

INFORMACE Z NRL A ODBORNÝCH PRACOVÍŠŤ CEM

INFORMATION FROM THE NRL AND RESEARCH GROUPS OF THE CEM

Doporučení pro laboratorní diagnostiku pertuse a parapertuse

Guidelines on laboratory diagnosis of pertussis and parapertussis

Jana Zavadilová, Kateřina Fabiánová

Souhrn

Pertuse je vysoce nakažlivé onemocnění závažné svým průběhem zejména pro novorozence a kojence do jednoho roku života. Z epidemiologického hlediska je proto nezbytným požadavkem rychlé a správné stanovení diagnózy. Článek shrnuje aktualizovaná doporučení pro laboratorní diagnostiku onemocnění pertuse a parapertuse.

Pertussis is a highly contagious disease that can have a severe course particularly in newborns and infants under one year of age. From the epidemiological perspective, rapid and accurate diagnosis is crucial. The article summarizes the updated recommendations for laboratory diagnosis of pertussis and parapertussis.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2014; 23(9): 318–320.

Klíčová slova: pertuse, parapertuse, laboratorní diagnostika, PCR, kultivace, sérologický průkaz
Keywords: pertussis, parapertussis, laboratory diagnosis, PCR, culture, serological detection

Úvod

V roce 2014 významně narostl počet hlášených případů pertuse v České republice. Případy onemocnění jsou hlášeny ze všech věkových skupin. V populaci, která je očkováná proti pertusi, se může klinický „učebnicový“ obraz pertuse měnit. Jediným symptomem onemocnění často bývá pouze protrahovaný kašel dětí, adolescentů nebo dospělých. Vzhledem k vysoké nakažlivosti onemocnění je z epidemiologického hlediska velmi důležité co nejrychleji stanovit diagnózu, aby byli nemocní a případně jejich kontakty cíleně a včas léčeni antibiotiky a předešlo se tak šíření onemocnění na další vnímavé osoby.

Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika pertuse/parapertuse se opírá o přímý průkaz patogenních agens *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis*, tedy kultivaci a izolaci agens a DNA PCR detekci – polymerázová řetězová reakce, a o průkaz nepřímý – stanovení specifických protilátek. Podrobné informace k diagnostice onemocnění lze nalézt na webových stránkách Národní referenční laboratoře pro pertusi a difterii (NRL/DiPe), odkaz Doporučené postupy (<http://www.szu.cz/metody-nrl-pro-pertusi-a-difterii>).

1. Kultivace („zlatý standard“)

Odběr – výtěr/nebo aspirát z nosohltanu: Na počátku onemocnění, nejlépe do 2 týdnů trvání příznaků (kašel), před zahájením ATB léčby, ráno nalačno, nekouřit, nečistit si zuby, nežvýkat žvýkačku!

Odběrová souprava: Tampon ze syntetické bavlny na drátku s transportním médiem – Amies s aktivním uhlím. Pro poskytnutí odběrové soupravy kontaktujte spolupracující mikrobiologickou laboratoř nebo NRL/DiPe.

Technika odběru: Před odběrem je vhodné se pacienta dotázat na pocit ucpaného nosu, odebrat z nosního průduchu, který pacient vnímá jako lépe průchodný. Tampon jemně zasunout přes nosní průduch těsně podél nosní přepážky a po spodní stěně nosní dutiny až k zadní stěně nosohltanu (pro představu – délka zasunuté části drátku přibližně odpovídá vzdálenosti nosní křídlo – tragus). Několikrát jemně pootočit a tampon opatrně vytáhnout. U dětí je nutná fixace, odběr je velmi nepřijemný.

Uchovávání a transport materiálu: Při pokojové teplotě, materiál zpracovat v laboratoři v den odběru, optimum do 4 hodin.

Kultivační půdy: Kultivace bordetel se provádí na speciálních půdách. Jako kultivační médium je možné používat pouze uvedené typy agarů, buď Charcoal agar nebo Bordet-Gengou agar:

- Charcoal agar
- Charcoal agar se suplementem (cefalexin, 40 mg/l)
- Bordet-Gengou agar
- Bordet-Gengou agar se suplementem (cefalexin, 40 mg/l)

Půda musí být v misce dostatečně vysoko vylitá, aby během dlouhé doby inkubace nevysychala (výška 7–10 mm). Důležité je také pH půdy, které má být upraveno na 7,4±0,2

Kultivovat je třeba vždy jak na médiu s cefalexinem, tak i na médiu bez cefalexinu, z důvodu možné inhibice růstu některých kmenů na médiu s cefalexinem.

Podmínky kultivace: V normální atmosféře při teplotě 35–36 °C po dobu 7 dnů, denní odečet ploten.

Růst a vzhled kolonií:**Bordet-Gengou agar:**

- *Bordetella pertussis* vyrůstá za 48 hodin, častěji však za 72 hodin v drobných (do 0.5 mm) hladkých, stříbrných koloniích, které se nepohybují při doteku kličkou, ale rozetřou se. Po delší inkubaci se kolonie zvětšují až na 2 mm a je viditelná zóna hemolýzy. Intenzita hemolýzy závisí na množství krve v půdě.
- *Bordetella parapertussis* vyrůstá za 48 hodin, kolonie jsou větší (1–2 mm), šedostříbrné s výraznou zónou hemolýzy a tmavým černohnědým pigmentem v okolí kolonie. Po delší inkubaci kolonie narůstají až do velikosti 3 mm a vypadají jako vpadlé do půdy. Nepohybují se po plotně při doteku kličkou.

Charcoal agar:

- *Bordetella pertussis* vyrůstá za 48 hodin, častěji však za 72 hodin v drobných, hladkých, šedých a velmi lesklých koloniích, které vypadají jako „kapky rosy“.
- *Bordetella parapertussis* vyrůstá za 48 hodin, kolonie jsou podobné druhu *Bordetella pertussis*, ale jsou větší a šedivější. Po delší inkubaci vypadají kolonie jako vpadlé do půdy.

Druhá identifikace: Sklíčkovou aglutinací s diagnostickými séry *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* (výrobce Remel Ltd., dodává OXOID CZ s.r.o.).

Sérotypizace izolátů *B. pertussis* pro určení typu fimbrií: Provádí se v NRL pro pertusi a difterii, sklíčkovou aglutinací s použitím monoklonálních protilátek *Monoclonal Antibody for Serotyping Bordetella pertussis Fimbrial Antigen 2, 1 st WHO IS* (NIBSC, UK) a *Monoclonal Antibody for Serotyping Bordetella pertussis Fimbrial Antigen 3, 1 st WHO IS* (NIBSC, UK) [1].

Ve vyhlášce MZ ČR č. 473/2008 Sb. je stanoveno: „Vyšetřující laboratoř zašle každý izolovaný kmen *B. pertussis* a *B. parapertussis* k ověření do Národní referenční laboratoře pro pertusi a difterii.“ Prosíme tedy všechny kolegy o spolupráci.

2. PCR diagnostika pertuse/parapertuse

Odběr – výtěr/nebo aspirát z nosohltanu: Na počátku onemocnění, nejlépe do 3 týdnů trvání příznaků (kašel), lze i po zahájení ATB léčby, ráno nalačno, nekouřit, nečistit si zuby, nežvýkat žvýkačku! K odběru na PCR vyšetření používat pouze rukavice bez talku!

Odběrová souprava: Nylonový tampón na flexibilní plastové tyčince (bez transportního média) nebo odběrová souprava pro průkaz respiračních virů (s médiem) nebo odběrová souprava s tekutým médiem Eswab. Pro poskytnutí odběrové soupravy kontaktujte spolupracující mikrobiologickou laboratoř nebo NRL/DiPe.

Technika odběru: Před odběrem je vhodné se pacienta dotázat na pocit ucpaného nosu, odebírat z nosního průduchu, který pacient vnímá jako lépe průchodný. Tampon jemně zasunout přes nosní průduch těsně podél nosní přepážky a po spodní stěně nosní dutiny až k zadní stěně nosohltanu (pro představu – délka zasunuté části drátku přibližně

odpovídá vzdálenosti nosní křídlo – tragus). Několikrát jemně pootočit a tampon opatrně vytáhnout. U dětí je nutná fixace, odběr je velmi nepřijemný.

Uchování a transport materiálu: Nylonový tampon bez transportního média se uchovává a přepravuje při pokojové teplotě, pokud je dopraven do laboratoře v den odběru nebo při -20 °C pokud je nutné jej před transportem skladovat. Zpracovat v den dodání do laboratoře nebo zmrazit (-20 °C). Odběrová souprava pro průkaz respiračních virů s transportním médiem se uchovává a přepravuje při teplotě 2–8 °C, pokud je dopraven do laboratoře v den odběru nebo při -20 °C, pokud je nutné jej před transportem skladovat. Zpracovat v den dodání do laboratoře nebo zmrazit (-20 °C).

Detekované sekvence pro druhy *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*:

V klinických vzorcích, pro které je požadována PCR diagnostika pertuse, vždy **detekujeme nejprve IS481, v případě pozitivitu doplníme PtxA-pr.**

- IS481 – je inzertní sekvence přítomná v genomu *Bordetella pertussis* v mnoha kopiích, je tedy detekována s vyšší senzitivitou než PtxA-pr. Vyskytuje se pravidelně v genomu druhů *Bordetella pertussis* a *Bordetella holmesii*, variabilně pak i v genomu *Bordetella bronchiseptica* a *Bordetella parapertussis* v různém počtu kopií, **není tedy specifická pro druh *Bordetella pertussis*.**
- PtxA-pr – promotor genu kódujícího A podjednotku pertusového toxinu, **sekvence je specifická pro druh *Bordetella pertussis***, vyskytuje se v 1 kopii, proto je **detekována s nižší senzitivitou než IS481.** V případě negativity 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.
- IS1001 detekujeme ve vzorcích, pro které je požadována PCR diagnostika parapertuse.

Interpretace výsledků: Rodová a druhová identifikace infekčních agens na základě výsledků testování:

- **IS481 negativní** – Ve vyšetřovaném materiálu neprokázána DNA *Bordetella pertussis*. (V závažných případech: kojenci, nebo kontakt s neočkovanými dětmi vždy nutno testovat i PtxA-pr!)
- **IS481 negativní, PtxA-pr negativní** – Ve vyšetřovaném materiálu neprokázána DNA *Bordetella pertussis*.
- **IS481 pozitivní, PtxA-pr negativní** – Ve vyšetřovaném materiálu prokázána DNA *Bordetella* sp.
- **IS481 negativní, PtxA-pr pozitivní** – Nejednoznačný výsledek. Pokud bude totožný při opakovaném testování, interpretujeme jako „Možná přítomnost DNA kmene *Bordetella pertussis* s netypickými genotypovými vlastnostmi“.
- **IS481 pozitivní, PtxA-pr pozitivní** – Ve vyšetřovaném materiálu prokázána DNA *Bordetella pertussis*.
- **IS1001 pozitivní** – Infekce pravděpodobně způsobená *B. parapertussis*, pokud odpovídají klinická kritéria.

3. Sérologická diagnostika pertuse/parapertuse

Sérologická diagnostika pertuse/parapertuse je založena na vyšetření párových sér. **Pro správnou interpretaci séro-**

logického vyšetření je třeba znát data odběru obou vzorků, datum narození pacienta, vakcinační anamnézu pacienta.

Odběr materiálu: K diagnostice onemocnění pertuse/parapertuse se odebírají dva vzorky srážlivé krve. První vzorek se odebere co nejdříve po vyslovení podezření na onemocnění pertusí/parapertusí, druhý vzorek nejdříve 21 dní po odběru prvního vzorku. U malých dětí se druhý vzorek odebírá za 5 až 6 týdnů.

Párová séra se vždy vyšetřují současně v téže laboratoři. První odebraný vzorek se skladuje při -20 °C až do obdržení druhého vzorku séra.

Uchovávání a transport materiálu: Srážlivá krev pro získání séra – do 24h je možné skladovat při pokojové teplotě, pak je nutno separovat sérum. Vzorky sér jsou uchovávány při teplotě 2–8 °C max. 5 dnů, po delší dobu je nutno je skladovat v mrazicím boxu (-20 °C).

Stanovení IgG protilátek proti pertusovému toxinu: Používáme metodu ELISA s výstupem v mezinárodních jednotkách – IU/ml.

Hodnota protektivní koncentrace IgG protilátek proti PT není stanovena. Vyšetřením jednoho vzorku séra lze zjistit pouze skutečnost, zda pacient přišel do kontaktu s antigennem (PT) *Bordetella pertussis*. 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 očkován acelulární (aP) vakcínou proti pertusi, je správná a validní interpretace sérologických testů možná až za rok po tomto očkování.

Stanovení IgA protilátek anti PT je doporučeno používat pouze tehdy, pokud je stanovení IgG anti PT nejasné nebo pokud není možné získat druhý vzorek séra [2].

Stanovení IgM anti PT není vhodná metoda k průkazu pertuse (není dostatečně specifická).

Interpretace výsledků – stanovení IgG anti PT: Pro potvrzení diagnózy je signifikantní vzestup koncentrace protilátek v séru o 100 % počáteční hodnoty (hodnota naměřená v prvním z párových sér) nebo pokles koncentrace protilátek o 50 % počáteční hodnoty.

Stanovení antiparapertusových protilátek: Používáme aglutinační metodu, výsledek je udáván jako titer protilátek.

Interpretace výsledků – stanovení antiparapertusových protilátek: Pro potvrzení diagnózy je signifikantní čtyřnásobný vzestup nebo pokles titru protilátek v párových vzorcích.

4. Odběry v SZÚ

Možnosti odběru na kultivační/PCR vyšetření přímo v areálu SZÚ při podezření na onemocnění pertusí/parapertusí. Odběry se provádí každé pondělí od 7,30-8,30 (kromě letních prázdnin a státních svátků) v odběrové místnosti v **budově č. 3 v areálu SZÚ, zvonek NRL AIDS, 1. patro, č. dveří 115**. Jiný čas je možný po předchozí dohodě. K odběru je nutná žádanka o vyšetření.

<http://www.szu.cz/odbery-na-kultivacni-a-pcr-vysetreni-pertuse-parapertuse-v-1>

Kontakt:

*NRL pro pertusi a difterii
SZÚ-CEM*

Šrobárova 48, Praha 10

budova č. 2, 1. patro

tel.: 267 08 2242

e-mail: jzavadilova@szu.cz

Závěr

Většina případů pertuse v ČR hlášená do EPIDATu je stále 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“ IgG anti PT dosahují svého vrcholu asi za 4,5 týdne po onemocnění. Pokud pacient kašle delší dobu, první vzorek se odebírá až v pozdější fázi onemocnění a druhý v rekonvalescenci, je možné brát za diagnostický průkaz signifikantní pokles koncentrace specifických protilátek. Definitivní diagnóza stanovená pomocí specifických protilátek je značně opožděná a zastihne pacienta obvykle až ve fázi rekonvalescence.

Vzhledem k velkému počtu vnímavých jedinců v populaci a k snadnému šíření pertuse musí laboratorní diagnostika při podezření na onemocnění směřovat k rychlému určení původce onemocnění; tedy na prvním místě k PCR diagnostice a ke kultivaci. Sérologické vyšetření u pertuse by mělo být používáno především jako metoda konfirmační.

Je velmi důležité změnit přístup odborné a laické veřejnosti k onemocnění pertuse. Lékaři by měli u pacienta s kašlem provést správné odběry na určení původu onemocnění co nejdříve. Veřejnost je třeba soustavně informovat o symptomech onemocnění a závažnosti situace při kontaktu s malými dětmi. Pokud je kašlající osoba v blízkém kontaktu s dosud neočkovanými nebo neúplně očkovanými dětmi návštěva lékaře by neměla být odkládána.

Spolu s očkováním adolescentů a dospělých proti pertusi tak lze snížit cirkulaci původce onemocnění *Bordetella pertussis* v populaci na minimum.

LITERATURA

1. van Gent M, de Greeff SC, van der Heide HG, Mooi FR. An investigation into the cause of the 1983 whooping cough epidemic in the Netherlands. *Vaccine*. 2009; 27(13): 1898-1903.
2. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann M, 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.

Mgr. Jana Zavadilová

NRL pro pertusi a difterii

*Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz
CEM, SZÚ*

MUDr. Kateřina Fabiánová

*Oddělení epidemiologie infekčních nemocí
CEM, SZÚ*