

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОКЛЮША И ПАРАКОКЛЮША С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО, МОЛЕКУЛЯРНОГО И СЕРОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДОВ

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь*

В настоящее время коклюш остается эндемичным заболеванием во многих регионах мира. Также в последние годы отмечается рост заболеваемости во многих странах, несмотря на высокий охват иммунизацией против коклюша. Как правило, у не привитых лиц заболевание протекает с наличием типичных симптомов инфекции, в то время как у большинства привитых детей, подростков и взрослых, заболевание часто протекает нетипично, что требует подтверждения диагноза с использованием лабораторных методов. Быстрая диагностика коклюша важна для своевременной изоляции источника инфекции, раннего проведения профилактических мероприятий среди контактных лиц, особенно среди не вакцинированных новорожденных детей, для которых коклюш представляет угрозу для жизни [1].

На сегодняшний день в мире для лабораторной диагностики коклюшной инфекции наиболее широко используются: выделение возбудителя с использованием бактериологического метода, обнаружение ДНК возбудителя методом ПЦР, а также серологические исследования сывороток крови в ИФА или реакции агглютинации [2].

Целью данного исследования являлся анализ результативности различных методов лабораторной диагностики коклюша.

Лабораторная верификация диагноза у подозрительных на коклюш пациентов осуществлялась в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии с использованием бактериологического, молекулярного (ПЦР) и серологического методов. Забор и доставка клинического материала осуществлялись в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения коклюша», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения 13 июля 2012 г. № 70.

За период 2012-2015 гг. из различных учреждений здравоохранения, зональных и областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья в лабораторию поступил клинический материал от 4091 пациента с подозрением на коклюш/паракоклюш. С использованием двух методов – бактериологического и ПЦР, – были обследованы 582 пациента, только методом ПЦР – 2086, только серологическим методом – 672, серологическим и в ПЦР – 751.

Для исследования бактериологическим методом носоглоточные мазки в транспортной среде Amies культивировали на кровяно-угольном агаре (с добавлением цефалексина в концентрации 40 мкг/мл) в течение 3-7 суток при +37°C. Чашки с посевом анализировали ежедневно, подозрительные колонии отсеивали и идентифицировали.

Носоглоточные мазки исследовались с использованием разработанного нами метода ПЦР в режиме реального времени, основанном на обнаружении ДНК *B. pertussis* по мишеням IS481 и BP0026 и ДНК *Bordetella parapertussis* по мишени IS1001 [3].

Для серологических исследований применяли коммерческую тест-систему SERION ELISA classic *Bordetella pertussis* Toxin IgG (Virion/Serion, Германия) для обнаружения иммуноглобулинов G к коклюшному токсину. Серологическая диагностика коклюша основывалась на 4-х кратном нарастании IgG к коклюшному токсину в парных сыворотках или на выявлении диагностического титра этих антител при использовании одной сыворотки крови в ИФА, взятой у привитых лиц в интервале не менее трех лет от последней прививки. В качестве диагностического титра, свидетельствующим о перенесенном заболевании, использовали значения 100 МЕ/мл и более.

До 2012 г. в Республике Беларусь ежегодно регистрировалось от 70 до 151 случаев коклюша и от 2 до 3 случаев паракоклюша. В 2012 г. зарегистрировано 576 случаев коклюша и 18 паракоклюша, в 2013 г. – 188 и 5 случаев, в 2014 г. – 378 и 12 случаев, и в 2015 – 503 и 5 случаев, соответственно. Доля лабораторно подтвержденных случаев в эти годы составила 85,3, 82,3, 95,7 и 91,5% соответственно.

На сегодняшний день бактериологический метод является «золотым стандартом» лабораторной диагностики, благодаря его высокой специфичности (100%). Однако на его чувствительность существенно влияют качество сред, сроки взятия материала для исследования, а также проведение антибиотикотерапии. Кроме того, само исследование достаточно длительное и занимает 7 и более дней для получения окончательного результата. В связи с этим в последние годы первое место в диагностике коклюшной/паракоклюшной инфекций занимает ПЦР метод. Данный метод обладает высокой чувствительностью и специфично-

стью, а также обеспечивает более быструю диагностику, что особенно важно на ранних стадиях заболевания для выбора правильного курса терапии [2].

Среди 582 мазков, параллельно исследованных бактериологическим методом и в ПЦР, возбудитель коклюша был выделен всего в 11 случаях (1,9%). В то время как в ПЦР ДНК *B. pertussis* была выявлена в 141 мазке (24,2%). Таким образом, наши результаты подтверждают, что использование только бактериологического метода в конечном итоге приводит к низкой эффективности диагностики коклюшной инфекции. Однако проводить данные исследования необходимо, так как ценность их связана с возможностью выделения клинических изолятов *B. pertussis* и дальнейшего их изучения на фено- и генотипическом уровнях для оценки изменчивости.

Среди 3419 мазков, поступивших для исследования в ПЦР за 2012-2015 гг., положительными к ДНК *B. pertussis* оказались 838 (24,5%), и 14 (0,4%) – положительными к ДНК *B. parapertussis*. Как следует из данных литературы, содержание ДНК возбудителя в носоглотке зависит от возраста пациента и постепенная элиминация возбудителя из носоглотки происходит в среднем до 40 дней [4]. В связи с этим метод ПЦР наиболее эффективен в первые три недели от начала заболевания. Шанс обнаружения ДНК *B. pertussis* значительно снижается при заборе материала через месяц и более от начала кашля. Проведенный нами анализ результатов исследования носоглоточных мазков в зависимости от сроков их забора от начала заболевания показал, что только 1979 из 3419 мазков были взяты в сроки от 1 до 21 дня от начала заболевания и положительными к возбудителю коклюша среди них оказались 687 (34,7%). Среди 525 мазков, взятых на 22-30 сутки от начала заболевания, ДНК *B. pertussis* была выявлена в 104 (19,8%), а среди 915 мазков, взятых в сроки более 30 дней от начала заболевания, лишь в 47 (5,1%). Следует отметить, что число положительных в ПЦР мазков было значительно выше среди детей до 1 года. Из 557 мазков, полученных от детей до 1 года, ДНК возбудителя коклюша выявлена в 341 (61,2%). При этом почти все они (82,2%) были обследованы в сроки до двух недель от начала заболевания.

Сыворотки крови 1423 пациентов с подозрением на коклюш/паракоклюш, включая 35 пациентов, от которых были получены парные сыворотки крови, были исследованы в ИФА на наличие IgG к коклюшному токсину. Среди 35 парных сывороток 4-х кратное нарастание титра антител выявлено в 26 сыворотках крови (74,3%). Среди 410 сывороток крови, взятых в сроки до двух недель от начала заболевания, положительными были лишь 109 (26,5%). Среди 978 сывороток крови, взятых на 14 день и позднее от начала заболевания, диагностический титр антител, свидетельствующий о недавно перенесенной коклюшной инфекции, выявлен в 555 (56,7%).

Таким образом, использование трех лабораторных методов при диагностике коклюшной инфекции обеспечивает высокую эффективность выявления случаев данной инфекции. При этом на разных сроках заболевания значимость различных методов отличается. На начальной стадии заболевания коклюшем основную роль для диагностики играет ПЦР метод и бактериологическое исследование, в то время как на поздней стадии наиболее эффективно использование ИФА, являющегося ретроспективным методом диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Defining* Pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives / J. D. Cherry [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2005. Vol. 24. P. 25-34.
2. *Van der Zee, A.* Laboratory diagnosis of pertussis / A. Van der Zee, J. F. Schellekens, F. R. Mooi // *Clin. Microbiol. Rev.* 2015. Vol. 28. P. 1005-1026.
3. *Kolodkina, V. L.* Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / V. L. Kolodkina, V. S. Martynov, A. Babenko // *Iran. J. Microbiol.* 2014. Vol. 6. P. 346-354.
4. *Differences in Bordetella pertussis* DNA load according to clinical and epidemiological characteristics of patients with whooping cough / P. Brotons [et al.] // *J. Infect.* 2016. Vol. 72. P. 460-467.