

Aktualizovaná doporučení pro laboratorní diagnostiku pertuse a parapertuse

Updated guidelines for the laboratory diagnosis of pertussis and parapertussis

Kateřina Fabiánová, Jana Zavadilová

Souhrn • Summary

Pertuse je vysoce nakažlivé onemocnění závažné svým průběhem zejména pro novorozence a kojence do jednoho roku života. Z epidemiologického hlediska je proto nutným požadavkem rychlé a správné stanovení diagnózy a následná cílená antibiotická terapie osob s pertusí. Spolu s očkováním adolescentů a dospělých proti pertusi tak lze snížit cirkulaci původce onemocnění *Bordetella pertussis* v populaci na minimum.

Skupina reprezentující dvanáct evropských referenčních laboratoří „EU Pertstrain Group“ na základě mnoha studií doporučuje změnit přístup k laboratorní diagnostice pertuse a uvádí ve svých závěrech zásadní pravidla pro sérologickou diagnostiku pertuse.

Pertussis is a highly infectious disease that can have a severe course, particularly in newborns and infants under one year of age. From the epidemiological perspective, there is a need for a rapid and accurate diagnosis of pertussis and subsequent targeted antibiotic therapy. Vaccination of adolescents and adults against pertussis is another step in minimizing the circulation of the causative agent Bordetella pertussis.

Based on multiple studies, the EU Pertstrain Group representative of 12 European reference laboratories recommends that the approach to the laboratory diagnosis of pertussis should be revised and summarizes the basic rules of the serological diagnosis of pertussis.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2011; 20(4): 142–144.

Klíčová slova: pertuse, laboratorní diagnostika, ELISA, pertusový toxin, PCR

Keywords: pertussis, laboratory diagnosis, ELISA, pertussis toxin, PCR

V dnešní dobře proočkované populaci se typický klinický obraz pertuse mění a často může být protražovaný kašel dětí, adolescentů a dospělých jediným symptomem onemocnění. Původcem lidského onemocnění pertusí je bakterie *Bordetella pertussis*; spolu s bakterií *Bordetella parapertussis*, *B. bronchiseptica* a *B. holmesii* patří mezi původce dávivého kašle (whooping cough).

Z epidemiologického hlediska je důležité co nejrychlejší stanovení diagnózy, aby byl nemocný a případně jeho kontakty cíleně a včas přeléčeni antibiotiky, aby se předešlo dalšímu šíření onemocnění na vnímavé osoby.

Laboratorní diagnostika pertuse se opírá o přímý průkaz (kultivace a izolace agens a PCR detekce – polymerázová řetězová reakce) a nepřímý průkaz (sérologie, průkaz specifických protilátek). Podrobné informace nutné k diagnostice onemocnění byly publikovány v tomto časopise a lze je nalézt na webových stránkách SZÚ [1].

K diagnostikování pertuse je dostupná celá řada sérologických metod. Podle posledních studií většina komerčně vyráběných testů nedává validní výsledky díky zkříženým reakcím a nedostatečné senzitivitě a specifitě. Specifické pro *B. pertussis* jsou pouze protilátky proti pertusovému toxinu (PT). Protilátky proti dalším antigenům FHA (filamentózní hemaglutinin), PRN (pertaktin), FIM (fimbrie), ACT (adenylátcyklázový toxin) jsou méně specifické – existuje možnost zkřížené reaktivity, nejčastěji

s antigeny *B. parapertussis*, *Haemophilus* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*.

Z nedávno publikovaných závěrů skupiny reprezentující dvanáct evropských referenčních laboratoří „EU Pertstrain Group“ [2] vyplývají **důležitá a zásadní pravidla pro sérologickou diagnostiku pertuse:**

- Pro ELISA testy (enzyme-linked immunosorbent assay) používat jako antigen pouze vysoce purifikovaný nedetoxifikovaný pertusový toxin.
- Nejlepší senzitivita a specifita je dosažena stanovením IgG protilátek proti PT [3].
- Stanovení hladiny protilátek třídy IgA anti PT používat pouze tehdy, pokud je stanovení IgG anti PT nejasné nebo pokud není možné získat druhý vzorek séra.
- Nepoužívat ostatní pertusové antigeny k rutinní diagnostice (nejsou dostatečně specifické).
- Nedoporučuje se používání ELISA kitů s více pertusovými antigeny.
- Nepoužívat následující laboratorní metody:
 - mikroaglutinaci (pro nedostatečnou senzitivitu)
 - imunoblot
 - KFR (komplement fixační reakce)
 - nepřímou imunofluorescenci.
- Zatím nelze odlišit imunitní odpověď organismu na očkování od imunitní odpovědi na probíhající infekci; interpretace hladin protilátek proti PT u nedávno očkovaných osob je obtížná.
- Pokud byl tedy pacient očkovan acetulární (aP) vakcínou proti pertusi, je správná a validní interpretace sérologických testů možná teprve až za rok po očkování aP vakcínou.

Tabulka 1: ELISA kity pouze s PT, ČR

Výrobce	Název kitu	Antigen	Dodavatel	Katalogové číslo	Cena v Kč
Euroimmun	Bordetella pertussis toxin IgG	PT	Dynex	EI 2050-9601-G	4 370.-
	Bordetella pertussis toxin IgA	PT	Dynex	EI 2050-9601-A	4 370.-
Virion/Serion	Bordetella pertussis toxin IgG	PT	BioVendor	ESR1201G	5 916.-
Genzyme Virotech	Bordetella pertussis toxin IgG	PT	Biomedica ČS	EC 215 G 00	4 952.-
	Bordetella pertussis toxin IgA	PT	Biomedica ČS	EC 215 A 00	4 952.-
	Bordetella pertussis toxin IgM	PT	Biomedica ČS	EC 215 M 00	4 952.-

Cena je bez DPH, aktuální ke květnu 2011.

Tabulka 2: Komerčně dostupné RT PCR kity pro diagnostiku pertuse/parapertuse v ČR

Výrobce	Název kitu	Sekvence	Dodavatel	Katalogové číslo	Cena v Kč
Argene	Bordetella parapertussis 60 testů	IS 1001	Medisco Praha	71-012	21 200.-
Argene	Bordetella kit 60 testů	IS 481	Medisco Praha	69-011B	25 500.-
Shanghai ZJ Bio-Tech	Pertussis Real Time PCR kit 25 testů	IS 481	Gali s.r.o.	RD-0061-01/ RD-006-02 *)	9 280.-

*) Liší se podle typu RT Cycleru:

RD-0061-01 je vhodný pro LightCycler, LightCycler 2.0,

RD-0061-02 je vhodný pro PE5700, MJ-Opticon, ABI7000, ABI7300, ABI7900, ABI StepOne, StepOne plus, MJ-Opticon 2, MJ-chromo4, MX3000P, MX3005P, Smart CyclerII, Rotor-Gene6000, LightCyclerR480, iCycler iQ4, iCycler iQ5

Doporučení pro odběry vzorků na vyšetření u suspekt-ních případů:

- U novorozenců a malých dětí by měly být provedeny odběry nazofaryngeálních vzorků (výtěr a/nebo aspirát) na PCR a/nebo na kultivaci co nejdříve po začátku symptomů.
- U očkovaných dětí a dospělých, pokud kašel trvá méně než dva týdny, lze provést odběr z nazofaryngu na PCR a kultivaci.
- Stanovení protilátek třídy IgG anti PT (proti pertusovému toxinu) má význam pro starší děti a dospělé, včetně rodičů a členů domácnosti.
- U kašle trvajících dva až tři týdny není stanovení IgG anti PT pouze z jednoho vzorku dostatečné.
- U adolescentů a dospělých s dobou trvání kašle nad tři týdny je doporučeno provést PCR a stanovení IgG anti PT.

Pro přehlednost uvádíme ELISA kity pouze s PT, které jsou komerčně dostupné v České republice. (Tabulka 1)

Pro úplnost uvádíme také **doporučení evropských referenčních laboratoří „EU Pertstrain Group“ k interpretaci výsledků RT PCR diagnostiky** (Pertussis Work Area 4, EUVAC.NET, Kodaň listopad 2010, Berlín únor 2011)

Pro RT PCR diagnostiku pertuse se nejčastěji používají sekvence IS 481 a ptxP (promotor PT). Insertní sekvence IS 481 není 100 % specifická pro *B. pertussis*, vyskytuje se i u *B. holmesii* a *B. bronchiseptica*. Sekvence ptxP je specifická pro *B. pertussis*, ale má nižší senzitivitu.

Pro diagnostiku parapertuse se používá sekvence IS 1001, která je pro *B. parapertussis* specifická.

Interpretace výsledků RT PCR [4, 5, 6]

- IS 481 pozitivní a ptxP pozitivní: infekce způsobená *B. pertussis*.
- Pouze IS 481 pozitivní: uzavřít jako infekce způsobená *Bordetella spp.* (pokud není možnost ověřit pozitivitu ptxP).
- IS 1001 pozitivní: infekce způsobená *B. parapertussis*.

Závěr

Většina případů pertuse v ČR nahlášená do EPIDATu v posledních letech je diagnostikována sérologicky. Počet hlášených kultivačních a PCR vyšetření a pozitivních záchytů je minimální.

Sérologická diagnostika pertuse provedená podle „EU case definic“ znamená: „průkaz specifické protilátkové odpovědi“ (tzn. k sérologickému vyšetření se odebírají dva vzorky krve v odstupu tří týdnů, první by měl být odebrán co nejdříve v akutním stádiu onemocnění, druhý zhruba za 3 týdny – potvrzením diagnózy je signifikantní čtyřnásobný vzestup titrů specifických protilátek, případně sérokonverze z negativity do pozitivity. IgG anti PT dosahují svého vrcholu asi za 4,5 týdne po onemocnění. Pokud pacient kašle delší dobu a první vzorek se tedy odebírá až v pozdější fázi onemocnění a druhý v rekonvalescenci, je možné brát signifikantní (čtyřnásobný) pokles titrů specifických protilátek za diagnostický průkaz.

Stanovení definitivní diagnózy je velmi opožděné a obvykle pak zastihne pacienta až ve fázi rekonvalescence.

Laboratorní diagnostika při podezření na pertusi musí směřovat k rychlému určení původce onemocnění; tedy na prvním místě k PCR diagnostice a ke kultivaci. Sérolo-

gie u pertuse by měla být používána především jako metoda konfirmační.

Vzhledem k vysokému počtu sérologických vyšetření v ČR to znamená změnit přístup odborné a laické veřejnosti k onemocnění. Lékaři musí u pacienta s kašlem zajistit správné odběry co nejdříve. Veřejnost je třeba soustavně informovat o onemocnění, o jeho symptomech a závažnosti při kontaktu s malými dětmi. Návštěva lékaře by neměla být odkládána, zejména pokud je kašlající osoba v blízkém kontaktu s dosud neočkovanými nebo neúplně očkovanými dětmi.

LITERATURA

1. Zavadilová J, Fabiánová K, Maixnerová M. Doporučení pro laboratorní diagnostiku dávivého kašle. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha)*, 2009; 18(1): 24–25. Dostupné: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/18_2009/1 leden/24_pertuse.pdf
2. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann, Von König CHW. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011; 30(3): 307–312.
3. Watanabe M, Connelly B, Weiss AA. Characterization of serological responses to pertussis. *Clin. Vaccine Immunol*, 2006; 13(3): 341–348.
4. Reischl U, Lehn N, Sanden G, Loeffelholz M. Real-Time PCR Assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(5): 1963–1966.
5. Riffelmann M, Von König CHW, Caro V, Guiso N. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(10): 4925–4929.
6. Caro V, Guiso N, Alberti C, Liquori C, Burucoa C, et al. Proficiency program for Real-Time PCR diagnosis of *Bordetella pertussis* infections in French hospital laboratories and at the French national reference center for whooping cough and other Bordetellosis. *J Clin Microbiol*, 2009; 47(10): 3197–3203.

MUDr. Kateřina Fabiánová
Oddělení epidemiologie infekčních nemocí
CEM, SZÚ

Mgr. Jana Zavadilová
Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz
Vedoucí NRL pro pertusi a difterii
CEM, SZÚ