

**Doporučení Státního zdravotního ústavu pro
diagnostiku dávivého kašle, pertuse a parapertuse
v ordinaci
Červen 2022**

Autoři: Fabiánová K.¹, Zavadilová J.²

¹ Oddělení epidemiologie infekčních nemocí, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, SZÚ

² Národní referenční laboratoř pro pertusi a difterii, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, SZÚ

Projednáno a schváleno výborem Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP

červen 2022

Obsah

Úvod.....	3
Kdy pomýšlet na pertusi.....	3
Možnosti laboratorní diagnostiky	3
Kauzální diagnostika pertuse.....	4
1.1 Standardní postupy laboratorní diagnostiky pertuse a parapertuse -podrobně	6
1.2 Kultivace	7
1.2.1 Odběr klinického materiálu na kultivační vyšetření.....	7
1.2.2 Výtěr ze zadní stěny nosohltanu	7
1.2.3 Aspirát	8
1.2.4 Uchovávání a transport klinického materiálu	8
1.2.5 Kultivační půdy	8
1.2.6 Podmínky kultivace a identifikace kultur	8
1.2.7 Druhovká identifikace a antigenní charakterizace	9
1.3 Real-Time PCR	9
1.3.1 Odběr klinického materiálu na RT-PCR vyšetření.....	9
1.3.2 Uchovávání a transport klinického materiálu	10
1.3.3 Detekované sekvence pro RT-PCR.....	10
1.4 Sérologický průkaz pertuse	12
1.4.1 Odběr klinického materiálu na sérologické vyšetření	12
1.4.2 Uchovávání a transport materiálu.....	13
1.4.3 Stanovení protilátek proti pertusovému toxinu.....	13
1.5 Sérologický průkaz parapertuse	13
Použitá literatura:.....	14
Příloha 1.....	16
Příloha 2.....	17
Příloha 3.....	18

Úvod

Pertuse (černý, dávivý kašel) je preventabilní respirační onemocnění způsobené bakterií *Bordetella pertussis* ohrožující zejména novorozence a plně neočkované kojence. Díky pravidelnému očkování sice v minulosti došlo k významné redukci rizika fatální pertuse, ale v posledních desetiletích celosvětově opět počet onemocnění narůstá a maximum nemocnosti se přesouvá do věkových skupin adolescentů a dospělých. Parapertuse je způsobena bakterií *Bordetella parapertussis*, která neprodukuje pertusový toxin zodpovědný za závažné klinické projevy černého kašle, a její průběh bývá mírnější. Přestože se diagnostické možnosti dávivého kašle zlepšují, podhlášenost pertuse je stále značná a hlášené případy onemocnění tvoří jen „špičku ledovce“, pouhých 1-36 % (Miller E. et al., 2000, Strebel P. et al., 2001, Solano R. et al, 2016). Mnoho dospělých lidí s kašlem vyhledá lékaře teprve, když potíže trvají neobvykle dlouho a běžně dostupné léky proti kašli nezabírají. Proto je pertuse u dospělých, ale i u dětí často nediagnostikována nebo považována za jinou infekci horních cest dýchacích, bronchitidu nebo alergii. Navíc, onemocnění vyvolaná jinými druhy bordetel než *B. pertussis* a *B. parapertussis*, např. *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, jsou chybně diagnostikována a rovněž podhlášena vzhledem k tomu, že některé používané diagnostické testy pro PCR diagnostiku testující pouze sekvence IS481 a IS1001 nejsou druhově specifické.

Kdy pomýšlet na pertusi

Diagnózu pertuse je třeba zvážit zejména při klinickém obrazu typických opakovaných záchvatů kašle, které končí zajíknutím, případně zvracením, kdy kašel nereaguje na běžná antitusika a zhoršuje se v noci. U očkovaných osob, adolescentů a dospělých mohou být příznaky onemocnění mírnější, charakterizované pouze dlouhotrvajícím kašlem bez typických záchvatů. U neočkovaných nebo neúplně očkovaných dětí v kojeneckém věku nebývá přítomen výrazný kašel; obvykle se po krátkém katarálním stádiu mohou objevit apnoické pauzy a lapavé dýchání, gasping. Proto by nevysvětlitelné apnoické pauzy u dětí v kojeneckém věku měly vždy vzbudit podezření na diagnózu pertuse. Vždy je nutné se ptát také na očkování, ale ani anamnéza kompletního očkování nevylučuje onemocnění.

Možnosti laboratorní diagnostiky

Rychlá a přesná diagnostika onemocnění pertusí je důležitá pro včasné zahájení správné antibiotické léčby a tím i pro výrazné ovlivnění průběhu celého onemocnění a cirkulaci agens v populaci.

Kauzální diagnostika pertuse

Opírá se o **přímý průkaz** agens, tedy detekci DNA bordetel a kultivační průkaz. Odběry k průkazu DNA bordetel a na kultivační průkaz se provádějí co nejdříve po začátku onemocnění, před zahájením antibiotické léčby, ideálně nejlépe ráno nalačno před napitím nebo 2-3 hodiny po jídle a pití a před ústní hygienou, doporučuje se nekouřit. Odběr se provádí speciálním tampónem přes dutinu nosní ze zadní stěny nazofaryngu.

Nejvhodnější pro kultivační průkaz je nazofaryngeální výtěr odebraný během prvních 2 týdnů kašle, kdy jsou v nosohltanu stále přítomny životaschopné bakterie. Po prvních 2 týdnech citlivost klesá a zvyšuje se riziko falešně negativních výsledků (CDC, Manual, 2020).

Metoda PCR má optimální senzitivitu v prvních třech týdnech onemocnění. DNA lze v nazofaryngeálním výtěru prokázat i po zahájení antibiotické léčby, PCR může být pozitivní 5 až 21 dní, výjimečně i měsíc po zahájení léčby antibiotiky (Riffelmann M. et al., 2005, Bidet P. et al., 2008). Po čtvrtém týdnu kašle se však množství bakteriální DNA v nosohltanu rychle snižuje, což zvyšuje riziko získání falešně negativních výsledků. Výsledky by proto měly být vždy interpretovány spolu s klinickými příznaky pacienta a epidemiologickými informacemi (CDC, Manual, 2020).

Pokud se podaří izolovat od pacienta kmen, má být podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví ČR č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, příloha č. 3, poslán do Národní referenční laboratoře pro pertusi a difterii SZÚ, kde je následně zařazen do sbírky kmenů a slouží zejména pro další sledování charakteristik kmenů bordetel cirkulujících v populaci pomocí molekulárně biologických metod MLST (Multilocus Sequence Typing), MAST (Multiple Antigen Sequence Typing), WGS (Whole-Genome Sequencing) a ke sledování citlivosti bordetel na antibiotika.

Další možností laboratorní diagnostiky pertuse je **nepřímý průkaz**, tedy odběr krve k sérologickému vyšetření specifických protilátek proti pertusi. Potvrzení výsledků sérologického vyšetření je vzhledem k nástupu protilátek u pacienta možné až v pozdějších fázích onemocnění.

Studie, které měřily protilátky IgM, IgA a IgG v séru pacientů s potvrzenou pertusí v různém věku a s různou vakcinační historií, běžně zjišťovaly, že nejcitlivější byly hodnoty IgG protilátek proti pertusovému toxinu. Primární očkování acelulární (aP) a celobuněčnou (wP) očkovací látkou proti pertusi v prvním roce života indukuje vysoké hladiny protilátek IgM a

IgG, které interferují s laboratorní diagnostikou (van der Zee, et al. 2015). U dětí mladších než 4 roky mohou být odpovědi IgA na infekci velmi nízké nebo dokonce žádné (van der Zee, et al. 1996).

Pokud byl pacient očkován aP nebo wP vakcínou proti pertusi, je správná a validní interpretace sérologických testů možná teprve až za rok po očkování aP vakcínou (Guiso N. et al., 2011, van der Zee, et al. 2015).

Sérologický průkaz se nedoporučuje u novorozenců a kojenců, protože jejich imunitní systém je nezralý a imunitní odpověď je ovlivněna mateřskými protilátkami (WHO, Laboratory Manual, 2014)

Ochrannou koncentraci protilátek proti pertusovému toxinu (anti-PT) zatím není možné vyšetřit, protože není známa hodnota korelátu protektivity (WHO, Immunological Basis for Immunization Series, 2017).

Vyšetřením pouze IgG anti-PT z jednoho vzorku séra lze zjistit pouze skutečnost, že pacient přišel do kontaktu s antigeny *Bordetella pertussis*, nelze však odlišit protilátky postinfekční a postvakcinační.

ELISA testy jsou určeny pouze k diagnostice onemocnění pertusí. Nejsou vhodné ke kontrole proočkovanosti populace.

V různých stadiích infekce *B. pertussis* by měly být použity různé diagnostické metody. Metoda PCR je nejcitlivější a měla by být vždy zahrnuta, nezávisle na stadiu onemocnění, pro doplnění kultivace v časném stadiu a sérologie v pozdějším stadiu; po „covidových“ dvou letech by odběr na PCR vyšetření měl být rutinní záležitostí, jak pro lékaře, tak pro pacienta. V případě pozitivního výsledku PCR, pokud nejsou přítomny výrazné symptomy onemocnění, pokud je výsledek kultivace negativní nebo sérologické vyšetření není průkazné, lze tento výsledek hodnotit jako skutečný indikátor infekce, pokud byla splněna všechna kritéria kvality pro test a může být vyloučena kontaminace (van der Zee et al. 2015).

1.1 Standardní postupy laboratorní diagnostiky pertuse a parapertuse - podrobně

Laboratorní diagnostika pertuse a parapertuse se provádí metodami přímé a nepřímé diagnostiky.

Přímá diagnostika:

- Kultivační vyšetření
- Real-Time PCR vyšetření (RT-PCR)

Nepřímá diagnostika:

- Sérologické vyšetření

Laboratorní metoda/druh vyšetření je volen/a dle intervalu mezi odběrem klinického materiálu a počátkem onemocnění a dle zahájené antibiotické (ATB) terapie (CDC, Manual, 2020).

Doporučená laboratorní diagnostika v závislosti na době trvání příznaků je uvedena v tabulce:

Metoda	Materiál	Do 2 týdnů trvání příznaků	Do 4 týdnů trvání příznaků	Nad 4 týdny trvání příznaků
Kultivační průkaz (provádí se, pokud není zahájena ATB terapie)	Výtěr z nosohltanu nebo aspirát	Ano	Ne	Ne
Detekce nukleové kyseliny (do 5 dnů po zahájení ATB terapie)	Výtěr z nosohltanu nebo aspirát	Ano	Ano	Ne
Průkaz protilátek IgG a IgA proti pertusovému toxinu (Pt)	Žilní krev - srážlivá	Ne	Ano	Ano

1. odběr proveden **do 2 týdnů** od počátku onemocnění + **nezahájena** ATB terapie: provést **kultivaci a RT-PCR**
2. odběr proveden **do 2 týdnů** od počátku onemocnění + **zahájena** ATB terapie: provést pouze **RT-PCR**

3. odběr proveden **3. až 4. týden** od počátku onemocnění: provést **RT-PCR** a/nebo **sérologické vyšetření**
4. odběr proveden **déle než 4. týden** od počátku onemocnění: provést pouze **sérologické vyšetření**
5. v ohnisku pertuse: provést RT-PCR a sérologické vyšetření bez ohledu na dobu trvání příznaků

U dětí do 1 roku a pacientů, u kterých neuplynulo 12 měsíců od očkování proti pertusi, se k průkazu onemocnění provádí pouze kultivace a RT-PCR, sérologické testy se neprovádí.

1.2 Kultivace

1.2.1 Odběr klinického materiálu na kultivační vyšetření

Podmínky: Co nejdříve po vyslovení podezření na onemocnění, nejlépe do 2 týdnů od počátku onemocnění, před zahájením ATB léčby, ráno nalačno, před napitím a před ústní hygienou nebo 2 až 3 hodiny po jídle a pití, před odběrem nekouřit. Při odběru používat pouze bezpudrové rukavice.

1.2.2 Výtěr ze zadní stěny nosohltanu

Odběrová souprava pro kultivační vyšetření:

- 1) Tampon ze syntetické bavlny na drátku s Amiesovou půdou s aktivním uhlím
- 2) Souprava FLOCKED SWAB nasofaryngeální flexibilní s tekutým Amiesovým médiem eSwab (Copan Italia S.p.A.). Informace o soupravě viz příloha 1. **CAVE!**

Postup: Před odběrem je vhodné se pacienta dotázat na pocit ucpaného nosu, odebírat z nosního průduchu, který pacient vnímá jako lépe průchodný. Tampon jemně zasouváme přes nosní průduch těsně podél nosní přepážky a po spodní stěně nosní dutiny až k zadní stěně nosohltanu (přibližně 10 cm v závislosti na věku pacienta, pokud dojde k říhání, byl tampon zasunut příliš hluboko). Několikrát jemně pootočíme a tampon opatrně vytáhneme (WHO, Laboratory Manual, 2014). Pro děti ≤12 měsíců věku platí poloviční vzdálenost (přibližně 5 cm). U dětí je nutná fixace, odběr je nepříjemný. Obrázek viz příloha 2.

1.2.3 Aspirát

Aspirát je odebírán dle metody zavedené v odběrovém místě, za dodržení sterilních podmínek odběru.

Jako transportní médium pro odsátý aspirát použít 3 ml sterilního fyziologického roztoku.

1.2.4 Uchovávání a transport klinického materiálu

Při pokojové teplotě, materiál by měl být doručen do laboratoře v den odběru, maximálně do 24 hodin.

1.2.5 Kultivační půdy

Kultivace bordetel se provádí na speciálních půdách. Jako kultivační médium je možné použít buď Charcoal agar nebo Bordet-Gengou agar (WHO, Laboratory Manual, 2014).

- 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). **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.**

1.2.6 Podmínky kultivace a identifikace kultur

Podmínky kultivace: V normální atmosféře při teplotě 35-37 °C po dobu 7 dnů.

Růst a vzhled kolonií:

Charcoal agar:

Bordetella pertussis vyrůstá za 48 až 72 hodin v drobných, hladkých, stříbrošedých a velmi lesklých koloniích, které vypadají jako „kapky rosy“. Kolonie se nepohybují po doteku kličkou, ale rozetřou se.

Bordetella parapertussis vyrůstá za 48 hodin, kolonie jsou podobné druhu *B. pertussis*, ale jsou větší a šedivější. Po delší inkubaci vypadají kolonie jako vpadlé do půdy.

Bordet-Gengou agar:

Bordetella pertussis vyrůstá za 48 až 72 hodin v drobných (do 0,5 mm) hladkých, stříbřitých koloniích, které se nepohybují při doteku kličkou, ale rozetrou se. Po delší inkubaci se kolonie zvětšují až na 2 mm a je viditelná zóna hemolýzy.

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.

Mikroskopický obraz v Gramově barvení: gramnegativní kokobacily.

1.2.7 Druhová identifikace a antigenní charakterizace

Druhová identifikace: Pomocí MALDI-TOF (Matrix Assisted Desorption Ionization – Time of Flight) a/nebo sklíčkovou aglutinací s diagnostickými séry *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* (výrobce Remel Ltd.).

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) (van Gent M. et al., 2009).

1.3 Real-Time PCR

1.3.1 Odběr klinického materiálu na RT-PCR vyšetření

1.3.1.1 Výtěr ze zadní stěny nosohltanu

Podmínky: co nejdříve po vyslovení podezření na pertusi, ráno nalačno nebo 2 až 3 hodiny po jídle a pití, a před ústní hygienou, maximálně do 5 dnů od zahájené ATB léčby, před odběrem nekouřit. Při odběru používat pouze bezpudrové rukavice!

Odběrová souprava pro RT-PCR vyšetření:

- 1) Souprava FLOCKED SWAB nasofaryngeální flexibilní s tekutým Amiesovým médiem eSwab (Copan Italia S.p.A.). Informace o soupravě viz příloha 1. **CAVE!**
- 2) Odběrová souprava pro průkaz respiračních virů s médiem

Postup: Před odběrem je vhodné se pacienta dotázat na pocit ucpaného nosu, odebírat z nosního průduchu, který pacient vnímá jako lépe průchodný. Tampón jemně zasouváme přes nosní průduch těsně podél nosní přepážky a po spodní stěně nosní dutiny až k zadní stěně nasofaryngu (přibližně 10 cm v závislosti na věku pacienta, pokud dojde k říhání, byl tampón zasunut příliš hluboko). Několikrát jemně pootočíme a tampón vytáhneme (WHO, Laboratory Manual, 2014). Pro děti ≤12 měsíců věku platí poloviční vzdálenost (přibližně 5 cm). Obrázek viz příloha 2.

1.3.1.2 Aspirát

Aspirát je odebírán dle metody zavedené v odběrovém místě, za dodržení sterilních podmínek odběru.

Jako transportní médium pro odsátý aspirát použít 3 ml sterilního fyziologického roztoku.

1.3.2 Uchovávání a transport klinického materiálu

Odběrová souprava s tekutým médiem Eswab nebo aspirát: Do zpracování v laboratoři uchovávat při pokojové teplotě, nebo v lednici při 4-8 °C. Materiál zpracovat v laboratoři do 5 dní od odběru.

Odběrová souprava pro průkaz respiračních virů s transportním médiem: Uchovávat a přepravovat při teplotě 2-8 °C, pokud je materiál dopraven do laboratoře v den odběru, nebo při -20 °C, pokud je nutné jej před přepravou skladovat. Skladuje se zmrazený při -20 °C. Zpracovat ihned po dodání nebo zmrazit (-20 °C).

1.3.3 Detekované sekvence pro RT-PCR

Pro PCR diagnostiku je možné testovat několik sekvencí (WHO, Laboratory Manual, 2014, ECDC, Guidance and protocol for the use of real-time PCR, 2012) viz tabulka 1. Většina těchto sekvencí je přítomna v genomu více druhů rodu *Bordetella*. Pro identifikaci infekčního agens je proto potřeba testovat kombinaci sekvencí.

Je možné sestavit sekvence do home-made PCR nebo si vybrat komerční soupravu. V současné době je na trhu několik komerčních souprav s různou kombinací sekvencí. Některé soupravy identifikují kromě *B. pertussis* a *B. parapertussis* také *B. holmesii*. U komerčních souprav se vyhodnocení provádí podle příbalového letáku výrobce. U home-made PCR se vyhodnocení provádí podle vybraných detekovaných sekvencí. Návrhy sekvencí pro home-made PCR viz příloha 3.

Tabulka 1: Nejčastěji používané sekvence pro PCR diagnostiku rodu *Bordetella*

Sekvence	Přítomná v	Počet kopií v genomu
IS481	<i>B. pertussis</i>	50-200
	<i>B. holmesii</i>	8-10
	u některých kmenů druhu <i>B. bronchiseptica</i>	<5
IS1001	<i>B. parapertussis</i>	~20
	u některých kmenů druhu <i>B. bronchiseptica</i>	1-7
IS1002	<i>B. pertussis</i>	4-9
	<i>B. parapertussis</i>	9
	<i>B. bronchiseptica</i>	1
pIS1001	<i>B. parapertussis</i>	3-5
h-IS1001	<i>B. holmesii</i>	3-5
ptxP	<i>B. pertussis</i>	1
recA	<i>B. holmesii</i>	1
ptxS1	<i>B. pertussis</i>	1
	<i>B. parapertussis</i>	1
	<i>B. bronchiseptica</i>	1
ptxA-Pr	<i>B. pertussis</i>	1
	<i>B. parapertussis</i>	1
	<i>B. bronchiseptica</i>	1
	po úpravě sekvence specifická pro <i>B. pertussis</i>	1

1.4 Sérologický průkaz pertuse

1.4.1 Odběr klinického materiálu na sérologické vyšetření

Podmínky: od 3. týdne trvání příznaků. Pokud byl pacient očkovan acelulární (aP) nebo celobuněčnou (wP) vakcínou proti pertusi, je správná a validní interpretace sérologických testů možná teprve až za rok po očkování aP vakcínou (Guiso N. et al., 2011).

Sérologický průkaz se nedoporučuje u novorozenců a kojenců, protože jejich imunitní systém je nezralý a imunitní odpověď je ovlivněna mateřskými protilátkami (WHO, Laboratory Manual 2014).

Není možné vyšetřit ochrannou koncentraci protilátek proti pertusovému toxinu (anti-PT), hodnota korelátu protektivity není známa (WHO Immunological Basis for Immunization Series, 2017).

Vyšetřením pouze IgG anti-PT z jednoho vzorku séra lze zjistit pouze skutečnost, že pacient přišel do kontaktu s antigeny *Bordetella pertussis*, nelze však odlišit protilátky postinfekční a postvakcinační. ELISA testy jsou určeny pouze k diagnostice onemocnění pertusí. Nejsou vhodné ke kontrole proočkovanosti populace.

Podle skupiny zahrnující evropské referenční laboratoře EU Pertstrain se nedoporučuje v sérologické diagnostice dávivého kašle používat následující laboratorní metody (Guiso N. et al., 2011):

- mikroaglutinaci
- imunoblot
- KFR (komplement fixační reakce)
- nepřímou imunofluorescenci.

Mnoho komerčních souprav detekuje protilátky v séru proti *B. pertussis* a/nebo anti-PT, anti-FHA, anti-PRN a také ACT protilátky za použití blotovacích technik. Soupravy používající jako antigeny suspenze celých buněk nejsou specifické pro detekci/diagnostiku infekcí dávivého kašle kvůli velké zkřížené reaktivitě s jinými bakteriemi (např. jinými druhy bordetel, druhy *Haemophilus*, *Mycoplasma pneumoniae*). Antigeny použité v těchto soupravách musí být validovány, pokud jde o jejich čistotu, protože kontaminace jinými antigeny nebo agregáty antigenů může také vést k falešně pozitivním výsledkům.

Kvantitativní interpretace výsledků blotu není možná, ale možná je pouze semikvantitativní

interpretace výsledků. Proto není použití imunoblotů pro sérologický průkaz pertuse doporučeno skupinou EU Pertstrain (Guiso N. et al, 2011).

1.4.2 Uchovávání a transport materiálu

Srážlivá krev pro získání séra: separovat sérum co nejdříve, skladovat v lednici při teplotě 2-8 °C. Krev je možné skladovat při pokojové teplotě do 24 hodin, pak je nutno separovat sérum. Separované sérum skladovat v lednici při teplotě 2-8 °C.

Vzorky sér: v lednici při teplotě 2-8 °C max. 5 dnů, po delší dobu je nutno skladovat v mrazicím boxu (- 20 °C)

1.4.3 Stanovení protilátek proti pertusovému toxinu

K diagnostice onemocnění se provádí stanovení IgG a IgA protilátek proti pertusovému toxinu metodou ELISA s kvantitativním vyhodnocením v mezinárodních jednotkách (IU/ml) (ECDC, Guidance and protocol for the serological diagnosis, 2012) a vyhodnocením podle příbalového letáku výrobce. Při hodnocení je nutné brát v úvahu věk pacienta a očkovací statut, což může ovlivnit hladiny protilátek. Pokud není interpretace možná, je nutné vyšetření druhého vzorku za 3 až 6 týdnů. Séra by měla být testována společně v jednom běhu.

Při vyšetření pouze IgG protilátek proti pertusovému toxinu je nutné vyšetřit 2 vzorky séra, odebrané minimálně v třítýdenním rozestupu. Za pozitivní výsledek se považuje prokazatelná dynamika protilátek, tedy ≥ 50 -100% zvýšení nebo snížení koncentrace IgG protilátek v IU/ml párových vzorků. I dynamický pokles protilátek svědčí pro nedávný kontakt s agens. Párová séra by měla být testována společně v jednom běhu (Guiso N. et al, 2011).

1.5 Sérologický průkaz parapertuse

Vzhledem k tomu, že výrobce firma Test-Line ukončil na začátku roku 2022 výrobu aglutinogenu k sérologickému průkazu parapertuse, není možné provádět touto metodou diagnostiku parapertuse.

Podle výsledků z NRL je interpretace výsledků pomocí soupravy ELISA založené na indexu positivity nedostatečná pro sérologický průkaz parapertuse a nekoreluje s výsledky z aglutinace.

Pozn. Pro diagnostiku parapertuse doporučujeme používat metodu PCR a kultivační průkaz.

Použitá literatura:

- Miller E, Fleming DM, Ashworth LA, Mabbett DA, Vurdien JE, Elliott TS. Serological evidence of pertussis in patients presenting with cough in general practice in Birmingham. *Commun Dis Public Health*. 2000;3(2):132-4. Erratum in: *Commun Dis Public Health*. 2000;3(3):221.
- Strebel P, Nordin J, Edwards K, Hunt J, Besser J, Burns S, Amundson G, Baughman A, Wattigney W. Population-based incidence of pertussis among adolescents and adults, Minnesota, 1995-1996. *J Infect Dis*. 2001;183(9):1353-9.
- Solano R, Crespo I, Fernández MI, Valero C, Álvarez MI, Godoy P, Caylà JA, Domínguez À. Underdetection and underreporting of pertussis in children attended in primary health care centers: Do surveillance systems require improvement? *Am J Infect Control*. 2016 Nov 1;44(11):e251-e256.
- Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N; Pertussis PCR Consensus Group. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):4925-9.
- Bidet P, Liguori S, De Lauzanne A, Caro V, Lorrot M, Carol A, Faye A, Guiso N, Bingen E, Bonacorsi S. Real-Time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3636-8.
- van der Zee A, Schellekens JF, Mooi FR. Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(4):1005-26.
- van der Zee A, Agterberg C, Peeters M, Mooi F, Schellekens J. 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.
- WHO Immunological Basis for Immunization Series, Module 4: Pertussis Update 2017.
- Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases, Chapter 10: Pertussis, CDC (Page last reviewed: May 11, 2020).
- Laboratory Manual for the Diagnosis of Whooping Cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*, update 2014; WHO/IVB/14.03

- 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.
- Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*, ECDC Technical Document, 2012.
- Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*, ECDC Technical Document, 2012.
- 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.

Příloha 1

Copan Liquid Amies Elution Swab (eSwab)

Tato odběrová souprava je vhodná jak pro kultivační vyšetření, tak i pro PCR vyšetření. Umožňuje nasadit kultivaci při pozitivním výsledku PCR. V případě požadavku na kultivační i PCR vyšetření stačí provést pouze jeden odběr. V laboratoři nejprve z média odebrat alikvot na PCR, ze zbytku média provést kultivaci (možno nanést inokulum přímo tamponem z odběrové soupravy), aby nedošlo ke kontaminaci materiálu na PCR.

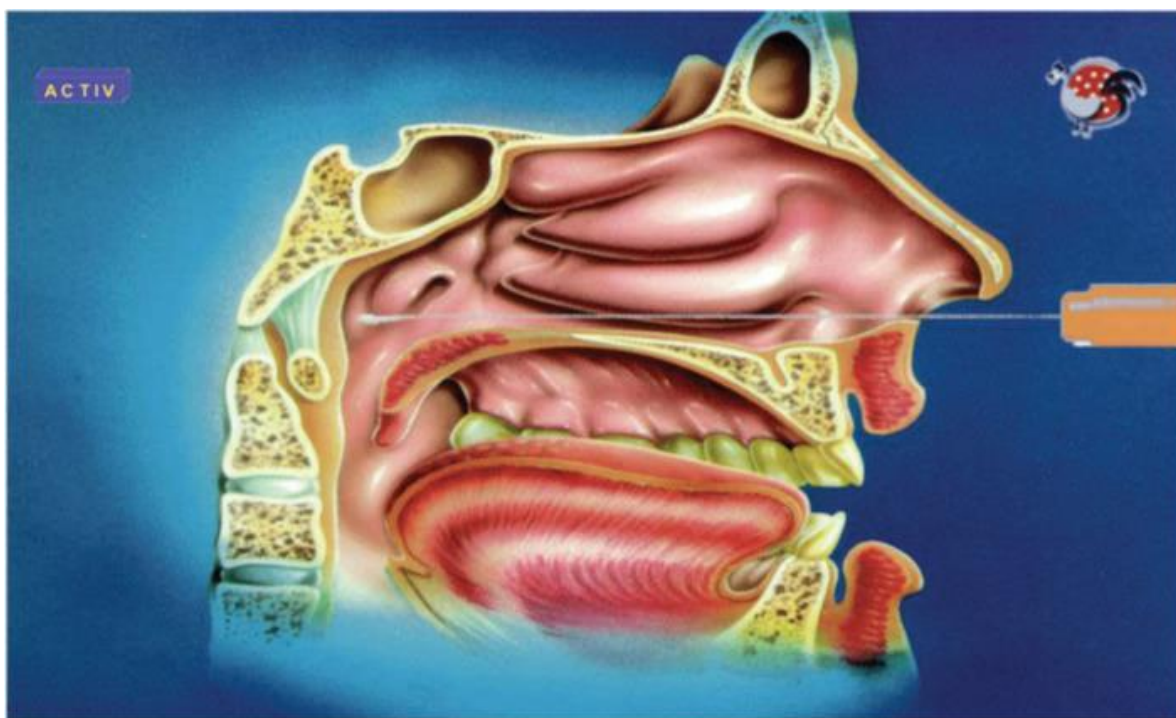
Firma Copan doplnila do návodu k použití následující informaci:

CAVE! *V odběrové soupravě Eswab mohou být obsaženy stopy nukleových kyselin z neživých organismů, které mohou být amplifikovány PCR testy v závislosti na analytické citlivosti testu. Při zpracování výsledků ze vzorků s nízkou amplifikací (vysoká hodnota Ct) cílového mikroorganismu se řiďte návodem k použití od výrobce testu a interními laboratorními postupy (Systém transportu a odběru Copan Liquid Amies Elution Swab, návod k použití, odstavec Omezení, bod 9, verze návodu HPC031R08 Date 2021.10).*

Za NRL pro pertusi a difterii můžeme říct, že tento problém se týká sekvencí, které detekují *B. paraptussis*. Námi otestované sekvence IS1001 a plS1001 u některých negativních vzorků vykazovaly amplifikaci s Ct >35.

Příloha 2

Odběr na kultivaci a PCR ze zadní stěny nosohltanu



Obrázek převzat z Laboratory Manual for the Diagnosis of Whooping Cough caused by Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis, update 2014; WHO/IVB/14.03;

Příloha 3

Návrh kombinace sekvencí pro home-made PCR diagnostiku

Doporučení ECDC [4]:

1. krok Multiplex PCR sekvencí IS481 a IS1001.
2. krok PCR sekvence ptxA-Pr (sekvence specifická pro *B. pertussis*)

Interpretace výsledků:

- IS481 negativní, PtxA-pr negativní – Ve vyšetřovaném materiálu neprokázána DNA *B. pertussis*.
- IS481 pozitivní, PtxA-pr negativní – Ve vyšetřovaném materiálu prokázána DNA *Bordetella species*
- IS481 negativní, PtxA-pr pozitivní – Nejednoznačný výsledek. Pokud bude totožný při opakovaném testování, interpretujeme jako „Možná přítomnost DNA kmene *B. pertussis* s netypickými genotypovými vlastnostmi“.
- IS481 pozitivní, PtxA-pr pozitivní – Ve vyšetřovaném materiálu prokázána DNA *B. pertussis*.
- IS1001 pozitivní - infekce pravděpodobně způsobená *B. parapertussis*, pokud odpovídají klinická kritéria.

Doporučení WHO [2]:

sekvence					Interpretace
IS481	IS1001	IS1002	ptxP	h-IS1001	
+	-	+	+	-	<i>B. pertussis</i>
+	-	+	-	-	<i>Bordetella species/B. pertussis</i>
+	-	-	-	-	<i>Bordetella species</i>
-	+	+	-	-	<i>B. parapertussis</i>
-	+	-	-	-	<i>Bordetella species/B. parapertussis</i>
+	-	-	-	+	<i>B. holmesii</i>

+ pozitivní; - negativní; + může být pozitivní u *B. bronchiseptica*