозу вторинної інфекції, що призводить до тяжких ускладнень. Крім того, слизово-гнійні пробки закривають дрібні бронхи, внаслідок чого розвивається місцеве порушення дихання і кровообігу у легенях.

Спостерігається перибронхіальна інфільтрація. Порушується легенева вентиляція, збільшується проникність судин → гіпоксемія і ацидоз. Формується реакція ГЧПТ (сильний бактеріальний алерген). У генезі судомних нападів має значення сенсibiliзація організму до токсинів кашлюкової палички. Постійне подразнення рецепторів дихальних шляхів обумовлює кашель і призводить до формування у дихальному центрі вогнища збудження типу домінанти. Внаслідок цього типові напади спазматичного кашлю можуть бути спричинені і неспецифічними подразниками. З домінантного вогнища збудження може віддавати і на інші відділи нервової системи, наприклад на судиноруховий (підвищення артеріального тиску, спазм судин). Іррадіацією збудження пояснюється також поява судомних скорочень м'язів обличчя і тулуба, блювоти та інших симптомів коклюшу.

У розвитку коклюшу виділяють три стадії, провідну роль у яких відіграють різні фактори патогенності:

1. Адгезія, у якій беруть участь пертактин, філаментозний гемаглютинін, аглютиногени;
2. Локальне пошкодження, основними факторами, якого є трахеальний цитотоксин, аденілатциклаза-гемолізін і коклюшний токсин;
3. Системні ураження під дією коклюшного токсину.

Коклюшний токсин, що має аденозиндифосфатрибозилтрансферазну активність, впливає на внутрішньоклітинний обмін іонізованого кальцію (роботу «кальцієвого насосу»), обумовлюючи розвиток судомного компонента кашлю, судом при важкій формі коклюшу, а також гематологічних та імунологічних змін (у тому числі розвиток лейкоцитозу і лімфоцитозу, підвищення чутливості організму до гістаміну й інших біологічно активних речовин з можливістю розвитку гіперергії з IgE-опосередкованим механізмом алергічних реакцій).

У структурі системних уражень при коклюші домінують:

1. Розлад центральної регуляції дихання.
2. Порушення функції зовнішнього дихання з розвитком спастичного стану дихальних шляхів у поєднанні з продуктивним запаленням у перибронхіальній, периваскулярній та інтерстиціальній тканинах.
3. Порушення капілярного кровотоку через ураження судинної стінки з гострим розладом крово- і лімфообігу (повнокров'я, крововиливи, набряк, лімфостаз) переважно у місці запалення (органи дихання).
4. Дисциркуляторні порушення у головному мозку і порушення внутрішньоклітинного метаболізму мозкової тканини переважно за рахунок гіпоксії з можливістю некробіотичних змін нервових клітин (їх лізісом з подальшою гліальною реакцією при важких формах захворювання).
5. Пригнічення судинних центрів і блокада β -адренорецепторів під дією коклюшного токсину поряд із порушенням капілярного кровотоку і впливом гіпоксії є причиною порушень з боку серцево-судинної системи.
6. Зниження неспецифічної резистентності (фагоцитозу) і порушення механізмів цитокінової регуляції Т-клітинної ланки імунітету з розвитком вторинного імунодефіцитного стану.

Коклюшна паличка і продукти її життєдіяльності спричиняють тривале подразнення рецепторів аферентних волокон блукаючого нерву, імпульси з якого спрямовуються у ЦНС, зокрема дихальний центр, що призводить до формування у ньому застійного вогнища збудження, що характеризується ознаками домінанти за А. А. Ухтомським.

Основними ознаками домінантного вогнища під час коклюшу є:

- підвищена збудливість дихального центру і здатність підсумувати подразнення (іноді досить незначного подразника для виникнення нападу судомного кашлю);
- здатність специфічної відповіді на неспецифічний подразник: будь-які подразники (больові, тактильні та ін.) можуть призводити до виникнення судомного кашлю;
- можливість іррадіації збудження на сусідні центри:
 - а) блювотний (з відповідною реакцією – блювотою, якою нерідко закінчуються напади судомного кашлю);

б) судинний (з відповідною реакцією – підвищення артеріального тиску, спазм судин з розвитком розладу мозкового кровообігу і набряку головного мозку);

в) центр скелетної мускулатури (з відповідною реакцією у вигляді тоніко-клонічних судом);

- стійкість (тривалий час зберігається активність);
- інертність (вогнище, яке сформувалось, періодично слабшає і посилюється);
- можливість переходу домінантного вогнища у стан парабіозу (станом парабіозу дихального центру пояснюються затримки і зупинки дихання у хворих на коклюш).

Формування домінантного вогнища відбувається вже на початку захворювання (у пресудомному періоді), однак найбільш яскраво його ознаки проявляються у судомному періоді, особливо на 2-3-му тижні.

Відповідною реакцією є кашель (по типу безумовного рефлексу), який на стадії локальних ушкоджень (пресудомний, катаральний період, початковий період коклюшу) має характер звичайного трахеобронхіального, згодом (на стадії системних уражень у період судомного кашлю, спазматичного кашлю, розпаду захворювання) набуває нападоподібного судомного характеру.

Клінічна картина. Інкубаційний період триває 3–14 діб, найчастіше – 5–8 діб.

Симптоматика складається з 3 періодів: *катарального, пароксизмального і завершального*.

Катаральний період. Перші прояви коклюшу схожі з перебігом ГРВІ або бактеріальної інфекції верхніх дихальних шляхів (*табл. 3*):

- підвищення температури тіла до +38 °С, що супроводжується ознобом, погіршенням загального самопочуття, хоча можливо і перебіг захворювання без гіпертермії;
- слабкість, «ломота» в м'язах, головний біль;
- катаральні явища: прозорі виділення з носових ходів, закладеність носа, сухий кашель, набряклість слизових.

Таблиця 3

Клінічні критерії діагностики коклюшу

Ознака	Характеристика
Інтоксикаційний синдром	Відсутній протягом усього захворювання (як у пресудомному періоді, так і в періоді судомного кашлю) при відсутності ускладнень або супутніх інфекцій
Лихоманка	Відсутня протягом усього захворювання (як у пресудомному періоді, так і в періоді судомного кашлю) при відсутності ускладнень або супутніх інфекцій

Ознака	Характеристика
Катаральний синдром	У перші 1–2 тиж захворювання: наявність сухого, непродуктивного, нав'язливого кашлю, наростаючого у динаміці, незважаючи на проведену симптоматичну терапію, на тлі задовільного стану і гарного самопочуття дитини, відсутності або слабкої виразності інших катаральних явищ і об'єктивних змін з боку верхніх і нижніх дихальних шляхів. З 2–3 тиж захворювання зміна характеру кашлю на нападopodobний судомний з гіперемією або ціанозом особи, репризами, сльозотечею, відходженням в'язкого мокротиння або блювотою після нападу кашлю. Характерно посилення кашлю у нічний час, при пробудженні, під час прийому їжі, після фізичного та емоційного навантаження
Синдром набряків	Зниження діурезу в період розпалу захворювання (на 1–2 тиж періоду судомного кашлю); набряклість обличчя
Геморагічний синдром	Носові кровотечі під час нападу кашлю, субкон'юнктивальні крововиливи у куточках очей, елементи петехіального висипу на обличчі
Характерний симптом	Надрив або виразка вуздечки язика

Відзначаються також гіперемія зіву, прискорене серцебиття, прискорений ритм дихання. Тривалість катаральної стадії коклюшу – 7–10 днів. Якщо захворів новонароджений, то може відзначатися стрімкий розвиток захворювання, коли судомна стадія настає через 2–3 дів після появи перших ознак патології.

У цей період збудник найбільш інтенсивно виділяється з організму.

Пароксизмальний період (від грец. *paroxysmos* - подразнення, збудження) триває від 2–3 тиж до 4–8 тиж. Характерний симптом коклюшу нападopodobний судомний кашель обумовлений тонічною судомою дихальної мускулатури.

Пароксизмальний період характеризується нападом невинного кашлю до 20–30 разів на добу, який може бути спровокований і неспецифічними подразниками (світло, запах, дим, звук, медичний огляд, маніпуляції). Під час нападу обличчя хворого червоніє, потім набуває синюшного відтінку, на очах виступають сльози, інколи утворюються крововиливи у оболонку очей, виділяється в'язке мокротиння, шийні вени набухають, м'язи ший напружені, можливе невимушене виділення сечі і калу. Язик висовується з ротової порожнини до межі, кінчик його піднімається догори. У результаті тертя вуздечки язика об зуби і її надмірного механічного розтягнення відбувається надрив або утворення виразки. Надрив або виразки язичка - характерний симптом коклюшу.

Напад кашлю починається з характерних відчуттів нестачі повітря, наявності стороннього предмета у горлі. Діти молодшого віку не можуть відчувати наближення нападу, однак з 5–6 років дитина вже здатна усвідомлювати початок характерних нападів кашлю.

Надалі:

- кілька кашльових поштовхів на видиху з характерним «гавкаючим» звуком;
- довгий судомний вдих-реприз, який виникає під час проходження повітря через звужену голосову щілину (внаслідок ларингоспазму) і супроводжується сипінням, свистом;
- наступна серія кашлю на видиху.

Після кожного нападу, викликаного спазмом, мокрота починає відходити з дихальних шляхів. У разі значного пошкодження епітелію у густому секреті можуть спостерігатися включення крові.

Різкі спазми дихальних шляхів, у першу чергу, трахеї, нерідко призводять до блювоти, що спричинена перенапруженням м'язів. Напруга під час кашлю є причиною характерного зовнішнього вигляду хворих на коклюш: одутлість обличчя, сліди крововиливів на склерах очей, у куточках рота (рис. 4). На поверхні язика можуть розвиватися білі щільні виразки, на вуздечці - травма внаслідок тертя об зуби під час кашльових нападів.



Рис. 4. Зовнішній вигляд хворого на коклюш

Кашель може супроводжуватися конвульсіями (від лат. *convulsivus* – судомний), ціанозом, затримкою дихання. Після нападу у дітей, особливо раннього віку, виникає болючий інспіраторний стридор (від лат. *stridor* – свист, скрип), спричинений спазмом гортані.

Нападу може передувати аура (почуття страху, занепокоєння, чхання, першіння у горлі та ін.). Напади кашлю можуть бути короточасними або тривати 2–4 хв. Можливі пароксизми – концентрація нападів кашлю під час короткого проміжку часу.

Напади кашлю, часте блювання призводять до порушення вживання їжі, зневоднення організму. Внаслідок цього розвивається виснаження, пригнічення свідомості. У проміжках між нападами кашлю діти відчують себе задовільно.

Поза нападом кашлю зберігаються одутлість і набряклість обличчя хворого, набряклість повік, блідість шкіри, періоральний ціаноз; можливі субкон'юнктивальні крововиливи, петехіальний висип на обличчі та шії.

Характерним є поступовий розвиток симптомів з максимальною участю і навантаженням нападів судомного кашлю на 2-му тижні судомного періоду; на 3-му тижні виявляються специфічні ускладнення; на 4-му тижні – неспецифічні ускладнення на тлі вторинного імунodefіциту.

Під час певного періоду, що характерний судомами є виражені зміни у легенях. Напади кашлю поступово частішають і досягають свого максимуму на другому тижні спазматичного періоду.

Ураження органів дихання є основним симптомокомплексом під час коклюшу. Розрізняють варіанти патологічних змін: 1) пневмококлюш або «коклюшні легені»; 2) бронхіт; 3) пневмонія і 4) ателектаз.

Пневмонія під час коклюшу частіше виникає у зв'язку з приєднанням вторинної респіраторної інфекції – частіше ГРВІ та мікоплазмової інфекції.

Симптоми коклюшу посилюються надвечір через загальне збудження і втому, послаблення настає за умови забезпечення припливу свіжого повітря. Кашель може бути спровокований больовими відчуттями, фізичним навантаженням, прийомом їжі або лікарськими препаратами у твердій формі.

Тахікардія, задишка, виражені напади виснажливого кашлю є приводом для стаціонарного лікування дитини для надання допомоги, якщо виникає потреба у підключенні до апарату штучного дихання.

Небезпечні сильні напади судомного кашлю, що супроводжуються спазмами бронхіального дерева і трахеї, що призводить до гіпоксії міокарда, явищам кисневої недостатності головного мозку і м'язових тканин. Виражений спастичний синдром частіше спостерігається у дітей віком до 3-х років.

Відсутність своєчасної терапії або недотримання приписів фахівця можуть призвести до виникнення змін у серцевому м'язі з розширенням меж органу, виникнення некротичних вогнищ у легенях.

Завершальний період (період реконвалесценції) триває 2–4 тиж, інколи до 2–6 міс. Напади кашлю стають менш тривалими, виникають не так часто. Під час кашлю постійно виділяються шматочки некротизованих часток слизової оболонки трахеї та бронхів.

Період зворотного розвитку (раньої реконвалесценції) триває від 2 до 8 тиж. Кашель втрачає типовий характер, виникає рідше і стає легше. Поліпшуються самопочуття і стан дитини, зникає блювота, нормалізуються сон і апетит.

Період пізньої реконвалесценції триває від 2 до 6 міс. У цей час зберігається підвищена збудливість дитини, можливі слідові реакції (повернення нападopodobного судомного кашлю при нашаруванні інтеркурентних захворювань).

Відзначається скорочення кількості нападів кашлю і загальне поліпшення самопочуття дитини. У середньому протягом 2-х тижнів ще зберігається залишковий кашель, який не викликає перенапруження організму. Ще 2 тиж зберігаються прояви хвороби, після чого напади закінчуються.

Протягом періоду зворотного розвитку важливо оберігати дитину від вірусних і бактеріальних інфекцій, сильних стресів, емоційних переживань, у тому числі і радісних: вони можуть часто провокувати напади кашлю.

У середньому кашель та інші ознаки коклюшу зникають самостійно протягом 1–2 міс, але кашлеві напади можуть відновлюватися на тлі захворювань, переохолодження або стресів протягом півроку після закінчення хвороби.

Температура протягом усього періоду – нормальна.

Може бути стертий перебіг (в основному у щеплених) – відсутні напади кашлю, який являє собою епідеміологічну небезпеку.

Класифікація коклюшу.

За типом:

1. Типовий.
2. Атиповий:
 - абортивний;
 - стертий;
 - безсимптомний;
 - транзиторне бактеріоносійство.

За ступенем тяжкості:

1. Легка форма.
2. Середньоважка форма.
3. Важка форма.

Тяжкість хвороби визначається частотою і характером нападів кашлю, наявністю ускладнень і виразністю ознак кисневої недостатності між нападами кашлю (*табл. 4*).

Таблиця 4

Критерії оцінки ступеню тяжкості коклюшу за клінічними ознаками

Ознаки	Ступінь тяжкості		
	Легкий (70–80 %)	Середньоважкий (20–29,5 %)	Важкий (0,5 %)
Гіпоксія	Не має	Ціаноз носогубного трикутника	Ціаноз обличчя під час кашлю
Тривалість передсудомного періоду	7–14 діб	7–10 діб	3–5 діб
Частота нападів кашлю	До 10 на добу; репризи рідко	10–20 на добу; репризи часто	Більше 20 на добу; пароксизми
Блювота після кашлю	Не має	Характерна	Можлива
Стан у періоді між нападами	Активний, апетит збережений	Активний, апетит знижений	Млявий, апетит відсутній
Строки розвитку ускладнень	Не має	На 3–4 тижні	З 1 тижня
Апноє	Не має	Не має	Характерне
Порушення функції серцево-судинної системи	Не має	Слабко виражене	Виражене

Ознаки	Ступінь тяжкості		
	Легкий (70–80 %)	Середньоважкий (20–29,5 %)	Важкий (0,5 %)
Судомний синдром	Не має	Не має	характерний
Лейкоцитоз	$10\text{--}15 \times 10^9$ кл/л	до $20\text{--}30 \times 10^9$ кл/л	більше 40×10^9 кл/л
Лімфоцитоз	до 70 %	70–80 %	більше 88 %

Критерії тяжкості:

- вираженість симптомів кисневої недостатності;
- частота і характер нападів судомного кашлю;
- стан дитини між нападами;
- вираженість набрякового синдрому;
- наявність специфічних і неспецифічних ускладнень;
- вираженість гематологічних змін.

За характером перебігу:

1. Гладкий.

2. Негладкий:

- з ускладненнями;
- з нашаруванням вторинної інфекції;
- із загостренням хронічних захворювань.

Атипові форми коклюшу. *Абортивна форма* - період судомного кашлю починається типово, але дуже швидко закінчується (протягом тижня).

Стерта форма – у дитини протягом усього періоду захворювання зберігається сухий нав'язливий кашель, нападopodobний судомний кашель не спостерігається.

Безсимптомна (субклінічна) форма – клінічні прояви захворювання відсутні, але збудник висівається, є повторне виділення його ДНК з мазку з задньої стінки глотки / носоглотки і (або) наростання титрів специфічних антитіл у крові.

Транзиторне бактеріоносійство – висів або виділення ДНК коклюшної палички за відсутності клінічних проявів захворювання і без наростання титрів специфічних антитіл у динаміці дослідження. Бактеріоносійство у дітей спостерігається рідко (у 1,0–2,0 % випадків), як правило, у щеплених дітей. Носій інфекції є джерелом збудника, заражає оточуючих.

Атипові форми кашлю частіше відзначаються у дорослих і щеплених дітей.

Особливості коклюшу у нещеплених дітей раннього віку. Інкубаційний і передсудомний періоди скорочені до 1–2 діб, період судомного кашлю подовжений до 6-8 тижнів. Переважають тяжкі і середньотяжкі форми захворювання. Напади кашлю можуть бути типовими, проте репризи і висовування язика спостерігаються рідше і виражені нечітко. Найчастіше відзначається ціаноз носогубного трикутника і обличчя. У ново народжених, особливо недоношених, кашель слабкий, малогучний, без реприз,

без різкої гіперемії обличчя, але з ціанозом. Мокротиння під час кашлю виділяється менше, так як діти його ковтають. У результаті дискоординації різних відділів дихальних шляхів, у тому числі м'якого піднебіння, слиз може виділятися з носа.

У дітей перших місяців життя замість типових нападів кашлю відзначаються їх еквіваленти (чхання, невмотивований плач, крик). Характерний геморагічний синдром: крововиливи у ЦНС, рідше - у склери і шкіру. Загальний стан хворих між нападами порушений: діти мляві, втрачаються набуті до моменту захворювання навички. Часто розвиваються специфічні, у тому числі загрозливі для життя ускладнення (апное, коклюшна енцефалопатія) з розвитком невідкладних станів (порушення ритму дихання, судоми, пригнічення свідомості, крововиливи і кровотечі).

Порушення ритму дихання (затримки і зупинки дихання) можуть виникати як під час нападу кашлю, так і поза нападом (уві сні, після вживання їжі). Апное при коклюші у дітей перших місяців життя поділяється на спазматичне і синкопальне. Спазматичне апное виникає під час нападу кашлю, триває від 30 с до 1 хв. Синкопальне апное, інакше зване паралітичним, не пов'язане з нападом кашлю. Дитина стає млявою, гіпотонічною. З'являється спочатку блідість, а потім ціаноз шкірних покривів. Настає припинення дихання при збереженні серцевої діяльності. Подібні апное тривають 1–2 хв.

У недоношених дітей за наявності морфофункціональної незрілості, перинатальне ураження центральної нервової системи або супутнього коклюшу ЦМВІ апное виникає частіше і може бути тривалим. Апное спостерігається переважно у дітей перших місяців життя. У літературі відсутні дані про тяжкі порушення ритмів дихання у дітей, які за віком старші одного року.

Коклюшна енцефалопатія є наслідком дисциркуляторних порушень у головному мозку на тлі гіпоксії і розвивається після частих і тривалих зупинок дихання у нещеплених дітей раннього віку, а також внаслідок внутрішньочерепного крововиливу.

Першими ознаками неврологічних розладів є загальне занепокоєння або, навпаки, гіподинамія, підвищена сонливість вдень і порушення сну вночі, тремор кінцівок, підвищення сухожильних рефлексів, легкі судомні посмикування окремих груп м'язів. При більш важкому перебігу коклюшно-енцефалопатії спостерігається судомний синдром з нетривалою втраченою свідомості.

З неспецифічних ускладнень найбільш часто виникає пневмонія. Можливі летальні випадки.

Вторинний імунodefіцит розвивається у ранні терміни (з 2–3-го тижня спазматичного кашлю) і значно виражений.

Особливості коклюшу у щеплених дітей. Щеплені проти коклюшу діти можуть захворіти внаслідок появи недостатнього імунітету або зниження його напруженості. Найчастіше відзначаються легкі і середньотяжкі форми захворювання, тяжкий перебіг не характерний. Часто зустрічаються атипові форми. Специфічні ускладнення трапляються рідко і не мають загрозливого для життя характеру. Летальних випадків не спостерігається. Найчастіше рееструються атипові форми коклюшу. Інкубаційний і передсудомний періоди подовжені до 14–20 діб, період спазматичного кашлю укорочений до 2 тиж. Репризи і блювота відзначаються рідше. Геморагічний і набряклий синдроми не характерні; перебіг захворювання частіше гладкий. Гематологічні зміни виражені слабо – відзначається незначний лімфоцитоз. При бактеріологічному дослідженні частіше виділяють *B. pertussis* серотипів 1.0.3 і 1.0.0. Наростання титру специфічних антитіл більш інтенсивне і відзначається на початку 2-го тижня періоду судомного кашлю.

Особливості коклюшу у підлітків і дорослих.

- Частіше хворіють жінки.
- Переважно відзначаються атипові або легкі форми.
- Специфічні ускладнення рідкі, загрозливі для життя ускладнення і летальні випадки не спостерігаються.

Ускладнення. Важка форма коклюшу може призводити до тривалої гіпоксії, порушень кровопостачання тканин головного мозку і міокарду.

Тривала гіпоксія є причиною структурних змін органів, розширення шлуночків і передсердь, небезпечних патологій, пов'язаних з порушеннями мозкової активності.

Нерідко спостерігається розвиток вторинного астматичного комплексу з регулярними нападами задухи на тлі вірусних захворювань дихальних шляхів.

Специфічні ускладнення:

- ателектаз (повне спадання бронхів) → порушення вентиляції → розмноження анаеробної мікрофлори → гангрена легенів;
- клапанна обтурація → емфізема → бронхоектатична хвороба (розмноження гноєтворних коків *Staphylococcus*, *Streptococcus*);
- виражена емфізема легенів, емфізема середостіння;
- порушення ритму дихання (затримки дихання – до 30 с і зупинки – апное – більше 30 с);
- коклюшна енцефалопатія;
- кровотечі (з носа, позаглоткового простору, бронхів, зовнішнього слухового проходу), крововиливи (у шкіру і слизові оболонки, склеру і сітківку, головний і спинний мозок);
- грижі (пупкова, пахова), випадіння слизової оболонки прямої кишки;
- розриви барабанної перетинки та діафрагми.

Неспецифічні ускладнення (пневмонія, бронхіт, ангіна, лімфаденіт, отит і ін.). Більшість ускладнень належать до вторинних бактеріальних інфекцій. На тлі ослабленого імунітету і скорочення інтенсивності руху лімфи у легеневій тканині можливі застійні явища, що обумовлює формування сприятливої мікрофлори для приєднання стафілококової, стрептокової, пневмококової та синьогнійної патогенної інфекції.

Резидуальні зміни. Хронічні бронхолегеневі захворювання (хронічний бронхіт, бронхоектатична хвороба); затримка психомоторного розвитку, невроз, судомний синдром, різні мовні розлади; енурез; рідко у нещеплених за відсутності етіопатогенетичної терапії – сліпота, глухота, парези, паралічі.

Диференціальна діагностика коклюшу. У періоді судомного кашлю необхідно проводити диференційну діагностику коклюшу з паракклюшем і захворюваннями, що мають перебіг з синдромом коклюшеподібного кашлю (мікоплазмоз, хламідіоз і респіраторно-синцитіальна (RS) інфекція, муковісцидоз, а також аспірація стороннього тіла). У рідкісних випадках доводиться виключати захворювання, що супроводжуються збільшенням внутрішньогрудних лімфатичних вузлів (лімфогранульоматоз, лейкози, туберкульоз внутрішньогрудних лімфатичних вузлів).

Параоклюш може бути діагностований тільки за наявності лабораторного підтвердження (бактеріологічного, ПЛР, серологічного). За клінічними ознаками і епідеміологічними даними (контакт з хворим, який тривало кашляє) паракклюш не відрізнити від коклюшу, проте в гемограмі відсутні характерні зміни (лейкоцитоз, лімфоцитоз). Дитина, яка перехворіла паракклюшем, потребує проведення профілактичних щеплень. В одному осередку можливе виявлення захворювань, викликаних як *B. pertussis* (A37.0), так і *B. parapertussis* (A37.1).

RS-інфекція частіше починається поступово, однак початковий її період короткий: 2–3 дні. Синдром інтоксикації виражений слабо або помірно, температура субфебрильна. Катаральні явища з боку верхніх дихальних шляхів виражені слабо: невеликий набряк слизової оболонки, не рясне серозне виділення з носа, кашель нав'язливий, малопродуктивний, часто нападаподібний. У клінічній картині переважають явища дихальної недостатності. У легенях вислуховуються сухі, свистячі хрипи, які крепетують, перкуторно - коробковий відтінок легеневого звуку. Виявляють рентгенологічні ознаки емфіземи легенів. В аналізах крові - лейкопенія, лімфоцитоз, нормальна ШОЕ. Діагноз підтверджується виявленням РНК респіраторно-синцитіального вірусу методом ПЛР, виявленням специфічних IgM в ІФА, а також виявленням антигенів вірусу в мазках-відбитках зі слизової оболонки задньої стінки глотки методами імунофлюоресценції (ІФ) або імуноцитохімії (ІЦХ).

Респіраторний хламідіоз починається поступово, частіше на тлі нормальної або субфебрильної температури. Виразений катаральний синдром: ринофарингіт, кон'юнктивіт. Кашель спершу сухий, але поступово набуває характеру нападів з періоральним ціанозом, тахіпноє, блювотою. Характерна невідповідність між незначними явищами інтоксикації і клінічно вираженою пневмонією. Можлива експіраторна задишка. У легенях – хрипи, крепетують на висоті вдиху, тимпанічний відтінок легеневого звуку, можливо його скорочення. На рентгенограмі виявляються множинні дрібнопористі інфільтровані тіні на тлі емфіземи і посилення легеневого малюнку. Характерні також шийний лімфаденіт і гепатоспленомегалія. У гемограмі – лейкоцитоз, нейтрофіліоз зі зрушенням формули, збільшена ШОЕ. Діагноз підтверджується виявленням специфічних IgM у сироватці крові методом ІФА, наростанням титру IgG у динаміці, виявленням антигенів збудників за допомогою ІФ або ІЦХ мазків-відбитків зі слизової носоглотки, фрагментів ДНК *S. pneumoniae* методом ПЛР у мазках з носоглотки.

Респіраторний мікоплазмоз може починатися гостро або поступово. Характеризується фебрильною лихоманкою або тривалим субфебрилітетом, а також невідповідністю між високою лихоманкою і помірно вираженим синдромом інтоксикації. Із перших днів захворювання виявляють гіперемію, ринофарингіт, склерит. Хворого непокоїть нападopodobний кашель, часто з болями в животі, відходженням в'язкого мокротиння або блювотою. При поступовому початку захворювання характер кашлю може змінюватися від сухого нав'язливого до нападів. Відзначають дисоціацію аускультативної і рентгенологічної картини («німі» пневмонії), вкорочення легеневого звуку, частіше справа або двостороннє. Характерні рентгенологічні ознаки інтерстиціальних, вогнищевих, дольових пневмоній, ателектазів. Поряд із зазначеними клінічними особливостями у хворих часто виявляються лімфаденопатія, гепатомегалія, можливі: висип, диспепсичний синдром, серозний менінгіт. У гемограмі – лейкоцитоз, нейтрофіліоз зі зрушенням формули, збільшена ШОЕ. Діагноз підтверджується виявленням специфічних IgM у сироватці крові методом ІФА, зростанням титру IgG у динаміці; виявленням антигенів збудників за допомогою ІФ або ІЦХ мазків-відбитків зі слизової носоглотки, фрагментів ДНК *M. pneumoniae* методом ПЛР у мазках із носоглотки, можливий посів на елективне середовище.

Муковісцидоз характеризується наявністю сімейних випадків захворювання, поступовим початком, проявляється з перших днів життя. Синдром інтоксикації відсутній, температура тіла нормальна, катаральних явищ немає. Характерне поступове посилення кашлю до нападів, з ціанозом, задишкою і відходженням в'язкого мокротиння. Вислуховуються різнокаліберні хрипи, тимпанічний відтінок легеневого звуку або його вкорочення. Характерні перібронхіальні, інфільтративні, склеротичні зміни легеневої тканини, емфізема, поширеність уражень. Екскременти ясні,

смердючі, в'язкі, блискучі. Характерні гіповітаміноз, гіпотрофія; у дітей старше 1 року - ознаки целіакії. Гемограма відповідає віковій нормі. Лабораторне підтвердження діагнозу включає: «потову пробу» (підвищення концентрації хлору і натрію в поті), «меконіальний тест» у новонароджених (збільшення кількості альбуміну в фекаліях), зниження ферментів підшлункової залози в дуоденальному вмісті, копрологічні ознаки ферментативної недостатності.

Сторонні тіла у гортані, трахеї і бронхах характеризуються гострим початком на тлі нормальної температури тіла, відсутні ознаки синдрому інтоксикації і катаральних явищ. В анамнезі, як правило, відзначається гра дитини з дрібними предметами або їх потрапляння до дихальних шляхів і кашель під час вживання їжі або гри. Кашель відразу має нападopodobний судомний характер, за наявності чужорідного тіла у гортані може супроводжуватися задихою, за наявності чужорідного тіла у трахеї та бронхах – блювотою або нападами задихи. Аускультативні і перкуторні дані обстеження легенів без особливостей, однак, за наявності чужорідного тіла у трахеї та бронхах може вислуховуватися хлопаючий шум під час удару стороннього тіла об нижню поверхню голосових зв'язок. Рентгенологічна картина залежить від рентгеноконтрастності чужорідного тіла і рівня ураження. Гемограма без особливостей. Для підтвердження діагнозу необхідне проведення ларинго- або бронхоскопії.

Імунітет. Коклюш, на який хворіла людина (як і протикоклюшне щеплення) не забезпечує напруженого довічного імунітету, тому можливі повторні захворювання на коклюш (близько 5 % випадків коклюшу припадає на дорослих людей). Перехресний імунітет проти інших бордетел НЕ розвивається.

Незважаючи на наявність трансплацентарної передачі деяких протикоклюшних антитіл, новонароджені діти не захищені від хвороби в перші місяці життя. Уроджений імунітет, обумовлений материнськими антитілами, не розвивається. Вірогідність зараження під час контакту становить 90 %. Дуже небезпечний для дітей віком до 2-х років.

Пасивно отримані антитіла зникають через кілька місяців. У шестимісячному віці тільки 4 % дітей мають антитіла проти коклюшу. Період, за який зміст анти-КТ, анти-ГА і аглютинінів зменшується наполовину, ймовірно дорівнює 36, 40 і 55 дням відповідно.

Частота виявлення протикоклюшних антитіл у різних вікових групах залежить від охоплення щепленнями проти коклюшу та інтенсивності циркуляції збудника в загальній популяції.

Серологічні дослідження показують, що частка осіб із виявленими IgG проти коклюшного токсину збільшується з віком, відображаючи частоту контактів з *B. pertussis*.

Мікробіологічна діагностика. Мікробіологічна діагностика проводиться трьома методами: бактеріологічним, серологічним та молекулярно-генетичним (табл. 5).

Таблиця 5

Методи лабораторної діагностики коклюшу

Метод	Показання
Бактеріологічний метод	Пацієнти з клінічними симптомами коклюшу, діти та дорослі, які кашляють більше 7, але не більше 21 дня; контактні діти і дорослі, які працюють у дитячих навчальних та лікувально-профілактичних установах
Молекулярно-генетичний метод (ПЛР)	Пацієнти з клінічними симптомами коклюшу, діти та дорослі, які кашляють більше 7, але не більше 28 днів; контактні діти і дорослі, які працюють у дитячих навчальних та лікувально-профілактичних установах
Серологічні методи (ІФА, РА)	Пацієнти з клінічними симптомами коклюшу, діти та дорослі, які кашляють більше 14 днів для щеплених дітей і дорослих і понад 21 день для нещеплених, контактні діти і дорослі, які працюють у дитячих навчальних та лікувально-профілактичних установах, незалежно від вакцинального статусу
Експрес-метод (РНІФ)	Пацієнти з клінічними симптомами коклюшу, діти та дорослі, які кашляють більше 7 днів

Лабораторні дослідження проводять з діагностичною метою та за епідемічними показаннями:

1) з діагностичною метою:

– дітям, які кашляють протягом 7 днів і більше, незалежно від вказівок на контакт із хворим на коклюш;

– дітям із підозрою на коклюш і коклюшоподібне захворювання за клінічними даними;

– дорослим із підозрою на коклюш і коклюшоподібне захворювання, які працюють у пологових будинках, дитячих лікарнях, санаторіях, дитячих освітніх установах і школах, у т.ч. закритого типу;

2) за епідемічними показаннями (особам, які були у контакті з хворим):

– дітям, які відвідують дитячі освітні установи, що знаходяться в дитячих лікарнях, санаторіях, в яких були виявлені хворі на коклюш / паракклюш, а також усім дітям до 14 років, які спілкувалися з хворим на коклюш / паракклюш у домашніх умовах;

– дорослим, які працюють у зазначених вище дитячих установах, при виявленні в них хворих на коклюш / паракклюш, а також при спілкуванні з хворим на коклюш / паракклюш у домашніх умовах.

Лабораторна діагностика визначається стадією захворювання. У катаральній стадії і на початку судомного кашлю діагностичним методом вибору є пряме виявлення збудника за допомогою ПЛР. Цей метод дозволяє швидко і ефективно досліджувати назально-фарингеальні мазки на наявність *B. pertussis* і *B. paraptussis*.

Молекулярно-генетичні методи (ПЛР) – виявлення генетичного матеріалу *B. pertussis* у мазку з глотки чи носа (забір мазка проводити лише дакроновим зонд-тампоном), або у промивних водах із носа.

Матеріал для дослідження для методу ПЛР:

– глибокий назально-фарингальний мазок без транспортного середовища: тупфер обережно ввести через ніздрю до задньої стінки зіву, обернути один раз і витягти з носового ходу. Витягти тупфер і вставити в пробірку без середовища.

– рідина після промивання носової і фарингальної порожнини, назально-фарингальний аспірат.

Метод ПЛР дозволяє протягом 6 годин виявити ДНК збудника на більш пізніх термінах захворювання, ніж бактеріологічний метод, і на тлі проведення антибіотикотерапії, проте максимальна ефективність методу на ранніх термінах (1–3 тиж від початку захворювання). При цьому наявність в анамнезі вакцинації проти коклюшу не впливає на результати ПЛР. Однак за допомогою ПЛР виявляються ДНК не тільки живих, але і загиблих мікробів, яка зберігаються в біологічному матеріалі від 1 тиж до 1 міс. У зв'язку з цим ДНК може бути виявлена на тлі клінічного одужання і після успішного лікування антибіотиками, тому ПЛР не рекомендується використовувати для підтвердження ефективності лікування.

Бактеріологічний метод є основним методом лабораторного підтвердження діагнозу коклюшу. Частота виділення залежить від термінів узяття матеріалу; на 1-у тижні захворювання позитивні результати вдається отримати у 95 % хворих, на 4-й – лише у 50 %, а починаючи з 5-го тижня, мікроб виділити вже не вдається.

Виділення *B. pertussis* із слизу задньої стінки глотки або носоглотки здійснюють на казеїново-вугільному агарі (КВА) або середовищі Борде–Жангу (картопляно-гліцеринний агар з додаванням крові, пеніциліну і цефалоспоринов 1 покоління з метою пригнічення кокової мікрофлори). Забір матеріалу здійснюють до початку антибактеріальної терапії не раніше, ніж через дві години після вживання їжі. Бактеріологічне дослідження з діагностичною метою слід проводити дворазово щодня або через день у ранні терміни захворювання (не пізніше 3-го тижня хвороби). У більш пізні терміни виділення бордетел різко знижується.

Відбір матеріалу на дослідження (слиз із задньої стінки глотки) проводять двома методами: методом "кашльових пластинок" і задньоглотковим тампоном (рис. 5). Матеріал беруть у спеціально відведеному приміщенні, виключаючи контакт з іншими дітьми, щоб повністю уникнути можливого взаємного зараження тих, кого обстежують.

Матеріал відбирають до вживання антибіотиків, натще або не раніше ніж через 2–3 год після споживання їжі. Якщо почали антибіотикотерапію, то брати матеріал слід тільки через 2–3 дні після припинення лікування.



Мал. 5. Відбір матеріалу задньоглотковим тампоном (А) і методом "кашльових пластинок" (В)

Матеріал, відібраний сухим тампоном, негайно засівають на підігріті поживні середовища (вата пригнічує ріст *B. pertussis*). Матеріал, відібраний зволеним тампоном, доставляють у лабораторію. Транспортують матеріал у межах температур 4–37 °С.

Під час відбирання матеріалу методом "кашльових пластинок" відкрити чашку Петрі з підігрітим до 37 °С середовищем тримають у вертикальному положенні під час нападу кашлю на відстані 8–10 см від рота дитини протягом 6–8 кашльових поштовхів. У разі коротких нападів кашлю цю чашку можна піднести ще раз (чашку у перерві між нападами треба тримати у термостаті при 37 °С).

Треба запобігати потраплянню на поверхню середовища мокротиння, блювотних мас, слизу. При транспортуванні матеріал оберігають від охолодження (загортають у папір, вату, у контейнер поміщають грілку, заповнену гарячою водою).

Методом "кашльових пластинок" недоцільно користуватися на ранніх стадіях захворювання, при легкому і атиповому перебігу хвороби та під час обстеження маленьких дітей. Для збільшення позитивного результату поєднують обидва методи відбору матеріалу. Виділену чисту культуру ідентифікують за культуральними, морфологічними, біохімічними й антигенними властивостями (табл. 6).

Таблиця 6

Диференційні ознаки видів роду *Bordetella*

Ознаки	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Ріст на середовищі Борде-Жангу (доба)	3–6	1–2	1
Рухливість	–	–	+
Відновлення нітратів	–	–	+
Уреазний тест	–	+	+
Оксидазний тест	+	–	+
Утилізація цитратів	–	+/-	+
Коклюшний токсин	+	–	–

Серологічний метод. Терміни обстеження. При первинній інфекції антитіла класів IgM і IgA утворюються не раніше другого тижня від появи клінічних симптомів, ще через 1 тиждень починають виявлятися і антитіла класу IgG, досягаючи свого максимуму до 6–8-го тижня, після чого їх рівень знижується. Після вакцинації утворюються антитіла класу IgG. IgG-антитіла можуть виявлятися до досягнення дорослого віку в низькій концентрації. У зв'язку з цим серологічну діагностику коклюшу і паракклюшу доцільно застосовувати не раніше третього тижня хвороби; оптимальні терміни для серологічної діагностики – з 3 по 6 тиж захворювання. Протягом 1 року після вакцинації проти коклюшу проводити серологічне дослідження з діагностичною метою не рекомендується. Слід враховувати, що у дітей, віком до 3 міс власні антитіла не утворюються, але можуть існувати материнські антитіла, які, як правило, визначаються в низьких титрах.

Серологічний метод є методом пізньої діагностики. Його використовують для підтвердження захворювання, у хворих з негативними результатами бактеріологічних досліджень, для ретроспективного діагнозу та виявлення колективів ризику. До груп ризику належать особам, у крові яких рівень протикоклюшних антитіл нижчий, ніж захисний, тобто нижчий за 1:80. Серологічні реакції – РА, РЗК, РПГА, ІФА – ставлять методом парних сироваток, взятих з інтервалом 1–2 тиж. Діагностичний титр при одноразовому обстеженні нещеплених пацієнтів – 1:80; найбільше значення має чотириразове наростання титру специфічних антитіл у парних сироватках, взятих з інтервалом 7–14 днів залежно від вакцинального статусу. Щепленим дітям дослідження слід проводити тільки в динаміці з інтервалом не менше 7 днів, незалежно від початкового титру специфічних антитіл. У дітей перших 2 років життя серологічні реакції часто бувають негативними через слабку імунну відповідь.

Для експрес-діагностики коклюшу використовують реакцію пластинчастої фарбованої мікрولاتекс-аглоутинації (РПФМЛА), за допомогою якої визначають протикоклюшні антитіла у слині. За допомогою експрес-методів (РНІФ) виявляють антигени коклюшної палички в браш-біоптаті з задньої стінки глотки.

Останнім часом успішно використовують імуноферментний метод (ІФА) для виявлення у сироватці антитіл класу IgM (у ранні терміни) і IgG (у пізні терміни хвороби) і в носоглотковому слизу (імуноглобуліни класу А). Ці антитіла з'являються з 2–3-го тижня хвороби і зберігаються протягом 3 міс. IgA визначають виключно у випадку сумнівного чи невірогідного результату для IgG. IgG у старших дітей і дорослих є результатом перенесеної інфекції або щеплення; якщо пацієнт не був щеплений проти коклюшу протягом останніх 12–24 міс, то підвищений титр IgG до РТ в окремій пробі вказує на свіже інфікування; підтвердженням захворювання також є

збільшення на ≥ 100 або зменшення на ≥ 50 % рівня антитіл, виявлених у другій пробі сироватки, взятій через 2–4 тиж після забору першої проби.

Коклюш диференціюють у катаральному періоді хвороби від ГРЗ, у період спазматичного кашлю від інших захворювань, що супроводжуються стійким кашлем за нормальної температури тіла і відсутності ознак загальної інтоксикації.

Імуноферментний метод відрізняється більшою чутливістю, в порівнянні з РА і дає змогу виявляти антитіла до окремих антигенів збудника (коклюшного токсину, філаментозного аглютиніну), що важливо для контролю ефективності імунізації безклітинним вакцинами. Для імуноферментного аналізу використовують очищені білкові антигени *B.pertussis* (такі як ГА, КТ або АГ).

Реакція аглютинації (РА) - перший метод визначення рівня протикоклюшних антитіл, використовується найчастіше до теперішнього часу. У РА виявляються аглютинуючі антитіла до *B. pertussis* і *B. parapertussis*. При постановці РА визначають антитіла, індуковані аглютиногенами антигенної форми збудників коклюшу, що знаходяться в I-й фазі. Нещодавно виділені інкапсульовані коклюшні бактерії належать, головним чином, до фази I. Пасаж збудника в культурі може привести до появи інших форм, позбавлених імуногенних властивостей, які належать до фази II, III або IV коклюшного мікроба. Штами, що належать до фази I, викликають захворювання у людей.

Недоліками РА є низька чутливість і нестандартність. Титри аглютинінів знаходяться в значній залежності від бактеріального штаму, який використовується як антиген. Результати вимірювань рівня антитіл у РА добре корелюють із результатами визначення IgG і IgA за допомогою ІФА.

Діагностичним титром у РА у нещеплених і нехворілих раніше на коклюш дітей вважають розведення 1:80. В імунізованих дітей і дорослих позитивні результати РА враховують тільки при дослідженні парних сироваток в разі збільшення титру не менше ніж у 4 рази. Слід враховувати, що у дітей віком до 3 місяців власні антитіла не продукуються, але можуть існувати материнські антитіла, які, як правило, визначаються в низьких титрах.

З метою визначення захисного титру антитіл серологічне дослідження проводять через 1,5 місяці після третьої вакцинації або ревакцинації з використанням РА при імунізації вакциною з цільноклітинним коклюшним компонентом (н.-р., АКДС), ІФА з визначенням антитіл класу G до РТ (або РТ і ФНА) – при імунізації безклітинною вакциною.

Критерії лабораторного підтвердження діагнозу. Діагноз "коклюш, спричинений *B. pertussis*" ставиться в разі підтвердження клінічного діагнозу "коклюш" хоча б одним із зазначених методів:

- виділення культури *B. pertussis*;
- виявлення специфічного фрагменту геному *B. pertussis* методом ПЛР;
- у щеплених дітей і дорослих: виражена сероконверсія, тобто збіль-

шення або зменшення в 4 і більше разів рівня специфічних IgG і / або IgA (ІФА) або рівня аглютинуючих антитіл (РА) при дослідженні парних сироваток, взятих з інтервалом не менше 2 тиж;

– у дорослих: припустиме одноразове виявлення специфічних IgM (ІФА);

– у нещеплених дітей: одноразове виявлення специфічних IgM, і / або IgA, і / або IgG (ІФА) або антитіл у титрі 1/80 і більше (РА).

Діагноз "коклюш, спричинений *B. parapertussis*" ставиться у разі:

– виділення культури *B. parapertussis*;

– або при виявленні фрагменту геному *B. parapertussis* методом ПЛР;

– або при виявленні антитіл до *B. parapertussis* методом РА у титрі не менше 1/80.

Критерії спеціальної діагностики лабораторними методами:

– *бактеріологічний метод* – «золотий стандарт», який є абсолютним підтвердженням коклюшу в разі позитивного висіву, однак у нещодавно щеплених дітей, на тлі прийому антибактеріальної терапії або після неї, після 21 дня від початку захворювання метод стає малоефективним. Метод більш інформативний у ранні терміни захворювання (до 2-го тижня періоду спазматичного кашлю).

– *молекулярно-генетичний метод* – сучасний високотехнологічний метод етіологічної діагностики, що дає змогу виявляти ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу в мазках із задньої стінки глотки у хворих із підозрою на «коклюш», контактних дітей і дорослих незалежно від вакцинального статусу, на тлі або після антибактеріальної терапії і в терміни до 4-х тижнів від початку захворювання;

– *серологічні методи (ІФА, РА)* - методи ретроспективної діагностики, ефективно підтверджують коклюш у щеплених дітей і дорослих. У дітей новонароджених і перших місяців життя, а також у пацієнтів з імунодефіцитними станами не мають діагностичної значущості.

РА з визначенням титру специфічних антитіл проти коклюшного і паракклюшного антигену в динаміці застосовують для діагностики коклюшу на пізніх термінах або для епідеміологічного аналізу (обстеження осередків). Діагностичний титр при одноразовому обстеженні – 1:80; у щеплених – діагностичне значення має чотириразове наростання титру специфічних антитіл в парних сироватках.

Методом імуноферментного аналізу визначають у крові протикоклюшні антитіла класу IgM у ранні терміни і чотириразове наростання титру специфічних IgG при обстеженні в динаміці з інтервалом 10–14 днів.

Реакція непрямой імунофлюоресценції (РНІФ) є *методом експрес-діагностики*, дозволяє виявити антигени кашлюкових паличок у матеріалі з рото- і носоглотки протягом декількох годин;

Лікування у підлітків та дорослих слід розпочати в межах 3 тиж від появи кашлю. Антибіотикотерапія, призначена у ранній фазі катарального періоду полегшує перебіг захворювання, натомість після появи спазматичного кашлю не впливає на симптоми, але скорочує період контагіозності. Препарати вибору: макроліди (азитроміцин, кларитроміцин, еритроміцин), антибіотики пеніцилінової групи (ампіцилін, амоксицилін, цефтріаксон, цефепім та ін.). Якщо є гіперчутливість або несприйняття макролідів і пеніцилінів назначають котримоксазол.

Специфічна профілактика. Використовуються 2 різновиди вакцин проти коклюшу:

1. Вакцини з убитих коклюшних бактерій (цільноклітинні): АКДП, яка містить коклюшний компонент (убиті *B. pertussis* у концентрації 20 млрд/см³) і очищені від баластних білків дифтерійний і правцевий анатоксини, адсорбовані на алюмінію гідроксиді.

2. Вакцини з окремими антигенами коклюшу (безклітинні або ацелюлярні), в яких коклюшний компонент представлений трьома високоочищеними антигенами.

Вакцину вводять відповідно до календаря щеплень триразово на 3, 4 і 5-й місяці після народження дитини, ревакцинацію проводять через 1,5–2 роки.

Види комбінованих вакцин, що застосовуються для профілактики коклюшу:

- Інфанрікс Гекса додатково захищає від гемофільної інфекції, поліомієліту та гепатиту В;
- Тетракок із додатковим компонентом від поліомієліту;
- Бубо-Кок містить також компонент проти гепатиту В;
- Пентаксим захищає від коклюшу (безклітинний компонент), дифтерії, правця, а також від гемофільної інфекції та поліомієліту.

Для екстреної профілактики коклюшу у нещеплених дітей можна застосувати імуноглобулін людини нормальний - дворазово з інтервалом 24 год в разовій дозі 3,0 мл і можливо у більш ранні терміни після контакту з хворим.

Алгоритми лабораторної роботи:

Алгоритм: «Хід мікробіологічного дослідження матеріалу за підозри на коклюш».

Матеріал для дослідження та способи відбору: Слиз із носоглотки.

З діагностичною метою обстежують дітей за клінічними ознаками або тих, які кашляють протягом 5–7 днів, без ознак запалення у ротоглотці, незалежно від наявності контакту з хворим на коклюш; дорослих з підозрою на коклюш, які працюють у пологових будинках, дитячих лікарнях, дитячих садках і т.д., а також дорослих, які працюють з дітьми і кашляють протягом 5–7 днів і більше.

За епідеміологічними показниками обстежують осіб, які спілкувалися з хворими на коклюш.

Забір матеріалу проводиться натще, або через 2–3 год після сніданку. З метою діагностики дослідження триразове щодня або через день, за епідемічними показникам – дворазове. Після 3-го тижня захворювання можливість виділення збудника різко знижується.

Відбір матеріалу можна здійснювати двома способами (рис. 6):

- ✓ задньоглотковим тампоном
- ✓ методом «кашльових пластинок».

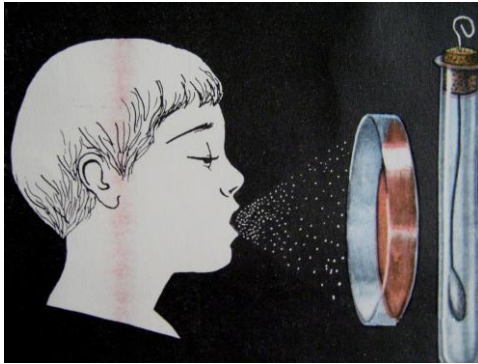


Рис. 6. Відбір матеріалу від хворого на коклюш

Задньоглотковим тампоном матеріал беруть як з метою діагностики, так і за епідеміологічними показниками, а також у будь-якому випадку у дітей грудного віку. Для цього використовують два тампони: сухий і зволожений. Взяття матеріалу сухим тампоном стимулює кашель і підвищує можливість виділення збудника. Сухим тампоном роблять посів (обов'язково), а зволожений відправляють до лабораторії не пізніше 2–4 год після взяття матеріалу.

Для дослідження забирають слиз із задньої стінки глотки. При цьому треба пам'ятати про те, що у верхніх відділах носоглотки знаходяться авірулентні штами, схильні до автолізу, а вірулентні колонізують нижній відділ верхніх дихальних шляхів.

Методика взяття матеріалу сухим і зволженим тампонами однакова і зводиться до наступного. Медичний працівник лівою рукою фіксує за допомогою шпателя корінь язика, а правою вводить тампон у порожнину рота, просуваючи його за корінь язика. Тампон не повинен торкатися слизової щік, язика і мигдаликів. Кінчиком тампона і опуклою його частиною торкаються задньої стінки глотки, проводячи по ній справа наліво 2–3 рази. Потім також обережно, над шпателем, витягають тампон з порожнини рота. В обох випадках посів бажано проводити на 2 чашки Петрі. Якщо дитина проявляє ознаки занепокоєння, то помічник, який стоїть за її спиною ззаду фіксує голову.

Метод «кашльових пластинок» використовують тільки з діагностичною метою за наявності кашлю.

Забір матеріалу проводять на 2 чашки з живильним середовищем. Під час нападу кашлю лівою рукою знімають кришку чашки, а правою підносять її до рота на відстані 10–12 см так, щоб крапельки слизу з дихальних шляхів потрапили на поверхню середовища. Чашку в такому положенні тримають деякий час (протягом 6–8 кашльових поштовхів). В разі нетривалого покашлювання можна цю чашку піднести повторно. На живильне середовище не повинні потрапляти слина, блювотні маси, мокротиння. Потім чашку з живильним середовищем закривають кришкою і доставляють у лабораторію.

У більшості країн світу матеріалом для дослідження є слиз із носоглотки, який відбирають носоглотковим тампоном або шляхом аспірації. Взяття може проводитися тільки спеціально навченим персоналом. Мазки зі слизової носоглотки беруть сухим стерильним назофарингеальним вельюр-тампоном на пластиковому аплікаторі. Зонд вводять легким рухом по зовнішній стінці носа на глибину 2–3 см до нижньої раковини, злегка опускають донизу, вводять у нижній носовий хід під нижню носову раковину до носоглотки, роблять обертальний рух і видаляють уздовж зовнішньої стінки носа. Загальна глибина введення зонда повинна становити приблизно половину відстані від ніздрі до вушного отвору (3–4 см для дітей та 5–6 см для дорослих).

Під час транспортування матеріал для дослідження слід оберігати від прямих сонячних променів, зберігаючи його за температури 35–37 °С, для чого рекомендується поміщати весь матеріал у спеціальні ящики, бікси з захисною прокладкою (марлеві ватники та ін.) і грівкою.

Бактеріоскопічний метод дослідження: при забарвленні за Грамом – дрібні грамнегативні палички овоїдної форми.

Бактеріологічний метод дослідження передбачає виділення збудника захворювання шляхом посіву на щільні поживні середовища, виділення чистої культури та ідентифікацію збудників роду бордетел до виду. Дослідження триває протягом 5–7 днів.

Посів матеріалу з діагностичною метою проводять паралельно на дві чашки, за епідеміологічними показниками – на одну. Посів здійснюють на середовища, оброблені антибіотиками (пеніцилін) для пригнічення сторонньої мікрофлори. Під час взяття матеріалу методом «кашльових пластинок» застосовують середовища без антибіотика, тому що супутня мікрофлора у цьому разі буде незначною. Для посіву обов'язково використовують тепле поживне середовище. У разі взяття матеріалу сухим тампоном посів проводять негайно через низьку стійкість збудника.

Матеріал, взятий тампоном, можна посіяти наступними способами:

а) посів матеріалу проводять шляхом його ретельного втирання тампоном спочатку по периферії середовища чашки Петрі у вигляді 4–5 бляшок, а потім Z-подібним штрихом у центрі чашки, потім стерильним шпателем розтирають центральні частини посіву, не торкаючись бляшок;

б) можна використовувати метод секторних посівів (метод Gould): матеріал втирається тампоном у сектор А, після цього стерильним шпателем або петлею проводять 4 штрихових посіви з сектора А у сектор І, потім петлю / шпатель пропалюють і аналогічним чином проводять штрихові посіви з сектора І у сектор ІІ з ІІ у ІІІ.

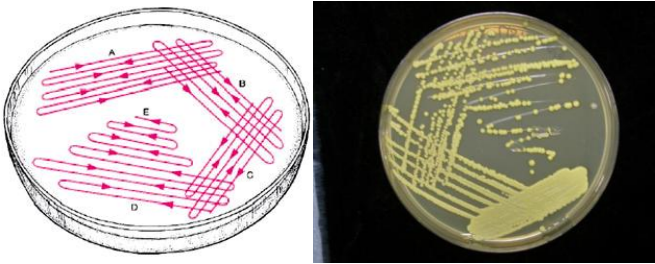


Рис. 7. Метод секторних посівів

Якщо посів проводять на місці взяття, то матеріал втирають тампоном на одній половині середовища, а потім у лабораторії проводять його розштрихування бактеріологічною петлею ще на 2 сектори.

Перший день дослідження:

Засіяні чашки з казеїново-вугільним агаром (КВА) вміщують у термостат за температури 35–37 °С. Для зволоження повітря у термостат ставлять відкриту чашку Петрі з водою. Через 24–72 год на казеїново-вугільному агарі *B. pertussis* утворюють дрібні колонії, діаметром 1–2 мм, колонії *B. parapertussis* більші, блискучі, сірувато-кремового кольору (крапельки ртуті), з рівним краєм. Колонії можуть бути зеленого, кремового, рожевого, шоколадного та молочного кольорів. Промінь світла, що падає збоку на колонії, відбивається її поверхнею, внаслідок чого утворюється світловий конус (промінець), що падає від центру колонії на поверхню поживного середовища. Це можна спостерігати у стереоскопічному мікроскопі. Посіви витримують до 7 днів (3–4 доби у термостаті, останні дні за кімнатної температури (целофановому пакеті)).

Четвертий день дослідження (72 год.):

1) Переглядають посіви на чашках із живильним середовищем з метою відбору підозрілих колоній бактерій роду бордетел. Перегляд колоній проводять за допомогою бінокулярного стереоскопічного мікроскопу або бінокулярної лупи з великою фокусною відстанню. Колонії бактерій роду

бордетел при рості на щільних поживних середовищах опуклі, вологі, гладкі, блискучі, з рівними краями, сірого кольору, з блакитним, перловим або металевим, а іноді жовтуватим або білуватим відтінком. Колонії *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* мають м'яку (маслянисту) консистенцію і легко знімаються. Під час перегляду колоній у стереоскопічному мікроскопі можна спостерігати вузький промінь світла ("хвостик"), що відходить від її центру. Колонії *B. bronchiseptica* в субкультурі можуть бути двох видів: подібні до коклюшних і більш плоскі, з піднятим центром.

Терміни появи колоній різні: колонії *B. bronchiseptica* з'являються через 18–24 год, *B. parapertussis* – через 24–48 год. і *B. pertussis* – через 48–72 год. Різна швидкість росту відбивається на величині колонії при перегляді їх через 72 год. На середовищах із кров'ю навколо колоній майже завжди утворюється зона слабого гемолізу.

Зростання коклюшного і бронхісептичного мікробів на живильному середовищі не супроводжується зміною його кольору. Паракоклюшні мікроби за умови рясного росту на середовищі КВА надають дифузному забарвленню середовища буро-коричневого кольору, що виявляється при перегляді у світлі, а також спричиняють потемніння середовища з кров'ю.

Таблиця 7

Ростові характеристики основних видів бордетел

Ознака	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Час, необхідний для появи колоній (доба):			
– на КВА	2–3	1–2	18–24 год.
– на середовищі Борде–Жангу	3–6	2–3	1–2
Розмір колоній на КВА	1–2мм	2–3 мм	4 мм
Ріст на МПА	–	+	+

2) За наявності на середовищі культивування підозрілих колоній проводять виділення чистої культури шляхом відсіву їх у чашки Петрі з одним із живильних середовищ. При цьому поверхню середовища ділять на кілька секторів і відсівають кожну колонію на окремий сектор, ретельно втираючи її у середовище круговими рухами.

3) За наявності значної кількості однотипових підозрілих колоній, крім виділення чистої культури, з решти колоній роблять мазки в фізіологічному розчині, визначаючи морфологію культури при фарбуванні за Грамом. Одночасно визначають також відсутність спонтанної аглютинації. Мікроби роду бордетел мають вигляд мноморфних дрібних овоїдних паличок (кокобактерій), рівномірно розташовуються у мазку, грамнегативні. Іноді паракоклюшні мікроби, особливо з середовища Борде–Жангу, мають вигляд подовжених поліморфних паличок.

Культуру з решти колоній перевіряють у реакції аглютинації на склі зі специфічними видовими неадсорбованими сироватками, розведеними

1:10, і за можливості з адсорбованими монорецепторними сироватками до аглютиногенів (факторів) 1 і 14.

Якщо число підозрілих колоній значне, то можливе здійснення проби Закса для визначення наявності ферменту уреазы.

4) На підставі вивчення характеру колоній і морфології клітин у мазках, пофарбованих за Грамом, позитивної реакції аглютинації з видовими неадсорбованими і адсорбованими сироватками до факторів 1 і 14 на третю добу можна видати попередню відповідь.

5) За відсутності росту підозрілих колоній на середовищі вирощування чашки Петрі знову поміщають у термостат на 24–48 год. і переглядають повторно у відповідні терміни.

П'ятий-шостий день дослідження (96–120 год.)

1) Переглядають посіви, проведені для виділення чистої культури, і відзначають зміну кольору середовища: паракоклюшні мікроби дифузно забарвлюють середовище вирощування (КВА) у буро-коричневий колір.

2) На предметному склі у краплі фізіологічного розчину готують мазки і фарбують їх за Грамом, визначають морфологію виділеної культури, її чистоту, а також відсутність спонтанної аглютинації.

3) Серологічні властивості перевіряють у реакції аглютинації на склі зі специфічними неадсорбованими коклюшними і паракоклюшними сироватками, розведеними 1:10, а також з адсорбованими монорецепторними сироватками до факторів 1 і 14 (рис. 8). Сероваріанти коклюшного мікробу визначають у аглютинації з монорецепторними сироватками до факторів 1, 2, 3.



Рис. 8. Постановка реакції аглютинації на склі

4) Для перевірки біохімічних властивостей проводять посіви чистої культури на агарове середовище з тирозином (визначення наявності тиро-

зинази), визначають наявність уреазу у пробі Закса або посівом на бульйон Хотингера з сечовиною. При підозрі на виділення чистої культури *B. bronchiseptica* визначають утилізацію цитрату на середовищі Сімонса і рухливість шляхом посіву на напіврідкий агар (0,5 % агар-агар). *B. pertussis* біохімічно інертна: не росте на МПА, не змінює кольору агарового середовища з тирозином, не має ферменту уреазу (проба Закса негативна), не утилізує цитрат.

B. paraptussis дає ріст на простих поживних середовищах, змінює середовище з тирозином на коричневий колір, має фермент уреазу (проба Закса позитивна).

B. bronchiseptica відрізняється швидким ростом на простих поживних середовищах, рухливістю, не змінює кольору середовища з тирозином, має фермент уреазу (проба Закса позитивна через 4 год), здатна утилізувати цитрат на середовищі Сімонса.

5) На підставі вивчення чистої культури: морфології колоній і клітин, реакції аглютинації з видовими неадсорбованими сироватками та адсорбованими монорецепторними сироватками до факторів 1 і 14, результатів проби на уреазу, зміни кольору середовища з тирозином, утилізації цитратів може бути видана остаточна позитивна відповідь.

Відповідь при дослідженні на коклюш і паракоклюш видається, як правило, на 4–6 день. Попередня позитивна відповідь може бути видана на 4 день з формулюванням: "Виявлені мікроби, підозрілі на бактерії роду бордетел, дослідження триває". Остаточна позитивна відповідь може бути видана на 5–6 день і сформульована як: "Виявлено *B. pertussis* (*B. paraptussis*, *B. bronchiseptica*)". Негативна відповідь видається на 6 день за відсутності підозрілих колоній для бактерій роду бордетел і формулюється: "коклюшні (паракоклюшні, бронхісептичні) мікроби не виявлено". У разі уповільненого росту мікробів або виділення нетипової культури попередня і остаточна відповіді можуть бути видані пізніше (7–8 день).

Алгоритм "Вивчення ферментативної активності та її облік":

Визначення біохімічних властивостей (табл. 8):

- наявність тирозинази;
- визначення уреазу;
- рухомість;
- здатність утилізувати цитрати (середовище Сімонса);
- вивчення сахаролітичних властивостей на середовищі Олькеницького.

Таблиця 8. Диференціація бордетел за біохімічними властивостями

Вид мікроорганізмів	Ріст на МПА	Наявність тирозинази	Наявність уреазу	Утилізація цитратів
<i>B. pertussis</i>	-	-	-	-
<i>B. paraptussis</i>	+	+	+	+
<i>B. bronchiseptica</i>	+	-	+ повільно	+

1) Для визначення уреазної активності мікробів суміш реактивів А (1 частина) і Б (19 частин) розливають по 0,1–0,2 мл у стерильні аглютинаційні пробірки (з пробками) і вносять 1–2 петлі випробуваної культури. Пробірки поміщають у термостат при 35–37 °С на 30 хв. Облік результатів проводять після інкубування, а за відсутності зміни кольору суміші пробірки залишають за кімнатною температурою і результат враховують наступного дня. Одночасно ставлять контроль реактиву без внесення культури. За наявності у мікробів ферменту уреазі відбувається розщеплення сечовини до аміаку, що призводить до залужування середовища, його колір змінюється з жовтого на малиновий (рис. 9).

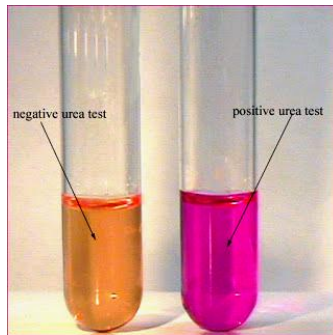


Рис. 9. Визначення уреазної активності

2) Для визначення потреби у цитратах здійснюють посів випробуваної культури на скошений агар середовища Сімонса. Пробірки інкубують за температури 37 °С протягом однієї доби. Бактерії, які утилізують цитрат добре ростуть, залужують середовище й обумовлюють фарбування його у синій колір. Мікроби, що не утилізують цитрати на цьому середовищі, не ростуть і не змінюють його кольору (рис. 10).

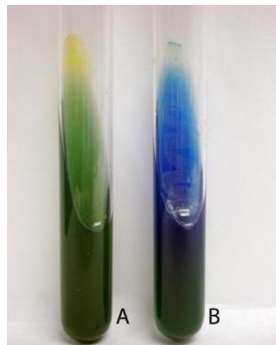


Рис. 10. Визначення потреби у цитратах:
А – тест негативний; В – тест позитивний

3) Для визначення пігментоутворення проводять посів виділеної культури на простий поживний агар з 0,1 % тирозину з інкубацією протягом доби за температури 37 °С. При розщепленні тирозину середовище забарвлюється у жовто-коричневий колір (рис. 11).

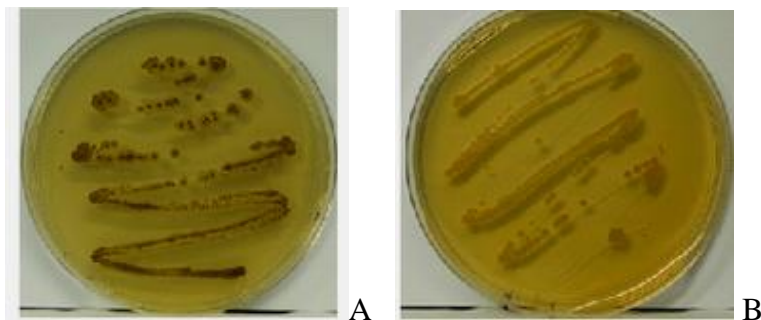


Рис. 11. Визначення тирозинази:

А – тест позитивний, В – тест негативний

Алгоритм "Взяття патологічного матеріалу задньоглотковим тампоном":

- візьміть у ліву руку стерильну пробірку з тампоном, позначте на ній номер аналізу;
- зігніть правою рукою тампон приблизно на відстані 2 см від кінця об'єкту пробірки під кутом 120° під час виведення тампона з пробірки, тампон тримайте у правій руці;
- візьміть у ліву руку шпатель для зів'я;
- запропонуйте пацієнту широко відкрити рота;
- притримуйте корінь язика шпателем, уведіть тампон зігнутих кінцем донизу у ротоглотку до "відчуття провалу";

Увага! Під час взяття матеріалу не можна торкатися тампоном слизової оболонки щік, язика, мигдаликів, піднебіння!

- проведіть кінцем тампона і його випуклим боком, торкаючись задньої стінки глотки, справа наліво 2–3 рази;
- вийміть тампон із рота і, розгинаючи, опустіть його у пробірку.

Алгоритм "Постановка полімеразної ланцюгової реакції":

Виявлення ДНК *B. pertussis*, *B. paraptussis*, *B. bronchiseptica* проводять методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть методу полягає у багаторазовому копіюванні (ампліфікації) специфічних ділянок ДНК досліджуваних бактерій у процесі повторення від 35 до 45 разів запрограмованих циклів, що складаються з трьох (як правило) режимів температури, утримуваної певний час. Ампліфікація ділянок ДНК відбувається на спеціальному обладнанні (ампліфікатор) за допомогою термостабільного

ферменту Таq-полімерази, який добудовує нуклеотидну послідовність після коротких олігонуклеотидів (праймерів), які комплементарно зв'язуються зі специфічною ділянкою ДНК.

На першому етапі аналізу проводиться обробка досліджуваного біологічного матеріалу з метою екстракції (виділення) ДНК збудника і видалення або нейтралізації інгібіторів реакції ампліфікації. З метою забезпечення якості виконання процедури дослідження для кожного зразка доцільно використовувати внутрішній контрольний зразок, який додається у біологічний зразок на етапі екстракції ДНК. На другому етапі проводиться власне ампліфікація фрагмента ДНК мікроорганізму і далі візуалізація (детекція) результату. Останній етап – детекція фрагментів ампліфікації може проводитися різними методами. Більш дешевим методом є метод електрофорезу в агарозному гелі, однак цей спосіб пов'язаний з підвищеним ризиком контамінації лабораторії фрагментами ПЛР, що може призвести до хибнопозитивних результатів дослідження, особливо в разі неотримання суворох правил організації лабораторії та порядку виконання процедур.

Використання у ПЛР флуоресцентно-мічених олігонуклеотидних зондів, які гібридизуються з комплементарними ділянками ампліфікованої ДНК-мішені, у результаті чого відбувається наростання інтенсивності флуоресценції у процесі реакції, і дає змогу реєструвати накопичення специфічного продукту ампліфікації шляхом вимірювання інтенсивності флуоресцентного сигналу як під час ампліфікації (у режимі реального часу), так і по її закінченні. Цей спосіб значно знижує ризик забруднення лабораторії продуктами ПЛР і скорочує тривалість аналізу.

В умовах високого охоплення дітей щепленнями проти коклюшу знижується ефективність бактеріологічного дослідження і зростає роль ПЛР як швидкого (протягом 4–6 год) методу, який дає змогу виявити ДНК збудника на більш пізніх термінах захворювання, ніж бактеріологічний метод, і на тлі проведення антибіотикотерапії. При цьому наявність в анамнезі вакцинації проти коклюшу не впливає на результати ПЛР.

Необхідно враховувати, що у ПЛР виявляється також ДНК загнаних мікробів, які зберігаються у біологічному матеріалі довше, ніж життєздатні мікроорганізми (від 1 тиж до 1 міс). У зв'язку з цим ДНК може бути виявлена на тлі клінічного одужання і після успішного лікування антибіотиками, тому ПЛР не рекомендується використовувати для підтвердження ефективності лікування, як під час бактеріологічного дослідження або – використання методу NASBA, в якому можна знайти РНК бактерій (менш стабільного компонента генома, ніж ДНК).

Максимальний рівень специфічності і чутливості дослідження забезпечують тести на основі ПЛР з гібридаційною-флуоресцентною детекцією продуктів ампліфікації.

Оптимальні строки застосування ПЛР у діагностичних цілях – з перших днів катарального періоду захворювання і до трьох тижнів хвороби на момент обстеження.

Матеріалом для дослідження методом ПЛР є мазки зі слизової носоглотки і задньої стінки ротоглотки. Рекомендується досліджувати обидва типи мазків від кожного пацієнта. З цією метою доцільно об'єднувати і досліджувати як одну пробу обидва мазки, зібраних послідовно різними зондами до однієї пробірки. При цьому спочатку беруть мазок зі слизової носоглотки, потім мазки із задньої стінки ротоглотки. Робочу частину зонда з тампоном поміщають в ту саму пробірку, до якої було раніше поміщено кінець зонда з тампоном, що містить зібраний матеріал зі слизової носоглотки. Якщо порожнина носа заповнена слизом, перед процедурою рекомендується його видалити, тобто, висякати. За 2 год. до взяття мазків з ротоглотки не можна пити і вживати їжу. Протягом 6 год. перед процедурою не можна використовувати медикаменти, що зрощують носоглотку або ротоглотку, та препарати для розсмоктування у роті.

Мазки зі слизової носоглотки беруть сухим стерильним назофарингеальним велюр-тампоном на пластиковому аплікаторі. Зонд вводять легким рухом по зовнішній стінці носа на глибину 2-3 см до нижньої раковини, злегка опускають донизу, вводять у нижній носовий хід під нижню носову раковину до носоглотки, роблять обертальний рух і видаляють уздовж зовнішньої стінки носа. Загальна глибина введення зонда повинна складати приблизно половину відстані від ніздрі до вушного отвору (3–4 см для дітей та 5–6 см для дорослих). Після взяття матеріалу кінець зонда з тампоном опускають у стерильну одноразову пробірку з 0,5 мл транспортного середовища до місця зламу, при цьому гнучка частина зонда згортається спіраллю, далі, прикриваючи зверху пробірку кришкою, рукоятку зонда опускають вниз, домагаючись повного відламування верхньої частини зонда. Пробірку герметично закривають.

Мазки з ротоглотки беруть сухими стерильними зондами з полістиролу з віскозними тампонами обертальними рухами з задньої стінки ротоглотки, акуратно притискаючи язик пацієнта шпательом, не торкаючись щік, мигдаликів та язика. Після взяття матеріалу робочу частину зонда з тампоном поміщають на глибину 1,5 см у стерильну одноразову пробірку з 0,5 мл транспортного середовища. Рукоятку зонда з тампоном опускають вниз і відламують, притримуючи кришкою пробірки таким чином, щоб була можливість щільно закрити пробірку. Пробірку герметично закривають і маркують.

Підготовка біологічного матеріалу до ПЛР-дослідження. Безпосередньо перед дослідженням вміст закритої пробірки з мазками з носоглотки / ротоглотки перемішують на вортексі і центрифугують протягом 5 с при

5 тис. г на мікроцентрифузі для видалення крапель з внутрішньої поверхні кришки пробірки. Відкривають пробірку і, не витягуючи зондів, відбирають необхідну кількість зразка для дослідження.

Порядок проведення ПЛР-дослідження. Лабораторний процес повинен бути односпрямованим. Аналіз проводиться у двох окремих приміщеннях (зонах: зона екстракції нуклеїнових кислот і зона ампліфікації нуклеїнових кислот) при проведенні ПЛР із детекцією у режимі реального часу і у трьох окремих приміщеннях (зонах: зона екстракції нуклеїнових кислот, зона ампліфікації нуклеїнових кислот і зона детекції нуклеїнових кислот) при проведенні ПЛР з детекцією методом електрофорезу. Роботу слід починати у зоні екстракції нуклеїнових кислот, продовжувати в зонах ампліфікації і детекції. Не можна повертати зразки, обладнання та реактиви у зону, в якій була проведена попередня стадія процесу. Все лабораторне обладнання, у тому числі дозатори, штативи, лабораторний посуд, а також всі робочі розчини повинні бути суго стаціонарними. Забороняється переносити їх з одного приміщення до іншого. Невикористані реактиви, реактиви з вичерпаним терміном придатності, а також використані реактиви у т.ч. буфер і гелі) слід видаляти. Під час роботи за методом ПЛР з детекцією у режимі реального часу є неприпустимим відкривання пробірок і розбризування вмісту, оскільки це може призвести до контамінації продуктами ПЛР лабораторної зони, обладнання та реагентів. Суворі вимоги повинні бути застосовані до організації роботи у зоні електрофорезу: забороняється переміщення персоналу з приміщення для електрофорезу в інші робочі приміщення лабораторії. Зміна робочого верхнього одягу, головних уборів, взуття та рукавичок є обов'язковою умовою під час виходу з приміщення для електрофорезу.

Алгоритм "Серологічні методи дослідження":

В умовах масової вакцинопрофілактики істотно знизилася кількість тяжких форм захворювання, почастишали випадки пізнього звернення по медичну допомогу, нерідко вже на тлі антибактеріальної терапії. При цьому зросло значення серологічних методів як засобів пізньої (ретроспективної) діагностики.

Виявлення специфічних антитіл до збудників коклюшу проводиться з використанням реакції аглютинації (РА) і імуоферментного аналізу (ІФА). У РА виявляються представлені у крові аглютинуючі антитіла до *B. pertussis* і *B. parapertussis*. ІФА дозволяє виявляти антитіла класів IgM, IgA і IgG до різних антигенів *B. pertussis* (частіше до коклюшного токсину (РТ) і філаментозного гемаглютиніну (FHA), найбільшу специфічність мають антитіла до РТ).

При первинній інфекції антитіла класів IgM і IgA утворюються не раніше другого тижня від появи клінічних симптомів, ще через 1 тиж почи-

нають виявлятися і антитіла класу IgG, які досягають свого максимуму на 6–8 тиж, після чого їх рівень знижується. IgG-антитіла можуть виявлятися до досягнення дорослого віку в низькій концентрації. У зв'язку з цим серологічну діагностику коклюшу і паракоклюшу доцільно застосовувати не раніше другого тижня хвороби; оптимальні терміни для серологічної діагностики – з 3 по 6 тиж захворювання. Після вакцинації утворюються антитіла класу IgG. Тому протягом 1 року після вакцинації серологічне дослідження з діагностичною метою проводити не рекомендується, а у дітей, вакцинованих проти коклюшу, і у дорослих для серологічної діагностики необхідно використовувати тільки парні сироватки крові, отримані з інтервалом мінімум 2 тиж. Під час дослідження одноразово взятої сироватки результат виявлення антитіл класу IgG можна вважати позитивним тільки за наявності високого титру, при цьому значення, які вважаються високим титром, можуть варіювати у наборах реагентів різних виробників і їх слід уточнити згідно з інструкцією із застосування діагностичного набору, що використовується.

Виявлення значущого рівня IgM (з різними комбінаціями IgG або IgA) у нещеплених дітей і дорослих слід розцінювати як гостру інфекцію. Однак у деяких пацієнтів під час гострої інфекції антитіла класу IgM визначаються на низькому рівні. Діти молодше 6 місяців можуть не відповідати на інфекцію продукцією антитіл класу IgA, тому негативний результат IgA у дітей даного віку не означає відсутність захворювання.

Як підтверджуючий тест для зразків з граничними або позитивними результатами, отриманими у ІФА, може бути використаний метод імуноблоту, в якому визначаються антитіла класу IgG і IgA з використанням антигенів *Bordetella pertussis* (РТ у двох концентраціях і ФНА).

Діагностичним титром у РА для дітей, яких не було щеплено, і які раніше не хворіли на коклюш, вважають розведення 1:80. В імунізованих дітей і дорослих позитивні результати РА враховують тільки під час дослідження парних сироваток в разі наростання титру не менше ніж у 4 рази. Слід враховувати, що у дітей, віком до 3 міс власні антитіла не виробляються, але можуть бути материнські антитіла, які, як правило, визначаються в низьких титрах.

З метою визначення захисного титру антитіл серологічне дослідження проводять через 1,5 міс після третьої вакцинації або ревакцинації з використанням РА під час імунізації вакциною з цільноклітинним коклюшним компонентом (н.-р., АКДС), ІФА з визначенням антитіл класу G до РТ (або РТ і ФНА) – під час імунізації безклітиною вакциною (н.-р., Інфанрікс, Пентаксим).

Взяття крові (для ІФА обов'язково натщесерце) здійснюють із вени в об'ємі 3–4 мл або з подушечки третьої фаланги середнього пальця в об'ємі

0,5–1,0 мл (у дітей молодшого віку) в одноразову пластикову пробірку без антикоагулянту.

Взяття крові з ліктьової вени для отримання сироватки здійснюють одноразовою голкою (діаметр 0,8–1,1 мм) у пробірку типу Vacuette (R) без антикоагулянту або одноразовий шприц об'ємом 5 мл. Під час взяття у шприц, кров із нього акуратно (без утворення піни) переносять до одноразової скляної колби. Капілярну кров беруть з пальця в асептичних умовах, поміщаючи до пробірки без антикоагулянту. Перед взяттям крові кисть руки пацієнта зігрівають гарячою водою, потім насухо витирають. Подушечку пальця протирають 70° спиртом і проколюють стерильним скарифікатором одноразового використання. Кров збирають безпосередньо через край стерильної одноразової центрифужної пробірки. Після взяття крові місце уколу змащують 5 % розчином йоду. Проби крові, взяті без антикоагулянту, відстоюють за кімнатної температури протягом 30 хв або вміщують до термостату за температури 37 °С на 15 хв. Потім проводиться центрифугування протягом 10 хв при 3 000 об./хв. Після закінчення центрифугування сироватку переміщують до стерильних пробірок з використанням для кожного зразка окремого наконечника з аерозольним бар'єром.

Термін зберігання крові - не більше 6 год. Сироватка крові зберігається за кімнатної температури протягом 6 год., за температури 4–8 °С – протягом 5 діб, триваліше – за температури не вище мінус 16 °С. Багаторазове заморожування / розморожування сироватки крові неприпустимо.

Кожну пробірку маркують згідно з доданим у супровідному документі списком і поміщають до поліетиленового пакету відповідного розміру з ватою (або іншим гігроскопічним матеріалом) у кількості, достатній для адсорбції всього зразка у разі його витоку, і герметично закривають. Припустимо транспортувати зразки від різних пацієнтів в одному пакеті.

Поліетиленові пакети поміщають до ізоляційного контейнеру (сумка-холодильник), пристосованого для транспортування біологічних матеріалів, і транспортують за температури від 4 до 8 °С. Під час транспортування та зберігання крові у зимову пору року необхідно створити умови, за яких не відбувається її заморожування.

Пакети з матеріалом для ПЛР і серологічного дослідження можуть транспортуватися в одному термоізолюючому контейнері.

Реакція аглютинації. Під час використання РА серологічне дослідження сироватки крові слід проводити одночасно на коклюш і паракклюш з використанням діагностичних наборів, дозволених у встановленому порядку, відповідно до інструкції виробника.

Із досліджуваної сироватки готують 9-10 наступних розведень: 1:5, 1:10 і так далі до 1:1 280 або 1:2 560. До 10-ї (або 11-ї) пробірки наливають замість сироватки 0,25 мл фізіологічного розчину (контроль). Реакцію

аглотинації ставлять в об'ємі 0,5 мл: до 0,25 мл відповідного розведення сироватки додають 0,5 мл діагностикума. Пробірки поміщають до термостата за температури 37 °С на 2 год. і потім залишають за кімнатної температури. Результати враховують наступного дня за допомогою аглотиноскопу. Реакція вважається позитивною за наявності у пробірці чіткої аглотинації на чотири або три хрести (4+ або 3+).

Діагностичним титром реакції аглотинації у нещеплених і дітей, що не хворіли вважають розведення 1:80. В імунізованих дітей і дорослих позитивні результати реакції враховують тільки під час дослідження парних сироваток крові, взятих з інтервалом не менше ніж 2 тиж, в разі наростання титру не менше ніж в 4 рази.

Імуноферментний аналіз. Серологічну діагностику методом ІФА здійснюють із використанням наборів реагентів, дозволених для застосування в установленому порядку, в якісному, напівкількісному і кількісному форматах. Для дослідження використовується сироватка крові, всі маніпуляції та інтерпретація результатів проводяться за інструкцією виробника діагностичного набору. Результати враховуються на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм. Розрахунки проводяться графоаналітичним методом. Не рекомендується використання забруднених зразків. Наявність суспензії або преципітату у сироватці може бути причиною отримання неправильних результатів. Такі зразки перед дослідженням повинні бути центрифуговані або профільтровані.

Імуноблот. Як підтверджуючий тест для зразків з граничними або позитивними результатами, отриманими у ІФА або для самостійної діагностики може бути використаний метод імуноблоту, в якому визначаються антитіла класу IgG і IgA у сироватці крові з використанням антигенів *Bordetella pertussis* (РТ в двох концентраціях і FHA) .

Принцип дослідження полягає в проведенні реакції зв'язування специфічних антитіл з високоочищеними рекомбінантними антигенами, нанесеними у вигляді смуг на стрипи з нітроцелюлозної мембрани, попередньо обробленої розчином білка, з метою блокування вільних сайтів неспецифічного зв'язування імуноглобулінів. У ході аналізу стрипи інкубують з розведеними зразками сироватки крові людини. Якщо у зразку в наявності специфічні антитіла, то під час інкубації вони зв'язуються з антигенами, фіксованими на стрипі. Після промивання стрипи інкубують з антитілами до IgG або IgA людини, кон'югованими з пероксидазою хрому, і повторюють промивання. Специфічно пов'язані антитіла виявляють за допомогою кольорової реакції, додаючи субстрат, який взаємодіє з пероксидазою хрому. Темні смуги у відповідному місці стрипу вказують на наявність комплексу антиген-антитіло. Коклюшний токсин нанесений на стрип у двох концентраціях – РТ і РТ-100. Концентрація РТ стандартизована:

позитивна реакція на IgG (поява смуги) під час взаємодії досліджуваної сироватки з РТ-100 означає, що рівень IgG у сироватці перевищує 100 МО/мл за стандартом ВООЗ.

Контроль реакції проводиться з використанням чотирьох смуг, розмішених паралельно одна за одною на верхньому краї стрипа:

1) смуга позитивного контролю реакції, яка має бути в наявності під час аналізу кожної сироватки;

2) дві смуги позитивного контролю кон'югату (IgG/IgA), які є контролями виявлення кожного класу антитіл;

3) "контроль Cut-off" (для контролю реакції фарбування): інтенсивність цієї смуги є основою для оцінки реактивності антитіл й інтерпретації результату аналізу конкретного стрипу.

Результати аналізу враховуються тільки у разі отримання адекватних результатів контролів. Інтенсивність смуг залежить від концентрації антитіл, специфічних до *B. pertussis*, які є у досліджуваній сироватці, оцінка результату проводиться відносно інтенсивності смуги Cut-off.

Позитивна реакція з виявлення IgG до РТ у титрі більш ніж 100 МО/мл стандарту ВООЗ може розцінюватися як ознака гострої інфекції у невакцинованих дітей або вакцинованих більш ніж три роки тому. В інших випадках рекомендується повторне дослідження сироватки або плазми крові, взятої через 2 тиж після першої.

Схема бактеріологічного дослідження

1-й день

Посів досліджуваного матеріалу на середовища вирощування та інкубування у термостаті за температури 35–37 °С.

4-й день (через 72 год.)

1) Вивчення характеру колоній на середовищах вирощування з використанням стереоскопічного мікроскопу.

2) Відсів колоній для отримання чистої культури мікроба.

3) За наявності великої кількості колоній на середовищі вирощування:

а) приготування мазків, фарбування за Грамом, мікроскопія;

б) постановка реакції аглютинації на склі зі специфічними неадсорбованими коклюшними і паракклюшними сироватками у розведенні 1:10 і специфічними монорецепторними сироватками до аглютиногенів (факторів) 1 і 14;

в) постановка проби на уреазу.

4) Видача попереднього позитивного результату проведеного дослідження.

5-й день (через 96 год.)

Вивчення виділеної чистої культури у разі наявності у досліджуваному матеріалі паракклюшних або бронхосептичних мікробів:

- а) вивчення характеру росту чистої культури і зміни кольору живильного середовища;
- б) приготування мазків і забарвлення їх за Грамом, мікроскопія;
- в) постановка реакції аглютинації на склі з видовими неадсорбованими і монорецепторними сироватками до аглютиногенів (факторам) 1, 14 і 12;
- г) постановка проби на уреазу і облік результатів;
- д) посів на середовище з МПА з тирозином;
- ж) за необхідності визначення рухливості шляхом посіву в стовпчик напіврідкого агару;
- е) посів на середу Сімонса.

6-й день (через 120 год.)

- 1) Вивчення виділеної культури коклюшного мікроба або, у разі пізнього зросту, паракоклюшного за схемою п'ятого дня дослідження.
- 2) Облік результатів п'ятого дня дослідження.
- 3) Визначення сероваріантів коклюшного мікроба.
- 4) Видача остаточної відповіді: позитивної або негативної.

Примітка: За відсутності росту підозрілих колоній на четвертий день дослідження чашки із середовищем культивування переглядають на п'ятий і шостий дні. Подальший хід дослідження триває за схемою.

Практичні навички з теми

Визначення морфотинкторіальних і культуральних властивостей бордетел.

Термінологія.

Родина: *Alcaligenaceae*

Рід: *Bordetella*

Вид: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. avium*.

Запитання для контролю знань

- 1. Морфологічні, культуральні, антигенні властивості збудника коклюшу. Класифікація. Стійкість до чинників навколишнього середовища.
- 2. Значення в патології людини. Основи патогенезу, клінічні форми. Імунітет.
- 3. Правила взяття матеріалу, доставка його до лабораторії. Лабораторна діагностика. Диференціація збудників коклюшу, паракоклюшу та бронхопептикозу.
- 4. Специфічна профілактика коклюшу. Етіотропна терапія.

Тестові завдання

1. З метою серологічної діагностики коклюшу поставлена розгорнута реакція із коклюшним і паракоклюшним діагностикумами. На дні пробірок, в які було внесено діагностикум *Bordetella parapertusis*, утворився зернистий осад. Які антитіла виявляються в цій реакції?

- A. Бактеріолізину.
- B. Опсоніни.
- C. Аглютиніни.
- D. Антитоксини.
- E. Преципітини.

2. У пацієнта спостерігаються виражені катаральні симптоми. На поживному агарі Борде–Жангу вирости колонії, що нагадують крапельки ртуті. Під час дослідження мазків з патологічного матеріалу виявлено невеликі овоїдної форми грамнегативні палички розміром 1-3 мкм. Які мікроорганізми було виділено?

- A. *Bordetella*.
- B. *Corynebacteria*.
- C. *Meningococcus*.
- D. *Mycobacteria*.
- E. *Brucella*.

4. Під час бактеріологічного дослідження мокротиння дитини з задушливим кашлем та лихоманкою виявлено глянцеві гладкі колонії, що ростуть на казеїно-вугільному агарі та нагадують краплі ртуті. Мікроскопічне дослідження виявило короткі грамнегативні бактерії. Який мікроорганізм було виділено з мокротиння?

- A. *Klebsiella pneumoniae*.
- B. *Bordetella pertussis*.
- C. *Haemophilus influenza*.
- D. *Streptococcus pyogenes*.
- E. *Corynebacterium diphtheriae*.

5. У бактеріологічну лабораторію доставили мокроту хворого із підозрою на коклюш. Під час посіву матеріалу на казеїново-вугільному агарі через 24 год відбулося дифузне фарбування поживного середовища на бурокоричневий колір і з'явилися коричневі колонії. Який мікроорганізм роду *Bordetella* був виділений у цьому випадку?

- A. *B. pertussis*.
- B. *B. parapertussis*.
- C. *B. pertussis, B. parapertussis*.
- D. *B. bronchiseptica*.
- E. Все перераховане.

Література

Основна

1. Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов. – 5-е изд., испр. – Москва : ООО "Медицинское информационное агентство", 2016. – 792 с.

2. Зверев В. В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас-руководство : учеб. пособие / В. В. Зверев, А. С. Быков. – Москва : ООО "Медицинское информационное агентство", 2018. – 416 с.

3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник / под ред. В. П. Широкова. – 2-е изд. – Винница : Нова книга, 2015. – 952 с.

4. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник / за ред. В. П. Широкова. – 2-е вид. – Вінниця : Нова книга, 2011. – 952 с.

5. Широков В. П. Микробная экология человека с цветным атласом : учеб. пособие / В. П. Широков, Д. С. Янковский, Г. С. Дымент. – Киев : ООО "Червона Рута-Турс", 2010. – 340 с.

6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : в 2 т. / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Т. 1: учебник по дисциплине "Микробиология, вирусология и иммунология" для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 "Лечеб. дело", 060103.65 "Педиатрия", 060104.65 "Медико-профилактич. дело" – 2016 – 472 с.

7. Воробьев А. А. Медицинская и санитарная микробиология : учеб. пособие / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широков. – 3-е изд., стер. – Москва : Издательский центр "Академия", 2008. – 464 с.

8. Коротяев А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология : учебник / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – 4-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2008. – 767 с.

Додаткова

1. Донецкая Э. Г.-А. Клиническая микробиология: рук-во для специалистов клинической лабораторной диагностики / Э. Г.-А. Донецкая. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480с.

2. 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. – 600с.

3. Данилейченко В. В. Мікробіологія з основами імунології : підручник / В. В. Данилейченко, Й. М. Федечко, О. П. Корнійчук. – 2-е вид., перероб. та доп. – Київ : Медицина, 2009. – 391 с.

4. Широков В. П. Микробы в биохимических процессах, эволюции биосферы и существования человечества / В. П. Широков, Д. С. Янковский, Г. С. Дымент. – Киев : ФОП Верес О.И., 2014. – 464 с.

5. Янковский Д. С. Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека / Д. С. Янковский, В. П. Ширококов, Г. С. Дымент. – Киев : ТОВ "Червона Рута-Турс", 2011. – 169 с.

6. Manual of Clinical Microbiology / Karen C. Carroll et al. – 10th Edition. Vol. 2. – Washington, DC: ASM Press, 2011. – 2630 p.

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

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

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

10. Ananthanarayan: textbook of Microbiology. 9th Ed / Ananthanarayan, Paniker. – Orient Blackswan, 2013. – 657 p.

11. Конспект лекцій.

Навчальне видання

**Збудники повітряно-краплинних
бактеріальних інфекцій.
Збудники коклюшу**

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

Упорядники Замазій Тетяна Миколаївна
 Коваленко Наталія Іллівна

Відповідальний за випуск Т. М. Замазій



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

Формат А5. Ум. друк. арк. 3,0. Зам. № 20-33870.

**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.