

Zpráva o činnosti NRL pro pertusi a difterii za rok 2013

2013 report of the National Reference Laboratory for Pertussis and Diphtheria

Jana Zavadilová, Daniela Lžičarová, Kateřina Fabiánová, Bohumír Kríž

Souhrn

Článek informuje o metodách používaných v Národní referenční laboratoři pro pertusi a difterii, o počtech vyšetření provedených v roce 2013; upozorňuje na případy záchytu netoxigenních kmenů *Corynebacterium diphtheriae* a *Corynebacterium ulcerans* z klinického materiálu.

The article provides information about the methods used in the National Reference Laboratory for Pertussis and Diphtheria and the number of tests performed in 2013. It draws attention to the detection of non-toxicogenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* from clinical specimens.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2014; 23(5): 174–175.

Klíčová slova: *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans*, pertuse, difterie, laboratorní diagnostika
Keywords: *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans*, pertussis, diphtheria, laboratory diagnosis

Dávivý kašel

Dávivý kašel se v Národní referenční laboratoři pro pertusi a difterii (NRL) diagnostikuje průkazem původce (*Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*) metodou kultivace, průkazem DNA metodou Real-Time PCR a sérologicky.

Živé bakterie a DNA se prokazují v klinických vzorcích (výtěr z nosofaryngu) odebraných v odběrové místnosti v areálu SZÚ nebo zaslaných z terénu. Sérotypizace izolátů *B. pertussis* pro určení typu fimbrií se provádí sklíčkovou aglutinací s použitím monoklonálních protilátek *Monoclonal Antibody for Serotyping Bordetella pertussis Fimbrial Antigen 3 (1st WHO IS)* a *Monoclonal Antibody for Serotyping Bordetella pertussis Fimbrial Antigen 2 (1st WHO IS)*. V rámci grantového projektu Interní grantové agentury MZ ČR „Studium a porovnání kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v období 1964–2015 molekulárně biologickými metodami a aplikace získaných výsledků jako podkladů pro návrh aktualizace vakcinační strategie v ČR“ se provádí molekulární typizace získaných izolátů.

Sérologický průkaz pertuse se v NRL provádí metodou ELISA z párových vzorků sér, hodnotí se dynamika koncentrace IgG protilátek proti pertusovému toxinu, sérologický průkaz parapertuse pak metodou aglutinace, hodnotí se dynamika titru protilátek proti antigenům *Bordetella parapertussis*. Laboratoř vyšetřuje jak vzorky odeslané terénními laboratořemi ke konfirmaci, tak vzorky zaslané k primárnímu vyšetření.

V roce 2013 bylo vyšetřeno kultivačně 80 vzorků odebraných z nosohltanu. Jedenkrát byla potvrzena přítomnost *B. pertussis*, sérotyp Fim 2 a jedenkrát *B. parapertussis*.

V klinických vzorcích, pro které je požadována PCR diagnostika pertuse, vždy detekujeme nejprve inzerční sek-

venci 481 (IS481), v případě pozitivitu doplníme testování promotoru genu kódujícího A podjednotku pertusového toxinu (PtxA-pr). V případě negativitu IS481 přikročíme k detekci PtxA-pr vždy, jde-li o pacienty v kojeneckém věku, selektivně pak i u starších pacientů dle klinických a epidemiologických okolností. Inzerční sekvenci 1001 (IS1001) detekujeme ve vzorcích, pro které zadavatel požaduje PCR diagnostiku parapertuse.

Metodou Real-Time PCR bylo vyšetřeno 34 vzorků odebraných z nosohltanu, z toho 11 bylo od dětí do 1 roku věku. 7 vzorků bylo pozitivních s nálezem *B. pertussis* a 2 vzorky byly uzavřeny jako pozitivní s průkazem DNA *Bordetella* spp. Z těchto pozitivních záchytů se 6 týkalo neočkovaných dětí do 1 roku věku.

Ke konfirmaci bylo v roce 2013 do NRL zasláno 7 kmenů: 1 kmen *Bordetella parapertussis* k potvrzení identifikace z České národní sbírky typových kultur SZÚ a 6 kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v terénních laboratořích. Čtyři kmeny *B. pertussis* měly sérotyp Fim 3, dva kmeny *B. pertussis* Fim 2.

Počet kmenů odeslaných ke konfirmaci je malý ve srovnání s 1233 případy pertuse hlášenými v roce 2013. V terénu podle epidemiologických dat [Fabiánová K. et al. 2014] stále převládá sérologická diagnostika. Rádi bychom proto povzbudili k četnějšímu uplatnění kultivačního průkazu pertuse/parapertuse, který je vhodný zvláště u dětí a kontaktů. Podrobný návod je možné najít na webových stránkách NRL na odkoku doporučené postupy (<http://www.szu.cz/metody-nrl-pro-pertusi-a-difterii>).

V této souvislosti připomínáme vyhlášku Ministerstva zdravotnictví ČR č. 473/2008 Sb., O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce ve znění pozdějších předpisů, přílohu č. 3 „Systém epidemiologické bdělosti dávivého kašle, článek 2 Laboratorní diagnostika, bod 7, ze kterého vyplývá pro laboratoře povinnost každý izolovaný kmen *B. pertussis* a *B. parapertussis* zaslat do NRL pro pertusi a difterii. Odkaz na plné znění této vyhlášky je i na webových stránkách NRL (<http://www.szu.cz/tema/prevence/surveillance-pertuse-1?highlightWords=pertuse>).

Sérologicky bylo v roce 2013 vyšetřeno 337 vzorků. Pertuse byla prokázána ve 41 případech, parapertuse v 5 případech. Vybraná séra byla zařazena do sbírky NRL.

Záškrť

Záškrť se v NRL diagnostikuje průkazem původce, tzn. jednoho ze tří známých potenciálně toxigenních druhů rodu *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*) produkujícího difterický toxin. NRL provádí identifikaci (druh, biotyp) na základě fenotypových znaků (morfologie kolonií, růst na diagnostických půdách, mikroskopický obraz, biochemické testy, MALDI-TOF). Přítomnost *tox* genu odpovídajícího za produkci difterického toxinu se detekuje metodou Real-Time PCR. Produkce toxinu se stanovuje metabolicko-inhibičním kolorimetrickým testem na tkáňových kulturách.

Koncentrace difterických antitoxických protilátek v lidském séru se v NRL stanovuje metabolicko-inhibičním kolorimetrickým testem na tkáňových kulturách.

Do laboratoře byly v roce 2013 poslány ke confirmaci a stanovení produkce difterického toxinu 4 kmeny *Corynebacterium diphtheriae* a 1 kmen *Corynebacterium ulcerans*. U 1 z kmenů *Corynebacterium diphtheriae* a u kmene *Corynebacterium ulcerans* byl prokázán *tox* gen metodou Real-Time PCR. Produkce toxinu u těchto kmenů nebyla testem na tkáňových kulturách prokázána.

Přestože u žádného z kmenů nebyla prokázána produkce difterického toxinu, je třeba věnovat pozornost všem izolátům *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* a *Corynebacterium pseudotuberculosis* vzhledem k možnosti přenosu *tox* genu (kódovaného v genomu beta fágu) z toxigenních kmenů na kmeny netoxigenní. Při mikroskopickém nálezu koryneformních tyčinek v chronických defektech je třeba mít na paměti, že nemusí nutně jít o kontaminující kožní komenzály, a zvážit provedení druhové identifikace.

Dva netoxigenní kmeny *C. diphtheriae* byly zaslány k potvrzení identifikace a stanovení produkce toxinu Českou národní sbírkou typových kultur SZÚ.

V roce 2013 bylo vyšetřeno 152 vzorků sér imunokompromitovaných pacientů, cestovatelů, či jiných osob zajímajících se o stav protilátek proti difterii.

Druhová identifikace ostatních druhů korynebakterií

Druhová identifikace se provádí obdobně jako u potenciálně toxigenních druhů korynebakterií, pouze s využitím rozšířené škály testů. Do NRL bylo v loňském roce zasláno k identifikaci a/nebo confirmaci 19 zástupců rodu *Corynebacterium* izolovaných převážně z ran a hemokultur.

NRL pro pertusi a difterii se v roce 2013 úspěšně účastnila mezinárodních externích hodnocení kvality (EQA): EQA for *Bordetella* identification and *B. pertussis* typing a EQA for the laboratory diagnosis of diphtheria.

Autoři děkují všem laboratořím, které do NRL posílají materiál ke confirmaci a kmeny k dalšímu dourčení a uvítají spolupráci s dalšími laboratořemi.

LITERATURA

Fabiánová K, Beneš Č, Šebestová H, Kříž B. Pertuse v České republice v roce 2013 – rozbor epidemiologické situace, *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*, 2014; 23(3):97–104.

Mgr. Jana Zavadilová
MUDr. Daniela Lžičářová
Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz

MUDr. Kateřina Fabiánová
MUDr. Bohumír Kříž
Oddělení epidemiologie infekčních nemocí
CEM, SZÚ Praha