

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

«11» декабря 2013г.

Решением Ученого совета
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России

« » 2014г.

СТОЛЯРОВА Л.Г., МАЗУРОВА И.Ю., САФОНОВА Т.Б.,
ФИЛИМОНОВА О.Ю., ТАРАСЕНКО Л.А., ВЛАСОВА И.В.,
ЗОЛОТАРЕВА Л.В., ЗАЙЦЕВ Е.М., ЛАПШИНА Г.К.

КОКЛЮШ

Учебное пособие

Москва

2014

УДК 616.921.8; 616.8; 613.0(075.8); 159.98
ББК 51.204.0я73 52.64 55.1 88.6 К89
К 597

Столярова Л.Г., Мазурова И.Ю., Сафонова Т.Б., Филимонова О.Ю., Тараненко Л.А., Власова И.В., Золотарева Л.В., Зайцев Е.М., Лапшина Г.К. Коклюш: учебное пособие/ Л.Г.Столярова, И.Ю.Мазурова, Т.Б.Сафонова, О.Ю.Филимонова, Л.А. Тараненко, И.В.Власова, Л.В.Золотарева, Е.М.Зайцев, Г.К.Лапшина; ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2014. – 110 с. ISBN 978-5-7249-2111-4.

Цель учебного пособия – оказание помощи специалистам в организации и проведении бактериологической и клинической диагностики коклюша, его лечении и профилактики. Содержание учебного материала соответствует содержанию основной профессиональной образовательной программы послевузовского профессионального и дополнительного профессионального образования по специальности «Бактериология» и «Инфекционные болезни».

В учебном пособии представлены данные о морфологических и культуральных свойства возбудителя, его антигенной структуре, иммунитете при коклюше, факторах патогенности и генетических особенностях. Дана современная характеристика эпидемиологии, клиники, лечения и профилактики коклюша. Детально описаны методы лабораторной диагностики данного заболевания.

Данное учебное пособие разработано сотрудниками кафедры микробиологии РМАПО, ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова» РАМН с участием сотрудников Учебно-методического управления РМАПО в соответствии с системой стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу и предназначено для врачей - бактериологов, эпидемиологов, инфекционистов и педиатров, а также для аспирантов, клинических ординаторов и студентов старших курсов медико-профилактического и клинического профиля медицинских вузов и слушателей циклов повышения квалификации врачей по указанным специальностям.

УДК 616.921.8; 616.8; 613.0(075.8); 159.98
ББК 51.204.0я73 52.64 55.1 88.6 К89

Табл.5. Ил.1. Библиогр.:12 назв.

Рецензенты: **Петрухина М.И.** - к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии РМАПО
Свистунова Т.С. – к.м.н., зав.бактериологической лабораторией
2-й инфекционной больницы г.Москвы

ISBN 978-5-7249-2111-4

© Российская медицинская академия
последипломного образования, 2014

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГГ - наружные белки бордетелл

АДФ - аденозин-ди- фосфат

АКДС - –вакцина адсорбированная коклюш, дифтерия, столбняк

БКВ - бесклеточная коклюшная вакцина

БМ - бактериологический метод

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

ГК - глюкокортикоидные гормоны

ДКП 1 - кислородные палатки

ИВЛ - искусственная вентиляция легких

ИПВ - инактивированная полиомиелитная вакцина

ИФА - иммуноферментный анализ

КТ - коклюшный токсин

КУА - плотная питательная среда казеиново-угольный агар

ЛПС - липополисахарид

ОРВИ - острое респираторное вирусное заболевание

ОРЗ - острое респираторное заболевание

ПРН - пертактин

ПСК - период судорожного кашля

ПЦР - –полимеразная цепная реакция

РИФ - реакция иммунофлюоресценции

РНК - рибонуклеиновая кислота

СОЭ - скорость оседания эритроцитов

ТЛТ - термолабильный (дермoneкротический) токсин

ФГА - фермент филаментозный гемагглютинин

ХИБ - хроническая инфекция бронхов

ц-АМФ - циклический аденозинмонофосфат

ЦКВ - цельноклеточные коклюшные вакцины

BrkA - *Bordetella resistance killing* - англ. – белок

CD4 - мономерный трансмембранный гликопротеин надсемейства Ig с молекулярной массой 55 кД, содержит 4 внеклеточных домена, трансмембранный домен и цитоплазматический участок, является маркером Т-хелперов.

Fim - фимбрии

IgM, IgG - иммуноглобулины M, G

IL-10 - интерлейкин 10

JNH-6, JMH-7 - японские бесклеточные коклюшные вакцины

r-РНК - рекомбинационная рибонуклеиновая кислота

pH - показатель кислотности

RS - респираторно-синцитиальная инфекция

Th1 - Т-хелпер 1, клетки воспаления

TLR - толл-подобных рецепторов

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	7
I. Общая характеристика представителей рода <i>Bordetella</i>	9
§1. Морфологические свойства.....	11
§2. Культуральные свойства.....	12
§3. Антигенная структура	16
<i>Контрольные вопросы</i>	20
II. Факторы патогенности <i>B. Pertussis</i>	20
§1. Фазы развития.....	21
§2. Факторы патогенности.....	23
§3. Генетические особенности.....	29
<i>Контрольные вопросы</i>	30
III. Эпидемиология коклюша.....	31
<i>Контрольные вопросы</i>	32
IV. Патогенез коклюша.....	32
<i>Контрольные вопросы</i>	34
V. Клиника коклюша.....	34
§1. Классификация.....	35
§2. Клиническая диагностика.....	36
<i>Контрольные вопросы</i>	43
VI. Дифференциальная диагностика коклюша.....	45
§1. В предсудорожный период.....	46
§2. В период судорожного кашля.....	47
<i>Контрольные вопросы</i>	51
VII. Лабораторная диагностика коклюша.....	51
§1. Показания к обследованию.....	53
§2. Критерии лабораторной диагностики.....	54
§3. Сроки обследования.....	55

§4. Оформление направления материала на исследование.....	56
<i>Контрольные вопросы</i>	57
VIII Бактериологическое исследование.....	57
§1. Взятие материала.....	58
§2. Доставка материала.....	60
§3. Ход исследования.....	61
§4. Ферментативная активность бордетелл.....	67
<i>Контрольные вопросы</i>	69
IX. Методы экспресс-диагностики коклюша.....	70
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	71
X. Серологические методы диагностики коклюша.....	71
<i>Контрольные вопросы</i>	76
XI. Терапия коклюша.....	77
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	85
XII. Профилактика коклюша.....	85
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	94
Заключение.....	94
Приложения.....	97
Глоссарий.....	107
Список литературы.....	108
Основная.....	108
Дополнительная.....	108

ВВЕДЕНИЕ

Долгое время среди воздушно-капельных инфекций коклюш являлся одним из наиболее распространенных и тяжелых заболеваний детского возраста.

Коклюш и коклюшеподобные заболевания вызываются двумя видами возбудителей: *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis*. Со временем произошло изменение биологических свойств коклюшного микроба, что повлияло на характер течения заболевания и его эпидемиологию.

Коклюшный микроб выделяет несколько токсических и вирулентных субстанций, отличающихся по своим биологическим эффектам. Наибольшее значение имеет коклюшный токсин, который вызывает расстройство центральной регуляции дыхания за счет воздействия на дыхательный центр, приводя к изменению ритма дыхания и снижению чувствительности γ -глобулин хеморецепторов к уровню CO_2 , что в свою очередь способствует нарушению функции внешнего дыхания вследствие недостаточной альвеолярно-капиллярной диффузии газов.

Коклюш – острое антропонозное заболевание, передающееся воздушно-капельным путем и характеризующееся своеобразным спазматическим кашлем, поражением дыхательной, сердечно-сосудистой и центральной нервной систем.

Впервые коклюш был описан Абу Али ибн Синой (Авиценной) в XI столетии. Более подробное описание получено в XVI-XVII веках. В 1578г. Guilleaumedebailou описал эпидемию этого заболевания в Париже, протекающую с большой летальностью. Через 100 лет, в 1678г., тяжелую эпидемию коклюша в Лондоне наблюдал Willis. Им подмечены наиболее характерные клинические особенности этого заболевания. Более подробно описание клинического течения коклюша было сделано Sydenham на основании изучения эпидемий коклюша в Англии за 1670-1679 гг.

В дальнейшем упоминания о коклюше встречаются в литературе более часто. Название болезни «коклюш» (от франц. – coqueluche, лат. – pertussis,

немец.-keuchhusten, англ.- whoopingcough) относится к 1724г., когда эпидемии коклюша наблюдались в Англии, Франции и Австрии.

В отечественной литературе первое упоминание о коклюше встречается у Н. Максимовича-Амбодика в его труде «Искусство повивания» (1784г.). Клиническая картина коклюша в России была впервые описана в 1847г. Русским педиатром С.Ф.Хотовицким (1796-1885г.г.) в его книге «Педиятрика».

В дореволюционной России систематические сведения о заболеваемости и смертности, в том числе и при детских инфекционных заболеваниях, впервые появляются в печати с 70-х годов XIX века, когда были организованы земства и начали издаваться санитарные и санитарно-статистические работы. Большое значение в исходах коклюша имели социальные факторы, основными из которых были материальная обеспеченность и жилищные условия. В эти годы коклюш занимал первое место среди четырех капельных инфекций (кори, скарлатины, дифтерии).

Снижение смертности при коклюше произошло лишь в 50-ые годы прошлого столетия. Решающую роль в проблеме коклюша сыграла специфическая профилактика, которая в нашей стране впервые была введена в широкую практику в 1958 – 1960 гг. Специфическая профилактика коклюша привела к резкому снижению заболеваемости, уменьшению тяжести болезни, а также повлияла на изменение токсических свойств возбудителя.

Несмотря на то, что возбудитель коклюша – *Bordetellapertussis* был открыт в 1906г. J.Bordet и O.Yengou, многие фено- и генотипические свойства его оставались недостаточно изученными. Совершенствование молекулярной биологии и необходимость создания бесклеточной вакцины, менее реактогенной, чем корпускулярная, ускорила получение новых данных об антигенной структуре, факторах патогенности *B.pertussis*, их роли в развитии болезни и формировании иммунитета. Начиная с 80-90х годов прошлого столетия, появилась возможность разработки новых современных методов лабораторной диагностики, однако до сих пор такие методы в практическом здравоохранении в нашей стране отсутствуют.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА **BORDETELLA**

Возбудители коклюша, паракоклюша и коклюшеподобных заболеваний относятся к семейству **Alcoligenoaceae**, который включает 2 рода:

1. *Alcoligenes*
2. *Bordetella*

По классификации «Manual of clinical Microbiology а» (10-th edition 2003) род **Bordetella** включает 9 видов:

- *B. pertussis*,
- *B. parapertussis*,
- *B. bronchiseptica*,
- *B. avium*,
- *B. hinzii*,
- *B. holmesii*,
- *B. trematum*,
- *B. petrii*,
- *B. ansorpii*.

Филогенетический анализ, основанный на изучении последовательности генов на 16Sr-РНК показал, что *B. Pertussis*, *B. Parapertussis*, *B. Bronchiseptica*, *B. Holmesii* тесно связаны. Что касается других видов бордетелл, то информации на сегодняшний день ещё недостаточно.

B. pertussis был выделен в 1906 г. Борде и Жангу из кашлевой слизи больного ребенка при посеве на питательную среду, содержащую кровь. В связи с этим этот микроб был отнесен к гемофилам и долго назывался *Haemophiluspertussis*. В дальнейшем было показано, что коклюшная палочка может успешно расти на средах без добавления крови. Это поставило под сомнение обоснованность отнесения *B. Pertussis* к гемофилам.

Возбудитель паракоклюша был выделен в 1937 г Эльдерингом и Кендриком, и независимо от них Бредфордом и Славиным от детей с типичной

картиной коклюша. В последующих работах многих исследователей показана не только самостоятельная роль паракоклюшного микроба, но и установлено, что этот возбудитель обычно вызывает заболевание, которое характеризуется более лёгким течением по сравнению с коклюшем. Первоначально возбудитель паракоклюша, также как и коклюша был отнесён к роду *Haemophilus*.

Возбудитель бронхотоксикоза *B. Bronchiseptica*, называемый собачьей чумой был описан Ферри в 1911 г., выделившим его из дыхательных путей у собак на ранних стадиях заболевания. В дальнейшем было показано, что *B. bronchiseptica* является частым обитателем дыхательного тракта домашних животных, грызунов и т.д. Этиологическая роль его в коклюшеподобных заболеваниях человека полностью не доказана. Впервые, в 1926 г. Броуну удалось выделить *B. Bronchiseptica* от ребенка с клиническими проявлениями коклюша средней тяжести. *B. Bronchiseptica* – оппортунистический патоген и может обнаруживаться у человека при респираторных (бронхите и пневмонии) и других инфекциях (бактериемии, инфекции ран, эндокардите, менингите, перитоните). Некоторые из этих инфекций возникают при контакте с животными.

В 1976 г. Farrington и Jorgenson выделили бронхосептикоподобные микроорганизмы от молодых индюшат. В этом же году подобный микроб был выделен от воробьёв и получил название как возбудитель «птичьего бордетеллёза». Впоследствии он получил название – *B. Avium*. Является исключительно ветеринарным патогенном, не вызывает заболевания у человека, хотя иногда *B. avium*–подобные микробы выделяются из образцов материала полученного от человека.

В 1994-1996 гг. описаны *B. Hinzii*, *B. Holmesii*, *B. Trematum*. Они редко вызывают инфекционный процесс у человека, который может носить как респираторный так и нереспираторный характер. *B. Hinzii* первоначально отнесли к *Alcaligenes faecalis* тип II или *B. Avium-like* (подобным) и выделили из респираторного тракта цыплят и индюшат в различных регионах мира, при этом данный микроорганизм не всегда вызывал инфекционный процесс. Есть

сообщения о человеческих изолятах, выделенных из гноя больных фибринозным циститом.

B. holmesii может вызывать у человека заболевания с коклюшеподобной симптоматикой и иногда выделяется из крови при септицемии. *B. trematum* выделяется из инфицированных ран и отделяемого ушей.

В 2001 году была описана *B. Petrii*, единственный представитель рода, выделенный из окружающей среды и способный жить в анаэробных условиях. В 2005 год был выделен *B. Ansoarii*, описано несколько случаев выделения от пациентов с онкологическими заболеваниями (из гнояного содержимого эпидермальной кисты из крови).

§1. Морфологические свойства

Морфологически представители рода ***Bordetella*** – это мелкие граммотрицательные коккобациллы или короткие мелкие палочки размером от 0,2-0,5 до 0,5-2,0 мкм. *B. pertussis* имеет вид коккобацилл со слегка удлиненным одним диаметром, *B. Parapertussis* – ярко выраженная палочка длиной 0,8-2,0 мкм и шириной 0,6-1,5 мкм.

Клетки располагаются по одиночке или группами, имеют нежную капсулу, которую можно выявить сложными методами окраски по: Романовскому – Гимзе, Бурри – Гинсу и т.д. *B. Pertussis*, *B. parapertussis* и *B. Bronchiseptica* хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красителями. Наиболее целесообразно использовать краситель толуидиновый синий, т.к. этот краситель позволяет выявить метакроматические гранулы, наличие которых обусловлено неравномерным распределением липидов в клетке.

Среди бордетелл встречаются как подвижные виды *B. Bronchiseptica*, *B. Avium*, так и неподвижные – *B. Pertussis*, *B. Parapertussis*, *B. Hinzii*. Спор бордетеллы не образуют.

B. holmesii фенотипически сходны с видами ацинетобактера. Это мелкие коккобациллы или короткие палочки, имеют утолщение в середине. Если среда

несбалансированная, тона ней *B. Holmesii* образуют удлинённые палочки. Они хорошо растут на среде, используемой для выделения легионелл. Продуцируют растворимый пигмент тирозиназу. Способность продуцировать пигмент позволяют дифференцировать *B. Holmesii* от *B. Pertussis*, *B. Parapertussis*, *B. Bronchiseptica* и *B. Avium*.

Представители рода *Bordetella* – облигатные аэробы. Оптимальные условия для их роста температура 35-37°C и Рн среды 7,8. Присутствие углекислоты в концентрации 0,3-10,0% способствуют росту бордетелл. Если концентрация CO₂ будет выше, это тормозит рост бактерий.

§2. Культуральные свойства

B. pertussis наиболее требовательны к питательным средам, им необходим комплекс факторов роста. Свежие клинические изоляты неспособны расти на «шоколадном агаре» или на обычной агаровой среде с 5% овечьей кровью. Кроме того, некоторые субстанции, включая жирные кислоты, соли тяжелых металлов, сульфиды и пероксидазы ингибируют рост *B. pertussis*. Среда для первичного выделения *B. Pertussis* из клинического материала в основном включает крахмал, древесный уголь, ионообменные смолы или большое количество крови для инактивирования ингибирующих веществ.

B. parapertussis, *B. Bronchiseptica* и *B. Avium*, как правило, нетребовательны к средам, и могут расти на обычной питательной среде, включая кровяной агар или среды без крови.

В качестве ингибиторов сопутствующей микрофлоры на питательных средах используются бензилпенициллин. Однако, часть штаммов *B. Pertussis* чувствительна к этому антибиотику, что приводит к снижению высеваемости, поэтому его следует использовать в малых концентрациях. За рубежом вместо бензилпенициллина используют цефалексин, а для подавления грибковой микрофлоры – амфотерицин В.

На питательных средах рост *B. Pertussis* обнаруживается через 48-72 часа, для *B. Parapertussis* и *B. Bronchiseptica* характерна высокая скорость роста и поэтому их рост наблюдается уже через 24 часа. При учёте результатов исследования через 72 часа можно видеть колонии более крупные у *B. Parapertussis* и *B. Bronchiseptica*, чем *B. Pertussis*.

На кровяном агаре колонии всех видов бордетелл появляются в виде выпуклых, мелких, блестящих, непрозрачных образований с ровными краями, в виде капелек росы маслянистой консистенции белого, сероватого или жемчужных цветов.

Для *B. Parapertussis* характерно появление металлического оттенка.

На молочно-кровяном агаре *B. Pertussis* и *B. Parapertussis* образуют плоские серовато-белые колонии.

Представители рода *Bordetella* обладают способностью гемолизировать эритроциты, однако величина и характер зоны гемолиза вокруг колоний зависит от вида крови, её концентрации и состава питательной среды. Более четкую зону гемолиза можно видеть на среде КУА с кровью. На среде КУА колонии выпуклые, круглые с ровными краями серовато-голубоватого цвета. При проведении стереоскопической микроскопии можно видеть узенький луч света «хвостик», отходящий от центра колонии. Наиболее часто «хвостик» выражен у *B. Pertussis*.

При изучении культуральных свойств бордетелл в стереоскопическом микроскопе колонии *B. Pertussis* однородные, гладкие без пигмента, не имеют зернистости. Для колоний *B. Parapertussis* характерно наличие колоний с зернистым строением, приподнятым центром и чаще с пигментом, придающим колониям розоватый или зеленоватый оттенок (особенно четко это видно через 72 ч. Инкубации).

Кроме того, следует отметить, что колонии *B. Pertussis* и *B. Parapertussis*, особенно на среде КУА с кровью – влажные, мягкой консистенции и очень легко снимаются с поверхности агара.

B. parapertussis и *B. Holmesii* имеют фермент тирагиназу, который расщепляет находящийся в среде тирозин с образованием меланиноподобного пигмента, и поэтому обладают способностью изменять цвет некоторых питательных сред.

Так, при росте на кровяных средах и КУА происходит потемнение или побурение среды, мясопептонный агар с тирозином приобретает коричневый цвет.

В жидких питательных средах бордетеллы растут при добавлении к ним крахмала (0,15%). Желательно вместе с крахмалом в среду добавлять активированный уголь для адсорбции ненасыщенных жирных кислот, которые тормозят рост микрофлоры.

Штаммы *B. Pertussis* растут только на мартеновском бульоне с крахмалом и углём, но некоторые могут расти и без угля.

B. parapertussis быстро размножаются и хорошо растут на сахарном и мартеновском бульоне с активированным углём и крахмалом (и без него).

В жидкой питательной среде бордетеллы сначала растут в виде поверхностной плёнки, затем на дне образуется густой слизистый осадок, поднимающийся при встряхивании пробирки в виде слизистой нити.

Кроме того, *B. Parapertussis* вызывают лёгкое равномерное помутнение питательной среды, тогда как при росте *B. Pertussis* среда остаётся прозрачной.

При проведении световой микроскопии изучая морфологию *B. Pertussis* и *B. Parapertussis* трудно отличить их друг от друга, поэтому для дифференциации необходимо использовать комплекс других диагностических тестов.

Бактерии рода обладают низкой ферментативной активностью (из них самые неактивные *B. Pertussis*) – не образуют индола, не свёртывают молоко, не разжижают желатин, не утилизируют сахара, они не используют глюкозу как источник энергии, не восстанавливают нитраты в нитриты (исключение *B. Bronchiseptica*).

Все представители рода бордетелл окисляют аминокислоты, обладают каталазной, гиалуронидазной и коагулазной ферментативной активностью.

B. pertussis обладает оксидазной активностью, которая отсутствует у других видов бордетелл.

Наиболее отчетливо от дифференцировать *B. Pertussis* от *B. Parapertussis* можно по наличию уреазы в пробе Закса или при посеве на скошенный агар с мочевиной (используется двойной индикатор Андрее и тимолово-синий).

Основные свойства бордетелл представлены в таблице 1.

Таблица 1

Основные свойства видов рода *Bordetella*

Признаки	Рост на	Рост на	Подвижность	Оксидаза	Уреаза	Тирозиназа	Восстановление	Утилизация	Каталаза	Гиалуронидаза	Коагулаза
<i>B. pertussis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>B. parapertussis</i>	+	V	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>B. avium</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>B. hinzii</i>	+	+	+	+	±	-	-	+	+	+	+
<i>B. holmesii</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>B. trematum</i>	+	+	+	-	-	-	±	-	+	+	+
<i>B. petrii</i>	+		-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>B. ansorpui</i>	+		+	-	-	-	-	+	+	+	+

V – переменные, * – через 4 часа

§3. Антигенная структура

Микроорганизмы рода *Bordetella* имеют общие родовые антигены и антигены, характерные для каждого вида (видовые).

Наличие общих родовых антигенов является причиной положительной реакции агглютинации сгомолгичными и гетерологичными неадсорбированными сыворотками как коклюшными так и паракклюшными. Всего у микроорганизмов рода *Bordetella* описано 16 антигенов из них один седьмой является обще родовым.

Антигенная структура в настоящее время изучена только для 3 видов бордетелл: *B. Pertussis*, *B. Parapertussis* и *B. Bronchiseptica*. В отношении других представителей рода информация пока отсутствует.

Антигенная структура 3 видов бордетелл представлена в таблице 2.

Таблица 2

Антигенная структура видов рода *Bordetella*

Антигенные факторы	Виды бордетелл		
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Родовые	7	7	7
Видовые	1	14	12
Типовые	2,3,4,5,6,13	8,9,10	8,9,10,11,13

Практически все антигены *B. Pertussis* являются иммуногенными и могут стимулировать образование IgM, IgA и IgG антител при естественной и искусственной иммунизации. Появление или нарастание уровня противококлюшных антител при естественной иммунизации происходит в течение первых трех недель от начала заболевания. Заболевание

сопровождается нарастанием всех трех основных классов иммуноглобулинов: IgM, IgA и IgG.

В некоторых случаях выраженный IgM ответ может регистрироваться даже в течение инкубационного периода. В ходе заболевания может наблюдаться повышение уровня антител одних классов, снижение уровня или отсутствие других.

Наличие IgM антител и нарастание в динамике заболевания IgG антител является признаком периода разгара болезни, острой его фазы.

Имеются данные о том, что IgA антитела к антигенам В. Pertussis играют ведущую роль в формировании местного гуморального иммунитета к коклюшу.

В связи с этим антителам этого класса придается значительное диагностическое значение при коклюше. Установлено, что у значительной части больных коклюшем определялись противокклюшные IgA антитела в высоких титрах. На этом основании повышенный уровень антител этого класса может рассматриваться как серологический маркер текущей коклюшной инфекции. Однако повышенные уровни антител определялись также и у определенной части здоровых лиц. При этом частота выявления IgA антител достоверно повышалась с возрастом обследованных.

Предполагается, что обнаружение IgA антител у практически здоровых лиц может быть признаком перенесенного коклюша в асимптомной или малосимптомной формах. Это обстоятельство в определенной степени снижает диагностическое значение IgA антител к антигенам В. Pertussis, однако, имеет значение для изучения распространения скрытых форм заболевания.

С другой стороны, не все вирулентные факторы В. Pertussis являются протективными антигенами, способными обеспечить защиту от коклюша. Имеющиеся сведения о протективном значении антигенов В. Pertussis ограничены и противоречивы. В значительной степени это

обусловлено отсутствием адекватных методов оценки протективного значения отдельных антигенов коклюшного микроба.

Наиболее изучены в этом отношении КТ, ФГА, пертактин и фимбриальные белки. Установлено, что эти антигены могут индуцировать защиту против коклюша, как человека, так и животных. Выявлена статистически значимая корреляция между защитой от коклюша и уровнем IgG антител к КТ, пертактину и фимбриям 2 и 3. Антитела к этим антигенам могут быть маркерами уровня поствакцинального иммунитета, стимулированного цельноклеточными и бесклеточными вакцинами.

Защита от коклюша у вакцинированных детей и переболевших коклюшем формируется за счет активации как клеточных, так и гуморальных факторов иммунитета.

Имеющиеся данные о возможности использования показателей клеточного иммунитета для оценки защищенности от коклюша и эффективности коклюшных вакцин относительно немногочисленны. В частности, при исследовании ответа периферических Т лимфоцитов к КТ, ФГА и пертактину у больных коклюшем и привитых бесклеточной коклюшной вакциной «Инфанрикс» было установлено, что у вакцинированных и больных детей активация клеточного иммунитета была эквивалентной.

Имеются данные о том, что показатели клеточного иммунитета персистируют дольше, чем антительный ответ. При этом бесклеточные коклюшные вакцины индуцировали более выраженный клеточный иммунитет, чем цельноклеточная вакцина.

По мнению авторов, показатели клеточного иммунитета лучше коррелирует с защитой от коклюша и могут быть использованы для оценки иммуногенности вакцин. По данным других авторов, признаки активации клеточного иммунитета к КТ, ФГА и пертактину у вакцинированных бесклеточными коклюшными вакцинами детей сохранялись в течение 24 месяцев.

Таким образом, показатели клеточного иммунитета могут служить дополнением к серологическим данным при исследовании уровня поствакцинального иммунитета.

Предполагается, что вакцинация цельноклеточными и бесклеточными коклюшными вакцинами может сопровождаться длительной персистенцией Т и В клеток памяти при анамнестическом антительном ответе.

Следовательно, иммунологическая память может играть более важную роль в протекции и обеспечивать у привитых детей защиту от коклюша при отсутствии противококлюшных антител в сыворотке.

На экспериментальной модели также было продемонстрировано, что протективный иммунитет к коклюшу в значительной степени определяется CD4Т клетками и В лимфоцитами.

В последние годы проводятся исследования, направленные на выяснение значения механизмов врожденного иммунитета в формировании невосприимчивости к коклюшу.

Показано, что активация толл-подобных рецепторов (TLR) имеет важное значение для формирования протективного иммунитета к В. Pertussis посредством TLR-4 опосредованной активации дендритных клеток и В лимфоцитов, индукции синтеза цитокинов.

Также **установлено,** что толл – подобный рецептор TLR-4 активирует продукцию IL-10 и ингибирует Th1 ответ и ограничивает воспаление в легких в ходе инфицирования.

Приведенные данные указывают на информативность показателей клеточных факторов для оценки противококлюшного иммунитета. Однако, эти методы не получили распространения в практике, и используются только при проведении научных исследований.

Основным способом оценки противококлюшного иммунитета, доступным в условиях практического здравоохранения является исследование гуморального звена.

Контрольные вопросы:

1. Какие виды бордетелл наиболее тесно генетически связаны?
2. Какие исследователи впервые выделили возбудитель паракоклюша?
3. Какие виды патогенных бордетелл подвижны?
4. Могут ли свежие клинические штаммы *B. Pertussis* расти на простых питательных средах?
5. Чем внешне отличаются колонии *B. Pertussis* от колоний *B. Parapertussis* при изучении в стереоскопическом микроскопе?
6. Какое свойство отличает *B. pertussis* от других представителей рода?
7. Обладают ли бордетеллы ферментативной активностью?
8. Какие антигены имеются у микроорганизмов рода *Bordetella*?
9. Какие антитела образуются в организме человека при естественной и искусственной иммунизации?
10. Какие антитела являются признаком периода разгара болезни (его острой фазы)?

II. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *B. Pertussis*

B. pertussis обладает сложным набором факторов патогенности, действующих согласованно и целенаправленно. Основной точкой их приложения является мерцательный эпителий респираторного тракта.

B. pertussis практически лишена инвазивности. Попадая в дыхательные пути, возбудитель прикрепляется к ресничкам мерцательного эпителия трахеи и бронхов и размножается на их поверхности, вызывая повреждение эпителиоцитов. Одним из основных факторов вирулентности *B. Pertussis* являются токсины.

§1. Фазы развития

B. pertussis выделенные от больных продуцируют токсины и высоко вирулентны, но при субкультивировании на 21есс21глютинин питательных средах появляются колонии нового типа, которые имеют разную степень вирулентности. Эти изменения связаны с различными фазами развития культуры.

Leslie и Gander в процессе длительного культивирования коклюшных микробов в среде Борде–Жангу отметили значительные изменения их вирулентности и серологических свойств по сравнению с исходными штаммами. Стадии диссоциации были разделены на несколько «фаз»:

- фаза 1 – вирулентная, наиболее полноценна в 21есс21глют отношении,
- фазы 2 и 3 – промежуточные серологические варианты,
- фаза 4 – авирулентная, слабоантигенная.

Эти данные, в основном, были подтверждены многими авторами, в том числе Lawson. Но, подтвердив данные в отношении фаз 1, 3 и 4, он не обнаружил среди своих культур штаммов, сходных с фазой 2, и вместе с тем выявил другие варианты. На основании собственных данных Lawson детально описал характерные признаки для трех форм колоний:

- гладкой,
- промежуточной,
- шероховатой.

Гладкая форма колоний (фаза 1 по Лесли и Гарднеру) бордетелл микроскопически - мелкие мономорфные палочки, размером от 0,2 мкм до 0,3 мкм в ширину и от 0,4 до 1,2 мкм в длину, иногда расположены парами, неподвижные, имеют тонкую нежную капсулу.

На среде Борде-Жангу колонии *B. pertussis* блестящие, жемчужно-серого цвета, выпуклые, размером от 0,25 до 1 мм в диаметре. Не растут на шоколадном, кровяном, асцитном агаре, среде Лефлера. Индол в пептонной

воде не образуют, углеводы не ферментируют.

При внутрикожном введении кроликам *B.pertussis* вызывают некроз; внутрибрюшинное введение животным (кроликам, морским свинкам, мышам) вызывает их гибель; при внутри трахеальном, внутриносовом введении и в гортань у мышей наблюдается бактериемия и гибель от пневмонии.

Промежуточная форма (3 фаза по Лесли и Гарднеру) - *B.pertussis* образуется только в результате лабораторных пересевов, от больных такие штаммы не выделялись. Клетки 3 фазы имеют размеры 0,4 – 6,0 мкм, но их колонии неотличимы от колоний 1 фазы. На среде Борде-Жангу образуют гемолиз. Хорошо растут на кровяном, шоколадном агаре, среде Лефлера и на мясо-пептонном бульоне. При внутрикожном введении кролику некроза не вызывают. Слабовирулентны для мышей. Монорецепторная сыворотка против промежуточной формы *B.pertussis* хорошо агглютинирует свои штаммы и только частично штаммы гладкие и шероховатые форм (1 и 4 фазы).

Форма шероховатая (4 фаза по Лесли и Гарднеру) появляется исключительно при культивировании в лабораторных условиях.

Морфологически 4 фаза *B.pertussis* имеют вид цепочек до 40-50 мкм длиной, колонии размером 4-5 мм в диаметре, растут на всех средах. На среде Борде-Жангу гемолиза не образуют, колонии сухие, зернистые, непрозрачные, коричневого цвета. Эта форма лишена токсических и вирулентных свойств и имеет слабые антигенные свойства. **Получить иммунную сыворотку к 4 фазе *B.pertussis* сложно.**

К этим данным можно добавить еще несколько признаков, отличающих шероховатую (4 фаза) от гладкой (1 фаза) формы бордетелл.

Это отсутствие у 4 фазы гемагглютиниана, гистаминсенсibilизирующего и лимфоцитозстимулирующего факторов, протективного антигена, аденилатциклазы. При этом выявлены изменения в

протеиновом профиле наружной мембраны клетки – отсутствие по крайней мере четырех протеинов из всех обнаруживаемых в фазе 1.

Установлено, что деградация штаммов от 1-ой к 4 фазе не связана с изменением таких ферментов, как супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза. В опытах ДНК-ДНК гибридизации, с применением количественного гидроксипатитного метода, установлена полная гомология ДНК обеих фаз.

Можно заключить, что деградация штаммов 1 фазы в фазу 4 не обусловлена потерей хромосомного или экстрахромосомного материала.

§2. Факторы патогенности

1. Коклюшный токсин (КТ) – сложный пятикомпонентный белок с молекулярной массой 117 Кд. Он состоит из S1 субъединицы (А-протомера), обладающей АДФ-рибозилирующей и рядом других токсических активностей, и В-олигомера, состоящего из 4-х субъединиц (S2-S5), который связывается с рецепторами эукариотической клетки и способствует прохождению S1 субъединицы в цитозоль (это цитоплазма).

В геноме каждую субъединицу токсина кодирует отдельный ген. Субъединицы S2 и S3 гомологичны на 70% по аминокислотному составу и на 75% по составу нуклеотидов. Субъединицы синтезируются по отдельности, накапливаются в периплазме клетки, где и соединяются в токсин.

В организме хозяина КТ обладает высокой иммуногенностью, приводит к развитию лимфоцитоза и повышает выработку инсулина. В экспериментах на мышах показана протективная роль КТ. После аэрозольного заражения у животных вырабатывались антитела IgG к КТ (при минимальном уровне антител к другим антигенам *B.pertussis*), а после повторного заражения выздоровевших животных элиминация возбудителя происходила существенно быстрее, чем у мышей, иммунизированных

бесклеточной вакциной, у которых на момент инфицирования преобладали антитела к филаментозному гемагглютининому (ФГА).

С КТ связывают тяжесть заболевания и системные проявления при коклюше. Ему отводится ведущая роль в формировании длительного и достаточно напряженного иммунитета.

Однако, в ряде исследований указывается на присутствие практически всех симптомов коклюша у больных паракоклюшем, при котором токсин не вырабатывается; единственным отличием является отсутствие лейкоцитоза при паракоклюше.

Некоторые исследователи считают, что роль КТ в патогенезе еще недостаточно изучена.

2. Пертактин – белок с молекулярной массой 69 Кд является нефимбриальным поверхностно расположенным антигеном, входящим в состав наружной мембраны *B.pertussis*. Он рассматривается как один из факторов вирулентности и иммуногенности возбудителя. Его связь с вирулентностью опосредована тем, что он наряду с ФГА и КТ принимает участие в прикреплении микробов, и инвазии их в клетки хозяина, включая реснитчатый эпителий и альвеолярные макрофаги. Активная и пассивная иммунизация животных пертактином защищает их от церебрального заражения коклюшем.

У *B.bronchiseptica* и *B.parapertussis* (между которыми существует высокая степень генетического родства) обнаружены белки, сходные по молекулярной массе с пертактином, однако подобный белок у *B.bronchiseptica* имеет другую изоэлектрическую точку,

3. Филаментозный гемагглютинин (ФГА) выступает в роли главного адгезина коклюшного микроба, являясь поверхностным белком и обеспечивая прикрепление вирулентных бактерий к цилиарным клеткам верхних дыхательных путей, он инициирует начало патогенного цикла. В экспериментах на животных ФГА не проявляет токсичности, при активной иммунизации мышей защищает их от последующего инфицирования.

4. Фимбрии и антигены. Антигены уже описаны при определении сероваров бордетелл. Они тесно связаны с белками таких образований как фимбрии (Fim).

Существует несколько видов фимбриальных белков: Fim 2, Fim 3, Fim X. Фимбрии состоят из большой (Fim 2 или Fim 3) и малой субъединиц (FimD). Малая субъединица связывается с рецептором V α -5 (интегрином), находящимся на поверхности моноцитов. Посредством большой субъединицы фимбрии *B.pertussis* связываются с сульфатированными сахарами, имеющимися на поверхности эпителия во всех отделах дыхательного тракта человека.

Серотипирование *B.pertussis* основано на реакции агглютинации бактериальных клеток с моноклональными антителами к белкам фимбрий. Выявлены эпитопы белков Fim 2 и Fim 3, которые ответственны за связывание антител, при этом максимальная активность иммуноглобулинов А и G связана с разными эпитопами.

Роль антигенов в патогенезе коклюша до сих пор мало изучена. В отличие от классического адгезина ФГА они не обладают выраженными адгезирующими свойствами. Более того, они могут снижать адгезию за счет стерической конкуренции с ФГА и коклюшным токсином, ингибируют адгезию *B.pertussis* к клеткам Vero.

Фимбрии играют активную роль в аэрогенном инфицировании людей и животных. Они защищают мышей от респираторного, но не от интрацеребрального заражения.

Процесс инфицирования верхних дыхательных путей является многофакторным и зависит от наличия в микробной клетке ряда антигенов:

- фимбрий,
- ФГА.
- КТ.

Штаммы, дефектные по фимбриям и ФГА, не задерживаются в трахее и носоглотке, но способны колонизировать легкие. Это свидетельствует о

том, что фимбрии отвечают за первичное взаимодействие с клетками респираторного эпителия.

Фимбрии включены в состав некоторых бесклеточных коклюшных вакцин.

5. Другие белки (как факторы патогенности). Белок BrkA (*Bordetella resistancetokilling* – англ.) является белком наружной мембраны и кодируется одноименным локусом (*brk*) сходным с пертактином (гомология 29%), он также участвует в адгезии и инвазии микроорганизма. Предполагается, что он отвечает за устойчивость микроорганизма к классическому комплемент-зависимому пути элиминации возбудителя. Гомологичный белок продуцируется *B. bronchiseptica*, однако он не связан с таким свойством, как устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови.

Еще один белок, кодируемый локусом *brk* и обеспечивающий устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови, получил название BrkB. Он содержит участки, гомологичные различным транспортным белкам, и предположительно локализуется в цитоплазматической мембране.

К другим белкам, вероятно также являющимися факторами патогенности микроорганизмов рода *Bordetella*, относятся белки наружной мембраны, имеющие молекулярную массу 92, 32 и 30 Кд. N-концевые последовательности белков 30 и 32 Кд гомологичны C-концевому участку Р93-предшественника пертактина.

При определенных условиях, очищенный белок 32 Кд защищает мышей от интрацеребрального заражения *B. pertussis*. Белок 92 Кд становится протективным в присутствии небольшого (непротективного) количества КТ.

6. Трахеальный цитотоксин. Представляет собой фрагмент пептидогликана клеточной стенки, обладает различными биологическими свойствами:

- пирогенность,
- адьювантность,
- артритогенность,
- стимуляция продукции IL-I.

In vivo токсин повреждает эпителиальные клетки трахеи и вызывает цилиостаз. При этом нарушается очищение слизистой от бактерий (мукоцилиарный клиренс) и создаются условия для персистирования инфекции.

7. Фактор колонизации трахеи - фактор вирулентности, который продуцируется только штаммами *B. pertussis* и отсутствует у *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*. Фактор колонизации трахеи представляет собой белок с молекулярным весом 64Kd.

Анализ аминокислотной последовательности показал, что С-концевая часть белка (30Kd) имеет 50% идентичность С-концевой части такого белка как пертактин. N-концевая часть (34Kd) является уникальной, содержит три аминокислотных участка RGD и имеет 16,5% пролина. Подобные RGD участки имеют филаментозный гемагглютинин и пертактин.

Показано, что такая структура может оказывать влияние на процесс адгезии и колонизации респираторного эпителия дыхательных путей.

Так, при интраназальном заражении мышей штаммом *B. pertussis* 18323, имеющим недостаток этого белка, отмечали 10-ти кратное уменьшение количества микробов, выделенных из трахеи, по сравнению с обычным типовым штаммом.

8. Аденилатциклазный (токсин/гемолизин) представляет собой бифункциональный белок с молекулярной массой 200 Кд, состоящий из аденилатциклазного домена на N-концевой и гемолизина (Hly) на С-концевой части молекулы.

Обе – аденилатциклазная и гемолитическая - активности необходимы для инициации коклюшной инфекции. Аденилатциклазе

присущи иммуногенные свойства. Она может выступать в качестве важного иммунопротективного антигена в предупреждении или выздоровлении от коклюшной инфекции.

9. Термолабильный (дермoneкротический) токсин (ТЛТ) продуцируется под контролем *bvg*-локуса. Его патогенное действие связано с вазоконстрикторным эффектом на кровеносные сосуды, что приводит к тканевой ишемии с последующими некрозами. У экспериментальных животных вызывает снижение прироста массы тела, атрофию селезенки, ишемические повреждения или некроз кожи.

ТЛТ не принимает сколько-нибудь значительного участия в приживлении и колонизации коклюшного микроба. Протективные свойства его проблематичны. Штаммы, лишенные ТЛТ, полностью сохраняют вирулентность на уровне исходного штамма. Высокая активность ТЛТ может отрицательно сказаться на реактогенности клеточных вакцин, поэтому при конструировании продуцентов целесообразна инаktivация ТЛТ путем сайт направленного мутагенеза.

10. Липополисахариды (ЛПС). Липополисахарид бордетелл отличается от липополисахаридов энтеробактерий. В его состав входят два липида: А и Х.

Липид Х определяет биологическую активность липополисахарида.

Липид А обладает низкой пирогенностью, не токсичен; обладает иммуногенностью; с ним также связывают реактогенность цельноклеточной вакцины.

Отсутствие заметной лихорадки у больных коклюшем, по-видимому, обусловлено преимущественным размножением бактерий на цилиарном эпителии респираторного тракта, не обеспечивающем поступление пирогенного эндотоксина в систему кровообращения. В то же время адъювантное действие ЛПС может повысить эффективность протективных антигенов коклюшного микроба.

§3. Генетические особенности

К настоящему времени расшифрован геном *B. pertussis*, что позволяет проследить за изменениями в генах, кодирующих основные протективные антигены *B. pertussis* и факторы вирулентности.

B. pertussis, подобно другим микроорганизмам рода *Bordetella*, характеризуются вариабельностью гено- и фенотипа.

Экспрессия факторов вирулентности микроорганизмов рода *Bordetella* регулируется *bvg*-локусом, состоящим из транскрипционного активатора *Bvg*, трансмиттерного домена *BvgS* и регулятора *BvgR*. Под их контролем находится экспрессия генов, обеспечивающих синтез всех основных антигенов, в том числе факторов патогенности коклюшного микроба: филаментозного гемагглютинаина, сероспецифических фимбрий, коклюшного токсина, пертактина, аденилатциклазы/гемолизина, дермонекротического токсина и др.

Показан полиморфизм генов пертактина (*prp*) и *S1* субъединицы коклюшного токсина (*ptxS1*), кодирующих основные протективные антигены штаммов *B. pertussis*.

Структура этих генов у штаммов *B. pertussis*, выделяемых с 80-х годов прошлого столетия и по настоящее претерпела некоторую микроэволюционную изменчивость.

Это привело к отличию структуры генов между штаммами, вызывающими заболевание коклюшем и штаммами, используемыми для производства цельноклеточных вакцин.

Постоянно поддерживается интерес к бактериофагам бактерий рода *Bordetella*, их роли в обеспечении вирулентности и изучению лизогенности патогенных для человека и животных микроорганизмов. Этот интерес обусловлен известной ролью бактериофагов в формировании вирулентных форм патогенных бактерий и их участием в адаптации бактерий к среде обитания.

До сих пор связь бактериофагов *Bordetella* с вирулентностью возбудителей не установлена. Однако показано, что некоторые бактериофаги *B.bronchiseptica* обладают повышенным тропизмом к бактериям, находящимся в различных фазовых состояниях (Liu M. et.all 2002, 2004).

Трансдуцирующие бактериофаги всегда были важным инструментом генетического анализа бактерий. По этой причине поиск и изучение новых бактериофагов, особенно способных осуществлять генетическую трансдукцию хромосомных маркеров недостаточно охарактеризованных бактерий рода *Bordetella*, остается актуальной задачей

Учёные Нью-Йоркского университета сделали удивительное открытие – токсическое вещество, вызывающее неукротимый кашель при коклюше вырабатывается бактериофагом, инфицирующим бактерию.

Фаги вырабатывают особый фермент – лизин, который разрушает клеточную стенку инфицированных бактерий, освобождая в окружающую среду сотни фаговых частиц.

Сотрудники ContraFect полагают, что им удастся победить бактериальные инфекции, используя лизин для разрушения стенки бактерий (2012г.).

.

Контрольные вопросы:

1. Что является основным фактором вирулентности *B. pertussis*?
2. Чем по морфологии, вирулентности и серологии различаются культуры *B.pertussis* в разных фазах роста?
3. К чему в организме хозяина приводит действие коклюшного токсина?
4. С чем обусловлено вирулентное действие пертактина?
5. Что выполняет роль главного адгезина коклюшного микроба?
6. Какие отделы дыхательного тракта способны колонизировать штаммы, дефектные по фимбриям и ФГА?
7. Какие виды бордетелл продуцируют фактор колонизации трахеи?

8. Какой токсин бордетелл приводит к тканевой ишемии с последующими некрозами?
9. Чем обусловлено отсутствие заметной лихорадки у больных коклюшем?
10. Что вызывает неудержимый кашель при коклюше?

III. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ КОКЛЮША

Коклюш – типичная воздушно-капельная инфекция.

Особенности эпидемиологии коклюша определяются рядом факторов:

- высокой восприимчивостью человека,
- трудностями диагностики в продромальном периоде болезни,
- длительным постинфекционным иммунитетом,
- малой стойкостью возбудителя вне организма человека.

Источником инфекции является больной коклюшем. Передача заразного начала осуществляется воздушно-капельным путём. Заразность особенно велика в начале судорожного периода, далее постепенно снижается и к 25 дню больной коклюшем, как правило, становится незаразен.

Коклюш не является «летучей» инфекцией. Вязкость мокроты служит препятствием для передачи инфекции. Сам возбудитель не стоек во внешней среде. Всё это является причиной, определяющей ограниченный радиус распространения возбудителя больным коклюшем. Мимолётная встреча восприимчивого ребёнка обычно кончается благополучно. Если во время кратковременного контакта больной не кашлял, заражение вообще мало вероятно.

Установлено, что ранняя изоляция из детских коллективов заболевшего коклюшем, нередко предупреждает распространение

инфекции. Заражение коклюшем через различные предметы, бывшие в пользование больного, не происходит вследствие очень малой стойкости возбудителя во внешней среде.

Особенностью коклюша является высокая восприимчивость к нему новорожденных детей, так как трансплацентарно переносимые антитела от матери не защищают от заболевания коклюшем.

В противоположность распространённому мнению, что коклюшем болеют только дети, нередко заболевания и среди взрослых.

В допрививочный период индекс заразности составлял 0,7-0,8. Та же восприимчивость сохраняется для детей в возрасте до 1 года, не получивших профилактических прививок.

Несмотря на увеличение вакцинирования детского населения в декретированные сроки (до 4 лет), сохраняются условия, способствующие распространению коклюша. **Заболеваемость коклюшем находится на относительно высоком уровне, хотя и наметилась тенденция к её снижению.**

Контрольные вопросы:

1. Какие факторы определяют особенности эпидемиологии коклюша?
2. В какие сроки особенно велика заразительность больного коклюшем?
3. Чем ограничен радиус распространения возбудителя коклюша?
4. Чем обусловлена восприимчивость к коклюшу новорожденных детей?

IV. ПАТОГЕНЕЗ КОКЛЮША

Большинство исследователей считают, что наибольшее значение в патогенезе коклюша имеет коклюшный токсин, обладающий всеми чертами присущими бактериальным токсинам. В первую очередь КТ вызывает расстройство центральной регуляции дыхания путём воздействия на

дыхательный центр, приводя к изменению ритма дыхания и снижению чувствительности медуллярных хеморецепторов к уровню CO_2 .

С другой стороны, появлению гипоксии и накоплению CO_2 способствует нарушение функции внешнего дыхания, которое обусловлено недостаточной альвеолярно-капиллярной диффузией газов.

При изучении патоморфологии органов дыхания у больных коклюшем обнаружены как обструктивные, так и рестриктивные изменения (дистония бронхиального дерева, ателектазы, острая эмфизема). Снижению альвеолярно-капиллярной диффузии газов способствует также продуктивное воспаление в перибронхиальной, периваскулярной и интерстициальной ткани.

Воспалительные изменения в легких обнаруживаются на фоне выраженных острых расстройств крово- и лимфо- обращения. В генезе указанных расстройств играют роль токсины возбудителя коклюша и повышение венозного давления в легочных сосудах. В основе нарушений сосудистой системы лежит угнетение β -адренорецепторов под влиянием КТ. Наряду с повышением венозного давления и замедлением скорости кровотока наблюдается снижение периферического кровообращения. В свою очередь, нарушение периферического кровообращения приводит к гипергидратации клеток, в том числе и головного мозга, чему способствует также нарушение их метаболизма на фоне гипоксии. Несомненное значение в развитии изменений со стороны сосудистой системы имеет гипоксия, в той или иной мере сопровождающая течение болезни.

Энцефалопатические расстройства при коклюше обусловлены циркуляторными нарушениями в головном мозге и повреждением внутриклеточного метаболизма.

Патологические реакции, возникающие в результате действия КТ, многообразны. Помимо уже указанных выше, КТ вызывает лимфоцитоз, изменяет физико-химический состав крови, повышает чувствительность к гистамину и другим биологическим активным веществам.

Контрольные вопросы:

1. Какое действие оказывает коклюшный токсин на дыхательный центр?
2. За счет чего происходит снижение альвеолярно-капиллярной диффузии газов при коклюше?
3. Какие воспалительные изменения в легких обнаруживаются при коклюше?
4. Что лежит в основе нарушений сосудистой системы при коклюше?
5. Чем обусловлены энцефалопатические расстройства при коклюше?

V. КЛИНИКА КОКЛЮША

Инкубационный период коклюша длится от 3 до 15, чаще 5-7 дней. Течение болезни можно разделить на три периода: катаральный, спазматический и завершения.

Опорными симптомами клинической диагностики коклюша в катаральном периоде являются постепенно нарастающая, назойливый кашель, который усиливается ночью, не поддается устранению (уменьшению) обычными средствами лечения, по сравнению неизменный общее состояние больного, лимфоцитарный лейкоцитоз. Значительную помощь оказывают данные эпидемиологического анамнеза.

В спазматического периоде диагностика коклюша облегчается в связи с появлением типичных приступов кашля с репризами, которые заканчиваются выделением вязкой, стекловидного мокроты, иногда рвотой, а также характерного внешнего вида больного (одутловатость лица, кровоизлияния в склеры), язвы на уздечке языка.

Прочный назойливый кашель без соответствующих изменений в легких всегда должен вызвать у врача подозрение на возможность коклюша.

§1. Классификация

ПО X Международной статистической классификации болезней пересмотра (МКБХ) **коклюш относится к:**

A37 Коклюш.

A37.0 Коклюш, вызванный *Bordetella pertussis*.

A37.1 Коклюш, вызванный *Bordetella parapertussis*.

A37.8 Коклюш, вызванный другим уточненным возбудителем вида *Bordetella*.

A37.9 Коклюш неуточненный.

Клиническая классификация коклюша подразделяет это заболевание по типу, тяжести и течению на отдельные виды, что **удобно для практических врачей.**

По типу течения заболевания можно выделить:

1. Типичные.
2. Атипичные -
 - абортивная,
 - стертая,
 - бессимптомная,
 - транзитное бактерионосительство.

По тяжести течения заболевания можно выделить:

1. Легкую.
2. Среднетяжелую.
3. Тяжелую.

По характеру течения заболевание можно выделить:

1. Гладкое.
2. Негладкое -
 - с осложнениями,
 - с наслоением вторичной инфекции,
 - с обострением хронических заболеваний.

§2. Клиническая диагностика

По данным отечественных и зарубежных авторов, истинная заболеваемость коклюшем намного превышает регистрируемую. Причина этого заключается в низкой выявляемости коклюша у детей старшего возраста и подростков, у которых заболевание часто протекает в стертых атипичных формах, а также в несовершенстве лабораторных методов диагностики.

Сохранившийся поствакцинальный иммунитет может существенно изменять клинические проявления заболевания у подростков и взрослых, что значительно затрудняет верификацию диагноза. Гиподиагностика коклюша в значительной степени обусловлена устоявшимся мнением о исключительно педиатрическом значении этой проблемы, возможности полного контроля этой инфекции средствами вакцинопрофилактики и пожизненном поствакцинальном иммунитете.

Коклюш – заболевание, продолжающееся минимум две недели, без явлений интоксикации и повышения температуры тела, протекающее с приступообразным кашлем, усиливающимся ночью и по утрам, сопровождающимся покраснением лица, шумными вдохами (репризами), заканчивающимся отхождением вязкой слизи или рвотой в конце приступа кашля.

Заболевание протекает циклично со сменой ряда периодов:

- **Инкубационный период** продолжается от 3 до 14 дней (в среднем 7-8 дней).
- **Предсудорожный период** – от 3 до 14 дней, проявляется сухим навязчивым кашлем на фоне нормальной температуры тела.
- **Период судорожного кашля (ПСК)** – от 2-3 до 6-8 недель и более, характеризуется типичными приступами судорожного кашля, часто сопровождаемого репризами и отхождением мокроты или рвотой после кашля.
- **Период обратного развития (ранней реконвалесценции)** – от 2 до 8

недель, на фоне улучшения самочувствия ребенка кашель становится реже и постепенно теряет типичный характер.

- **Период реконвалесценции (поздней)** – от 2 до 6 месяцев, характеризуется состоянием гиперреактивности с возможным развитием приступообразного кашля при интеркуррентных заболеваниях или эмоциональных нагрузках.

Критериями тяжести типичных форм коклюша являются:

1. Длительность продромального периода.
2. Частота приступов кашля.
3. Наличие цианоза лица при кашле.
4. Появление цианоза лица в ранние сроки болезни (1 неделя).
5. Сохранение приступов гипоксии вне приступов кашля.
6. Степень нарушения сердечно-сосудистой системы.
7. Энцефалические расстройства.

К лёгким формам типичного коклюша относят заболевания, при которых число приступов не превышает 15 раз в сутки, при этом общее состояние нарушается незначительно.

В этом случае инкубационный период длится от 10 до 21 дня, а чаще 14-18 дней. Продромальный период продолжается от 7 до 21 дня, в среднем составляет 10-13 дней.

Основным симптомом начинающегося коклюша является кашель, который мало чем отличается от кашля при ОРЗ или ОРВИ. Кашель обычно сухой, в половине случаев навязчивый, наблюдается чаще ночью или перед сном. Температура тела остаётся нормальной или в течение нескольких дней повышается до субфебрильной. Самочувствие ребёнка и его поведение, как правило, не меняется.

Кашель постепенно усиливается, приобретает все более упорный, навязчивый, а затем приступообразный характер. В период спазматического кашля появляется характерный для коклюша приступообразный кашель и симптоматика коклюшной инфекции достигает максимального развития.

Приступообразный кашель характеризуется рядом быстро следующих друг за другом выдыхательных толчков, сменяющихся судорожным свистящим вздохом – репризом. Во время приступа кашля лицо становится напряженным, появляется сначала гиперемия надбровных дуг, а затем всего лица, при этом язык выталкивается. Приступы кашля заканчиваются отделением вязкой прозрачной мокроты.

В предыдущие годы репризы рассматривались как обязательный симптом типичного коклюша у детей старше года, а в настоящее время наблюдается лишь у половины заболевших. Рвота бывает не у всех больных и лишь при отдельных приступах кашля. Приступы кашля возникают чаще во время сна и ослабевают на свежем воздухе. Они могут провоцироваться болевыми ощущениями, физическими нагрузками или кормлением. Старшие дети чувствуют приближение приступа, испытывая ощущение першения в глотке.

Более постоянным признаком является небольшая отёчность лица и особенно век, которая обнаруживается почти у половины больных. Геморрагический синдром, обычно в виде единичных петехий на коже, встречается редко.

При физикальном обследовании патологические признаки со стороны органов дыхания ограничиваются симптомами вздутия легких.

Аускультация выявляет у ряда детей жёсткое дыхание, хрипы, как правило, не выслушиваются.

У части больных лёгкой формой наблюдаются изменения крови, характерные для коклюша, увеличивается общее число лейкоцитов, однако сдвиги эти незначительны и не могут быть использованы с диагностической целью.

Несмотря на лёгкую форму коклюша спазматический период заболевания продолжается 4-5 недель.

В разрешающий период кашель теряет свой типичный характер, становится реже и легче.

При среднетяжелой форме заболевания наблюдается число приступов кашля от 16 до 25 раз в сутки, при этом приступы более длительные и тяжелые, с частыми репризами и заметным ухудшением общего состояния; часто в конце приступов появляется рвота.

Продромальный период короче и составляет, в среднем, 6-9 дней; спазматический период продолжается пять и более недель. Появляются изменения в поведении и самочувствии ребёнка, проявляющиеся в виде раздражительности, слабости, вялости и нарушении сна.

При аускультации могут выслушиваться единичные сухие и влажные хрипы, которые исчезают после приступа кашля и вновь появляются спустя некоторое время. Постоянно наблюдается одутловатость лица, могут появляться признаки геморрагического синдрома, кровоизлияние в склеры глаз, носовые кровотечения, петехиальные высыпания на коже.

С большим постоянством наблюдаются изменения в периферической крови. Увеличиваются количество лейкоцитов до 20-40 тысяч в 1 мл³ крови и удельный вес лимфоцитов, тогда как СОЭ остаётся в норме.

Длительность периода разрешения составляет 1,5-2 недели.

При тяжёлой форме коклюша наблюдается большое разнообразие клинических проявлений. Частота приступов кашля достигает 30 и более раз в сутки; приступы тяжелые и продолжаются иногда до 15 минут, имеют по 10 репризов и более, и почти всегда заканчиваются рвотой.

Продромальный период длится 3-5 дней. С наступлением спазматического периода состояние детей заметно ухудшается, отмечаются расстройство сна, отсутствие аппетита, вялость и похудание, в откашливаемой после приступа мокроте может иметь место примесь крови. У части детей, особенно раннего возраста, на высоте приступа развивается апноэ, а также может произойти непроизвольное отхождение мочи и кала.

Апноэ при коклюше обусловлено непосредственным воздействием коклюшного токсина на дыхательный центр, приводящим к нарушению процесса регуляции дыхания. Определённую роль в возникновении апноэ

играет физиологическая незрелость дыхательного центра, которая встречается у детей первых месяцев жизни.

При тяжёлой форме чаще наблюдаются симптомы нарушения сердечно-сосудистой системы, такие как повышение кровяного давления, одутловатость лица, отёки на кистях рук и стопах ног. В основе этих нарушений лежит непосредственное воздействие коклюшного токсина на стенки сосудов. Большое значение в развитии сосудистых нарушений также играет и развившаяся гипоксия.

Тяжёлые формы заболевания сопровождаются выраженными изменениями периферической крови. Резко увеличивается количество лейкоцитов до 40-80 тысяч в 1 мл³ крови, при этом удельный вес лимфоцитов составляет 70-90%.

На фоне частых приступов появляются признаки энцефалопатии. Наряду с длительными остановками дыхания тяжёлые энцефалитические расстройства, до настоящего времени, являются наиболее опасными проявлениями коклюшной инфекции.

Тяжёлые энцефалопатии сопровождаются продолжительными судорогами и угнетением сознания. Такое явление встречается у детей при сопутствующей коклюшу острой респираторной цитомегаловирусной инфекции или предшествующие коклюшу поражения ЦНС. Продолжительность спазматического периода составляет 6 недель, а периода разрешения – 3 недели.

Атипичная форма коклюша характеризуется нетипичным покашливанием, отсутствием последовательной смены периодов болезни. Кашель, как правило, сухой, иногда навязчивый, наблюдается чаще ночью и усиливается в период перехода катаральной в спазматическую фазу. Иногда появляются единичные, типичные приступы кашля при волнении, во время еды или наложении интеркурентных заболеваний.

При abortивной форме коклюша период судорожного кашля начинается типично, но заканчивается в течение недели.

При стертой форме коклюша сухой, навязчивый кашель сохраняется весь период заболевания. Из других особенностей стёртой формы следует отметить редкое повышение температуры тела, слабое проявление катарального воспаления слизистых носа и ротоглотки. Длительность кашля колеблется от 7 до 50 дней.

Бессимптомная (субклиническая) форма коклюша характеризуется отсутствием клинических симптомов, при выделении возбудителя и/или нарастание титров специфических антител.

Бактерионосительство *B.pertussis* наблюдается у 1-2% детей старшего возраста, привитых вакциной против коклюша по возрасту или переболевших этой инфекцией. У детей младшего возраста бактерионосительство встречается очень редко, и оно не превышает двух недель.

Коклюш у детей грудного возраста имеет ряд особенностей. Обычно отмечается укорочение инкубационного (до 3-5 дней) и катарального (до 2-6 дней) периодов; у небольшой части детей продромальный период может и не наблюдаться, а приступообразный кашель появляется уже с первых дней болезни. Приступы кашля у детей грудного возраста в большинстве случаев не сопровождаются репризами, но нередко заканчиваются апноэ.

Кроме того, в отличие от детей старшего возраста у детей раннего возраста реже наблюдаются рвота, геморрагические симптомы, отеки и язвочки на уздечке языка.

В тоже время у них чаще выявляются признаки тяжелой энцефалопатии с нарушением сознания и судорогами, а также осложнения со стороны органов дыхания, обусловленные присоединением вторичной микрофлоры, что в конечном итоге нередко приводит к развитию летального исхода.

Особенности клинического течения коклюша у привитых детей:

- преобладают легкие и среднетяжелые формы,
- часто встречаются атипичные формы,
- инкубационный и катаральный периоды удлиняются до 14 дней,
- период судорожного кашля укорачивается до 2 недель,

- репризы и рвота после кашля отмечаются реже,
- геморрагический и отечный синдромы не характерны,
- состояние в межприступном периоде нарушается реже,
- специфические осложнения редки и не носят угрожающего жизни характера,
- резидуальные явления и летальные исходы не регистрируют,
- гематологические изменения менее выражены,
- при бактериологическом обследовании чаще выделяют *B. Pertussis* 1.0.3.

Течение коклюша у **новорожденных** имеет свои особенности. Отмечается укорочение инкубационного (до 3-5 дней) и катарального (до 2-6 дней) периодов, что свойственно для тяжелых форм болезни.

Иногда болезнь начинается сразу с приступов спазматического кашля. Приступы кашля не сопровождаются репризами, реже появляются рвота, геморрагические симптомы. Во время приступа характерно апноэ.

Развитие гипоксической энцефалопатии является причиной генерализованных судорог. Расстройства газообмена более выражены, чем у детей старшего возраста, значительный цианоз.

В ряде случаев у младенцев вместо приступов кашля наблюдаются их эквиваленты в виде спазматического чихание или приступов апноэ. Чаще развиваются бронхит, ателектазы, бронхопневмония.

Основной причиной **негладкого течения** коклюша являются сопутствующие инфекционные заболевания, главным образом острые респираторные вирусные инфекции.

Наслоение ОРВИ приводит к усилению вентиляционных нарушений и появлению расстройств ритма дыхания, учащению приступообразного кашля, развитию бронхолегочных осложнений (распространенных бронхитов и пневмоний), энцефалитических расстройств.

Наряду с острыми респираторными вирусными инфекциями большое значение в развитии осложнений имеет микоплазменная, а у детей раннего возраста цитомегаловирусная инфекция.

Цитомегаловирусная инфекция у детей раннего возраста усиливает дыхательные расстройства, способствует возникновению диарейного синдрома и нарушению нутритивного статуса, а также оказывает неблагоприятное влияние на исходы.

Бронхиты и пневмонии являются осложнениями коклюша. В этиологии осложнений основную роль играет вторичная бактериальная или вирусно-бактериальная инфекция.

Летальность при коклюше в последние годы снизилась до единичных случаев.

Клинико-морфологические сопоставления позволили выявить основные причины летальных исходов при коклюше.

В структуре причин летальности коклюш как моноинфекция составляет 10%. Морфологические изменения при этом скудные и ограничиваются преимущественно органами дыхания и головным мозгом. В патогенезе основную роль играет отёк мозга гипоксического генеза.

Основное значение в структуре летальности при коклюше принадлежит сочетанной инфекции, в первую очередь, ОРВИ и цитомегаловирусной инфекции. Ведущей в причинах смерти являлась пневмония. В 92% случаев это внутрибольничная пневмония на фоне сочетанной инфекции.

Схематично клиника коклюша приведена в таблице 3

Контрольные вопросы:

1. Как можно подразделить по типу течения заболевания клинику коклюша?
2. С чем связана низкая выявляемость коклюша у детей старшего возраста и подростков?
3. Может ли сохранившийся поствакцинальный иммунитет существенно изменять клинические проявления заболевания у подростков и взрослых?
4. Каковы минимальный и максимальный сроки инкубационного периода при коклюше?

Таблица 3

Клиника коклюша

Клиничес- кие формы	Тяжест ь	Периоды	Критерии тяжести	Формы			Осложнения, проявления	Течение	
				Лёгка я	Средней тяжести	Тяжёлая			
Типичные	Лёгкая	Инкубацион ный	1. Длительность продромального периода (в днях).	10-14	6-9	3-5	I. Связаны с коклюшной инфекцией. I.I. Поражение бронхолегочной системы: I.I.1. Пневмококлюш. I.I.2. Ателектаз лёгких. I.II. Поражение сердечно-сосудистой системы. I.II.1. Легочное сердце. I.II.2. Субконъюнктивальные кровоизлияния. I.II.3. Кровоизлияния в дно IV желудочка. I.III. Энцефалопатия. II. Связанные со вторичной флорой: II.I. Бронхит и бронхиолит. II.П. Пневмония.	I. Гладкое. II. Волнообразное в сочетании с другими инфекционными заболеваниями.	
	Средне- тяжелая Тяжелая	Продромаль ный	2. Частота приступов кашля (в сутки).	1-15	16-25	Свыше 25			
			3. Наличие цианоза лица при кашле.	-	+	+			
			4. Появление цианоза лица на 1 неделе.	-	-	+			
			5.Апноэ.	-	-	+			
		Спазматичес кий	6.Сохранение дыхательной	-	+	+			
			Разрешения	недостаточности вне приступов кашля.	-	Слабо выражено			Выражено
				6. Степень нарушения сердечно-сосудистой системы.	-				
				7. Энцефалитические расстройства.	-	-			+
Атипичные	Стёртая								

5. Какие критерии указывают на тяжесть типичных форм коклюша?
6. Какие симптомы появляются в продромальный период коклюша?
7. Что обуславливает апноэ у детей раннего возраста?
8. Что является наиболее опасными проявлениями коклюшной инфекции?
9. Что характерно для атипичной формы коклюша?
10. Что является ведущей причиной смерти при коклюше?

VI. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЛЮША

Наибольшие трудности вызывает диагностика коклюша в катаральном периоде. Возникает потребность в дифференциации его с гриппом и другими ОРВИ. Эти болезни начинаются остро, сопровождаются лихорадкой, преобладанием признаков катарального воспаления верхних дыхательных путей, конъюнктивитом, фарингитом, ларингитом, бронхитом. Отмечается достаточно быстрая положительная динамика клинического процесса под влиянием лечения. Кашель ослабевает или усиливается параллельно с изменениями, которые обнаружены при физическом исследовании состояния легких.

У больных гриппом и другими ОРВИ наблюдается лейкопения, а при коклюше – лейкоцитоз. Острый ларингит и ларинготрахеит характеризуются осипшим (хриплым) голосом, лающим кашлем, который не сопровождается репризами.

При кори кашель появляется на фоне лихорадки и резко выраженных катаральных проявлений со стороны слизистых оболочек глаз, носа, глотки; наблюдаются пятна Бельского-Филатова-Коплика на слизистой оболочке щек и пятнистая энантема на мягком небе.

Бронхолегочная форма муковисцидоза характеризуется сильным кашлем, который напоминает коклюшный, кашлевых толчков короткие, возможны позывы к рвоте. В дыхательных путях скапливается вязкий секрет, в легких наблюдаются признаки спастического обструктивного бронхита, со временем

хрипы становятся грубыми и влажными и локализуются в соответствующих участках.

Для туберкулезного бронхоаденит характерный битональный кашель, другие симптомы туберкулеза, положительные туберкулиновые пробы. Рентгенологическое исследование легких позволяет выявить характерные изменения.

Бронхоэктазы, которые чаще наблюдаются у детей после года жизни, характеризуются утренним кашлем с выделением значительного количества мокроты без труда. Диагноз подтверждается данными рентгенологического исследования и бронхоскопии.

Приступы апноэ возможны при тяжелых бульварных расстройствах, обусловленных энцефалитом. Диагностика основывается на характерных изменениях со стороны центральной нервной системы.

§1. В предсудорожном периоде

Преимущественно проводят с острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ).

ОРВИ характеризуются острым началом с синдромом интоксикации, лихорадкой, выраженными катаральными явлениями (ринитом, фарингитом, конъюнктивитом), часто наличием энантемы на слизистых оболочках полости рта, быстрой положительной динамикой симптомов на фоне применения симптоматической терапии, характерными изменениями в гемограмме: лейкопенией, лимфоцитозом, неизменной СОЭ. С целью идентификации возбудителя ОРВИ проводят лабораторную диагностику методом ПЦР с использованием мазков из носоглотки и с задней стенки ротоглотки.

Корь в катаральном периоде характеризуется острым началом с выраженной интоксикацией, лихорадкой, катаральными явлениями: ринитом, фарингитом, конъюнктивитом и склеритом, грубым, часто

лающим кашлем, усиливающимся в течение катарального периода, синдромом поражения слизистых оболочек полости рта: энантемой и пятнами Бельского-Филатова-Коплика, в гемограмме: лейкопенией, лимфоцитозом, неизменной СОЭ.

Бронхит, пневмония характеризуются, как правило, острым началом с интоксикацией, лихорадкой, отсутствием или слабой выраженностью катаральных явлений со стороны верхних дыхательных путей (ринофарингита, конъюнктивита), характерными аускультативными и перкуторными изменениями в легких (сухие и/или влажные хрипы, при пневмонии локальные, укорочение легочного звука), рентгенологическими изменениями, лейкоцитозом, нейтрофилезом, сдвигом формулы влево, ускоренной СОЭ.

§2. В периоде судорожного кашля

В периоде судорожного кашля необходимо проводить дифференциальную диагностику коклюша с паракоклюшем и заболеваниями, протекающими с синдромом коклюшеподобного кашля (микоплазменной, хламидийной и респираторно-синцитиальной (RS) инфекциями, муковисцидозом, а также с аспирацией инородного тела.

В редких случаях приходится исключать заболевания, сопровождающиеся увеличением внутригрудных лимфатических узлов (лимфогрануломатоз, лейкозы, туберкулез внутригрудных лимфатических узлов).

Паракоклюш может быть диагностирован только при наличии лабораторного подтверждения (бактериологического, ПЦР, серологического). По клиническим признакам и эпидемиологическим данным (контакт с длительно кашляющим больным) паракоклюш не отличим от коклюша, однако, в гемограмме отсутствуют характерные изменения (лейкоцитоз, лимфоцитоз), в ряде случаев может отмечаться незначительный

изолированный лимфоцитоз.

В отличие от коклюша для паракоклюша не характерны угрожающие жизни специфические осложнения (нарушения ритма дыхания и мозгового кровообращения), а также патогномичный для коклюша симптом – надрыв уздечки языка. Заболеваемость паракоклюшем не зависит от уровня охвата вакцинацией против коклюша. Ребенок, переболевший паракоклюшем, нуждается в проведении профилактических прививок. В одном очаге возможно выявление заболеваний, вызванных как *Bordetellapertussis* так и *Bordetellaparapertussis*.

RS-инфекция чаще начинается постепенно, однако, начальный ее период короче, чем при коклюше (2-3 дня). Заболевание характеризуется слабо выраженным синдромом интоксикации, субфебрильной температурой, навязчивым малопродуктивным приступообразным кашлем. Катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей выражены слабо: отмечается отек слизистой оболочки, не обильное серозное отделяемое из носа.

В клинической картине преобладают явления дыхательной недостаточности. В легких выслушиваются сухие свистящие и мелкопузырчатые крепитирующие хрипы, перкуторно – коробочный оттенок легочного звука. Выявляются рентгенологические признаки эмфиземы легких. Возможна гепатоспленомегалия.

В анализах крови – лейкопения, лимфоцитоз, нормальная СОЭ. Диагноз подтверждается обнаружением РНК респираторно-синцитиального вируса методом ПЦР, выявлением специфических IgM в ИФА, а также РИФ из мазков-отпечатков со слизистой оболочки задней стенки глотки или смывов из носоглотки.

Респираторный хламидиоз характеризуется постепенным началом, чаще на фоне нормальной или субфебрильной температуры. Выражен катаральный синдром: ринофарингит, конъюнктивит.

Кашель в начале сухой, но постепенно приобретает характер

приступообразного с периоральным цианозом, тахипноэ, рвотой.

Характерно несоответствие между незначительными явлениями интоксикации и клинически выраженной пневмонией. Возможна экспираторная одышка. В легких – крепитирующие хрипы на высоте вдоха, тимпанический оттенок легочного звука, возможно его укорочение.

На рентгенограмме выявляются множественные мелкочастистые инфильтрированные тени на фоне эмфиземы и усиления легочного рисунка. Характерны также шейный лимфаденит и гепатоспленомегалия.

В гемограмме – лейкоцитоз, нейтрофилез со сдвигом формулы, увеличенная СОЭ. Диагноз подтверждается выявлением специфических IgM в сыворотке крови методом ИФА, ростом титра IgG в динамике; выявлением антигенов возбудителей с помощью РИФ из мазков-отпечатков со слизистой задней стенки глотки, фрагментов ДНК *Chlamydomphila pneumoniae* – методом ПЦР (исследуют мазки из носоглотки и с задней стенки ротоглотки).

Респираторный микоплазмоз может начинаться остро или чаще постепенно. Характеризуется фебрильной лихорадкой или длительным субфебрилитетом, а также несоответствием между высокой лихорадкой и умеренно выраженным синдромом интоксикации.

С первых дней заболевания выявляются гиперемия лица, ринофарингит, склерит. Больного беспокоит приступообразный кашель, часто с болями в животе, отхождением вязкой мокроты или рвотой. При постепенном начале заболевания характер кашля может изменяться от сухого навязчивого до приступообразного.

Отмечают диссоциацию аускультативной и рентгенологической картины («немые» пневмонии), укорочение легочного звука, чаще справа или двустороннее.

Характерны рентгенологические признаки интерстициальных, очаговых, долевого пневмоний, ателектазов.

Наряду с указанными клиническими особенностями у больных часто

выявляются лимфаденопатия, гепатомегалия, экзантема, диспепсический синдром, серозный менингит.

В гемограмме – лейкоцитоз, нейтрофилез со сдвигом формулы, увеличенная СОЭ.

Диагноз подтверждается выявлением специфических IgM в сыворотке крови методом ИФА, ростом титра IgG в динамике; выявлением антигенов возбудителей с помощью РИФ из мазков-отпечатков со слизистой задней стенки глотки, фрагментов ДНК *Mycoplasma pneumoniae* – методом ПЦР (исследуют мазки из носоглотки и с задней стенки ротоглотки), возможен посев на селективную среду.

Муковисцидоз характеризуется наличием семейных случаев заболевания, постепенным началом, с первых дней жизни. Синдром интоксикации отсутствует, температура тела нормальная, катаральных явлений нет.

Как правило, отмечается постепенное усиление кашля до приступообразного, с цианозом, одышкой и отхождением вязкой мокроты.

Выслушиваются разнокалиберные хрипы, тимпанический оттенок легочного звука, возможно его укорочение.

Характерны перибронхиальные, инфильтративные, склеротические изменения легочной ткани, эмфизема, распространенность поражений.

Испражнения обильные, зловонные, вязкие, блестящие. Характерны гиповитаминозы, гипотрофии; у детей старше 1 года – признаки целиакии. Гемограмма соответствует возрастной норме.

Лабораторное подтверждение диагноза включает:

- «потовую пробу» (повышение концентрации хлора и натрия в поте); «мекониальный тест» у новорожденных (увеличение количества альбумина в фекалиях);
- снижение ферментов поджелудочной железы в дуоденальном содержимом.

Контрольные вопросы:

1. Как можно подразделить по типу течения заболевания клинику коклюша?
2. С чем связана низкая выявляемость коклюша у детей старшего возраста и подростков?
3. Может ли сохранившийся поствакцинальный иммунитет существенно изменять клинические проявления заболевания у подростков и взрослых?
4. Каков минимальный и максимальный сроки инкубационного периода при коклюше?
5. Какие критерии указывают на тяжесть типичных форм коклюша?
6. Какие симптомы появляются в продромальный период коклюша?
7. Что обуславливает апноэ у детей, раннего возраста?
8. Что является наиболее опасными проявлениями коклюшной инфекции?
9. Что характерно для атипичной формы коклюша?
10. Что является ведущей причиной смерти при коклюше?

VII. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЛЮША

Основным методом выявления возбудителя коклюша, «золотым» стандартом диагностики коклюша был и по прежнему остается бактериологический метод. Положительные результаты бактериологического анализа являются безусловным подтверждением наличия инфекции. При всех своих преимуществах данный метод имеет ряд недостатков. В модельных экспериментах эффективность метода достигает 80%. Однако на практике может не превышать 10-20%. Это обусловлено рядом факторов: медленным ростом возбудителя, контаминацией исследуемого материала сопутствующей микрофлорой, неправильным забором материала, поздним сроком обследования больных, предшествующей антибиотикотерапией, низким качеством питательных сред. Наиболее современным и перспективным методом лабораторной диагностики коклюша является полимеразная цепная

реакция (ПЦР). Чувствительность ПЦР значительно превышает чувствительность бактериологического метода, составляет несколько бактерий в образце и позволяет идентифицировать возбудителя непосредственно в образцах носо – глоточных смывов от пациентов. Специфичность метода при использовании надежных контрольных образцов приближается к 100%. Важным преимуществом ПЦР является возможность быстрого получения результатов – в течение одного дня.

Показано, что результаты ПЦР в 73 -100% случаев совпадают с данными бактериологического метода. Показано, что результаты ПЦР могут быть положительными по крайней мере в течение 21 дня после начала катарального периода заболевания и по крайней мере в течение 14 дней после установления пароксизмального кашля.

По чувствительности и специфичности ПЦР сопоставима с определением противококлюшных антител в ИФА. Наибольшее диагностическое значение имеет сочетание серологических методов и ПЦР, что способствует повышению чувствительности и специфичности лабораторной диагностики.

Серологическая диагностика коклюша и оценка противококлюшного иммунитета основана на выявлении антител к тем или иным антигенам коклюшного микроба. Описано использование различных методов.

В настоящее время наиболее распространенным методом оценки противококлюшного иммунитета является ИФА, отличающийся высокой чувствительностью, продуктивностью, простотой проведения анализа.

Наиболее важным преимуществом ИФА является возможность оценки уровня антител различных классов иммуноглобулинов: IgM, IgA и IgG. Результаты этих исследований впервые показали, что ИФА может давать положительные результаты у больных коклюшем с отрицательными результатами бактериологического обследования. Определение уровня антител в ИФА обычно осуществляют в сыворотках крови. В некоторых случаях объектом исследования служит слюна больных.

Оценку уровня сывороточных антител проводят однократно или двукратно в парных сыворотках с интервалом в 2 недели или более. Метод парных сывороток позволяет оценить динамику уровня антител и их нарастание (сероконверсию).

Недостатком этого метода является отсроченность постановки диагноза. Нарастание уровня антител и достижение максимальных значений может предшествовать забору образцов крови для исследования.

Во многих случаях уровень антител достигает к моменту первого исследования максимальных значений и практически не меняется в течение последующих недель.

Установление интервала между исследованием образцов парных сывороток в 3 недели означает преимущественно ретроспективное значение серологических методов для диагностики коклюша.

Между тем, показано, что однократное исследование при использовании надежных контрольных образцов является достаточно информативным.

§1. Показания к обследованию

Лабораторные исследования проводят с диагностической целью и по эпидемическим показаниям:

1. С диагностической целью (двукратно, ежедневно или через день на 1-3-й неделях болезни):

- детям, кашляющим и течение 7 дней и более, независимо от указаний на контакт с больным коклюшем;
- детям с подозрением на коклюш и коклюшеподобными заболеваниями по клиническим данным;
- взрослым с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания, работающим в родильных домах, детских больницах санаториях, детских образовательных учреждениях и школах, в т. Ч. Закрытого типа.

2. По эпидемическим показаниям (лицам, бывшим в контакте с больным однократно):

- детям, посещающим детские образовательные учреждения, находящимся в детских больницах, санаториях, в которых были выявлены больные коклюшем / паракоклюшем, а также всем детям до 14 лет, общавшимся с больным коклюшем / паракоклюшем в домашних условиях;
- взрослым, работающим в указанных выше детских учреждениях, при выявлении в них больных коклюшем / паракоклюшем, а также при общении с больным коклюшем / паракоклюшем в домашних условиях.

§2. Критерии лабораторно диагностики

Диагноз «**коклюш, вызванный B.pertussis**» ставится при подтверждении клинического диагноза «коклюш» хотя бы одним из указанных методов:

- выделение культуры B.pertussis;
- обнаружение специфического фрагмента генома B. Pertussis методом ПЦР;
- у привитых детей и взрослых: выраженная сероконверсия, т.е. увеличение или уменьшение в 4 и более раз уровня специфических IgG и/или IgA (ИФА), или уровня агглютинирующих антител (РА) при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом не менее 2 недель;
- у взрослых: допустимо однократное обнаружение специфических IgM (ИФА);
- у непривитых детей: однократное обнаружение специфических IgM и/или IgA и/или IgG (ИФА) или антител в титре 1/80 и более (РА).

Диагноз «**коклюш, вызванный B. Parapertussis**» ставится в случае:

- выделения культуры B. Parapertussis;
- или при обнаружении фрагмента генома B. Parapertussis методом ПЦР;
- или при обнаружении антител к B.parapertussis методом РА в титре не менее 1/80.

Диагноз «**бронхисептикоз**» ставится при выделении культуры *B.bronchiseptica* или при обнаружении специфического фрагмента генома *B.bronchiseptica* методом ПЦР.

§3.Сроки обследования

Бактериологическое обследование следует проводить на ранних сроках заболевания (не позднее третьей недели), до начала терапии антибактериальными препаратами. В более поздние сроки и на фоне антибиотикотерапии высеваемость резко снижается.

Обследование методом ПЦР нередко оказывается эффективнее бактериологического метода в более поздние сроки заболевания и на фоне лечения антибиотиками, однако максимальная эффективность метода приходится на ранние сроки (1-3 недели от начала заболевания), прием антибиотиков может привести к ложноотрицательному результату анализа.

Серологическое обследование. При первичной инфекции антитела классов IgM и IgA образуются не раньше второй недели от появления клинических симптомов, спустя еще одну неделю начинают обнаруживаться и антитела класса IgG, достигая своего максимума к 6-8 неделе, после чего их уровень снижается. После вакцинации так же образуются антитела класса IgG. Эти антитела могут выявляться до достижения взрослого возраста, но в низких титрах. В связи с этим серологическую диагностику коклюша и паракоклюша целесообразно применять не ранее третьей недели болезни; оптимальные сроки для серологической диагностики с 3 по 6 неделю заболевания.

В течение 1-го года после вакцинации против коклюша проводить серологическое исследование в диагностических целях не рекомендуется.

Следует учитывать, что у детей в возрасте до 3 месяцев собственные антитела не вырабатываются, но могут присутствовать материнские антитела, которые, как правило, определяются в низких титрах. Схема лабораторной диагностики коклюша/паракоклюша дана в таблице 4.

**Рекомендуемая схема лабораторной диагностики
коклюша/паракоклюша**

Методы Категории	1 -2 недели от начала заболевания		3-4 недели		более 4 недель
	без лечения АБ	на фоне АБ	без лечения АБ	на фоне АБ	без лечения
Непривитые дети до 1 года	БМ*, ПЦР	ПЦР	БМ, ПЦР	ПЦР, серология	Серология
Непривитые дети старше 1	БМ, ПЦР	ПЦР	ПЦР, серология	Серология (ПЦР)	Серология
Привитые дети, подростки, взрослые	ПЦР, БМ	ПЦР	ПЦР, серология (БМ)	Серология (ПЦР)	Серология

* БМ бактериологический метод

** эффективность метода, указанного в скобках, у данной группы пациентов существенно снижается

§4. Оформление направления материала на исследование

На доставляемый в лабораторию материал должно быть оформлено направление, где указывается:

- наименование учреждения, направившего материал на исследование;
- фамилия, имя, отчество, возраст и домашний адрес обследуемого;
- причина обследования;
- вакцинальный статус (количество полученных доз вакцины против коклюша с указанием вакцины);
- дата заболевания;
- дата и время взятия материала;
- кратность обследования;
- наименование материала и метод взятия его;
- метод лабораторной диагностики;
- подпись лица, взявшего материал.

Контрольные вопросы и задания:

1. На каких признаках основывается дифференциальная диагностика коклюша от ОРВИ в предсудорожном периоде?
2. На каких признаках основывается дифференциальная диагностика коклюша от заболеваний, протекающими с синдромом коклюшеподобного кашля?
3. Какие лабораторные исследования могут подтвердить диагноз паракоклюша?
4. Что отличает клинику респираторного хламидиоза от клиники коклюша?
5. Что отличает клинику муковисцидоза легких от клиники коклюша?

VIII. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Бактериологическое исследование для выявления бордетелл проводят с диагностической целью и по эпидемическим показаниям.

Исследования с диагностической целью следует проводить двукратно ежедневно или через день в ранние сроки заболевания (не позднее 3-ей недели болезни).

В более поздние сроки высеваемость резко снижается и зависит от следующих **факторов**:

- срока обследования;
- кратности исследования;
- соблюдения правил взятия, транспортировки и посева материала;
- качества используемых материалов и сред.

Исследования по эпидемическим показаниям проводят один раз.

§1. Взятие материала

Все работы по взятию, транспортированию и подготовке проб клинического исекционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями:

- СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»,
- СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Исследуемым материалом является слизь из верхних дыхательных путей, осаждающаяся при кашле на задней стенке глотки.

Взятие материала может проводиться следующими способами:

- заднеглоточным тампоном,
- «кашлевыми пластинками».

Заднеглоточным тампоном материал забирают как с диагностической целью, так и по эпидемическим показаниям.

Метод «кашлевых пластинок» используют только с диагностической целью при наличии кашля. У детей трудного возраста рекомендуется брать материал заднеглоточным тампоном.

Взятие материала заднеглоточным тампоном должно проводится специально выделенным инструктированным персоналом: медицинскими сестрами детских поликлиник и детских учреждений, помощниками эпидемиологов, лаборантами. Материал берут в детских поликлиниках в специально выделенном помещении, а также в детских учреждениях и на дому.

При взятии материала должна быть полностью исключена возможность контакт с другими детьми и взаимного заражения обследуемых. Материал забирают натощак или через 2-3 часа после еды. Взятие материала у взрослых производят в бактериологических лабораториях и в детских учреждениях.

Для взятия материала используют стерильные тампоны из хлопка или вискозы на алюминиевой основе, изготовленные в лаборатории и предварительно (до стерилизации) изогнутые под тупым углом (110-120°), либо стерильные тампоны в индивидуальной пластиковой пробирке (их можно изогнуть при извлечении из пробирки).

Для увеличения числа положительных находок коклюшного и паракоклюшного микробов сбор материала рекомендуется производить двумя тампонами: сухим и смоченным забуференным физиологическим раствором по прописи Е.А. Кузнецова.

Взятие материала сухим тампоном стимулирует кашель и повышает возможность выделения возбудителя при взятии материала вторым влажным тампоном.

При посеве материала с диагностической целью рекомендуется использовать 2 чашки Петри со средой, а по эпидемическим показаниям – 1 чашку.

Материал с сухого тампона засевают на чашку Петри с одной из рекомендованных питательных сред **обязательно** на месте взятия, а с влажного – посев можно произвести после доставки тампона в лабораторию, но не позднее чем через 2-4 часа после взятия материала.

Методика взятия материала сухим и увлажненным тампонами одинакова и сводится к следующему:

Медицинский работник левой рукой фиксирует с помощью шпателя корень языка, а правой вводит тампон в полость рта, продвигая его за корень языка. Тампон не должен касаться слизистой щек, языка и миндалин. Кончиком тампона и выпуклой его частью касаются задней стенки глотки, проводя по ней справа налево 2- 3 раза.

Затем также осторожно над шпателем извлекают тампон из полости рта. В обоих случаях посев желательно производить на 2 чашки Петри. Если ребенок проявляет признаки беспокойства, то стоящий за его спиной помощник сзади фиксирует голову. Взятие материала «кашлевыми

пластинками" кроме медицинского персонала, можно поручить родителям, хорошо проинструктировав их.

Сбор материала производят на 2 чашки с питательной средой. Во время приступа кашля левой рукой снимают крышку чашки, а правой подносят ее ко рту на расстоянии 10-12 см так, чтобы капельки слизи из дыхательных путей попали на поверхность среды. Чашку в таком положении держат некоторое время (в течение 6-8 кашлевых толчков).

При непродолжительном покашливании можно ту же чашку поднести повторно. На питательную среду не должны попадать слюна, рвотные массы, мокрота.

Затем чашку с питательной средой закрывают крышкой и доставляют в лабораторию.

В большинстве стран мира материалом для исследования служит слизь из носоглотки, которую отбирают носоглоточным тампоном или путем аспирации. Взятие может производиться только специально обученным персоналом. Мазки со слизистой носоглотки берут сухим стерильным назофарингеальным велюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

Общая глубина введения зонда составляет примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3-4 см для детей и 5-6 см для взрослых).

§2. Доставка материала

Материал на увлажненных тампонах и посеvy материала, сделанные в учреждении, необходимо направлять в лабораторию, сопроводив направлением.

При транспортировке следует оберегать материал от прямых

солнечных лучей, сохраняя его при температуре 35-37°C, для чего рекомендуется помешать весь материал в специальные ящики, биксы с защищающей прокладкой, (марлевые ватники и др.) и грелкой.

Транспортировка материала на влажных тампонах должна занимать не более 2-4 часов.

§3. Ход исследования

Бактериологический метод исследования предусматривает выделение возбудителя заболевания путем посева на плотные питательные среды, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителей рода бордетелла до вида. Исследование продолжается в течение 5 – 7 дней.

Посев материала, взятого тампоном, производят последовательно на 2 чашки с питательной средой, предварительно обработанной антибиотиком для подавления сопутствующей микрофлоры (при взятии материала «кашлевыми пластинками» среду антибиотиками не обрабатывают).

Материал, взятый тампоном, можно посеять следующими способами:

а) посев материала производят путем тщательного втирания его тампоном вначале по периферии среды чашки Петри в виде 4-5 площадок, а затем Z-образным штрихом в центре чашки, затем стерильным шпателем растирают центральные части посева, не касаясь площадок;

б) можно использовать метод секторных посевов: материал втирается тампоном в сектор А, после этого стерильным шпателем или петлей производят 4 штриховых посева из сектора А в сектор I, затем петлю/шпатель прожигают и аналогичным образом производят штриховые посевы из сектора I в сектор II и из II в III.

Засеянные чашки (тампоном или «кашлевыми пластинками») помещают в термостат при температуре +35-37°C (лучше 35°C) на 3 суток (72 часа). Для увлажнения воздуха в термостат ставят сосуд с водой.

Просматривают посевы через 72 часа с целью отбора подозрительных на колонии рода бордетелла. Просмотр посевов производят при помощи бинокулярного стереоскопического микроскопа или бинокулярной лупы с большим фокусным расстоянием.

Колонии микробов рода бордетелла при росте на плотных питательных средах выпуклые, влажные, гладкие, блестящие с ровными краями, серого цвета с голубоватым, жемчужным или металлическим, а иногда желтоватым или беловатым оттенком. На средах с кровью вокруг колоний почти всегда образуется зона слабого гемолиза.

Колонии *B. Pertussis*, *B. Paraperlussis*, *B. Bronchiseptica* имеют мягкую (маслянистую) консистенцию и легко снимаются. При просмотре колоний в стереоскопическом микроскопе можно наблюдать узкий луч света («хвостик»), отходящий от ее центра. Наиболее часто «хвостик» выражен у *B. Pertussis*.

Колонии *B. Bronchiseptica* в субкультуре могут быть двух видов: сходные с коклюшными и более плоские, с приподнятым центром.

Сроки появления колоний различны для различных видов бордетелл: колонии *B. Bronchiseptica* появляются через 18-24 часа, *B. Parapertussis* – через 24-48 часов, а колонии *B. Pertussis* – через 48-72 часа. Различная скорость роста отражается на величине колоний при просмотре их через 72 часа.

Рост *B. Pertussis* и *B. Bronchiseptica* на питательной среде не сопровождается изменением ее цвета. *B. Parapertussis* при обильном росте на среде КУА вызывают диффузное окрашивание среды в буровато-коричневый цвет, что выявляется при просмотре в проходящем свете, а также вызывают потемнение среды с кровью.

При наличии на среде выращивания подозрительных колоний производят выделение чистой культуры путем отсева их в чашки Петри с одной из питательных сред. При этом поверхность среды делят на несколько секторов и отсевают каждую колонию на отдельный сектор, тщательно втирая ее в среду крупными движениями. Схема посева

При наличии значительного количества однотипных подозрительных колоний, помимо выделения чистой культуры, из оставшихся колоний делают мазки в физиологическом растворе, определяя морфологию культуры при окраске по Граму.

Одновременно определяют также отсутствие спонтанной агглютинации.

Представители рода бордстелла имеют вид мономорфных мелких овоидных палочек (коккобацилл), равномерно располагаются в мазке, грамотрицательны.

Иногда *B. Parapertussis*, особенно со среды Бордс-Жангу, могут иметь вид удлиненных полиморфных палочек.

Материал из оставшихся колоний проверяют в реакции агглютинации на стекле со специфическими видовыми неадсорбированными сыворотками, разведенными 1:10, и по возможности с адсорбированными монорецепторными сыворотками с антителами (факторам) I и 14.

Если число подозрительных колоний значительно, то возможна постановка пробы с мочевиной для определения наличия фермента уреазы.

На основании изучения характера колоний и морфологии клеток в мазках, окрашенных по Граму, положительной реакции агглютинации с видовыми неадсорбированными и адсорбированными сыворотками к факторам I и 14 на третьи сутки можно выдать предварительный ответ.

При отсутствии видимого роста чашки Петри вновь помещают в термостат еще на 24-48 часов и просматривают повторно.

Посевы, произведенные для выделения чистой культуры просматривают через 24, 48, 72 часов, и отмечают изменение цвета среды: паракокклюшные микробы диффузно окрашивают среду выращивания (КУА) в буровато-коричневый цвет.

Выросшие культуры окрашивают по Граму, определяют морфологию и чистоту культуры, а также отсутствие спонтанной агглютинации.

Серологические свойства проверяют в реакции агглютинации на стекле со

специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками, разведенными 1:10, а также с адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам 1 и 14. Сероваркоклюшного микроба определяют реакцией агглютинацией с монорецепторными сыворотками к факторам 1, 2, 3.

Для проверки биохимических свойств, производят посевы чистой культуры на агаровую среду с тирозином (определение наличия тирозиназы), определяют наличие уреазы пробой с мочевиной. При подозрении на выделение чистой культуры *V.bronchiseptica* определяют утилизацию цитрата на среде Симмонса и подвижность путем посева на среду – полужидкий агар (0.5 % агар-агара).

V.pertussis биохимически инертна: не растет на мясопептонном агаре, не изменяет цвета агаровой среды с тирозином, не имеет фермента уреазы, не утилизирует цитраты.

V.parapertussis дает рост на простых питательных средах, изменяет среды с тирозином в коричневый цвет, обладает ферментом уреазой.

V.bronchiseptica отличается быстрым ростом на простых питательных средах, подвижностью, не изменяет цвета среды с тирозином, обладает ферментом уреазой (проба Заксе положительная через 4 часа), способна утилизировать нитраты на среде Симмонса.

На основании изучения чистой культуры: морфологии колоний и клеток, реакции агглютинации с видовыми неадсорбированными сыворотками и адсорбированными монорецепторными сыворотками к факторам I и 14, результатов пробы на уреазу, изменения цвета среды с тирозином, утилизации цитратов может быть выдан окончательный положительный ответ.

Если в течение пяти суток (на 6 день исследования) на среде с первичным посевом не обнаружены колонии, подозрительные для бактерий рода бордетелла, наблюдение прекращают и выдают окончательный отрицательный ответ.

Схема бактериологического исследования:

1. **Посев** исследуемого материала на плотных среды для выращивания бордетелл и инкубирование их в термостате при $+35+37^{\circ}\text{C}$.

2. **Через 72 часа (4 день исследования):**

изучение характера роста культуры с использованием стереоскопического микроскопа.

а) отсев колоний для получения чистой культуры микроба

б) при наличии большого числа колоний при первичном посеве:

- микроскопия; б5ессб5глютинину иокрашенных по Граму,мазков
- постановка реакции агглютинации на стекле со специфическими неадсорбированными коклюшными и паракоклюшными сыворотками в разведении 1:10 и специфическими монорецепторными сыворотками к агглютиногенам (факторам) 1 и 14;
- постановка пробы на уреазу.

В) выдача предварительного положительного результата проведенного исследования.

3. **Через 96 часов (5-й день исследования):**

а) изучение выделенной чистой культуры и в случае наличия в исследуемом материале паракоклюшного или бронхисептического микробов:

б) изучение характера роста чистой культуры и изменения цвета питательной среды,

в)микроскопия мазков окрашенных по Граму,

г) постановка реакции агглютинации на стекле с видовыми несадсорбированными и монорецепторными сыворотками к агглютиногенам (факторам) 1. 14 и 12.

Д) постановка пробы на уреазу и учет результатов.

Е) посев на среду с МПА с тирозином

ж) при необходимости – определение подвижности путем посева в столбик полужидкого агара.

3) посев на среду Симмонса.

4. Через 120 часов(6-й день исследования):

а) изучение выделенной культуры коклюшного микроба, а в случае позднего роста *B.parapertussis* исследования проводят по схеме пункта 4.

Б) учет результатов предыдущих посевов

в) определение серовара коклюшного микроба.

Г) выдача окончательного ответа: положительного или отрицательного.

Примечание: При отсутствии роста подозрительных колоний через 72 часа (4 день исследования) чашки со средой выращивания просматривают через 96 (5 день исследования) и 120 часов (6 день исследования). При выделении культур похожих на бордетеллы ход исследования проводят по схеме.

Атипичные штаммы *B.pertussis*. В очагах коклюшной инфекции могут быть обнаружены атипичные штаммы *B.pertussis*. Они отличаются от типичных культур морфологическими свойствами и характером колоний.

В среде КУА такие штаммы образуют через 72 часа роста иногда более крупные колонии, с плоской поверхностью, западающим центром, имеют беловатый, бурый, желтоватый, слегка розоватый или зеленоватый цвет, маслянистую консистенцию.

Морфология клеток в мазках из этих колоний может отличаться от типичной: встречаются более длинные палочки, раздутые овоидные палочки с ослизненным концом, в формы стрептобацилл.

Чистая культура, выделенная из таких колоний, обладает типичными для *B.pertussis* свойствами.

Биохимические и серологические свойства атипичных штаммов характерны для *B.pertussis* они не разлагают мочевины и тирозин, агглютинируется на стекле специфическими видовыми неадсорбированными сыворотками, типизируются моноспецифическими рецепторными сыворотками к факторам I, 2, 3.

Сроки выдачи и формулировка ответов по результатам бактериологического исследования. Ответ при исследовании на коклюш и паракоклюш выдается, как правило, на 3 – 5 сутки.

Предварительный положительный ответ может быть выдан на третьи сутки с формулировкой: «Обнаружены микробы, подозрительные на бактерии рода бордетелла, исследование продолжается».

Окончательный положительный ответ может быть выдан на 5 – 6 сутки и формулируется: «Обнаружены коклюшные (паракоклюшные, бронхисептические) микробы».

Отрицательный ответ выдается на 5 сутки при отсутствии подозрительных колоний для бактерий рода бордетелла и формулируется: «Коклюшные (паракоклюшные, бронхисептические) микробы не обнаружены».

В случае замедленного роста микробов или выделения нетипичной культуры предварительный и окончательный ответы могут быть выданы позже (6 – 7 сутки).

§4. Ферментативная активность бордетелл

Изучение ферментов патогенных бактерий имеет исключительно важное значение, так как на основании определения ферментативной активности микробов можно дифференцировать различные виды и определять природу того или иного возбудителя заболеваний. Наряду с этим ферментативная активность микробов определяет патогенез и клиническую картину инфекционного заболевания.

Есть **несколько методов** определения ферментативной активности бордетелл:

1. Определение уреазной активности бордетелл. Для определения уреазной активности бордетелл можно использовать два метода: метод Заксе и бульон Хоттингера с мочевиной. При использовании определения уреазы по методу Заксе готовят 2 реактива.

Реактив А: 2г мочевины, 2мл 96⁰ этилового спирта, 4мл дистиллированной воды.

Реактив А не стерилизуют и хранят при температуре +4 – 10 °С.

Реактив Б: 1мл 0,2 % спиртового раствора фенол-рота, 0,1г KH_2PO_4 , 0,1 GK_2HPO_4 , 100 мл дистиллированной воды, 0,5г NaCl .

Реактив Б стерилизуют в автоклаве текучим паром.

Перед употреблением смешивают 1 часть реактива А и 19 частей реактива Б. Смесь реактивов разливают по 0,1-0,2 мл в стерильные агглютинационные пробирки с пробками и вносят 1-2 петли испытуемой культуры. Пробирки помещают в термостат при +35-37°С на 30 минут. Одновременно ставят контроль реактива без внесения культуры.

Учет результатов производят после инкубирования. При отсутствии изменения цвета смеси пробирки оставляют при комнатной температуре и результат учитывают на следующий день.

При использовании определения уреазы бульоном Хоттингера с мочевиной 100мл бульона Хоттингера Ph 7,0 добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл 1,6 % спиртового раствора крезолового красного, стерилизуют текучим паром при 100°С в течение 15 мин.

Посев производят в 1 мл среды петлей, инкубируют 24 часа при +35-37°С.

При наличии у микробов фермента уреазы происходит расщепление мочевины до аммиака, что приводит к защелачиванию среды и изменению ее цвет из желтого в малиновый (пурпурно-красному) Уточнить цвет среды до и после посева!!!.

2. Определение потребности в цитратах. Для определения потребности в цитратах делают посев испытуемой культуры на скошенный агар среды Симмонса. Пробирки инкубируют при +37°С одни сутки. Цитратассимилирующие бактерии хорошо растут, подщелачивают среду и вызывают окрашивание ее в синий цвет. Микробы, не ассимилирующие

цитраты, на этой среде не растут и не меняют ее цвета.

Пример: питательный агар с тирозином – К 100 мл дистиллированной воды добавляют 3.5 г сухого питательного агара и 0.1 г тирозина, расплавляют над пламенем горелки, разливают по пробиркам и стерилизуют при 0.5 атм. 20 – 30 мин.

3.Определение пигментообразования.

Для определения пигментообразования производят посев выделенной культуры на простой питательный агар с тирозина.

Для этого к 100 мл дистиллированной воды добавляют 3.5 г сухого питательного агара и 0.1 г тирозина, расплавляют над пламенем горелки, разливают по пробиркам и стерилизуют при 0,5 атм. 20 – 30 мин.

Засеянные пробирки инкубаруют в течение суток при +37 °С. При расщеплении тирозина среда окрашивается в желто-коричневый цвет.

Резюме: Бактериологическое исследование – это совокупность методов обнаружения и распознавания природы бактерий, выделяемых из окружающей среды. Бактериологические исследования являются основным методом лабораторной диагностики, при котором производится посев исследуемого материала на транспортно-селективные среды. Это метод ранней диагностики заболевания. Бактериологические исследования проводят лаборатории организаций здравоохранения, а также лаборатории центров Госсанэпиднадзора..

Без полноценного обследования и анализов определение диагноза и процесс лечения будут неэффективны.

Контрольные вопросы:

- 1.Что является исследуемым материалом при бактериологическом исследовании?
- 2.Какие методы применяют при взятии материала от больных коклюшем и по эпидпоказаниям?

3. Каковы условия и сроки доставки материала в лабораторию?
4. Какие этапы хода бактериологического исследования Вы можете назвать?
5. В какие сроки просматривают посеvy?
6. В какие сроки на плотных питательных средах возможно ожидать появления колоний *V. Pertussis*?
7. В какие сроки на плотных питательных средах возможно ожидать появления колоний *V. paraperlussis*, *V. Bronchiseptica*?
8. В какие сроки, и на каком основании, можно выдать положительный ответ о выделении возбудителя коклюша?
9. В какие сроки, и на каком основании, можно выдать отрицательный ответ?

IX. МЕТОДЫ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ КОКЛЮША

В последние годы для диагностики коклюшной и паракоклюшной инфекций возрастающее внимание уделяется полимеразной цепной реакции (ПЦР).

По сравнению с бактериологическим методом ПЦР обладает чувствительностью до 1 микробной клетки, что позволяет выявлять возбудитель в течение 6 недель с момента заболевания на фоне проводимой антибиотикотерапии. В зависимости от праймеров, используемых для амплификации, чувствительность ПЦР для *V.pertussis* достигает 95,8-98,9 %, а специфичность – 99.0%.

Благодаря высокой специфичности ПЦР контаминация исследуемых проб не влияет на результаты исследования.

Немаловажным достоинством метода является быстрое получение результатов анализа – в течение одного дня. При исследовании носоглоточных мазков и аспиратов ПЦР является быстрым, чувствительным и специфичным методом диагностики коклюша (MeadeB.D, BollenA., 1994,

FarrelD.J., McKeon и др., 2000).

Однако в настоящее время нет утвержденных Минздравом России коммерческих тест-систем для практического использования ПЦР.

Помимо диагностических работ ПЦР успешно используется в исследованиях по молекулярному типированию бордетелл при секвенировании генов пертактина и коклюшного токсина у генетически измененных атипичных штаммов *B.pertussis* (MakinenS.Etal., 2001; NygrenM., 2000, ReischlU, 2001).

Контрольные вопросы:

- 1.Какой метод наиболее целесообразно использовать для экспресс-диагностики коклюша?
2. Есть ли утвержденных Минздравом коммерческих тест-систем для практического использования ПЦР?

Х. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ КОКЛЮША

Серология (от лат. Serum — сыворотка и ...логия) – буквально – учение о свойствах сыворотки крови; обычно под серологией понимают раздел иммунологии, изучающий взаимодействие антител сыворотки с антигенами.

Серологические методы лабораторной диагностики коклюша основаны на определении уровня специфического иммунного ответа к отдельным антигенам или группе антигенов коклюшного микроба.

Классическим методом серологической диагностики коклюша, применяемым более 50-ти лет, является реакция агглютинации. В течение длительного времени она использовалась для оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета {Кирицева А.Д. и др., 1997}.

Хотя показано, что антитела не являются защитными антителами при коклюше (Minozi др., 1963), изотип и антигенная специфичность антител

по-прежнему остаются невыясненными.

Недостатками реакции агглютинации являются низкая чувствительность и нестандартность, так как титры антител зависят от бактериального штамма, используемого в качестве антигена.

С целью повышения чувствительности серологических реакций были проведены исследования по использованию формализированных эритроцитов животных, сенсibilизированных комплексом антигенов коклюшного микроба для РПГА (Шамардин В.Д., 1979). Предварительные результаты были обнадеживающими и дальнейшее совершенствование реакции шло по пути улучшения эритроцитарных диагностикумов.

Необходимо отметить, что в процессе конструирования диагностикумов авторы использовали различные методы сенсibilизации и стабилизации эритроцитов, а в качестве сорбируемого агента применяли целые бактерии или дезинтеграты, полученные различными способами. Такие эритроцитарные диагностикумы были нестандартны и показывали варьирующие результаты.

Следует отметить, что чувствительность, разрешающая способность и, самое главное, специфичность РПГА и других серологических реакций с использованием иммуносуспензионных диагностикумов на основе латексов и формализированных эритроцитов может быть существенно повышена при сенсibilизации их высокоочищенными моноантигенами и монорецепторными сыворотками к коклюшному токсину, пертактину, филаментозному 72есс72глютининому, фимбриальным агглютиногенам fim2, fim3 и другими антигенами B.pertussis.

С началом применения иммуноферментного анализа (ИФА) в медицине были предприняты попытки его использования в лабораторной диагностике коклюша.

Первоначально в качестве антигена использовали целые микробные клетки. Полученные при этом данные свидетельствуют о том, что ИФА обладает несомненными преимуществами по сравнению с реакцией

агглютинации бактерий и обеспечивает получение положительных результатов у 75 % заболевших.

Следующим шагом было использование в ИФА антигенных смесей или частично очищенных антигенов коклюшного микроба. Накопленные данные показали бесперспективность данного направления. Одна из причин связана с тем, что многие антигенные субстанции коклюшного микроба перекрестно реагируют с антигенами других грамотрицательных бактерий, а при высокой чувствительности ИФА возможность перекрестных реакций значительно возрастает. Наряду с этим, следует учесть, что сорбция антигенов из антигенной смеси на поверхности планшет зависит от сорбционных свойств как самих антигенов, так и материалов, на основе которых готовятся планшеты. Сочетание данных условий определяет как качественный, так и количественный состав адсорбированного материала.

Принципиально **новый этап** в применении ИФА начался после использования в качестве антигенного субстрата высокоочищенных антигенов коклюшного микроба (Смирнов В.Д., 1989; Беляева Н.Б. и др., 1992). Были использованы очищенные препараты фимбриального гемагглютинина (ФГА) и коклюшного токсина (КТ) с применением аффинного метода сорбции КТ на полистироле, покрытом фетуином.

Было установлено, что определение IgG антител к КТ более целесообразно, чем выявление IgA антител (Nagel и др., 1984). Авторами показано, что при заболевании коклюшем нарастание IgG антител происходит в более ранние сроки и на четвертой неделе болезни высокие титры антител выявляются у всех детей.

Интересные данные были получены при изучении изотопов антител в сыворотках вакцинированных, но заболевших детей. Иммунный ответ непривитых детей характеризовался накоплением IgM антител к КТ, содержание которых в сыворотке вакцинированных было значительно более низким, чем содержание IgG антител. Эти данные свидетельствуют, что вакцинация, индуцирующая незначительное количество антитоксических

антител, обеспечивает при инфицировании ответ по вторичному типу. Содержание сывороточных IgG антител к КТ выше 25 ЕД/мл может служить достоверным критерием заболевания (Nagel, 1984).

Многочисленными исследованиями, проведенными разными авторами, доказано, что для серологической диагностики коклюша методом ИФА из всех имеющихся в настоящее время очищенных антигенных препаратов *B.pertussis* предпочтение должно отдаваться коклюшному токсину.

В диагностических целях для подтверждения специфичности заболевания, особенно у лиц более зрелого возраста с менее выраженной клинической картиной коклюша, применяется серодиагностика с использованием парных сывороток, взятых от больных и реконвалесцентов. При выявлении у пациентов специфических коклюшных антител необходимо выяснить являются ли они результатом инфекции или ранее проведенной вакцинации.

Современная серологическая техника, в частности ИФА и РПГА, позволяет выявлять IgG, IgM, IgA и IgE антитела как к цельным клеткам, так и к их определенным изолированным компонентам. Заметные уровни IgG антител выявляются у реконвалесцентов и вакцинированных лиц на 2-3 неделях после заболевания или вакцинации.

Обнаружение специфических IgA и IgM антител свидетельствует о недавней инфекции и может быть использовано для дифференциальной диагностики более длительных коклюшных синдромов. IgG антитела к коклюшному токсину (КТ) и филаментозному гемагглютиниру (ФГА) выступают и качестве индикатора коклюшной инфекции у детей, а у *взрослых* пациентов – антитела к фимбриям 2/3. С другой стороны, в результате бытовой иммунизации наблюдается заметная корреляция между клинической защитой и присутствием антител к пертактину, фимбриям fim2, fim3 и коклюшному токсину.

Приведенные выше данные свидетельствуют, что для проведения серологических исследований на современном научно-техническом уровне

необходимо использовать диагностикумы на основе высокоочищенных монорецепторных антигенов и антител. Монорецепторные сыворотки к КТ, ФГА, пертактину, агглютиногенам 1.2.3 и паракокклюшному агглютиногену могут найти применение в диагностике и типировании эпидемических штаммов *B.pertussis*, а также в изучении иммунохимических, вирусных и иммуногенных свойств лабораторных и свежевыделенных эпидемических штаммов *B.pertussis*.

Иммуноблот. В качестве подтверждающего теста для образцов с пограничными или положительными результатами, полученными в ИФА, или для самостоятельной диагностики может быть использован метод иммуноблота (например, *RecomLineBordetellapertussisIgG*, *recomLineBordetellapertussisIgA*.Microgen, Германия), в котором определяются антитела класса IgG и IgA в сыворотке крови с использованием антигенов *Bordetellapertussis* (РТ в двух концентрациях и FНА).

Принцип исследования заключается в проведении реакции связывания специфических антител с высоко очищенными рекомбинантными антигенами, нанесенными в виде полос на стрипы из нитроцеллюлозной мембраны, предварительно обработанной раствором белка, с целью блокировки свободных сайтов неспецифического связывания иммуноглобулинов.

В ходе анализа стрипы инкубируют с разведенными образцами сыворотки человека. Если в образце присутствуют специфические антитела, то во время инкубации они связываются с антигенами, фиксированными на стрипе. После промывки стрипы инкубируют с антителами к IgG или IgA человека, конъюгированными с пероксидазой хрена и повторяют промывку. Специфически связанные антитела выявляют с помощью цветной реакции, добавляя субстрат, взаимодействующий с пероксидазой хрена. Проявляющиеся темные полосы в соответствующем месте стрипа указывают на присутствие комплекса антиген-антитело. Коклюшный токсин нанесен на стрип в двух концентрациях – РТ и РТ-100. Концентрация РТ

стандартизована: положительная реакция на IgG (появление полосы) при взаимодействии исследуемой сыворотки с РТ-100 означает, что уровень IgG в сыворотке превышает 100 МЕ/мл по стандарту ВОЗ.

Контроль реакции проводится с использованием четырех полос (бенда), расположенных параллельно одна за другой на верхнем краю стрипа:

- полоса положительного контроля реакции, которая должна присутствовать при анализе каждой сыворотки;
- две полосы положительного контроля конъюгата (IgG/IgA), которые служат контролями выявления каждого класса антител;
- «контроль Cut-off» (для контроля реакции окрашивания): интенсивность этой полосы является основной для оценки реактивности антител и интерпретации результата анализа конкретного стрипа.

Результаты анализа учитываются только в случае получения адекватных результатов контролей. Интенсивность полос зависит от концентрации антител, специфичных к *Bordetellapertussis*, присутствующих в исследуемой сыворотке, оценка результата проводится по отношению к интенсивности полосы cut-off. Положительная реакция по обнаружению IgG к РТ в титре более 100 МЕ/мл стандарта ВОЗ может расцениваться как признак острой инфекции у не вакцинированных детей или вакцинированных более трех лет назад. В остальных случаях рекомендуется повторное исследование сыворотки или плазмы крови, взятой через 2 недели после первой.

Контрольные вопросы и задания:

1. На чем основаны серологические методы лабораторной диагностики коклюша?
2. Чем отличается иммунный ответ непривитых детей от иммунного ответа привитых?
3. Какие серологические методы можно использовать в диагностических целях для подтверждения специфичности заболевания, у лиц зрелого возраста?
4. На чем основан принцип метода иммуноблота?

XI. ТЕРАПИЯ КОКЛЮША*

В настоящее время подавляющее число детей лечатся в амбулаторных условиях. Это, как правило, дети старшего возраста, привитые и переносящие коклюш в легкой форме. Обязательной госпитализации подлежат: дети раннего возраста (первых 4-х месяцев); больные с тяжелыми формами коклюша; пациенты с угрожающими жизни осложнениями (нарушением мозгового кровообращения и ритма дыхания); больные среднетяжелыми формами с негладким течением, неблагоприятным преморбидным статусом, обострением хронических заболеваний. Поскольку в коклюшных отделениях более половины детей переносит коклюш в виде микст-инфекций (ОРВИ, микоплазменная, хламидийная, цитомегаловирусная), необходимо строго соблюдать противоэпидемические мероприятия с целью предотвращения развития внутрибольничных инфекций. Режим для пациентов с нетяжелыми формами коклюша щадящий (с уменьшением отрицательных психоэмоциональных и физических нагрузок). Обязательными являются индивидуальные прогулки. Благоприятным считается пребывание больного в атмосфере свежего чистого прохладного и влажного воздуха. Оптимальной для прогулок является температура от +10 до -5°C. Продолжительность — от 20–30 мин до 1,5–2 ч. Прогулки при температуре ниже -10...-12°C нежелательны. Диета должна включать продукты, богатые витаминами, и соответствовать возрасту. При тяжелых формах коклюша пищу дают в небольших количествах и с меньшими интервалами, желательно после приступа кашля. Если рвота возникает после приема пищи, следует докармливать ребенка небольшими порциями через 10–15 мин после рвоты. Детям грудного возраста рекомендуется давать за 15 мин до кормления препараты барбитуратов. В остром периоде болезни, при симптомах выраженной гипоксии, используют сцеженное грудное молоко, которое дают ребенку с помощью пипетки.

* Автором главы XI «Терапия коклюша» и главы XII «Профилактика коклюша» является Лапшина Г.Н. — к.м.н., врач высшей категории, зав.инфекционным отделением ДГКБ №9 г. Москвы

Симптоматическая терапия включает в себя назначение витаминов, антигистаминных препаратов, биопрепаратов и др. В периоды ранней и поздней реконвалесценции показано применение иммунореабилитационных методов.

Диспансерному наблюдению подлежат:

- реконвалесценты тяжелых форм коклюша независимо от возраста;
- дети первого года жизни с неблагоприятным преморбидным статусом (поражение ЦНС и др.);
- реконвалесценты осложненных форм коклюша (бронхолегочной системы, ЦНС и др.).

Регламентирована следующая схема осмотров детей врачами-специалистами:

- педиатр-инфекционист — через 2, 6 и 12 мес после выписки;
- врач-пульмонолог — через 2 и 6 мес;
- врач-невролог — через 2, 6 и 12 мес (по показаниям проводится параклиническое обследование — ЭЭГ, ЭхоЭГ).

Этиотропная терапия коклюша предусматривает борьбу с дыхательной недостаточностью и устранение последствий, вызванных гипоксией, использование противокашлевых и муколитических препаратов и средств, воздействующих на неспецифическую резистентность организма, по показаниям проводится антибактериальная и кортикостероидная терапия.

Коклюш является заболеванием, симптомокомплекс которого обусловлен действием коклюшного токсина, в связи, с чем показания к проведению антибиотикотерапии вопреки бытующему мнению должны быть ограничены.

Одним из показаний антибиотикотерапии при коклюше является препятствие колонизации *B. Pertussis* на клетках цилиндрического эпителия верхних дыхательных путей. Для этой цели выбор антибиотиков ограничивается лишь теми препаратами, к которым микроб проявляет наибольшую чувствительность.

В настоящее время наибольшую чувствительность *B. Pertussis* проявляет к эритромицину, ампициллину и карбенициллину.

Учитывая спектр чувствительности *B. Pertussis*, для терапии коклюша следует использовать эритромицин и другие макролиды, а также ампициллин, и другие препараты, в состав которых входит ампициллин. Указанные препараты используют в возрастных дозировках в соответствии с инструкцией.

Терапевтическая эффективность антибиотиков возможна лишь при условии их применения в ранние сроки коклюша:

- макролидов в первые 10 дней,
- ампициллина – 7 дней от начала болезни.

Проведение же антибиотикотерапии в спазматическом периоде коклюша с целью предупреждения осложнений **нецелесообразно**, поскольку способствует более частому осложненному течению коклюша в связи с отрицательным влиянием антибиотиков на микробиологические системы организма и приводит к усилению колонизации дыхательных путей вторичной микробной флорой.

Однако, назначение антибиотиков в спазматической стадии коклюша показано:

- 1) при наличии бронхолегочных осложнений, вызванных вторичной бактериальной флорой;
- 2) при наличии сопутствующих хронических заболеваний легких.

Распространенные бронхиты нуждаются в антибиотикотерапии, в том случае, если они сопровождаются отделением гнойной мокроты и других признаков, позволяющих думать о роли вторичной микрофлоры в их происхождении. Пневмонии, осложняющие коклюш, лечатся антибиотиками во всех случаях.

В связи с развитием при коклюше гипоксии борьба с дыхательной недостаточностью является одной из основных задач его патогенетической терапии. Она состоит из проведения кислородной терапии, восстановления проходимости дыхательных путей, стимуляции аэробного типа тканевого

дыхания, применения средств, повышающих устойчивость центральной нервной системы к гипоксии.

Кислородная терапия при тяжелых и осложненных формах коклюша проводится в кислородных палатках (ДКП 1), при этом чистый кислород во вдыхаемой смеси не должен превышать 40%. При легких и среднетяжелых формах болезни можно ограничиться длительным пребыванием на свежем воздухе.

В случае остановки дыхания следует как можно быстрее добиться восстановления нормальных дыхательных движений путем ритмичного надавливания руками на грудную клетку и применения искусственного дыхания с использованием ручных респираторов. При частых и длительных остановках дыхания дети переводятся в отделение реанимации, где для восстановления дыхания, используются те же методы. Нецелесообразен перевод больных коклюшем с купирующимися апноэ на пролонгированную автоматическую ИВЛ.

С целью улучшения бронхиальной проходимости, а также для понижения венозного давления в малом круге кровообращения в лечении коклюша используется эуфиллин внутрь, либо парентерально в суточной дозе 4-5 мг/кг массы тела. Внутрь этот препарат применяется в виде микстуры в сочетании с йодистым калием, который обладает выраженным муколитическим эффектом.

У детей первого года жизни используется микстура следующего состава: эуфиллин – 0,4 /сухого вещества/, йодистый калий – 1,0, дистиллированная вода – 200,0. Назначается по 1 чайной ложке 3 раза в день.

Детям старше года можно применять микстуру следующего состава: эуфиллин 1,0, йодистый калий 2,0 /3,0/, дистиллированная вода – 200,0. Дозировка зависит от возраста, начиная с чайных ложек.

Парентеральное введение эуфиллина оправдано при обструктивном синдроме, при отеке легких, при появлении признаков нарушения мозгового

кровообращения.

Эуфиллин является важным патогенетическим средством при коклюше, так как препятствует накоплению ц-АМФ в клетках в противоположность действию коклюшного токсина.

Противокашлевые средства при коклюше имеют ограниченное применение в связи с малой эффективностью.

С целью стимуляции аэробного типа тканевого дыхания в условиях гипоксии, помимо кислородной терапии, целесообразно назначение кокарбоксилазы в суточной дозе 50 мг, аскорбиновой кислоты и токоферола в дозе 1 мг/кг массы тела однократно в сутки.

При тяжелых формах коклюша, сопровождающихся частыми и длительными апноэ, целесообразно назначение пирацетама или его аналогов. Пирацетам в качестве психотропного средства улучшает обменные процессы мозга, препятствует кариолизису нервных клеток в условиях гипоксии. Пирацетам применяется внутрь в суточной дозе 0,2 детям первого полугодия жизни и 0,3 – второго полугодия (в 2-3 приема).

Терапия ателектаза зависит от его давности. Как правило, ателектазы при коклюше не требуют специального вмешательства. Вибрационного массажа с постуральным дренажом на фоне применения муколитических препаратов обычно бывает достаточно. Бронхоскопия показана при массивном ателектазе, сохраняющемся в течение одного месяца и более.

Важным средством патогенетической терапии тяжелых форм коклюша являются глюкокортикоидные гормоны (ГК). Введение ГК предполагает их общебиологическое действие, нормализующее обмен, реакцию тканей на биологически активные вещества и на медиаторы нервных импульсов. Большое значение при коклюше имеет мембранозащитное влияние ГК, стимуляция регенерации альвеолярных макрофагов, уменьшение метаболических нарушений, связанных с гипоксией. В противовес коклюшному токсину ГК вызывают активацию адренорецепторов. Кроме того, применение ГК требуется при тяжелых

формах коклюша для защиты организма от функционального истощения надпочечников.

Использование ГК, в частности гидрокортизона, вызывает прекращение апноэ, уменьшает частоту и длительность кашля, улучшает показатели гемодинамики, предотвращает развитие энцефалических расстройств. Гидрокортизон применяется в суточной дозе 5-7 мг на 1 кг массы тела, преднизолон – 2 мг на 1 кг массы. Эта доза используется до получения терапевтического эффекта, как правило, на протяжении 2-3 дней. Снижение доз ГК должно быть постепенным, так как при быстрой отмене препарата возможно возобновление на короткое время тяжелых приступов кашля.

Показаниями для назначения ГК гормонов в случаях тяжелого коклюша являются:

- наличие приступов кашля с апноэ,
- наличие разлитого цианоза лица при приступах кашля у детей первых месяцев жизни,
- наличие энцефалических расстройств.

Наряду с дыхательными расстройствами у больных коклюшем необходимость проведения неотложной терапии может возникнуть при энцефалопатии. Сочетание спастического состояния периферических артериальных сосудов наряду с дистонией венозного отдела, замедлением кровообращения и повышением проницаемости сосудистой стенки приводит к гипергидратации клеток мозга, чему способствует также нарушение их метаболизма на фоне гипоксии.

Отек мозга у больных коклюшем смешанного генеза как вазогенного, так и цитотоксического. Соответственно терапия в этих случаях направлена на устранение гипоксии и отека мозга. При начальных и не резко выраженных признаках мозговых расстройств назначаются глюкокортикоидные гормоны, диуретические средства – лазикс (из расчета 1 мг на 1 кг массы в сутки), диакарб, противосудорожные средства,

преимущественно седуксен (в дозе 0,3-0,4 мг на 1 кг массы тела), ноотропные средства (перорально).

В случае повторных и непрекращающихся судорог больные должны переводиться в отделение реанимации, где комплексное лечение может быть проведено в наиболее полном объеме. При тяжелых проявлениях энцефалопатии усиливается как противосудорожная, так и дегидратационная терапия.

С целью купирования судорожного статуса наряду с седуксеном, вводимым внутривенно, хороший результат дает введение оксибутирата натрия в виде 20% раствора из расчета 50 мг/кг массы тела (в 10% растворе глюкозы). В случае необходимости препарат может быть введен повторно.

Усиление дегидратационной терапии осуществляется путем назначения дексазона, обладающего более мощным по сравнению с другими глюкокортикоидами «противоотечным» действием. Дексазон применяется парентерально в дозе 0,25 мг/кг массы тела каждые 6 часов в течение 4 дней с последующим переходом на преднизолон и постепенной отменой гормональных препаратов.

Более выраженный дегидратирующий эффект, достигается увеличением дозировки и кратности введения лазикса (до 2 мг/кг массы тела в сутки каждые 6 часов). Применение же осмотических диуретиков при гипоксическом отеке мозга должно быть осторожным, так как они увеличивают ОЦК и сердечный выброс, при этом расширяются сосуды мозга, что приводит к транзиторному, но опасному повышению внутричерепного давления.

С целью улучшения утилизации кислорода и стимулирования окислительных процессов в тканях применяется кокарбоксилаза, которая вводится внутривенно струйно или добавляется к капельно вводимым жидкостям в дозах 25-50 мг 1-2 раза в сутки. Внутривенно также вводится аскорбиновая кислота и витамины группы В.

При отсутствии тяжелых энцефалических расстройств больные

неосложненным коклюшем не нуждаются в инфузионной терапии. Назначение инфузионной терапии, как правило, диктуется наличием токсикоза, расстройствами гемодинамики, снижением ОЦК, опасностью развития ДВС-синдрома, что наблюдается при присоединении массивной пневмонии.

В заключении главы следует акцентировать внимание на таких моментах в лечении коклюша, как диета, уход и режим.

Диета. Серьезное внимание следует уделять питанию, так как существовавший до болезни или развившийся дефицит питания может существенно увеличить вероятность неблагоприятного исхода. Пищу рекомендуется давать часто, но небольшими порциями. При частой сильной рвоте необходимо парентеральное введение жидкости.

Для грудных детей жизненно важно отсасывание слизи из глотки; иногда могут потребоваться трахеостомия или назотрахеальная интубация.

Уход и режим. Тяжело больных грудных детей рекомендуется поместить в затемненную, тихую комнату и как можно реже беспокоить, поскольку воздействие внешних раздражителей может вызвать тяжелый пароксизм с аноксией. Рекомендуется пребывание больного на свежем воздухе (дети вне помещений практически не кашляют). Для старших детей с легкими формами заболевания постельный режим не требуется. При приступах апноэ – массаж грудной клетки, искусственное дыхание, кислород.

Методы лечения коклюша закреплены в приказе Комитета здравоохранения г. Москвы и ЦГСЭН в г. Москве от 25.11.2002 №539/230 «О мерах по совершенствованию профилактики коклюша»:

- Инструкцией «Требования к взятию и транспортировке материала для лабораторной диагностике коклюша»;
- Методическими рекомендациями «Клиника, диагностика и лечение коклюшной инфекции»;
- Методическими рекомендациями «Организация и проведение противоэпидемических мероприятий при коклюшной инфекции».

Контрольные вопросы:

1. Какие больные коклюшем подлежат обязательной госпитализации?
2. Возможно ли нахождение больных коклюшем на свежем воздухе и при каких условиях?
3. Что предусматривает этиотропная терапия коклюша?
4. Что является показанием к проведению антибиотикотерапии при коклюше?
5. К каким препаратам в настоящее время наиболее чувствительны штаммы *B. pertussis*?
6. В какие сроки заболевания нецелесообразно применять антибиотики и почему?
7. При каких условиях оправдано назначение антибиотиков в спазматической стадии коклюша?
8. Что является основной задачей патогенетической терапии при коклюше и какие методы и препараты при этом необходимо применять?

ХII. ПРОФИЛАКТИКА КОКЛЮША

Иммунитет при коклюше типоспецифический. Длительное время считали, что если человек встречается со штаммом, имеющим полный набор антигенов (при заболевании или вакцинации), то иммунитет вырабатывается на всю жизнь. Однако исследования отечественных и зарубежных авторов показали, что поствакцинальный иммунитет к коклюшу не является пожизненным и значительно снижается или утрачивается через 4 – 12 лет после вакцинации. В связи с этим часть привитых детей уже в младшем школьном возрасте становится восприимчивой к коклюшу.

Ранее было принято считать, что одного клинически выраженного заболевания коклюшем достаточно для выработки пожизненного иммунитета. Однако в последнее время истинность этого положения подвергается сомнению. Предполагают, что протективный иммунитет после перенесенного коклюша не является пожизненным и снижается через 7 – 20 лет. Описаны

лабораторно подтвержденные случаи повторных заболеваний коклюшем. Циркуляция возбудителя в популяции продолжается в результате снижения иммунитета у старших возрастных групп. Учителя, медицинские работники и работники детских учреждений входят в группу повышенного риска.

Основной причиной эпидемиологического неблагополучия при коклюше в настоящее время является низкий охват детей прививками, увеличение «неиммунной прослойки». По данным официальной статистики, в 1996 г. В целом по России законченную вакцинацию против коклюша получили 40,9 % детей в возрасте до 1 года, 65,2 % в возрасте 1-2 лет. В трехлетнем возрасте полностью вакцинированы против коклюша составили 66,0 %. На одной трети территории России охват детей прививками ниже среднереспубликанского показателя (Петрова М.С. и др., 1996).

В России, СНГ и во многих зарубежных странах, включая США, в течение многих лет для иммунизации детей против коклюша применяется комплексная вакцина АКДС, противококлюшный компонент которой представлен убитыми формалином цельными клетками *B. Pertussis*. После трехкратной иммунизации детей с последующей ревакцинацией АКДС, обеспечивает достаточно высокую защиту от коклюша, по крайней мере, от тяжелых форм этой инфекции. Относительным благополучием по коклюшу, достигнутым в шестидесятые годы и практически сохраняющимся до настоящего времени, мы обязаны этой вакцине.

«Ахиллесовой пятой» АКДС является ее высокая реактогенность, вследствие чего по объективным и субъективным причинам периодически сокращается контингент прививаемых детей. В 1980 г. Медицинские отводы от коклюшного компонента были даны 8-10 % детей, а в 1990 г. – уже 25 %. Если в 1970 г. Удельный вес непривитых детей среди заболевших коклюшем составлял 35-40 %, то в конце 70-х годов он возрос до 65 %, а в 1990 г. Превысил 75 %, что подтверждает вовлечение в эпидемический процесс именно непривитых детей. Низкий уровень иммунизации связан с

увеличением числа медицинских отводов из-за неблагополучия преморбидного фона (врожденная патология, поражения центральной нервной системы, аллергопатология), а также вследствие отказа от вакцинации. На поствакцинальные реакции, вызываемые АКДС, нередко наслаиваются интеркуррентные заболевания, которые утяжеляют клиническую картину и способствуют уклонению родителей от проведения плановой вакцинации детей.

Создание бесклеточной (ацеллюлярной) коклюшной вакцины, содержащие от 1 до 5 компонентов, позволяет получить на порядок менее реактогенную вакцину. Известны монокомпонентные вакцины на основе коклюшного анатоксина, двухкомпонентные вакцины (коклюшный анатоксин и филаментозный гемагглютинин ФГА), трехкомпонентные вакцины – коклюшный анатоксин, филаментозный гемагглютинин и пертактин и пятикомпонентные вакцины – коклюшный анатоксин, филаментозный гемагглютинин, пертактин, фимбрии 2 и фимбрии 3. Как показывает опыт развитых стран, перешедших на бесклеточные коклюшные вакцины, их применение позволяет резко повысить охват прививками, поскольку снимает опасения родителей и врачей в отношении возможных реакций и осложнений. Более того, с помощью бесклеточных вакцин вполне возможно введение второй ревакцинации перед школой – эта мера предусмотрена в Национальных календарях иммунопрофилактики СИТА Японии, Франции и ряда других стран.

Длительное время неудачи исследователей в разработке менее реактогенной бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) были обусловлены, с одной стороны, отсутствием точных знаний об антигенной структуре коклюшного микроба, с другой – низким научно-техническим уровнем, не позволяющим выделить отдельные очищенные антигены в количестве, достаточном для оценки их физико-химических и иммунобиологических свойств.

Благодаря разработке новых материалов и технологий, была

достаточно хорошо изучена антигенная структура коклюшного микроба.

Детальное изучение биологических свойств изолированных очищенных антигенов позволило уточнить роль каждого из них в патогенезе заболевания и формировании иммунитета к коклюшной инфекции.

Было установлено, что коклюшный токсин (КТ) является ведущим токсином, определяющим патогенез и клинику заболевания, и ведущим протективным антигеном, обеспечивающим формирование напряженного и длительного иммунитета. Кроме того, протективными свойствами обладают филаментозный гемагглютинин (ФГА) – фермент, способствующий «приклеиванию» бордетеллы к клеткам верхних дыхательных путей. Антитела к этому антигену снижают восприимчивость к инфицированию бордетеллой.

Пертактин (ПРН) и антигены (АГГ) – наружные белки *Bordetella*, которые могут быть эффективно распознаны иммунной системой.

Фимбрии (*fimbriae*, лат. – ворсинки) структуры, позволяющие бактерии увеличивать «полезную» площадь для прилипания к клеткам организма. В вакцинах используют, как правило, 2 и 3-й типы антигенов фимбрий.

Эти данные определили в последующем направления по разработке БКВ.

Первая бесклеточная коклюшная вакцина была разработана в Японии в 1981г. В экспериментальных исследованиях была установлена низкая токсичность, невысокая активность полученных препаратов (гистаминсенсibiliзирующая и илейкоцитозстимулирующая).

Испытания вакцины в полевых опытах показали ее выраженную защитную активность.

С осени 1981 г. БКВ в ассоциации с дифтерийным и столбнячным анатоксинами была включена в календарь прививок Японии для вакцинации детей с двухлетнего возраста, а с 1988 г. – с трехмесячного возраста.

Обнадеживающие результаты применения бесклеточной коклюшной вакцины в Японии способствовали широкому испытанию в полевых условиях как японской вакцины, так и БКВ, разработанных в

других странах.

Первая попытка оценить профилактическую эффективность БКВ в Европе была предпринята в Швеции в 1986г. Использовали японскую вакцину JNIN-6 (двухкомпонентную), содержащую по 23,4 мкг обезвреженного КТ и ФГА, и JMN-7 (однокомпонентную), содержащую 37,7 мкг обезвреженного КТ. Двукратную вакцинацию проводили детям в 5-11 месяцев и через 8-12 недель.

Было показано, что двухкомпонентная вакцина (JNTH-6) обеспечивала защиту 69%, а монокомпонентная – 54% вакцинированных детей. Обе вакцины обладали низкой реактогенностью. Вместе с тем последующие наблюдения в течение трех лет свидетельствовали о том, что эффективность двухкомпонентной вакцины колебалась от 77% до 92 %, а монокомпонентной – от 65 % до 82 %. Иммуитет после вакцинации бесклеточной КВ сохранялся, по крайней мере, в течение четырех лет.

На основании результатов шведских полевых испытаний, ВОЗ в 1991 г. Созвала рабочую группу экспертов для выработки согласованных критериев оценки эффективности БКВ, которые в дальнейшем могли бы быть использованы при проведении ее контролируемых испытаний.

В период с 1991 г. По 1996 г. В полевых условиях была изучена иммуногенная активность, безопасность, реактогенность и профилактическая эффективность 13-ти БКВ в ассоциации с дифтерийным и столбнячным анатоксинами. В качестве препарата сравнения использовали АКДС вакцину с корпускулярным коклюшным компонентом.

Испытуемые вакцины значительно различались по составу антигенов В. Pertussis, методам их очистки и обезвреживания коклюшного токсина, содержанию дифтерийного и столбнячного анатоксинов и сорбентов.

Все вакцины вызывали значительный антительный ответ к входящим в их состав антигенам. Уровень антител к пертактину, АГГ и ФГА коррелировал с количественным их содержанием в вакцине. Уровень же антитоксических антител к КТ недостаточно коррелировал с количественным

содержанием этого антигена. Исследования также показали, что введение БКВ вызывало у детей специфический Т-клеточный ответ к КТ, ФГА и пертактину.

Таким образом, с 1990 по 1996 гг. проведено 8 полевых испытаний эффективности тринадцати бесклеточных КВ, изготовленных разными производителями в сравнении с цельноклеточной коклюшной вакциной.

Эффективность БКВ и ЦКВ по окончании курса была одинакова. Эффективность монокомпонентной коклюшной вакцины, содержащей только обезвреженный коклюшный токсин, подтверждает концепцию M. Pittman (6) о том, что коклюшный токсин является ведущим протективным антигеном.

Вместе с тем большая эффективность трех- и четырехкомпонентных бесклеточных КВ свидетельствует о важной роли в защите против коклюша пертактина и агглютиногенов, белков, тесно связанных с наружной мембраной клетки *B. pertussis*.

О взаимосвязи защитной активности коклюшной корпускулярной вакцины с содержанием в ней поверхностных белков, в частности антигенов 2 и 3, указывали ряд исследователей. Было показано, что высокое содержание в клетке антигенов 2 и особенно 3 совпадало с формированием более сложной и стабильной структуры наружной мембраны и высокого стабильного уровня защитной активности корпускулярной коклюшной вакцины. В этой связи наиболее важной задачей при разработке и производстве бесклеточной КВ является оптимизация ее состава и технологии изготовления индивидуальных очищенных антигенов.

Реактогенность испытуемых вакцин была определена более чем на 2000 детей после первой, второй и третьей вакцинации в динамике в течение 7 сут и на 14 сут. Все испытанные бесклеточные КВ обладали меньшей реактогенностью и более низким побочным действием по сравнению с коклюшной корпускулярной вакциной.

В среднем БКВ примерно в 2-10 раз менее реактогенна, чем

цельноклеточная коклюшная вакцина.

После введения бесклеточной КВ уменьшалась частота случаев неврологических осложнений и смертей, связанных с вакцинацией. По данным Kimura M., Kuno-Sakai в Японии за период с 1970 по 1980 годы после прививок корпускулярной коклюшной вакцины наблюдалось 109 случаев неврологических осложнений и 40 смертей, после введения бесклеточной коклюшной вакцины (с 1981 по 1990 годы) — 11 и 2 случая соответственно.

Данные японских исследователей и полевых испытаний свидетельствуют о том, что продолжительность иммунитета после введения бесклеточной коклюшной вакцины эквивалентна или превышает таковую после введения корпускулярной коклюшной вакцины.

Применение бесклеточной коклюшной вакцины в Японии привело к снижению заболеваемости коклюшем. Так, после отмены противокклюшной вакцинации с 1976 по 1983 годы в стране наблюдалось 40.000 случаев заболевания коклюшем, около 200 из которых закончились летально. После возобновления вакцинации против коклюша бесклеточной коклюшной вакциной в период с 1981 по 1988 годы наблюдалось приблизительно 400 случаев заболевания и 5 смертей от коклюша. Отмечалось снижение заболеваемости детей старшей возрастной группы.

Одновременно с лицензированием изученных вакцин для вакцинации детей в рамках календаря прививок продолжают исследования бесклеточной коклюшной вакцины в следующих направлениях:

- для вакцинации детей старших возрастных групп и взрослых;
- возможности применения АКДС вакцины с бесклеточным коклюшным компонентом в ассоциации с другими вакцинами:

- четырех- (АаКДС+инактивированная полиомиелитная вакцина или вакцина против гемофильной инфекции),
- пяти- (АаКДС+ИПВ+ХИБ),
- шести-компонентные (АаКДС+ИПВ+ХИБ+Гепатит В).

Опыт применения бесклеточной коклюшной вакцины показал, что

значительно более низкая реактогенность бесклеточных КВ обусловлена практически полным отсутствием в препаратах бактериального эндотоксина. Это позволяет снять ту настороженность к АКДС вакцине с корпускулярным коклюшным компонентом, которая имеется не только у родителей, но и у некоторых врачей, и рекомендовать вакцинацию в календарные сроки, как это предусмотрено календарями профилактических прививок практически во всех странах мира, в том числе и у детей с 2-3 месячного возраста.

Сдерживающим моментом расширения использования бесклеточных вакцин является их высокая стоимость – на 1-2 порядка выше, чем цельноклеточных. В связи с этим Всемирная Организация Здравоохранения, считая цельноклеточную вакцину основой борьбы с коклюшем, рекомендовала использовать бесклеточную вакцину в тех ситуациях, когда эта мера может повысить охват детей прививками против коклюша.

С учетом высокой стоимости импортных бесклеточных вакцин и в свете рекомендаций ВОЗ представляется крайне желательным создание отечественной бесклеточной коклюшной вакцины для использования как в целях первичной вакцинации детей грудного возраста, так и для ревакцинации перед школой.

В 2004 г. В России зарегистрирована бесклеточная коклюшно – дифтерийно – столбнячная вакцина Инфанрикс, содержащая три антигена коклюшного микроба (коклюшный анатоксин, филаментозный гемагглютинин и пертактин).

В зарубежные страны вакцина Covaxis (в некоторых странах лицензированная под названием Triaxis и Adacel) включает дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин и 5 антигенов B. Pertussis:

- коклюшный токсин,
- филаментозный гемагглютинин,
- пертактин,
- фимбриальные белки типа 2 и типа 3.

В странах Европы эта вакцина лицензирована для ревакцинации детей в

возрасте от 4 лет, подростков и взрослых. В США вакцина Sovaxis разрешена для ревакцинации лиц в возрасте от 11 до 64 лет. Проведенные расширенные в Великобритании и США клинические испытания свидетельствуют о высокой иммуногенности и низкой реактогенности вакцины.

Низкая реактогенность этих вакцин позволяет увеличить охват населения прививками за счет вакцинации детей, имеющих противопоказания к введению цельноклеточной вакцины. Это позволяет повысить охват первичной вакцинацией до 95-98%, что приведет практически к ликвидации коклюша у детей грудного и раннего возраста.

Ревакцинация перед школой позволяет пролонгировать защиту от коклюша, создаваемую первичной вакцинацией, и снизить, если и не полностью ликвидировать, заболеваемость коклюшем школьников.

Бустерные дозы бесклеточных коклюшных вакцин в разных странах вводятся в различном возрасте:

Австралия: в 18 мес. и в 4 года;

Австрия: в 16 – 18 мес., в 6 лет и в 13 – 14 лет;

Великобритания: в 4 – 5 лет;

Германия: в 15 мес. и в 11 -18 лет;

Греция: в 18 мес. и в 4 года;

Италия: в 5 лет;

Испания: в 18 мес. и в 4 – 6 лет;

Португалия: в 18 мес. и в 5- 6 лет;

Финляндия: в 20 – 24 мес.;

Франция в 11-13 и 16 – 18 лет;

США и Канада в 18 мес., 4 – 6 лет.

Важное значение имеет разработка программ вакцинации групп повышенного риска – медицинских работников, работников дошкольных учреждений и учителей.

Разрабатываются новые подходы к совершенствованию вакцинопрофилактики коклюша, основанные на молекулярно-генетических методах.

В частности, разработана живая аттенуированная коклюшная вакцина, обеспечивающая высокий уровень защиты к коклюшу и паракоклюшу на экспериментальной модели после однократной назальной вакцинации.

Резюме: Вопрос о лучших, более безопасных, но значительно более дорогих вакцинах ждет своего решения. Как и вопрос, совместимы ли прививки против коклюша со здоровьем ребенка и нужны ли вообще коклюшные вакцины. Выбор остается за родителями.

Контрольные вопросы и задания:

1. Как долго длится поствакцинальный иммунитет к коклюшу?
2. Как долго длится протективный иммунитет после перенесенного коклюша?
3. Возможно ли случаи повторного заболевания коклюшем?
4. Какие люди старших возрастных групп входят в группу повышенного риска?
5. Какие вакцины в настоящее время применяются наиболее часто для иммунизации детей против коклюша?
6. Назовите принципы создания современных противокклюшных вакцин.
7. Какие преимущества существуют у бесклеточных противокклюшных вакцин?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используемые в настоящее время бактериологические методы лабораторной диагностики коклюша недостаточно чувствительны, а серологические методы недостаточно специфичны.

Идентификация ДНК *B.pertussis* с помощью методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) (XuanOinetal., 2007) не нашла широкого применения в отечественной практике здравоохранения (И.Н. Лыткина и др., 2004).

Необходимость дальнейшего совершенствования лабораторной диагностики возбудителя коклюша, в том числе, методов анализа фазовых вариантов бактерий *B.pertussis* *in vitro* и *in vivo*, определяет актуальность прикладного раздела исследования.

Тест-системы для обнаружения ДНК возбудителя коклюша в клиническом материале с помощью ПЦР и методы выявления бактерий *B.pertussis*, содержащих инсерцию IS-элемента в генах вирулентности, будут использованы для изучения носительства возбудителя коклюша, диагностики атипичных форм заболевания, определения структуры и механизмов формирования резервуаров инфекции.

В настоящее время актуальным ставится вопрос о необходимости **использования новых производственных штаммов**, идентичных по антигенному профилю циркулирующим штаммам *B.pertussis*.

Потребуется также создание **системы слежения** за антигенным дрейфом коклюшного микроба под влиянием коллективной иммунизации (Семенов Б.Ф., 2002).

Приведенные выше данные литературы свидетельствуют, что слежение за фено- и генотипическими свойствами циркулирующих в настоящее время штаммов *B.pertussis* актуально.

Оно необходимо для последующего конструирования на их основе перспективных вакцинных препаратов, обладающих более высокой протективной активностью в отношении современных эпидемических штаммов коклюшного микроба.

Иногда, очень редко, бывает так, что взрослый пациент, который когда-то уже переболел коклюшем, опять подхватывает эту заразу.

Необходимо сказать, что **после перенесения болезни у человека в организме остается очень стойкий иммунитет**. Но в редких случаях бывает

совпадение резкого падения иммунитета вследствие иных причин и инфицирования коклюшем. Вот в таких случаях и может взрослый повторно переболеть.

Перенесенная болезнь обычно оставляет пожизненный иммунитет.

До появления прививки коклюш был преимущественно болезнью детей в возрасте от 2 до 10 лет, когда она редко бывает опасной, а дети в возрасте до 1 года были защищены материнскими антителами.

Заболеваемость и смертность были обусловлены недоеданием, скверными гигиеническими условиями, неправильным уходом и неправильным лечением.

Однако долгосрочный иммунитет к коклюшу лишь в очень небольшой степени зависит от антител; главную роль играют другие факторы, о которых мы знаем еще очень мало.

Смертность от коклюша снизилась со второй половины XIX в. до середины XX в., когда только и появилась соответствующая прививка, на -

- 90% в США, Англии и Швеции,
- 92% во Франции,
- 99,15% (!) в Испании.

Такое резкое снижение, впрочем, не было привилегией одного лишь коклюша.

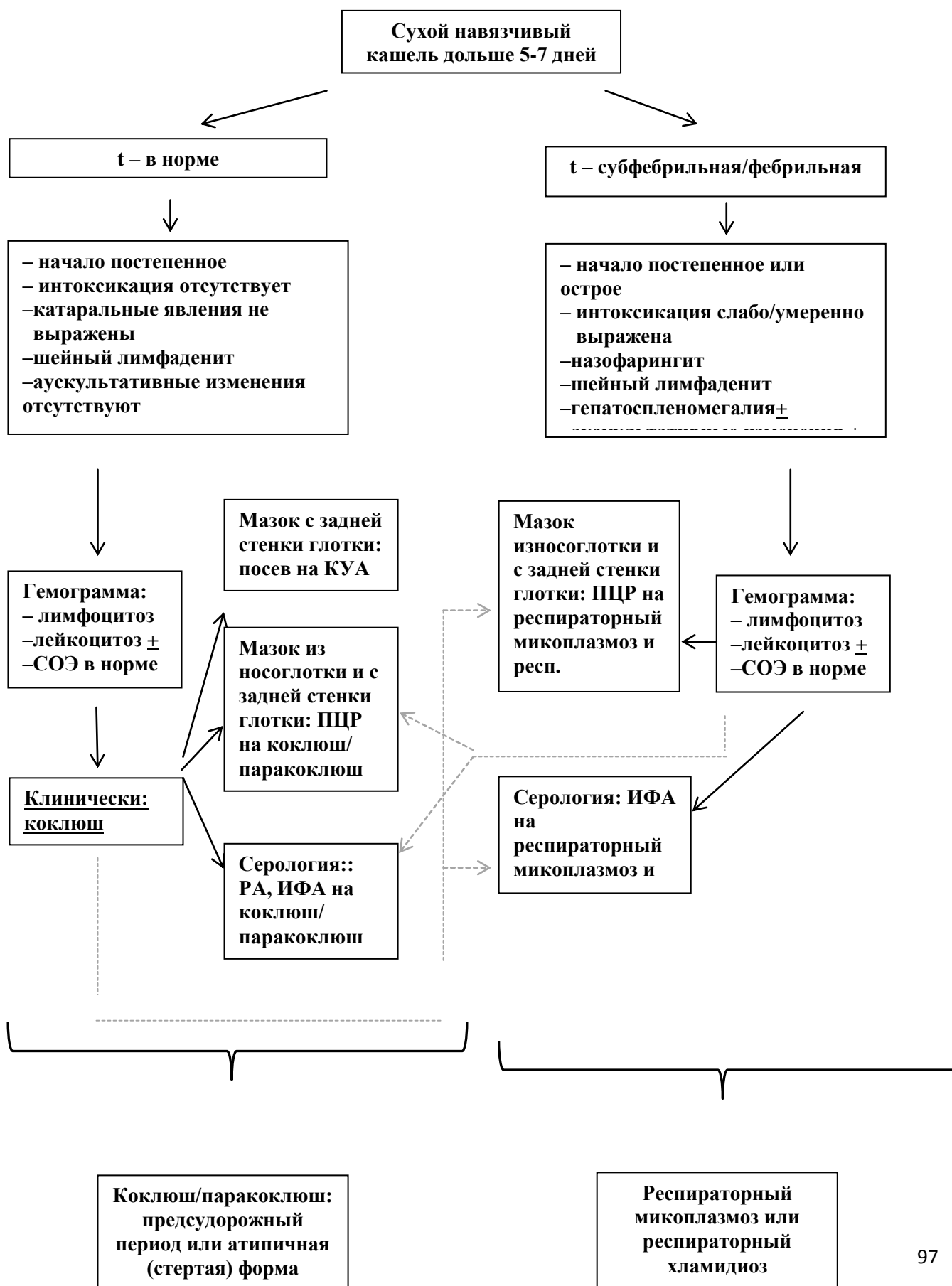
Резко снизилась смертность от скарлатины, кори, гриппа, туберкулеза и тифа, вне всякой связи с наличием или отсутствием прививок.

Связано это было, в первую очередь, со значительным улучшением санитарно-гигиенического состояния мест проживания людей и со значительно улучшившимся питанием. Более здоровые дети и взрослые могли лучше сопротивляться болезни.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Алгоритм клинико-лабораторной диагностики



Приготовление и стерилизация тампонов

1. Сухие ватные тампоны: на один конец металлической легко сгибающейся проволоки плотно наматывают слой гигроскопической ваты. Длина намотки должна быть равной 4-5 см (во избежание аспирации ваты). Затем конец проволоки с намоткой ваты (1-2 см) изгибают под тупым углом 110-120°. Другой конец проволоки монтируют в корковую или ватную пробку. Изготовленный тампон помещают в пробирку и стерилизуют в автоклаве при 112° в течение 30 минут или в сушильном шкафу при температуре 140 - 150° в течение часа.

2.. Увлажненные тампоны: готовят из легко сгибающейся нержавеющей проволоки (лучше алюминиевой). Намотку ваты, сгибание и стерилизацию проводят так же, как указано для сухих тампонов. Стерильные тампоны перед употреблением смачивают в забуференной смеси путем двукратного погружения в пробирку с жидкостью. После смачивания тампона его помещают в пробирку, а затем используют для взятия материала. Хранить 3 дня в условиях холодильника.

Раствор для смачивания тампонов (по прописи Е.А. Кузнецова).

В конической колбе смешивают 90-95 мл предварительно приготовленного раствора Na_2HPO_4 (11,876 г на 1 л дистиллированной воды) и 5-10 мл раствора KH_2PO_4 (9,078 г на 1 л дистиллированной воды).

К этой смеси добавляют 0,5 г агар-агара, стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

Затем в горячую смесь добавляют 0,2 г активированного угля (навеску угля стерилизуют отдельно (режим стерилизации)). Смесь готовят впрок и хранят в холодильнике до 2 месяцев.

Приготовление питательных для выделения бордетелл

В качестве питательной среды для посева исследуемого материала применяют:

1. картофельно-глицериновый агар (среда Борде-Жангу)
2. казеиново-угольный агар (КУА).

Среды могут быть приобретены и приготовлены согласно инструкции производителя.

Для улучшения роста при необходимости в среду можно добавить до автоклавирования активированный уголь (0.5 %) и ростовые добавки - дрожжевой диализат или экстракт (50 мл на 1 л среды), предварительно нейтрализованный до pH 7,0 (по бромтимоловому синему до зеленого цвета), а также пролин или глютамин (0,03 г на 1 л среды).

Ростовые добавки вносятся в стерилизованную и остуженную до температуры +50°C среду. Оптимально добавлять в среды дефибрированную лошадиную или баранью кровь: в среду Борде-Жангу - 20 %, в КУА – 10 %.

Добавление человеческой крови или эритроцитарной массы дает худшие результаты, их можно частично заменить 5 % сыворотки крупного рогатого скота или добавить 1% питательной среды №199.

Для подавления посторонней микрофлоры при посеве исследуемого материала используют пенициллин или бициллин. Их применяют как при обработке поверхности питательной среды разлитой в чашки Петри, так и при внесении антибиотика в среду.

В мировой практике для этих целей используется цефалексин, который, в отличие от пенициллина, не подавляет рост *B.pertussis* и более эффективен в отношении сопутствующей микрофлоры.

Использование пенициллина и бициллина. Для обработки поверхности среды используют пенициллин из расчета 7,5 МЕ, нанося его на поверхность среды шпателем или внося его в КУА, растопленный и остуженный до температуры +50°C, из расчета 30 МЕ на 100 мл среды.

Пенициллин разводят непосредственно перед взятием материала. Для этого во флакон с антибиотиком добавляют стерильный физиологический раствор для получения основного разведения пенициллина.

При содержании во флаконе 500000 МЕ в него добавляют 1 мл физиологического раствора, а при содержании 1 млн. МЕ - 2 мл

Полученное основное разведение антибиотика во флаконе можно хранить в условиях холодильника при +4°C не более недели.

Для получения необходимых для работы концентраций антибиотика 0.1 мл основного разведения из флакона (50000 МЕ) растворяют в 9.9 мл стерильного физиологического раствора. 1 мл такого раствора содержит 5000 МЕ на 1 мл. Далее делают разведения до получения 75 МЕ в 1 мл физиологического раствора.

Схема разведения пенициллина или бициллина:

1-ая пробирка - физиологический раствор 9.9 мл + 0.1 мл основного разведения антибиотика = в 1 мл 5000 МЕ;

2-ая пробирка - физиол. раствор 8.5мл + 1.5 мл раствора из 1пробирки = в 1мл 750МЕ;

3-ая пробирка - физиол. раствор 4.5мл + 0.5 мл раствора из 2пробирки = в 1мл 75МЕ.

Из третьей пробирки наносят 0,1мл (7.5 МЕ) на поверхность питательной среды в каждой чашке, тщательно втирая шпателем.

Раствор из третьей пробирки можно использовать для внесения его в среду.

Для этого 4 мл (300 МЕ) антибиотика добавляют на 1 л среды (из расчета 30 МЕ на 100 мл среды).

Это же разведение можно использовать для добавления к смачивающим жидкостям из расчета 0,1мл на 10 - 12 мл жидкости.

Рабочее разведение антибиотика (в последней пробирке) используют только в день приготовления.

Использование цефалексина.

Цефалексиниспользуется в концентрации 40 мг/л среды. Цефалексинпродается как селективная добавка для бордетелл (Bordetelaselectivesupplement). Содержимое одного флакона (20 мг цефалексина) асептически растворяется в 2 мл стерильной дистиллированной воды и добавляется к 500 мл стерильной остуженной до температуры +50°C питательной среды.

Определение содержания аминного азота в питательных средах

Определение содержания аминного азота в питательных средах проводят методом формольного титрования. Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при рН 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

Реактивы:

- 1) натрия гидроксид (0,1 моль/л) или раствор соляной кислоты (0,1 моль/л);
- 2) натрия гидроксид 10%-й раствор;
- 3) раствор формалина (40%-й раствор формальдегида) (ГОСТ 1625-75), перед каждым определением рН формалина доводят до рН 7.0 10%-м раствором натрия гидроксида.

Ход определения

В стакан вместимостью 50 мл наливают необходимый объем (А) (подготовка проб см. примечания 1 и 2) анализируемого раствора препарата, содержащего 1.5-5.0 мг аминного азота, и доводят общий объем дистиллированной водой до 20 мл.

Электроды потенциометра погружают в исследуемый раствор, рН которого доводят до значения 7,0 с помощью раствора натрия гидроксида (0.1 моль/л) или раствора соляной кислоты (0,1 моль/л). В ходе определения электроды должны все время оставаться погруженными в раствор. К нейтрализованному раствору добавляют 2 мл нейтрального формалина, перемешивают и, не вынимая электроды, титруют содержимое раствором натрия гидроксида (0,1 моль/л) до рН 9,1.

При титровании следует использовать бюретку вместимостью 5 мл. Проводят два параллельных измерения.

Содержание аминного азота в исследуемом препарате и процентах (X) вычисляют последующим формулам.

1) Для сухого образца: $X = V \times K \times 1,4 \times 100 / C$, где:

V - количество раствора натрия гидроксида (0.1 моль/л) в миллилитрах, пошедшее на титрование испытуемой пробы от pH 7.0 до 9.1;

K - поправка к титру раствора натрия гидроксида (0.1 моль/л);

1,4 - количество аминного азота в миллиграммах, эквивалентное 1,0 мл р-ра натрия гидроксида (0,1 моль/л);

C - анализируемая навеска сухого препарата в миллиграммах, содержащаяся в титруемом объеме "А";

100 - коэффициент пересчета миллиграммов в проценты.

2) Для жидкого образца: $X = V \times K \times 1,4 \times 100 / A \times 1000$. где:

A - количество жидкого образца (мл), взятого на анализ;

100 - коэффициент пересчета миллиграммов в проценты.

1000 - коэффициент пересчета миллиграммов в граммы.

Примечание I. Для сухих образцов (гидролизаты, экстракты, среды (1,5 - 4.0% аминного азота) - "А"=10 мл 1%-го раствора (анализируемая навеска образца "С" составляет соответственно 100 мг)).

Примечание 2. Для жидких гидролизатов низкой степени расщепления (0.1 - 0.2% аминного азота) "А"=3 мл; для жидких гидролизатов средней степени расщепления (0.3 - 0.6% аминного азота) "А" = 1 мл; для жидких гидролизатов высокой степени расщепления (0.7 - 1.3% аминного азота) "А"=0,5 мл; для жидких питательных сред (0,08 - 0.14% аминного азота)"А" = 10 мл; для готовых плотных агаровых сред "А" = 3 мл препарата, расплавленного в кипящей водяной бане.

Проверка качества казеиново-угольного агара

В связи с довольно сложным составом казеиново-угольной среды и большой чувствительностью ее к режиму стерилизации следует периодически проверять качество готовой среды. Для этой цели необходимо пользоваться свежевыделенными культурами *B.pertussis*.

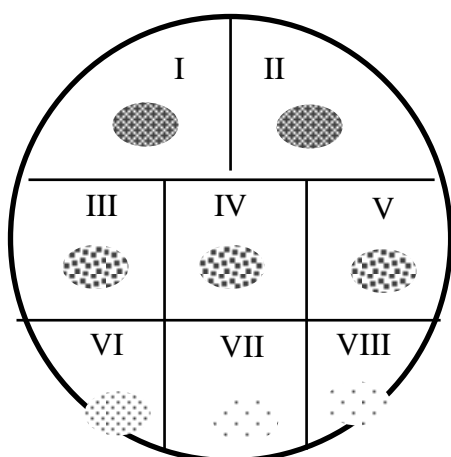
В стерильных пробирках делают 8 различных разведений взвеси 2-3-суточной культуры. Густота взвеси в первой пробирке должна соответствовать 5 млрд. микробных тел в 1 мл по стандарту мутности для *B.pertussis*. Во 2-6 пробирки налипают по 4,5 мл стерильного физиологического раствора, в 7-ю наливают 2 мл и в 8-ю - 1 мл (Таблица 5). Поверхность одной или двух чашек Петри с используемой средой делят на 2-4 или 8 секторов Рис .1а (в зависимости от питательной среды): 0.5 мл взвеси из 1 пробирки переносят стерильной пипеткой во 2 пробирку и этой же пипеткой наносят 0,1мл взвеси на сектор 1. Другой стерильной пипеткой перемешивают содержимое второй пробирки (вдуванием и выдуванием), переносят из нее 0.5 мл в 3-ю пробирку и 0.1 мл наносят на сектор 2 и т.д. Для каждого разведения следует употреблять отдельную стерильную пипетку, перемешивая ею содержимое пробирки. В 8-ю пробирку переносят из 7-й 1 мл взвеси, также перемешивая стерильной пипеткой, и наносят 0,1 мл на сектор 8. Чашку Петри осторожно, крышкой кверху (чтобы капли не слились) ставят о термостат и выдерживают в течение 3 - 5 суток. Если среда приготовлена правильно, то на первых трех секторах рост имеет вид сплошных бляшек, на секторах 4, 5 и 6 вырастают тесно расположенные колонии, а на секторах 7 и 8 - небольшое количество изолированных колоний (Рисунок 1а). Если нет роста на последних 2 секторах, то средой пользоваться нельзя.

При использовании питательных сред с добавлением крови, чашки Петри делят на 2 сектора, а при использовании сухих сред (КУА) с добавлением дрожжевого экстракта - на 4 сектора.

Схема приготовления разведений коклюшной культуры для проверки качества КУА

Номер пробирки	Кол-во раствора, мл	физ. Объем вносимой взвеси из предыдущей	Кол-во микробов в 1 мл
1	1.0	X (исходная взвесь)	5 000 000 000 (5×10^9)
2	4.5	0.5	500 000 000 (5×10^8)
3	4.5	0,5	50 000 000 (5×10^7)
4	4.5	0.5	5 000 000 (5×10^6)
5	4,5	0.5	500 000 (5×10^5)
6	4.5	0.5	50 000 (5×10^4)
7	2,0	0.5	10 000 (1×10^4)
8	1,0	1,0	5 000 (5×10^3)

а)



б)

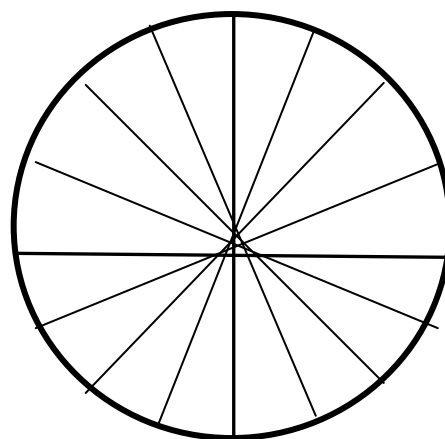


Рис.1. Разделение чашки на сектора

В районных лабораториях ЦГиЭ можно использовать метод проверки качества питательной среды, предложенный Е.А. Кузнецовым. Посев колонии коклюшного микроба производят на 1/16 поверхности чашки со средой КУА (рис. 1 б), разлитой в чашки Петри. Всего проверяют 5-10 колоний. Учет роста культуры проводят через 48 часов. В случае роста культуры по всему сектору - среда хорошего качества, при росте на 1/2 сектора - замедленный рост коклюшного микроба; рост только на посевной площадке - среда плохая.

Хранение культур бордетелл

Коклюшная культура, высушенная из замороженного состояния под вакуумом, может храниться неопределенно долгое время при сохранении вакуума в ампуле и при температуре не выше +10 °С.

Ампулу с высушенным штаммом вскрывают стерильно над лотком. Верхний конец ампулы нагревают на пламени горелки и снимают парафин, затем кусочком стерильной ваты, смоченным в стерильной воде, осторожно прикасаются к оттянутому концу ампулы так, чтобы получилась небольшая трещина, и той же мокрой ватой обводят вокруг носика ампулы.

После образования круговой (или не полностью круговой) трещины легким ударом пинцета удаляют конец ампулы.

После вскрытия ампулы в нее стерильно наливают 0.2-0.3 мл стерильного физиологического раствора.

После растворения сухого содержимого ампулы его переносят пастеровской пипеткой на чашку с питательной средой и 48-72 часа выращивают при температуре +35-37 °С.

В первых пересевах микробы обладают несколько пониженной жизнеспособностью. Для восстановления полной жизнеспособности требуется 2-3 пассажа на оптимальных питательных средах.

Рекомендуется для работы пользоваться культурой после второго или третьего пересева.

В дальнейшем коклюшные культуры сохраняют на среде Борде-Жангу или КУА с 10% крови, пересевая раз в 3-4 недели. Можно пользоваться культурой не более 10 пассажа.

Способы длительного хранения (без пересева):

1. Хранение культур коклюшного микроба в консервирующей смеси (рецепт МПИИЭМ им. Г.Н. Габричевского)

Готовят 2 раствора:

- 1 - 80 % раствор глицерина в буферном физиологическом растворе;
- 2- сахарозо-желатиновая среда (10% раствор сахарозы и 1% раствор желатина).

Смешивают по 2,0 мл первого и второго растворов в стерильных агглютинационных пробирках, помещают на дно пробирки 3-4 петли 3-суточной культуры коклюшного микроба и хранят в морозильной камере холодильника или в глубоко морозильной камере при -30°С под ватно-марлевой пробкой до 1 года.

При высевах берут петлей часть материала со дна пробирки и высевают на среду КУА с 3-4% крови, растирая шпателем.

Приготовление 80 % раствора глицерина в буферном физиологическом растворе:

1) Для приготовления 8 л буферного физиологического раствора pH 7.2 необходимо:

NaCl - 69 г 200 мг, Na_2HPO_4 - 15 г 360 мг, KH_2PO_4 - 3 г 520 мг растворяют в 8 л дистиллированной воды, автоклавируют при 0.3 атм. в течение 30 минут. 80 % раствор глицерина стерилизуют в автоклаве при 1.8 атм. в течение 30 минут.

2) Приготовление сахарозо-желатиновой среды:

- на водяной бане при +55 °C в 300 мл дистиллированной воды растворить 10 г желатина;
- в 300 мл дистиллированной воды 100 г сахарозы;
- соединить 1 и 2 раствора, довести дистиллированной водой до 1 л, установить pH 7.0 раствором бикарбоната натрия.

Среду стерилизовать текучим паром в автоклаве три дня по 1 часу. Хранить разлитой во флаконы.

2. Хранение культур коклюшного микроба в полужидком КУА с кровью и без (рецепт Центра ГСЭН г. Москвы)

Казеиново-угольный агар готовят по прописи, но агара добавляют 1,0 г на 1 л среды (0,1%), разливают по пробиркам (в количестве до 8,0 мл) и стерилизуют в автоклаве при 112°C 20 мин.

В остуженный до 50°C полужидкий агар КУА можно добавить стерильную дефибрированную кровь крупного рогатого скота из расчета 0,5-1 мл на 8,0 мл среды.

Культуру коклюшного микроба засевают в среду, выдерживают в термостате 3-4 дня, а затем без пересева сохраняют в холодильнике или при комнатной температуре в течение 1 месяца.

При хранении культуры коклюшного микроба на плотной КУА ее пересевают через 10-14 дней.

ГЛОССАРИЙ

Антропонозное - заболевания свойственные только человеку.

Апноэ - остановка дыхания.

Аттенуированная культура– утратившая вирулентность, но сохранившая иммуногенность, ослабленная.

Бортеделла - палочка коклюша, не устойчивая во внешней среде.

Бустерные дозы - повторные дозы.

Гемофилы - любящие кровь.

Диссоциация - изменение культуры микроорганизма по каким то признакам эукариотической клетки - клетки имеющие ядро

Изоляты – микроорганизмы, выделенные из патологического материала или окружающей среды.

Инвазивность - способность микроорганизмов проникать внутрь клетки макроорганизма.

Коккобациллы – мелкие палочки почти кокки.

Легионелл – вид микроорганизмов.

Метахроматические - различно окрашенные.

Моноцит - клетка крови.

Облигатные - абсолютные.

Патогенный - микроб вызывающий заболевание.

Пептидогликан - компонент клеточной стенки бактерий.

Респираторные - заболевания дыхательного тракта.

Филогенетический - эволюционная генетическая близость.

Фимбрии - образования на поверхности бактериальной клетки.

Энантемы - высыпания, сыпь.

Эпителиоциты - клетки мерцательного эпителия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Зайцев Е.М. Эпидемический процесс и вакцинопрофилактика коклюша. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии- 2013. - №3. - С. 103 – 110.
2. А.С. Лабинская «Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекции» , БИНОМ, М.2013.752с.
3. Малеев В.В. Вакцины для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша /Таточенко В.К., Зайцев Е.М. // Национальное руководство «Вакцины и вакцинация» под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. – М.: «ГЭОТАР – Медиа» - 2011.- Гл. 21 – С. 446 – 455.

Дополнительная

4. Бабаченко И.В., Курова Н.Н., Ценева Г.Я. Коклюшная инфекция в условиях антигенного дрейфа Bordetellapertussis // Вопросы современной педиатрии. – 2006. - 5 (6). - С. 25 – 27.

Нормативно-правовая

5. СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности»
6. СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
7. МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред»
8. МР, утв. Минздравом «Коклюш и паракоклюш. Профилактика,

клиника, диагностика» СССР 9 сентября 1983г. Инструкция МЗ СССР, 1984 г. «По бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше»

9. СП 3.1.2.1320-03 «Профилактика коклюшной инфекции»
10. МУ 3.1.2.2160-07 «Эпидемиологический надзор за коклюшной инфекцией»
11. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности»
12. МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)»

СТОЛЯРОВА Лидия Григорьевна
МАЗУРОВА Ирина Юрьевна
САФОНОВА Татьяна Борисовна
ФИЛИМОНОВА Ольга Юрьевна
ТАРАНЕНКО Любовь Анатольевна
ВЛАСОВА Ирина Владимировна
ЗОЛОТАРЕВА Любовь Васильевна
ЗАЙЦЕВ Евгений Михайлович
ЛАПШИНА Галина Константиновна

Коклюш

Учебное пособие

Редактор

Подписано к печати..... Формат 60×90 1/16

Печать.....Бумага.....

Усл. печ.л....

Тираж ...экз.

Заказ №

«Российская медицинская академия последипломного образования».

ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

Ул. Баррикадная, д.2/1, стр.1, Москва, 123995

Электронный адрес: www.rmapo.ru

E-mail: rmapo@rmapo.ru