

УДК 616.921.8-078+579.843.94.08

Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша

Г.Я. Ценева, Н.Н. Курова

Лаборатория бактериальных капельных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Коклюш остается актуальной инфекцией во всем мире, в том числе в странах с высоким уровнем иммунизации населения. В то же время до сих пор отсутствуют высокочувствительные, специфичные и легко воспроизводимые методы диагностики этой инфекции, которые бы удовлетворяли потребностям практического здравоохранения. В 1980–90-е годы были получены новые данные об антигенной структуре *Bordetella pertussis* и факторах патогенности этого микроорганизма. Представлен обзор данных по микробиологической характеристике возбудителя

коклюша и родственных ему бактерий. Описаны различные факторы патогенности *B. pertussis*, их роль в развитии заболевания и формировании иммунитета у человека. Рассмотрены некоторые вопросы патогенеза коклюша. Описываются различные методы лабораторной диагностики инфекции, вызванной *B. pertussis*, их преимущества и недостатки.

Ключевые слова: коклюш, *Bordetella pertussis*, факторы патогенности, коклюшный токсин, лабораторная диагностика.

Microbiological Description of *Bordetella pertussis* and Laboratory Diagnosis of Whooping Cough

G.Ya. Tseneva, N.N. Kurova

Laboratory of droplet bacterial infections, Research Institute of Epidemiology and Microbiology named under L. Pasteur, Saint-Petersburg, Russia

Whooping cough remains a significant problem worldwide, even in countries with high number of immunized people. However, a lack of sensitive, specific and reproducible diagnostics for this infection that would meet the needs of health-care system still exists. In 1980–90s, novel information on antigen structure and virulence factors of *Bordetella pertussis* was discovered. This paper

presents a review of data on microbiological properties of *B. pertussis* and related bacteria. Virulence factors of *Bordetella pertussis* as well as their role in pathogenesis of pertussis and protective immunity to the infection in humans are described. Some aspects of pathogenesis of whooping cough are also considered. Currently existing laboratory methods for the diagnosis of infection caused by *Bordetella pertussis*, their advantages and disadvantages are reviewed.

Key words: whooping cough, *Bordetella pertussis*, virulence factors, pertussis toxin, laboratory diagnosis.

Контактный адрес:

Галина Яковлевна Ценева

Тел.: (812) 238-0939

Эл. почта: tseneva@PC7367.spb.edu

Введение

Введение в России обязательной вакцинации в 1959 г. позволило снизить заболеваемость коклюшем в десятки раз: в С.-Петербурге в 1958 г. заболеваемость составляла 710 на 100 000 населения, а в 1973 г. – 18,8 (минимальный уровень для С.-Петербурга за весь период наблюдения). Летальность, связанная с этой инфекцией, была практически сведена к нулю. Однако в начале 1990-х необоснованно возросшее число медицинских отводов детей от прививок привело к возникновению эпидемии. Особенно пострадали крупные регионы, в том числе С.-Петербург. Пик эпидемии пришелся на 1994 г., когда заболеваемость в РФ составила 32,6 на 100 000 населения, а в С.-Петербурге – 143,2 на 100 000 населения. В последующие годы были приняты меры по увеличению охвата прививками детей до 4 лет. К 1999 г. показатель привитости в С.-Петербурге составил 84,6% по сравнению с 35,7% в 1992 г. Как следствие этого – заболеваемость в городе снизилась, однако до сих пор она в 3–4 раза превышает заболеваемость по РФ.

В настоящее время частота подтвержденных случаев коклюша в ряде регионов России, в том числе в С.-Петербурге, не превышает 15%. В значительной степени это связано с несвоевременным и неполным обследованием лиц с подозрением на коклюш, а также с несовершенной лабораторной диагностикой.

В последние годы регистрируется множество случаев заболевания коклюшем среди привитых детей. Особенно широко этот вопрос исследуется в странах Балтии и Северной Европы, на территории которых коклюш является распространенной инфекцией. Так, в Норвегии, где уровень охвата прививками детей составляет более 95%, показатель заболеваемости коклюшем в 2000 г. составил 76,3 на 100 000 населения. Высокие уровни заболеваемости регистрировались также в Швеции, Эстонии и других странах.

Все вышеизложенное определило необходимость обобщения современных данных о биологических свойствах *Bordetella pertussis*, его индикации и идентификации с целью оценки эффективности лабораторных методов диагностики коклюша.

Микробиологическая характеристика *Bordetella pertussis*

Возбудитель коклюша – *Bordetella pertussis*, выделенный в 1906 г. J. Bordet и O. Gengou [1], относится к роду *Bordetella*, который включает также *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* и *B. avium*. В 1994–95 гг. появились публикации, в которых описывались новые виды бордетелл: *B. holmesii* и *B. hinzii*. Ранее

существовало представление о *B. parapertussis* как о патогене исключительно человека, однако в последующем он был выделен от здоровых и больных пневмонией ягнят [2]. *B. pertussis* вызывает заболевание у человека, *B. bronchiseptica* – преимущественно у домашних животных (у человека всего в 0,1–0,5% случаев), *B. avium* – у птиц. *B. holmesii* (15 штаммов) была выделена из крови пациентов, у некоторых из которых имелись нарушения функции иммунной системы. Штаммы *B. hinzii*, сходные с *B. avium*, были выделены из дыхательных путей индеек и цыплят, 2 штамма – из слюны и крови больного СПИДом [3–5].

Бордетеллы представляют собой мелкие (0,5–2,0×0,2–0,5 мкм) грамтрицательные коккобациллы. На плотных питательных средах образуют гладкие, влажные, выпуклые, ровные, блестящие колонии с жемчужным оттенком. Самые мелкие колонии (1–2 мм) характерны для *B. pertussis*, рост которых определяется через 48–72 ч (*B. parapertussis* – через 24–48 ч, *B. bronchiseptica* – 18–24 ч). *B. pertussis* неподвижна, обладает низкой ферментативной активностью (положительный тест на оксидазу). *B. parapertussis* также неподвижна, вырабатывает ферменты тирозиназу и уреазу (отрицательный тест на оксидазу). Наиболее активна *B. bronchiseptica*: подвижна, вырабатывает уреазу, оксидазу, утилизирует цитраты, переводит нитраты в нитриты. Более того, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* менее прихотливы и растут на простом агаре, в то время как для роста *B. pertussis* требуются сложные питательные среды. *B. bronchiseptica* и *B. avium* способны расти в фосфатно-солевом буфере и пресной воде, которые теоретически могут являться источниками инфекции [6].

Коклюшный токсин. К факторам патогенности *B. pertussis* относят в первую очередь *коклюшный токсин* (КТ). Он представляет собой экзотоксин – белок с молекулярной массой 117 кДа, состоящий из двух функциональных частей (А и В) и пяти структурных субъединиц. Участок А (соответствует субъединице S1) обладает ферментативной активностью и катализирует АДФ-зависимое рибозилирование трансдуцина – белка мембраны клетки-мишени, являющегося частью системы, ингибирующей клеточную аденилатциклазу [7]. Нарушение контроля функционирования аденилатциклазы способствует накоплению цАМФ, что приводит к нарушению функции клеток-мишеней. Участок В состоит из субъединиц S2–S5 и отвечает за связывание токсина с рецепторами клеток-мишеней [8]. В организме хозяина КТ, обладающий высокой иммуногенностью, приводит к развитию лимфоцитоза и повышает выработку инсулина. У пациентов с

бактериологически подтвержденным диагнозом коклюша проверяли иммунный ответ на различные антигены *B. pertussis* в парных сыворотках. Наиболее выраженной, особенно у детей до 1 года, была реакция на КТ [9–11]. В экспериментах на мышах показана протективная роль КТ. После аэрозольного заражения у животных вырабатывались антитела класса G 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 гемагглютинину* (ФГА) [12]. С КТ связывают тяжесть заболевания и системные проявления при коклюше. Однако в ряде исследований указывается на присутствие практически всех симптомов коклюша у больных паракоклюшем, при котором токсин не вырабатывается (отсутствие продукции токсина для исключения смешанной инфекции проверялось в эксперименте); единственным отличием является отсутствие лейкоцитоза при паракоклюше [13]. В геноме каждую субъединицу токсина кодирует отдельный ген. Субъединицы S2 и S3 гомологичны на 70% по аминокислотному составу и на 75% по составу нуклеотидов [14]. Экспрессия генов (как и других генов, кодирующих факторы вирулентности *B. pertussis*) регулируется двухкомпонентной сигнальной системой BvgAS. BvgA является транскрипционным активатором участков генома, кодирующих КТ и ФГА [15]. Субъединицы синтезируются по отдельности, накапливаются в периплазме клетки, где и соединяются в токсин. При изучении штамма-мутанта с включением транспозона Tn5 в ген S3 оказалось, что остальные субъединицы продуцировались и накапливались в клетке, но не объединялись в токсин и не покидали клетку. Экспрессия токсина у этого штамма не была выявлена [16].

Филаментозный гемагглютинин. ФГА является поверхностным белком, который участвует в адгезии микроорганизма. Адгезия осуществляется с помощью лектиноподобных участков, взаимодействующих с сульфатированными сахарами поверхностных гликоконъюгатов, и *арг-гли-асп* последовательности, которая распознает находящиеся на поверхности клеток человека белки-рецепторы из семейства интегринов. В экспериментах на животных ФГА не проявляет токсичности, при активной иммунизации мышей защищает их от последующего инфицирования [17]. В исследованиях уровень антител к ФГА у иммунизированных школьников коррелировал со степенью защищенности их от

коклюша [18]. Экспрессия гена, кодирующего ФГА, регулируется BvgAS системой [15].

Агглютиногены и фимбрии. Агглютиногены являются поверхностными белками, которые стимулируют синтез антител, связывающихся с бактериальными клетками, что приводит к агглютинации. Всего у бордетелл выделено 16 агглютиногенов, из них 7-й является общим для всего рода *Bordetella*, а 1-й – основным для *B. pertussis*. В зависимости от наличия 2-го и 3-го агглютиногена выделяют 4 серотипа *B. pertussis*: 2,0; 0,3; 2,3; 0,0. Кроме того, у *B. pertussis* выделяют также 4-, 5-, 6-, 13-, 15- и 16-й агглютиногены. Общеизвестным агглютиногеном для *B. bronchiseptica* является 12-й, для *B. parapertussis* – 14-й. Агглютиногены 8-, 9- и 10-й – общие для *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis*, 11-й встречается только у *B. bronchiseptica*.

Агглютиногены тесно связаны с белками таких образований, как фимбрии (Fim) [19]. Существует несколько типов фимбриальных белков: Fim2, Fim3, FimX. Серотипирование *B. pertussis* основано на реакции агглютинации бактериальных клеток с моноклональными антителами к белкам фимбрий. Выделены эпитопы белков Fim2 и Fim3, которые ответственны за связывание антител, при этом максимальная активность иммуноглобулинов А и G связана с разными эпитопами [20]. Фимбрии состоят из большой (Fim2 или Fim3) и малой субъединицы (FimD). Малая субъединица связывается с рецептором V1a-5 (интегрином), находящимся на поверхности моноцитов. Посредством большой субъединицы фимбрии *B. pertussis* связываются с сульфатированными сахарами, в том числе с хондроитинсульфатом, гепарансульфатом и декстрансульфатом, имеющимися на поверхности эпителия во всех отделах дыхательных путей человека [21]. Сравнительный анализ гепаринсвязывающего участка Fim2 и гомологичных участков Fim3 и FimX показал, что они совпадают по основным аминокислотам и тирозину. Основные участки, ответственные за связывание с гепарином, которые обнаружены в Fim2, входят в состав эпитопов, распознаваемых антителами человека и, следовательно, расположены на поверхности фимбрий и являются иммунодоминантными. Фимбрии *B. pertussis* обладают низкой перекрестной серологической реактивностью. В связи с этим различия в первичной структуре гепаринсвязывающих участков фимбриальных белков Fim2, Fim3 и FimX могут влиять на связывание с антителами, но не с гепарином, позволяя микроорганизму избежать воздействия антител за счет переключения экспрессии фимбриального гена [22]. В эксперименте на мышах показано, что иммунизация белками фимбрий 2-го и 3-го типа за-

щищала мышей от последующего аэрозольного заражения *B. pertussis* и в значительно меньшей степени – от инфицирования *B. parapertussis*, что свидетельствует о различиях антигенного состава фимбрий этих двух видов бордетелл [23].

Аденилатциклазный гемолизин. Аденилатциклазный гемолизин представляет собой токсин, который обладает АДФ-рибозилирующей активностью и катализирует синтез цАМФ, что приводит к накоплению последнего в клетке и нарушению ее функций. Состоит из аденилатциклазного участка (N-конец), ответственного за инвазию в клетки (фагоциты) и расположенного на C-конце гемолизина, содержащего длинные богатые глицином повторы. Этот токсин является незаменимым фактором патогенности, действующим на начальных этапах развития инфекции. Протективные свойства аденилатциклазного гемолизина связаны с его C-концевым участком [24]. При интраназальном заражении мышей штаммом, выделенным из легких инфицированных животных (но не штаммом, полученным путем субкультивирования на питательных средах), отмечалось накопление нейтрофилов в жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже, и снижение количества альвеолярных макрофагов в результате их апоптоза. При этом указанные явления были значительно меньше выражены у мышей, инфицированных штаммом-мутантом со сниженной экспрессией аденилатциклазного гемолизина, что подчеркивает ключевую роль токсина в этом процессе [25].

Белки наружной мембраны. Белок наружной мембраны **пертактин** (69 кДа), относится к генетически контролируемой системе адгезинов, продуцируемых бактерией при попадании в организм человека. Подобно ФГА, адгезия осуществляется за счет различных механизмов: лектиноподобных сайтов, взаимодействующих с поверхностными гликоконъюгатами, и *arg-glu-asp* последовательности, которая распознает находящиеся на поверхности клеток человека белки-рецепторы из семейства интегринов [17]. При иммунизации мышей очищенным пертактином и последующем аэрозольном заражении их *B. pertussis* этот белок защищал их от инфекции. Так, при введении 1 мкг пертактина выживало 50% мышей, у 38% наблюдался выраженный лейкоцитоз; при введении 16 мкг выживало 100%, выраженного лейкоцитоза не наблюдалось ни у одной мыши. В сыворотке крови и лаважной жидкости мышей определялись IgG к пертактину. Пассивная иммунизация (введение IgG к пертактину) также оказалась эффективной, при этом иммуноглобулины проникали из крови в легкие [26]. Это позволило предположить, что защита от инфекции

связана с наличием в легких специфических антигенов.

В экспериментах у бордетелл также обнаружен белок, сходный с пертактином (гомология 29%) и участвующий в адгезии и инвазии микроорганизма. Этот белок получил название **BrkA** (*Bordetella resistance to killing*) и кодируется одноименным локусом (*brk*). Предполагается, что он отвечает за устойчивость микроорганизма к классическому комплемент-зависимому пути элиминации антигенов. Гомологичный белок продуцируется *B. bronchiseptica*, однако он не связан с таким свойством, как устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови [27]. Штамм-мутант *B. pertussis* с включением транспозона Tn5 lac в область генома, кодирующую BrkA, обладает сниженной вирулентностью и в 10 раз более чувствителен к воздействию системы комплемента, чем дикие штаммы. Исследования показали, что штаммы с мутациями в других bvg-регулируемых участках генома, кодирующих КТ, аденилатциклазный гемолизин, ФГА, дермонекротоксин, фактор колонизации трахеи, белок Vag8 (95 кДа), не становятся более чувствительными к воздействию системы комплемента [28].

Другой 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 [29].

К другим белкам, вероятно также являющимся факторами патогенности бордетелл, относятся белки наружной мембраны, имеющие молекулярную массу 92, 30 и 32 кДа. N-концевые последовательности белков 30 и 32 кДа гомологичны C-концевому участку P93-предшественника пертактина. При определенных условиях очищенный белок 32 кДа защищает мышей от интрацеребрального заражения *B. pertussis*. Белок 92 кДа становится протективным в присутствии небольшого (непротективного) количества КТ. Также было обнаружено, что степень защиты при интрацеребральном заражении коррелирует с соотношением – белок 92 кДа/белок 138 кДа (порин) входящих в состав комплекса белков наружной мембраны [30].

Кроме того, у бордетелл выделен белок **Vag8** с молекулярной массой 95 кДа, относящийся к числу bvg-регулируемых белков [31].

Липополисахарид. 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, но сохраняет противовирусную

активность, адьювантные свойства и обеспечивает неспецифическую защиту от некоторых видов бактерий. В целом, липополисахарид обладает иммуногенностью; с ним также связывают реактогенность цельноклеточной коклюшной вакцины [32].

Трахеальный цитотоксин. Представляет собой фрагмент пептидогликана клеточной стенки. Относится к семейству мурамилпептидов и обладает различными биологическими свойствами: пирогенность, адьювантность, артритогенность. Индуцирует медленноволновой сон и стимулирует продукцию IL-1, в ответ на который синтезируется оксид азота, являющийся цитотоксическим фактором. *In vitro* токсин повреждает эпителиальные клетки трахеи и вызывает цилиостаз. При этом нарушается мукоцилиарный клиренс и создаются условия для персистенции инфекции. Важное значение имеет трахеальный цитотоксин, вырабатываемый *B. bronchiseptica*, так как он приводит к развитию у свиней атрофического ринита. Несмотря на то, что цитотоксин *B. bronchiseptica* вызывает лишь легкую атрофию слизистой, однако цилиостаз и скопление слизи в полости носа создают условия для колонизации токсигенной *Pasteurella multocida*, вызывающей у животных тяжелое прогрессирующее заболевание [33].

Дермoneкротизирующий токсин. Обладает сосудосуживающей активностью, у экспериментальных животных снижает прирост массы тела, вызывает атрофию селезенки, ишемию или некроз участков кожи. Его роль в развитии заболевания остается неясной. Генетический анализ показал гомологичность дермoneкротоксина *B. pertussis* и цитотоксического некротизирующего фактора 1 (CNF1), продуцируемого *E. coli*.

Все вышеперечисленные факторы патогенности присутствуют у свежeweделенных штаммов коклюшной палочки. Однако при хранении на искусственных питательных средах проявляется изменчивость возбудителя. Р. Leslie и А. Gardner установили, что коклюшная палочка проходит 4 фазы в процессе сапрофитизации. Свежeweделенный микроб (гладкий штамм), обладающий высокой вирулентностью и иммуногенностью, относится к I фазе. По мере перехода к IV фазе иммуногенность и вирулентность постепенно утрачиваются, меняются культуральные и биологические свойства.

В действии BvgAS-сенсорной системы выделяют две фазы: Bvg⁺, характеризующаяся экспрессией адгезинов и токсинов, и Bvg⁻, характеризующаяся экспрессией *vrg*-локусов у *B. pertussis* и экспрессией фенотипических признаков, сочетающихся с подвижностью *B. bronchiseptica*. В эксперименте по аэрозольному заражению мышей штаммами-мутан-

тами *B. pertussis* выявлено, что Bvg⁺-фаза является необходимым условием инфицирования мышей, в то время как экспрессия Bvg⁻-фенотипа снижает эффективность колонизации [34, 35]. Показано существование как минимум 22 белков, репрессируемых bvg-системой, количество которых значительно возрастает в авирулентной фазе. Два из них определены как поверхностные белки: первый экспрессируется только *B. pertussis*, второй присутствует у *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*, но экспрессируется на очень низком уровне, не регулируемом bvg-системой [36]. Изучение подобных репрессируемых белков и генов, кодирующих эти белки, поможет выяснить физиологическую роль такой модуляции.

Продукция антигенов и их выделение микробной клеткой определяются фазой роста, в которой находится микроорганизм. В эксперименте определяли количество КТ, вырабатываемого культурой *Bordetella pertussis* в жидкой среде. Так, при исследовании в лаг- и лог-фазе токсин не определялся, в фазе стационарного максимума его количество резко нарастало, а затем быстро снижалось [16]. При определении количества свободных и связанных с клеткой антигенов КТ и пертактин в начальной фазе роста уже определялись в надосадочной жидкости, тогда как ФГА и белок 92 кДа обнаруживались в небольшом количестве. При этом по мере роста количество связанного с клеткой ФГА прогрессивно уменьшалось, что свидетельствовало о высвобождении его из клетки; концентрация в клетке белка 92 кДа наоборот – увеличивалась [37].

В целом, антигенный состав бордетелл имеет много общего и прежде всего это касается *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*. Сравнительный иммуноэлектрофорез с 28 видами бактерий продемонстрировал, что из 44 выделенных антигенов *B. pertussis* [38] только два давали перекрестную реакцию с представителями других родов, в основном с грамотрицательными бактериями, в то время как у *B. parapertussis* перекрестные реакции наблюдались с 40 антигенами, а у *B. bronchiseptica* – с 42 антигенами. Всего один антиген оказался видоспецифическим [39]. У *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis* обнаружены белки, сходные по молекулярной массе с пертактином, но подобный белок у *B. bronchiseptica* имеет другую изоэлектрическую точку [40]. Между ними существует и высокая степень генетического родства. Гены, подобные гену КТ, обнаружены в геноме *B. parapertussis* (гомологичность 98,5%) и *B. bronchiseptica* (гомологичность 96%) [41, 42]. Большая часть мутаций является общей для *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis*, 50% из них затрагивают область промотора, большинство мутаций

не влияет на функцию, но ген *S2* у *B. parapertussis* содержит стоп-кодон. *S1*-субъединица всех 3 видов экспрессируется также *E. coli* и проявляет АДФ-рибозилирующую активность [41]. Все три микроорганизма имеют ген *vag8*, кодирующий белок 95 кДа [31]; *brk*-последовательности [28] и гомологичные гены, кодирующие аденилатциклазный гемолизин и порин. Однако при сравнении гена, кодирующего этот токсин, у *B. parapertussis* и *B. pertussis* обнаружено 70 мутаций [41]. На основе этого анализа построено филогенетическое дерево рода *Bordetella*, где показано, что расхождение ветвей *B. pertussis* и общей ветви *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* произошло уже давно, в то время как возбудители бронхисептикоза и паракоклюша более близки генетически. В эксперименте *in vivo* доказано, что иммунизация мышей коклюшной вакциной или отдельными антигенами возбудителя коклюша защищает их от аэрозольного заражения паракоклюшем лишь в очень небольшой степени. И наоборот, иммунизация антигенами паракоклюшной палочки защищает мышей от паракоклюша, но не защищает их от коклюша [23, 43].

Патогенез коклюша

В патогенезе коклюша выделяют три стадии:

I стадия – адгезия. В ней участвуют КТ, ФГА, фимбрии, пертактин и фактор колонизации трахеи. Предполагается, что эти адгезины последовательно или одновременно действуют в процессе всего развития заболевания.

II стадия – локальное повреждение. После адгезии и размножения в месте входных ворот *B. pertussis* начинает продуцировать различные токсины. К основным факторам патогенности, действующим на этой стадии, относятся *трахеальный цитотоксин*, вызывающий цилиостаз и нарушающий отток слизи (способствуя тем самым развитию инфекции) и аденилатциклазный гемолизин, который нарушает функцию эпителиальных и фагоцитирующих клеток дыхательных путей. КТ оказывает непосредственное повреждающее действие на ткани, однако до конца его роль остается неизученной.

III стадия – стадия системных проявлений. В этой стадии возбудитель редко обнаруживается в клиническом материале, а ведущая роль в патогенезе отводится КТ. Однако, как уже указывалось выше, это положение подвергается сомнению.

Необходимо отметить, что в нескольких исследованиях бордетеллы были выделены также из крови пациентов, а у *B. pertussis* была обнаружена способность выживать в эпителиальных клетках и фагоцитах. Это может изменить представление о бордетеллах как неинвазивных микроорганизмах со

средством к реснитчатому эпителию [44, 45]. Так, например, описан случай развития тяжелой энцефалопатии при заболевании коклюшем у 7-летней не привитой девочки. Определяли соотношение общего уровня IgG в спинномозговой жидкости и сыворотке крови, а также такое же соотношение для антител к КТ и ФГА. Соотношение уровней противокклюшных антител (к КТ и ФГА) в ликворе и сыворотке крови оказалось выше общего уровня IgG в 11 и 9 раз соответственно [46]. Это наблюдение также ставит под сомнение сложившееся представление о патогенезе коклюша.

Лабораторная диагностика коклюша

Методы определения возбудителя и его антигенов

Среди методов выявления возбудителя коклюша основным был и остается *бактериологический*. Материалом для исследования служит слизь из верхних дыхательных путей. Впервые J. Bordet и O. Gengou выделили бордетеллу путем посева мокроты, собранной в конце приступа спазматического кашля. Позднее Шиевиц и Мейер предложили использовать метод «кашлевых пластинок», для выполнения которого, однако, приходилось ждать приступа кашля [1]. Для устранения этого неудобства были предложены методы активного забора материала через нижние носовые ходы или через рот с использованием заднеглоточного тампона.

J. Bordet и O. Gengou выделили культуру на картофельно-глицериновом агаре с добавлением 50% свежей крови (в последующем количество крови сократили до 20%). Затем была предложена другая среда – молочно-красный агар, обеспечивавший хорошие результаты, но также требовавший добавления большого количества крови. В то же время для производства вакцин требовалось выращивание возбудителя на средах, не содержащих чужеродного белка. По этим причинам исследования шли в направлении использования полусинтетических сред без добавления крови или с добавлением минимального ее количества. Другие работы были направлены на устранение действия ингибиторов роста коклюшной палочки (ненасыщенных жирных кислот), что достигалось добавлением в среду активированного угля [47]. Для устранения роста контаминационной посторонней микрофлоры в питательную среду стали добавлять пенициллин [1].

В России материал берется с помощью заднеглоточного тампона через рот [48], в других странах – носоглоточным тампоном. Последний метод считается технически более легким и сопровождается меньшим риском контаминации материала [49]. За-

тем производят либо прямой посев на чашку с питательной средой, либо используют транспортные среды (в России не применяют). При транспортировке используют: если менее 2 ч – среду, содержащую 1% казеиновой кислоты; если в течение первых суток – угольную среду без крови или бульон Steiner-Scholte с циклодекстрином. При необходимости транспортировки в течение более одних суток используется угольно-кровяной агар [49]. Сравнение режимов транспортировки показало, что оптимальная температура составляет 4 °С; при температуре 35 °С возможна инкубация в транспортной среде (50% угольно-кровяной агар) в течение 1–2 сут, что по мнению ряда исследователей, улучшает ростовые свойства культуры. Транспортировка при температуре 25 °С существенно снижает процент положительных результатов культурального исследования [50].

Основной питательной средой для выделения бордетелл остается угольно-кровяной агар (среда Regan–Lowe) [47, 48]. Такие работы были проведены в НИИ прикладной микробиологии (Оболensk, Россия). Полученная в этом институте среда на основе казеиново-угольного агара позволила существенно повысить эффективность метода, при этом стало возможным добавлять минимальное количество крови [51, 52]. Оптимальным считается добавление в среду лошадиной или бараньей крови; использование человеческой крови дает худшие результаты [53]. Возможно добавление вместо крови или в дополнение к ней сыворотки крупного рогатого скота (5%) и среды № 199 (1%) [52].

В качестве ингибитора сопутствующей микрофлоры в России используется бензилпенициллин. Однако часть штаммов возбудителя коклюша чувствительна к пенициллину, в связи с чем использование этого антибиотика снижает процент положительных проб [52]. Для предотвращения отрицательного влияния пенициллина на бордетелл в некоторых лабораториях используют уменьшенную дозу антибиотика (0,1 мл рабочего разведения на 100 мл среды вместо 0,3 мл) [52]. В зарубежной практике для этих целей используется цефалексин (40 мг на 1 л среды), а иногда и амфотерицин В (50 мг на 1 л среды) – для подавления грибковой флоры [49]. В отличие от пенициллина, цефалексин не подавляет рост *B. pertussis* и *B. parapertussis* и более активен в отношении сопутствующей микрофлоры [49, 52].

Инкубация осуществляется при температуре 35 °С, без добавления CO₂, в условиях повышенной влажности [50]. Иногда продолжают использовать среду Борде–Жангу, получая практически те же результаты, что и при использовании среды

Regan–Lowe (угольно-кровяной агар) [47]. В целом, эффективность бактериологического метода, в идеале составляющая 80%, на практике оказывается гораздо ниже – 10–20% [54]. Это связано с особенностями возбудителя, его медленным ростом, контаминацией исследуемого материала, недостаточной кратностью обследования, неправильным забором материала, поздним обследованием больных, низким качеством питательных сред. Существенно снижает результативность обследования предшествующая антибактериальная терапия.

Следует отметить снижение внимания врачей к работе в очагах инфекции. При проведении целенаправленных исследований в каком-либо очаге выявляемость возбудителя не только культуральным, но и другими методами существенно возрастает [55]. Это связано с тем, что на фоне массовой иммунизации значительная часть заболеваний протекает бессимптомно или с минимальными клиническими проявлениями, особенно у детей 4–6 лет, имеющих достаточно высокий уровень поствакцинального иммунитета [56]. Это подтверждается результатами совместного исследования, проведенного в Финляндии и Швейцарии. В Швейцарии заболеваемость коклюшем среди детей 1–6 лет выше, чем в Финляндии, где график иммунизации предполагает введение бустерной дозы вакцины в возрасте 2 лет. При этом в Финляндии бессимптомные случаи инфекции наиболее часто встречаются у детей до 7 лет [57]. Существует, по видимому, и здоровое носительство. Практически не диагностируется коклюш у взрослых, что, вероятно, связано со стертой клиникой и отсутствием лейкоцитоза [58], а также отношением врачей к коклюшу как к исключительно детской инфекции. Проведенное в Японии исследование показало, что в семейных очагах коклюша в 11% случаев источником инфекции был взрослый; у 61,3% взрослых с клиническими проявлениями коклюша диагноз подтвердился при бактериологическом или серологическом обследовании. Из обследованных взрослых без симптомов коклюша у 25% была выявлена субклиническая форма инфекции [58].

Другим методом выделения возбудителя коклюша является **иммунофлюоресцентный**, описанный применительно к данной инфекции в 1960 г. P. Donaldson и J. Whitaker. При наличии качественных реактивов и квалифицированного персонала чувствительность метода составляет 60%, специфичность – 90% [49]. Однако при нарушении данных условий эти показатели резко снижаются, поэтому метод используется только в качестве дополнительного. Повышение его специфичности может быть достигнуто использованием моноклональных

антител, в частности к липополисахариду коклюшной палочки [59, 60].

Блот-ELISA представляет собой исследование визуально определяемых колоний *B. pertussis* с использованием моноклональных антител к ФГА и липополисахариду [61]. Чашки с первичным посевом инкубируются при обычных условиях в течение 40 ч, затем на них помещаются нитроцеллюлозные диски, и инкубация осуществляется еще в течение 10 мин при температуре 22°C. Диски снимаются с чашек, обрабатываются лизирующим раствором, инкубируются с моноклональными антителами, затем с субстратом. В результате удается выявить единичные колонии *B. pertussis*. Перекрестных реакций с представителями других родов не отмечено. С помощью антител к ФГА выявлялись также такие возбудители, как *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*; антитела к липополисахариду давали единичные перекрестные реакции с другими бордетеллами. В настоящее время широкого распространения этот метод не получил.

Современным и перспективным методом диагностики является **полимеразная цепная реакция (ПЦР)**. После предварительной экстракции ДНК проводят амплификацию необходимого фрагмента гена микроорганизма с последующей детекцией амплифицированного участка. Применение ПЦР для идентификации *B. pertussis* описано S. Houard и соавт. [62]. Чувствительность метода составляет несколько бактерий в образце, а специфичность приближается к 100% [63]. Срок получения результата – в течение одного дня. Положительные результаты культурального исследования подтверждаются соответствующими результатами ПЦР в 73–100% случаев, при отрицательных результатах посева ПЦР оказывается положительной в 71% случаев. В 6–11% случаев получают положительные результаты ПЦР при отрицательных результатах бактериологического исследования и иммуноферментного анализа [64].

В настоящее время разработаны тест-системы для идентификации различных участков генома *B. pertussis*: гена КТ [62], порина, аденилатциклазного гемолизина [65], повторяющегося участка ДНК [62, 66]. Все участки, за исключением последнего, встречаются и в геноме *B. parapertussis* [67]. Повторяющиеся участки ДНК обнаружены также и в геноме *B. bronchiseptica* [66], однако из-за низкой распространенности этого вида возбудителя у человека это не имеет принципиального значения для исследования. Выбор в качестве объекта поиска повторяющегося участка ДНК предпочтительнее также в связи с тем, что повышает чувствительность метода при меньшем количестве циклов амплификации. Это, в свою очередь, снижает вероятность получе-

ния ложноположительных результатов. Для повышения чувствительности и специфичности метода используют метод ПЦР с вложенными праймерами (nested-PCR), в котором после 20–25 циклов с внешними праймерами проводится 25–30 циклов с внутренними праймерами [63]. Также предложен протокол для параллельного определения *B. pertussis* и *B. parapertussis* [68]. Для этого используются праймеры к повторяющимся последовательностям в геноме *B. pertussis* (80 копий) и *B. parapertussis* (20 копий). Для исключения влияния большого числа копий участка ДНК *B. pertussis* на чувствительность реакции с ДНК *B. parapertussis* предложено использовать праймеры в соотношении, обратно пропорциональном количеству копий в ДНК, то есть 4:1 [69]. Забор материала осуществляется носоглоточными тампонами или путем аспирации слизи из носоглотки. Получены данные о том, что использование тампонов из альгината кальция и транспортировка материала в транспортной среде резко снижают эффективность метода, что связано с наличием факторов, ингибирующих ПЦР [70]. В связи с этим рекомендовано использовать тампоны типа Dacron и «сухую» транспортировку, а еще более предпочтительно получать материал из носоглотки путем аспирации. Для визуализации результата исследования используют окрашивание в агарозном геле, блот-гибридизацию [69]. Для исключения ложноположительных результатов необходим набор отдельных помещений: для выделения ДНК, собственно амплификации и детекции результатов. Иногда в состав реакционной смеси дополнительно вносят дУТФ и урацил-N-гликозилазу с целью предотвращения получения ложноположительных результатов вследствие контаминирования продуктами ПЦР [71]. В качестве одного из возможных методов контроля ложноотрицательных результатов вследствие ингибирования или деградации ДНК может использоваться параллельная амплификация ДНК человека из исследуемых клинических образцов. В этом случае результат амплификации ДНК *B. pertussis* учитывается как истинно отрицательный только при обнаружении положительной реакции на ДНК человека [67]. Другим методом контроля ложноотрицательных результатов является ко-амплификация так называемого гетерогенного внутреннего стандарта – искусственно созданной и добавляемой в реакцию последовательности ДНК, амплификация которой происходит только при наличии двух праймеров: одного для ДНК *B. pertussis*, другого – для ДНК *B. parapertussis* (контроль работы праймеров) [67, 69].

Выявление антигенов *B. pertussis* в клиническом материале можно проводить с помощью **иммуно-**

ферментного анализа (ИФА). Одним из вариантов этого метода исследования является определение КТ. Для этого разработана «сэндвич»-техника ИФА с применением очищенных аффинных антител к КТ [72]. Носоглоточный тампон после посева на казеиново-угольный агар погружают в пробирки с жидкой средой (среда обогащения), затем полученный материал исследуют ИФА. Чувствительность метода составляет 3 нг/мл. Специфичность оценивалась в реакции с дифтерийным и столбнячным токсином – перекрестных реакций не было. Диагностическая эффективность сравнивалась с эффективностью бактериологического метода на 247 пациентах. При культуральном исследовании положительные результаты были получены в 14,6% случаев, при проведении ИФА – в 42,9% случаев. В зависимости от выраженности клинических проявлений инфекции эффективность ИФА варьировала от 36,6% у контактных лиц и до 69,7% – у больных с бактериологически подтвержденным диагнозом. В то же время при посеве клинического материала от лиц, контактировавших с больными, и пациентов с подозрением на коклюш количество положительных результатов оказалось очень низким и составило 5%. При выборочном исследовании с помощью ИФА первичного клинического материала совпадение результатов этого метода и бактериологического исследования составило 100%.

Серологические методы

Серологические методы лабораторной диагностики коклюша основываются на определении уровня специфических антител к определенным антигенам или группам антигенов коклюшной палочки. Классическим методом серологической диагностики коклюша, применяемым уже более 50 лет, является **реакция агглютинации**. Она позволяет обнаружить антитела, индуцированные агглютиногенами возбудителей, находящихся в I фазе. Эта реакция длительное время использовалась для оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета [73]. Ее результаты коррелируют с данными определения концентрации IgG и IgA методом ИФА при титрах антител выше 1:320 [74]. Недостатками реакции являются низкая чувствительность и отсутствие стандартизированной методики.

Для проведения **реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)** обработанные эритроциты животных сенсibilизируются комплексом антигенов коклюшной палочки. Эта реакция характеризуется более высокой чувствительностью, чем реакция агглютинации. Однако в процессе создания диагностикумов использовались различные методы сенсibilизации и стабилизации эритроцитов, а получение ад-

сорбируемого антигена (целые клетки возбудителя или клеточные компоненты) проводилось различными способами, что привело к различной информативности получаемых данных [75]. В связи с этим РНГА не нашла широкого применения на практике.

Одной из модификаций реакции агглютинации является реакция **латекс-микроагглютинации** [75]. Принцип метода состоит в следующем: полистироловый латекс сенсibilизируют компонентами клеток коклюшной палочки и на стеклянной пластине смешивают с двукратно разведенным исследуемым субстратом. Результаты учитывают после окрашивания. Эта реакция отличается легкостью интерпретации результатов и позволяет выявить противокклюшные антитела на ранних сроках заболевания. Тем не менее в связи с использованием в качестве антигена продуктов распада клеток возбудителя, данный метод может давать ложноположительные результаты.

Реакция нейтрализации цитопатогенного действия КТ в культуре клеток яичников китайских хомячков основана на регистрации морфологических изменений клеточного монослоя, вызываемых токсином и блокируемых токсин-нейтрализующими антителами [76]. Стандартизация условий реакции позволила сделать ее высокоспецифичной и добиться высокой воспроизводимости результатов. Она позволяет провести количественное определение КТ и токсин-нейтрализующих антител. Однако этот метод очень трудоемок, поэтому в основном используется при проведении научных исследований и не имеет широкого распространения в практике.

Иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления антител к коклюшной палочке получил широкое распространение в 1980-е годы. Полученные результаты свидетельствовали о несомненных преимуществах этого метода по сравнению с реакцией агглютинации [77]. Для проведения ИФА использовались целые бактериальные клетки [78], комплексы антигенов [10] или частично очищенные отдельные антигены возбудителя. Однако ряд антигенов *B. pertussis* являются перекрестно реагирующими с антигенами других грамотрицательных бактерий, а при высокой чувствительности метода вероятность перекрестных реакций значительно возрастает. Более того, адсорбция антигенов из комплекса антигенов на поверхности планшет зависит от свойств самих антигенов и материала, из которого изготовлены планшеты.

Принципиально новым этапом разработки тест-систем для ИФА стало использование очищенных антигенов микроорганизма [10, 11]. В связи с этим возникла необходимость решить вопрос о диагностической ценности различных антигенов. В исследе-

дованиях сравнивали иммунный ответ на введение целых микробных клеток, очищенного КТ, ФГА, пертактина и комплекса этих антигенов [10]. Чувствительность метода при использовании различных антигенов составила 54% для целых клеток, 85% – для ФГА, 92% – для КТ, 62% – для пертактина и 85% – для комплекса, состоящего из 3 из указанных антигенов (приведены суммарные данные при использовании IgG, IgA и IgM). Сравнение иммунного ответа при исследовании парных сывороток от пациентов разных возрастных групп с бактериологически подтвержденным диагнозом выявило максимальный процент сероконверсии и положительных результатов в первой сыворотке в реакции с КТ; при этом самая высокая частота сероконверсии определялась у пациентов в возрасте до 3 месяцев и старше 15 лет [11]. Однако нельзя не учитывать, что на фоне массовой иммунизации у детей может быть повышен уровень IgG к КТ. В связи с этим положительным результатом может считаться либо высокий уровень IgG (при сравнении с уровнем IgG в контрольных сыворотках здоровых детей данного возраста), либо выраженная сероконверсия (повышение уровня иммуноглобулинов при повторном исследовании не менее чем на 20 МЕ или в 8 раз) [11, 79]. M. Viljanen и соавт. показали, что определение сывороточных IgM и IgA (в качестве антигена использовались целые клетки) с помощью ИФА может применяться для экспресс-диагностики коклюша, особенно его атипичных форм, при которых результаты культурального исследования, как правило, бывают отрицательными без исследования парных сывороток [78]. При использовании очищенных антигенов наиболее адекватным серологическим исследованием является определение уровня IgG и IgA к ФГА и IgG к КТ [9]. Учитывая, что формирование противокклюшного иммунитета происходит на местном и системном уровнях, было высказано предположение о важной роли sIgA в этом процессе [75]. Было установлено, что при искусственной иммунизации не происходит повышения уровня sIgA, поэтому выявление его в слизи носоглотки может свидетельствовать в пользу заболевания, в том числе при наличии отрицательного результата бактериологического исследования. При проведении ИФА с очищенными антигенами sIgA к ФГА были выявлены в секрете слизистой носоглотки в 70% случаев, к КТ – в 54% [80].

Литература

1. Иоффе В.И., Осипова П.В., Склярова Н.Н., Козлова Н.А. Коклюш (микробиология, иммунология, специфическая профилактика). М.: Медицина; 1964.

Сравнивая диагностическую эффективность ИФА, бактериологического метода и ПЦР [79, 81], используемых во многих странах в качестве методов рутинной диагностики коклюша, необходимо отметить, что ИФА становится результативным только к 4-й неделе заболевания [82]. В связи с этим при наличии типичных клинических проявлений ИФА позволяет только подтвердить диагноз, в то время как при стертых и атипичных формах инфекции этот метод может оказаться решающим в выявлении заболевания. Эффективность ИФА варьирует в широких пределах: от 23% при скрининговом обследовании детей в школах, детских садах и центрах здоровья во время вспышки коклюша [82] до 68% – при целенаправленном обследовании больных с подозрением на коклюш [79]. При обследовании пациентов со спазматическим кашлем бактериологическим методом и методом ПЦР наибольшая частота положительных результатов отмечена в первые недели заболевания с максимумом на 2-й неделе (32 и 46% соответственно), а методом ИФА – на 6-й неделе и более (54%); общее количество подтвержденных случаев заболевания в этом исследовании составило 47% от числа обследованных [82]. В другом исследовании при культуральном и серологическом исследовании материала, полученного от детей с инфекциями дыхательных путей, положительные результаты хотя бы одного теста наблюдались в 37% случаев, из них только в 26% они были подтверждены бактериологическим методом и в 87% – серологическими [83]. В связи с этим для оптимальной лабораторной диагностики коклюша у детей должны использоваться одновременно два метода исследования: посев материала из носоглотки и определение уровня антител класса G, A, M к двум токсинам (КТ и ФГА) [83].

Таким образом, на современном этапе диагностика коклюша в нашей стране и за рубежом остается недостаточно эффективной, особенно на ранних сроках заболевания, и требует совершенствования и стандартизации. В последние годы достигнуты определенные успехи в повышении диагностической ценности бактериологического метода. Тем не менее для практического здравоохранения требуются более чувствительные, высокоспецифичные и легко воспроизводимые методы лабораторной диагностики.

- Porter J.F., Connor K., Donachie W. Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology* 1994;140:255-61.
- Cookson B.T., Vandamme P., Carlson L.C., et al. Bacte-

- remia caused by a novel *Bordetella* species, «*Bordetella hinzii*». J Clin Microbiol 1994;32:2569-71.
4. Weyant R.S., Hollis D.G., Weaver R.E., et al. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. J Clin Microbiol 1995;33:1-7.
 5. Tang Y.W., Hopkins M.K., Kolbert C.P., et al. *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis and respiratory failure. Clin Infect Dis 1998;26:389-92.
 6. Porter J.F., Wardlaw A.C. Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lake water and in buffered saline without added nutrients. FEMS Microbiol Lett 1993;110:33-6.
 7. Hsia J.A., Moss J., Hewlett E.L., Vaughan M. ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin: effects on inhibitory agonist binding. J Biol Chem 1984;259:1086-90.
 8. Tamura M., Nogimori L., Murai S., et al. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with A-B model. Biochemistry 1982;21:5516-22.
 9. Granstrom G., Wretling B., Salenstedt C.R., Granstrom M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. J Clin Microbiol 1988;26:1818-23.
 10. He Q., Mertsola J., Himanen J.C., et al. Evaluation of pooled and individual components of *B. pertussis* as antigens in an enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12:690-5.
 11. Mertsola J., Ruuskanen O., Kuronen T., et al. Serologic diagnosis of pertussis: evaluation of pertussis toxin and other antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. J Infect Dis 1990;161:966-71.
 12. Redhead K., Watkins J., Barnard A., Mills K.H.G. Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. Infect Immun 1993;61:3190-8.
 13. Von Konig C.H., Finger H. Role of pertussis toxin in causing symptoms of parapertussis infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:455-8.
 14. Loch C., Keith J.M. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. Science 1986; 232:1258-64.
 15. Boucher P.E., Murakami K., Ishinama A., Stibitz S. Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the FHA promoter. J Bacteriol 1997;179 (Pt 5):1755-63.
 16. Nicosia A., Rappuoli R. Promoter of the pertussis toxin operon and production of pertussis toxin. J Bacteriol 1987;169:2843-6.
 17. Brennan M.J., Shahin R.D. Pertussis antigens that abrogate bacterial adherence and elicit immunity. Am J Respir Crit Care Med 1996;154 (4 Pt 2):S145-9.
 18. He Q., Viljanen M.K., Olander R.M., et al. Antibodies to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* and protection against whooping cough in school children. J Infect Dis 1994;170:705-8.
 19. Preston N.W., Matthews R.C. Components of acellular pertussis vaccines. Lancet 1996;347:764.
 20. Williamson P., Matthews R. Epitope mapping the Fim2 and Fim3 proteins of *Bordetella pertussis* with sera from patients infected with or vaccinated against whooping cough. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 13:169-78.
 21. Geuijen C.A., Willems R.J., Mooi F.R. The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. Infect Immun 1996;64:2657-65.
 22. Geuijen C.A., Willems R.J., Hoogerhout P. Identification and characterisation of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1998;66:2256-63.
 23. Willems R.J., Kamerbeek J., Geuijen C.A., et al. The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections in a respiratory mouse model. Vaccine 1998;16:410-6.
 24. Betsou F., Sebo P., Guiso N. The C-terminal domain is essential for protective activity of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. Infect Immun 1995; 63:3309-15.
 25. Gueirard P., Druilhe A., Pretolani M., Guiso N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. Infect Immun 1998;66:1718-25.
 26. Shahin R.D., Brennan M.J., Li Z.M., et al. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. J Exp Med 1990;171:63-73.
 27. Rambow A.A., Fernandez R.C., Weiss A.A. Characterization of Brk A expression in *Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun 1998;66:3978-80.
 28. Fernandez R.C., Weiss A.A. Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. FEMS Microbiol Lett 1998;163:57-63.
 29. Fernandez R.C., Weiss A.A. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. Infect Immun 1994;62:4727-38.
 30. Hamstra H.J., Kuipers B., Schijf-Evers D., et al. The purification and protective capacity of *Bordetella pertussis* outer membrane proteins. Vaccine 1995;13 (Pt 8): 747-52.
 31. Finn T.M., Amsbaugh D.E. Vag-8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. Infect Immun 1998;66:3985-9.
 32. Ayme G., Caroff M., Chaby R., et al. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. Infect Immun 1980;49:739-45.
 33. Parton R. New perspectives on *Bordetella pathogenicity*. J Med Microbiol 1996;44:233-5.
 34. Merkel T.J., Stibitz S., Keith J.M., et al. Contribution of regulation by the bvg locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1998; 66:4367-73.
 35. De Tejada M.G., Cotter P.A., Heininger U., et al. Neither the Bvg- phase nor the vrg 6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. Infect Immun 1998;66:2762-8.
 36. Stenson T.H., Pepler M.S. Identification of two bvg-repressed surface proteins of *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1995;63:3780-9.
 37. Westdijk J., van den Ijssel J., Thalen M., et al. Quantification of cell-associated and free antigens in *Bordetella*

- pertussis* suspensions by antigen binding ELISA. J Immunoassay 1997;18:267-84.
38. Hoiby N., Hertz J.B., Andersen V., Baekgaard P. Crossed immunoelectrophoretic analysis of *Bordetella pertussis* antigens and of corresponding antibodies in human sera. Acta Pathol Microbiol Scand 1976;84B:386-94.
 39. Hoiby N., Hertz J.B., Andersen V. Cross-reactions between *Bordetella pertussis* and 28 other bacterial species. Acta Pathol Microbiol Scand 84B:395-400.
 40. Pagliaccia C., Manetti R., Rappuoli R. Pertactin antigens extracted from *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* differ in the isoelectric point. Arch Microbiol 1997;168 (Pt 5):437-40.
 41. Arico B., Rappuoli R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. J Bacteriol 1987;169:2847-53.
 42. Marchitto K.S., Smith S.G., Loch C., Keith J.M. Nucleotide sequence homology to pertussis toxin gene in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. Infect Immun 1987;55:497-501.
 43. Khelef N., Danve B., Quentin-Millet M.J., Guiso N. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species. Infect Immun 1993; 61:486-90.
 44. Ewanovich C.A., Melton A.R., Weiss A.A., Pepler M.S. Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1989;57:2698-704.
 45. Friedman R.L., Nordensson K., Wilson L., et al. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. Infect Immun 1992;60:4578-85.
 46. Grant C.C., McKey E.J., Simpson A., Buckley D. Pertussis encephalopathy with high cerebrospinal fluid antibody titers to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin. Pediatrics 1998;102 (4 Pt 1):986-90.
 47. Regan J., Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. J Clin Microbiol 1977;6:303-9.
 48. Министерство здравоохранения СССР. Инструкция по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше. Москва; 1984.
 49. Gilchrist M.J.R. *Bordetella*. In: Balows A., Hansler W.J., Herrmann K.L., Isenberg H.D., Shadomy H.J., editors. Manual of clinical microbiology. 5th ed. Washington: ASM Press; 1991. p. 471-7.
 50. Morrill W.E., Barbaree J.M., Fields B.S., et al. Effects of transport temperature and medium on recovery of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs. J Clin Microbiol 1988;26:1814-7.
 51. Степаншина В.Н., Алексеева Л.Н., Коробова О.В., и соавт. Взаимосвязь состава питательных сред с ростовыми и биологическими свойствами *B. pertussis*. Журн микробиол эпидемиол иммунол 1994;6:26-7.
 52. Зверякина Н.Н., Ценева Г.Я., Курова Н.Н., и соавт. К вопросу о повышении эффективности бактериологического метода диагностики коклюшной инфекции. Клиническая лабораторная диагностика [в печати].
 53. Норпе J.E., Schlagenhauf M. Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of *Bordetella pertussis* on charcoal agar. J Clin Microbiol 1989;27:2115-7.
 54. Onorato I.M., Wassilak S.G.K. Laboratory diagnosis of pertussis: the state of the art. Pediatr Infect Dis J 1987;6:145-51.
 55. Попова О.П., Селезнева Т.С., Милюкова В.И. Клинико-эпидемиологические аспекты коклюшной инфекции в современных условиях. Эпидемиология и инфекционные болезни 1999;(2):63-4.
 56. He Q., Viljanen M.K., Nikkari S., et al. Outcomes of *Bordetella pertussis* infection in different age groups of an immunized population. J Infect Dis 1994;170:873-7.
 57. He Q., Schmidt-Schlapfer G., Just M., et al. Impact of polymerase chain reaction on clinical pertussis research: Finnish and Swiss experiences. J Infect Dis 1996; 174:1288-95.
 58. Aoyama T., Takeuchi Y., Goto A., et al. Pertussis in adults. Am J Dis Child 1992;146:163-6.
 59. Свиридов В.В., Селезнева Т.С., Буркин М.А., и соавт. Бактериологическая диагностика коклюша с использованием моноклональных антител. Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов; 28-31 января 1997; Москва, Россия. М.: 1997. с. 492-3.
 60. Le Blay K., Caroff M., Blandiard F., et al. Epitopes of *Bordetella pertussis* LPS as potential markers for typing of isolates with monoklonal antibodies. Microbiology 1996;142 (Pt 4):971-8.
 61. Gustafsson B., Askelof P. Rapid detection of *Bordetella pertussis* by a monoclonal antibody-based colony blot assay. J Clin Microbiol 1989;27:628-31.
 62. Houard S., Hackel C., Herzog A., Bollen A. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the p.c.r. Res Microbiol 1989;140:477-87.
 63. He Q., Mertsola J., Soini H., Viljanen M.K. Sensitive and specific polymerase chain reaction for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal specimens. J Pediatr 1994;124 (Pt 6):421-6.
 64. Reizenstein E. Diagnostic polymerase chain reaction. Dev Biol Stand 1997;89:247-54.
 65. Douglas E., Coote J.G., Parton R., McPheat W. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. J Med Microbiol 1993;38:140-4.
 66. Glare E.M., Paton J.C., Premier R.R., et al. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the PCR. J Clin Microbiol 1990;28:1982-7.
 67. Meade B.D., Bollen A. Recommendations for use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of *Bordetella pertussis* infections [report of a round-table meeting held in Rexensart, Belgium, on 12 May 1993]. J Med Microbiol 1994;41:51-5.
 68. Lind-Brandberg L., Welinder-Olsson C., Lagergard T., et al. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. J Clin Microbiol 1998;36:679-83.
 69. Van der Zee A., Agterberg C., Peeters M., et al. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. J Clin Microbiol 1993;31:2134-40.

70. Wadowsky R.M., Laus S., Libert T., et al. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a NF swab. *J Clin Microbiol* 1994;32:1054-7.
71. Pang J., Modlin J., Yolken R. Use of modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UNG) for the control of contamination in the PCR-based amplification of RNA. *Mol Cell Probes* 1992;6:251-6.
72. Кириллова Г.А., Сухинова Е.Е., Шмелева Е.И., и соавт. Опыт применения иммуноферментного анализа для диагностики коклюша. *Журн микробиол эпидемиол иммунол* 1994;6:83-4.
73. Машков А.В., Михайлова З.М., Дядюнова И.В. Ответные реакции организма ребенка на антиген коклюшного микроба при инфекции и вакцинации. В кн.: Проблемы коклюша. М.; 1961. с. 57-62.
74. Галазка А. Иммунологические основы иммунизации. Модуль 4. Коклюш. ВОЗ, Женева; 1993.
75. Ларшутин С.А., Смирнов В.Д., Сюндюкова Р.А., Провсиркина Т.Д. Лабораторная диагностика коклюша. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 1998; (4):50-2.
76. Hewlett E.L., Sauer K.T., Myers G.A., et al. Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect Immun* 1983;40:1198-230.
77. Mertsola J., Ruuskanen O., Kuronen T., Viljanen M.K. Serological diagnosis of pertussis: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and bacterial agglutination. *J Infect Dis* 1983;147:252-7.
78. Viljanen M.K., Ruuskanen O., Granberg C., Salmi T.T. Serological diagnosis of pertussis: IgM, IgA and IgG antibodies against *Bordetella pertussis* measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Scand J Infect Dis* 1982;14:117-22.
79. Van der Zee A., Agterberg C., Peeters M., et al. A clinical validation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* polymerase chain reaction: comparison with culture and serology using samples from patients with suspected whooping cough from a highly immunized population. *J Infect Dis* 1996;174:89-96.
80. Granstrom G., Askelof P., Granstrom M. Specific immunoglobulin A to *Bordetella pertussis* antigens in mucosal secretion for rapid diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;26:869-74.
81. He Q., Mertsola J., Soini H., et al. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:642-5.
82. He Q. Diagnosis of *Bordetella pertussis* infection and investigation of pertussis immunity by PCR and EIA serology [dissertation]. Turku; 1994.
83. Halperin S.A., Bortolussi R., Wort A.J. Evaluation of culture, immunofluorescence and serology for the diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 1989;27:752-7.