

PERTUSE LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Jana Zavadilová

Státní zdravotní ústav, Praha

Konference Problematika Pertuse, 15.4. 2011

EU definice potvrzeného případu pro pertusi vyhláška č. 275/2010 Sb.

Potvrzený případ = klinické projevy + průkaz minimálně jednou z následujících tří laboratorních metod:

- Izolace *B.pertussis* z klinického materiálu
- Detekce nukleové kyseliny (PCR)
- Průkaz specifické protilátkové odpovědi

**MUSÍ SE VYŠETŘOVAT AKUTNÍ A REKONVALESCENTNÍ SÉRUM
SOUCASNĚ V JEDNĚ LABORATOŘI!!!**

sérologický průkaz je proto možný až v rekonvalescenci

Vyšetření na základě jednoho vzorku séra i s vysokou
hladinou protilátek NENÍ v souladu s EU definicí!!!!

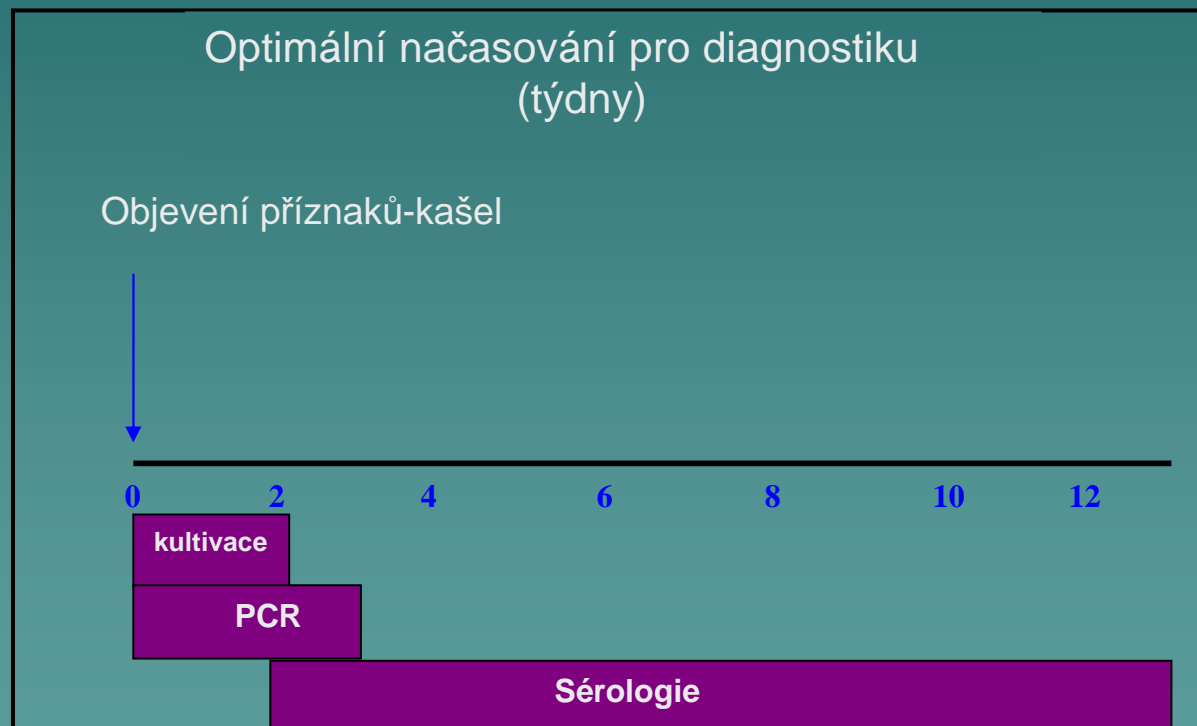
Laboratorní kritéria podle definice případu jsou často
nedodržována

Laboratorní metody

◆ Kultivace

◆ RT PCR

◆ Sérologie



Kultivace

- ◆ Standardní test
- ◆ Levná metoda
- ◆ 100% specifická
- ◆ Faktory ovlivňující senzitivitu:
 - načasování odběru- na počátku onemocnění
před zahájením ATB terapie
na lačno
 - odběr – je obtížný, vyžaduje trénink,
ideálně ORL specialista
 - transport materiálu

Odběr materiálu na kultivaci a PCR

- ◆ Odběr ihned při podezření na onemocnění, na lačno nebo tři hodiny po jídle a pití, nekouřit!
- ◆ Výtěr z nasopharyngu
- ◆ Tampón dacron, rayon, Pro PCR je vhodný i flocked swab



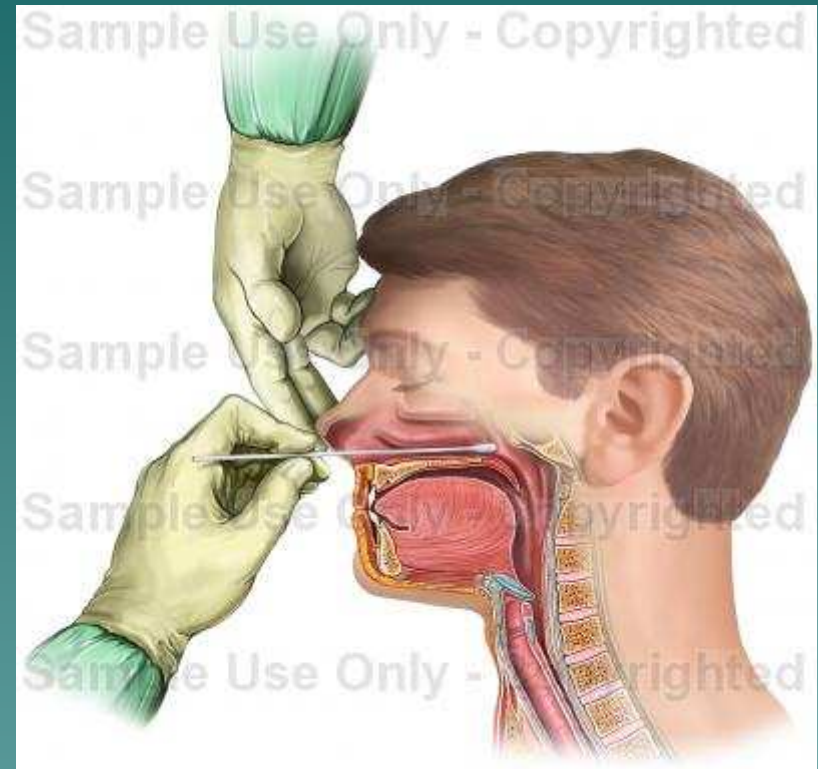
zdroj:<http://www.copanswabs.com/>

- ◆ Aspirát z nasopharyngu

<http://www.dispolab.cz>

Nasofaryngeální výtěr pro kultivaci a PCR

- ◆ Tampón jemně zasunout přes nosní průduch až k zadní stěně nasofaryngu
- ◆ Ponechat několik sekund za současného otáčení
- ◆ Opatrně vyjmout



zdroj:<http://www.copanswabs.com/>

Transport vzorků pro kultivaci

- ◆ Optimální je přímé naočkování vzorku na kultivační plotnu
- ◆ Tampón po odběru ihned zanořit do transportního média (AMIES s aktivním uhlím)
- ◆ Materiál přepravovat a uchovávat do zpracování při pokojové teplotě – **NE V LEDNICI !**
- ◆ Doba od odběru do zpracování materiálu max. 24 hodin

Transport vzorků pro PCR

- ◆ Tampón může být přepravován suchý
- ◆ Tampóny s Amies médiem
Amies s aktivním uhlím neovlivňuje PCR
- ◆ Materiál přepravovat při pokojové teplotě
- ◆ V laboratoři okamžitě zpracovat nebo skladovat při -20°C do zpracování

Kultivační média

- ◆ Charcoal agar (Regan-Lowe)
neselektivní
selektivní (+ cephalexin 40mg/l)
- ◆ Bordet – Gengou
- ◆ pH půdy $7,4 \pm 0.2$, půda na kultivační plotně dostatečně vysoko vylitá
- ◆ Kultivační podmínky
35-36°C, 7 dní, denní odečítání ploten

Kultivace – identifikace *B. pertussis*

- ◆ *B. Pertussis* vyrůstá za 48 až 72 hodin
drobné stříbřité polokulovité kolonie, při doteku kličkou se rozetřou (nepohybují se), po 3-4 dnech inkubace kolonie větší – „kapky rosy“, na Bordet-Gengou agaru slabá zóna hemolýzy



zdroj: www.hardydiagnostics.com

zdroj: faculty.matcmadison.edu/mljensen



Kultivace – identifikace *B. parapertussis*

- ◆ *B. parapertussis* vyrůstá do 48 hodin
kolonie jsou větší, šedostříbrné, při delší inkubaci vpadlé do půdy
na Bordet-Gengou agaru výrazná zóna hemolýzy a černohnědý pigment, roste i na krevním agaru



zdroj: <http://www.cdc.gov/pertussis/lab.html>

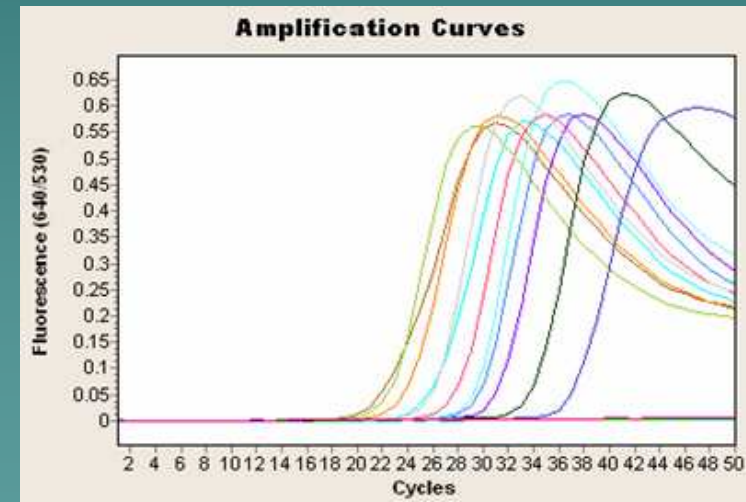
Identifikace bakteriální kultury

- ◆ Po izolaci čisté kultury – **ne starší než 48 hodin** se identifikace potvrdí sklíčkovou aglutinací s diagnostickými séry

<http://www.oxid.com/CZ/blue/search/results.asp>

RT PCR

- ◆ Rychlá metoda
- ◆ Vysoce citlivá
- ◆ Riziko kontaminace nižší než u klasického PCR
- ◆ Pozitivní výsledky i při ATB terapii (kultivace negativní)
- ◆ Jen v časně fázi onemocnění



Riffelmann et al., 2005 J Clin Microbiol 43:4925-9

RT PCR detekční formát

- ◆ Sekvenčně specifická detekce:
 - hybridizační próby (FRET)
 - TagMan próby
 - Molecular beacons
- ◆ Sekvenčně nespecifická detekce:
 - SYBR green

RT PCR sekvence *B.pertussis*

- ◆ IS481 – v několika kopiích u *B.pertussis*, ale není specifická

Tato sekvence se vyskytuje i u dalších Bordetel:

B. holmesii,

B. bronchiseptica

Reischl et al., 2001 J Clin Microbiol 39: 1963-6

- ◆ PT promoter (ptxP)- sekvence specifická pro *B. pertussis*, ale má nižší senzitivitu

RT PCR sekvence *B. parapertussis*

- ◆ IS1001 – specifická pro *B. parapertussis*

RT PCR interpretace výsledků doporučení Pertussis Work Area 4 EUVAC.NET

- ◆ IS481 pozitivní a ptxP pozitivní
- infekce způsobená *B.pertussis*
- ◆ IS481 pozitivní
- možná infekce způsobená *B.pertussis*, uzavřít jako infekce způsobená *Bordetellou sp.*
- ◆ IS1001 pozitivní
- infekce způsobená *B.parapertussis*

Sérologie

- ◆ ELISA, aglutinace
- ◆ Poskytuje pozdní, retrospektivní diagnózu
- ◆ Nelze odlišit protilátky postinfekční od postvakcinačních
- ◆ Vyžaduje 2 vzorky séra (akutní a rekonvalescentní) s odstupem 2 až 4 týdnů
- ◆ Séra se vyšetřují současně v jedné laboratoři!
- ◆ Průkaz signifikantního vzestupu nebo poklesu protilátek nebo sérokonverze z negativity do positivity

Sérologie

- ◆ Aglutinace - vyšetření aglutinačních protilátek patří mezi tradiční, osvědčená a levná vyšetření v diagnostice infekce
- ◆ ELISA – stanovení IgA, IgM, IgG protilátek nejčastěji proti pertusovému toxinu (PT) a filamentóznímu hemagglutininu (FHA)

Sérologie doporučení EU Pertstrain group

- ◆ Pouze protilátky proti PT jsou specifické pro *B.pertussis* !
- ◆ Protilátky proti dalším antigenům: FHA, PRN, FIM, ACT jsou méně specifické, zkřížená reaktivita s antigeny *B. parapertussis*, *Haemophilus sp.*, *M. pneumonie*, *Ch. pneumonie*
- ◆ Není doporučeno používat komerční kity se směsnými antigeny
- ◆ Diagnostická sérologie nemůže být správně interpretována po dobu 1 roku od očkování acelulární pertusovou vakcínou (aP)

Riffelmann et al., 2010 J Clin Microbiol 13:4459-

Guiso et al., 2010 Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30:307-12

Sérologie

- ◆ Pro správné hodnocení
 - vždy dva vzorky séra + datum odběru
 - údaje o očkování
 - datum narození
- ◆ Jakákoli hladina protilátek v jediném vzorku není průkazem akutně probíhajícího onemocnění

Přehled ELISA kitů

Výrobce	Dodavatel	Antigeny	Název kitu
Genzyme Virotech	Biomedica ČS	PT	Bordetella pertussis toxin IgG; IgA; IgM
Serion Immundiagnostica	Biovendor	PT	Bordetella pertussis toxin IgG
Euroimmun	Dynex	PT	Bordetella pertussis toxin IgG;IgA
Genzyme Virotech	Biomedica ČS	PT a FHA	Bordetella pertussis IgG/IgA
Serion Immundiagnostica	Biovendor	PT a FHA	Bordetella pertussis IgA;IgG
NovaTec	Laboserv	PT a FHA	Bordetella pertussis IgA;IgG
Novagnost	Biovendor	PT a FHA	Bordetella pertussis IgA;IgG;IgM
R-Biopharm AG	MEDISCO Praha	PT a FHA	Bordetella IgA;IG;IgM
Immunolab	MEDISCO Praha	PT a FHA	Bordetella pertussis IgA;IgG;IgM
Savyon Diagnostics	GALI s.r.o.	PT a FHA	Sero pertussis IgG; IgA/IgM
MAST DIAGNOSTICA	GALI s.r.o.	PT a FHA	Mastazyme Bordetella IgG;IgA;IgM

Problémy z praxe - kultivace

Faktory, které se mohou podílet na neúspěchu kultivace:

- ◆ špatně provedený odběr (ne výtěr z krku, po léčbě nebo během léčby ATB)
- ◆ nedodržení transportních podmínek (nepřevážovat vzorek v chladícím boxu, nejkratší transport)
- ◆ špatná volba kultivační půdy
- ◆ použití kultivačního média jen s cefalosporinem (použít médium jak s cefalosporinem, tak bez)
- ◆ pH půdy (optimální $7,4 \pm 0,2$)
- ◆ stará krev
- ◆ nedostatečně vylitá plotna – vysychání při kultivaci

Transport izolátů do NRL

- ◆ V současné době zaznamenáváme zvyšující se výskyt pertuse
- ◆ U izolátů *B. pertussis* je žádoucí provádět genotypizaci (MLSTA, MLVA) – přínos pro zkvalitnění surveillance a vakcinační strategie
- ◆ Žádáme mikrobiology o zvýšené úsilí při kultivačním průkazu pertuse a o posílání izolátů *B. pertussis* a *B. parapertussis* do NRL
- ◆ Transport izolátů do NRL
Na kultivační plotně
Tampón s transportním médiem
(AMIES, AMIES s aktivním uhlím)

EHK-673/ 2010

- ◆ Zařazena *Bordetella parapertussis*
- ◆ Vzorky rozeslány 120 laboratořím
- ◆ 111 laboratořím kmen určilo správně
- ◆ Nesprávně kmen identifikovalo 7 laboratořím
- ◆ Pouze 2 laboratoře kmen nedourčily a označily vzorek jako *Bordetella sp.*

- ◆ Kmen *B. parapertussis* byl zaslán v rámci EHK podruhé (EHK-78/ 1997)
- ◆ Je potěšující, že většina laboratořím (92,5%) vzorek určila správně

Laboratorní vyšetření v roce 2010

- ◆ 662 hlášených případů onemocnění pertusí
- ◆ Bylo provedeno pouze 48 kultivačních vyšetření, z toho bylo 28 pozitivních
- ◆ Do NRL bylo zasláno **pouze 7 kmenů**
- ◆ Metodou PCR bylo diagnostikováno 12 případů
- ◆ Většina případů onemocnění byla potvrzena sérologickým vyšetřením

Zdroj: Fabiánová et al., 2011 Zprávy EM (SZÚ, Praha) 20(1): 27-32

Závěr

- ◆ Pro včasnou DG Pertuse používat PCR a kultivační průkaz
- ◆ Odběr ihned po vyslovení podezření na onemocnění (kultivace, sérologie, PCR)
- ◆ Správná technika odběrů (kultivace, PCR)
- ◆ Co nejkratší doba mezi odběrem a zpracováním materiálu (odběrová místa blízko mikrobiologických laboratoří)
- ◆ U akutních případů provádět průkaz agens kultivačně, metodou PCR, sérologii používat k dourčení nejasných případů

Poděkování

- ◆ Za spolupráci všem laboratořím, které nám zasílají izoláty *B.pertussis* a *B.parapertussis*.



DĚKUJI ZA POZORNOST

Mgr. Jana Zavadilová
NRL pro pertusi a difterii
SZÚ
Šrobárova 48
100 42 Praha 10

Tel.: 267 082 242
E-mail: jzavadilova@szu.cz