

## **BORDETELLA PERTUSSIS: MOŽNOSTI DIAGNOSTIKY A VÝSKYT BORDETELLA PERTUSSIS: POSSIBILITIES OF DIAGNOSTICS AND OCCURRENCE**

HUDECOVÁ Gabriela

*Oddelenie klinickej mikrobiológie, Nemocenská BB spol. s r.o., Banská Bystrica*

### **ABSTRAKT**

V posledných rokoch sme svedkami stúpajúceho výskytu čierneho kašľa, a to najmä vo vekovej skupine adolescentov, mladých dospelých a detí do 1 roka. Tento nárast sa pripisuje predovšetkým poklesu post-vakcinačnej imunity. Pertussis (divý, dávivý, čierny kašeľ) je vysoko infekčné akútne ochorenie spôsobené malými gram-negatívnymi kokobacilmi *Bordetella pertussis*. Človek je jediným zdrojom infekcie, ktorá sa prenáša kvapôčkovou cestou. Disponuje viacerými faktormi virulencie (adhezíny, toxíny, lipopolysacharid), ktoré sa uplatňujú v patogenéze choroby. Včasná laboratórna diagnostika *Bordetella pertussis* pomocou sérologických vyšetrení a následnej polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) má veľký význam pre potvrdenie infekcie, vzhľadom k atypickosti a závažnosti ochorenia u najmladšej vekovej kategórie detí a k subklinickému priebehu u adolescentov a dospelých.

**Kľúčové slová:** *Bordetella pertussis*. Laboratórna diagnostika. Výskyt

### **ABSTRACT**

Nowadays, occurrence of whooping cough is rising especially in age groups of adolescents, young adults and infants younger than 1 year. Waning of post-vaccination immunity is one of the most important reasons for increasing pertussis occurrence. Pertussis (wild, brithing, black cough) is a highly infectious disease caused by small gram-negative coccobacilli *Bordetella pertussis*. Man is the only source of infection that is transmitted by droplet path. It has several virulence factors (adhesins, toxins, lipopolysaccharide) that are involved in the pathogenesis of the disease. Early laboratory diagnostics of *Bordetella pertussis* by serological examination and subsequent polymerase chain reaction (PCR) is of great importance for confirmation of infection due to the atypicality and severity of the disease in the younger age group of children and to the subclinical course in adolescents and adults.

**Key words:** *Bordetella pertussis*. Laboratory diagnostics. Occurrence

### **ÚVOD**

Pertussis (divý, dávivý, čierny kašeľ) je vysoko infekčné akútne ochorenie spôsobené malými gram-negatívnymi kokobacilmi *Bordetella pertussis*. Inkubačný čas ochorenia je 9-10 dní, ale môže sa pohybovať v rozsahu 6-20 dní [1]. V klinickom obraze typického dávivého kašľa možno rozlíšiť tri štádiá. Na začiatku ochorenia (katarálne štádium) sú prítomné nešpecifické príznaky poukazujúce na bežnú respiračnú infekciu. V tomto období podanie antibiotík zabráni progresii ochorenia alebo aspoň zníži

závažnosť záchvatov. Suchý dráždivý kašeľ ďalej progreduje a ochorenie prechádza do štádia paroxyzmálneho, keď už podanie antibiotík klinický priebeh ochorenia nezmení. Klinické príznaky paroxyzmálneho štádia sú dôsledkom produkcie pertussického toxínu. Kašeľ je typický záchvatovitý, veľmi vyčerpávajúci, sprevádzaný piskotom a hvízdavým nádychom. Podanie antibiotickej terapie má však v tomto štádiu opodstatnenie z hľadiska epidemiologického, nakoľko znižuje pravdepodobnosť prenosu na iné osoby v okolí. V poslednom štádiu – rekonvalescencii, postupne slabnú záchvaty kašľa, pacient však ostáva slabý. Rekonvalescencia je pomerne dlhá a trvá rádovo týždne. U dospelých a pacientov v adolescencii je priebeh pertussis veľmi často atypický a v klinickom obraze nie je zjavné striedanie vyššie opísaných štádií. Menej závažný kašeľ bez typických záchvatov môže pretrvávať aj dlhú dobu, keď je chorý zdrojom infekcie, ktorú nevedomky šíri vo svojom okolí [1-4].

### **Patogenéza**

Baktérie sa viažu prostredníctvom rôznych adhezínov na bunky riasinkovitého epitelu bez toho aby prenikli do epitelu či krvného riečiska. Mimo púzdra chrániaceho patogén pred inaktiváciou komplementom existujú funkčné dve skupiny virulentných faktorov: adhezíny a toxíny. Dva najdôležitejšie faktory adherencie sú filamentózyhemaglutinín (FHA) a pertussický toxín (PT), ktoré môžu fungovať ako exotoxín alebo adhezín. Na rozdiel od *Bordetella pertussis* nevytvára *Bordetella parapertussis* pertussický toxín. *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* sú na vonkajšej membráne vybavené membránovým toxínom pertaktinomom, ktorý hrá úlohu pri uchytení sa na hostiteľskú bunku. Ďalšími virulentnými faktormi sú toxín adenylátcykláza, ktorý postihuje imunitnú odozvu hostiteľa a tracheálny cytotoxín vytvorený peptidoglykanom bunkovej steny, ktorý spôsobuje fázu pohybu rias [5-8].

### **Epidemiológia**

V aktuálnej správe Európskeho centra pre prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) sa uvádza 40 727

prípadoch pertussis za rok 2014 v 29 štátoch EÚ / EHP, z toho v SR bolo hlásených 20,7 prípadov na 100 000 obyvateľov. Špecifické údaje o veku boli najvyššie u pacientov vo veku < 1 roka (51,6 prípadov na 100 000 obyvateľov), po nich nasledovali 10-14 ročný (24,4 na 100 000 obyvateľov) a 15-19 ročný (19,7 na 100 000 obyvateľov). Väčšina členských štátov uviedla údaje z komplexných, pasívnych systémov dohľadu s celoštátnym pokrytím [9].

### LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Za štandard diagnostiky bola považovaná kultivácia. Je špecifická, avšak málo citlivá, najmä u starších detí, mladistvých a dospelých, ktorí sú liečení antibiotikami alebo u ktorých kašeľ trvá tri a viac týždňov. Citlivosť priamej diagnostiky výrazne zvýšila metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Sérologické vyšetrenie pomocou ELISA metód je vhodné k potvrdeniu diagnózy najmä u pacientov v neskoršej fáze ochorenia [10].

#### Kultivácia

Kultivačný dôkaz *Bordetella pertussis* je štandardným testom pre diagnózu pertussis. Je však výrazne menej citlivý ako PCR, a časovo náročnejší. Senzitivita kultivácie je 20-40 %. Odber sa robí pred začatím antibiotickej terapie, nalačno. Na výter sa používa špeciálny dakrónový tampón (bavlnený tampón je toxický pre bordetely). Výter je nutné urobiť zo zadnej steny nosohltanu ideálne cez nosové priechody, prípadne cez ústnu dutinu ohnutým tampónom. Materiál je transportovaný do laboratória v transportnom médiu. Doba transportu by nemala byť dlhšia ako 24 hodín. Kultivácia sa vykonáva na špeciálnych kultivačných pôdach Bordet-Gengou agar prípadne Charcoal agar. Platne sa kultivujú pri teplote 35-37 °C po dobu 7 dní a denne sa hodnotia. Po izolácii čistej kultúry je vhodné kolónie overiť sklíčkovou aglutináciou s príslušnými antisérmi, prípadne PCR metódou. Izolované kmene sa zasielajú do NRC pre pertussis a parapertussis za účelom typizácie pomocou pulznej elektroforézy (PFGE) [11].

#### Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Na priamu diagnostiku *Bordetella pertussis* sa v súčasnosti začala používať metóda PCR. Real-time PCR je jednou z najčastejšie využívaných typov PCR, nakoľko pomocou fluorescenčne značených sond umožňuje nielen sledovať priebeh reakcie v reálnom čase, ale aj detekciu a rozlíšenie *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis* tej istej

vzorke. Najčastejšie PCR metódy ako cieľovú sekvenciu využívajú inzerčnú sekvenciu *IS 481* promotorovú oblasť génu kódujúceho S1 podjednotkupertussis toxínu (*ptxS1*), génovú oblasť kódujúcu adenylátcyklázu (*cyaA*), oblasť pertaktínového génu a oblasť vonkajšieho membránového porínu. Dôkaz viacerých cieľových sekvencií *Bordetella pertussis* zvyšuje pravdepodobnosť zachytenia *Bordetella pertussis* vo vyšetrovanej vzorke. Najvhodnejším materiálom na PCR vyšetrenie je výter z nosohltanu prípadne nazofaryngeálny aspirát. Výhodou PCR oproti kultivácii je možnosť odberu materiálu v priebehu antibiotickej terapie a vzhľadom k vysokej citlivosti metódy i v neskoršom období ochorenia. Najvyššia záchytnosť však ostáva, tak ako aj pri kultivácii, v začiatočnom štádiu ochorenia. Ďalšou výhodou sú podmienky transportu materiálu určeného na vyšetrenie metódou PCR, ktoré sú menej náročné ako pri kultivácii [11, 12].

#### Sérologická diagnostika

Sérologické metódy sú vhodné na diagnostiku pertussis u pacientov s klinickými príznakmi ochorenia ako sú pretrvávajúci záchvatovitý kašeľ, duseň, zvracanie po záchvate kašľa. Sérologická diagnostika je zameraná predovšetkým na zistenie hladiny protilátok v daných vzorkách. Potrebné je vyšetrenie párových vzoriek séra za rovnakých laboratórnych podmienok. Prvý odber by sa mal vykonať ihneď po podozrení na ochorenie, druhá vzorka sa obvykle odoberá približne o tri týždne. Na potvrdenie ochorenia by sa mala využívať kombinácia sérologických metód dôkazu protilátok triedy IgG, IgA proti pertussickému toxínu a PCR, bez ohľadu na dĺžku trvania klinických príznakov ochorenia. Sérologickými metódami je možné potvrdiť ochorenie, prípadne slúžia na stanovenie pretrvávania protilátok po očkovaní celobunkovou vakcínou. Na dosiahnutie najlepšej senzitivity a zároveň špecificity sa na sérologickú diagnostiku odporúča využiť kvantitatívne ELISA metódy dôkazu na stanovenie prítomnosti protilátok IgG a IgA proti pertussickému toxínu [11].

#### CIELE PRÁCE

V našej práci sme sa zamerali na dve skupiny (muži, ženy) a podskupiny (deti a dospelí) a cieľom práce bolo štatistické rozdelenie a vyhodnotenie podľa pohlavia, vekového rozmedzia a sezónnosti.

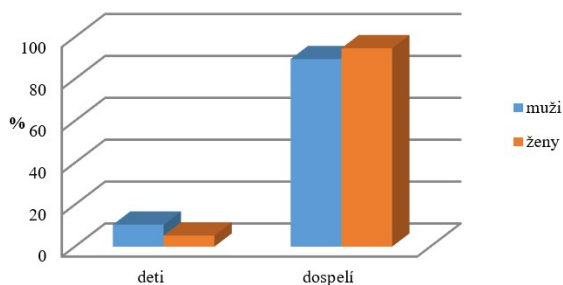
#### METODIKA A MATERIÁL

V období počas troch rokov sme na Oddelení kli-

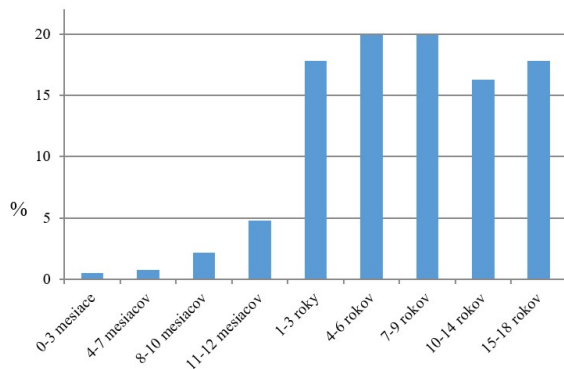
nickej mikrobiológie vydifereovali pacientov a pomocou podmienkového exportu dát súbor rozdelili na dve skupiny (muži, ženy) a podskupiny (dospelí, deti). Vzorky pacientov pochádzali prevažne z ambulancií všeobecných lekárov pre dospelých a všeobecných lekárov pre deti a dorast. Cieľom práce bolo rozdeliť skupiny podľa pohlavia, vekového rozmedzia a sezónnosti a štatisticky vyhodnotiť. Na stanovenie sme použili kvantitatívnu metódu ELISA stanovenia protilátok triedy IgG, IgA proti pertussickému toxínu *Bordetella pertussis*. Testovacia súprava ELISA je založená na kvantitatívnom *in vitro* stanovení ľudských protilátok imunoglobulínovej triedy IgG, IgA proti toxínu *Bordetella pertussis* v sére alebo v plazme pre diagnostiku infekcií spôsobených *Bordetella pertussis*, čierneho kašľa. Súprava je kalibrovaná pomocou medzinárodného séra podľa WHO štandardu a spĺňa najnovšie nároky na sérologickú diagnostiku infekcií *Bordetella pertussis*.

## VÝSLEDKY

Aj napriek tomu, že pohlavie nie je považované za faktor, ktorý ovplyvňuje prítomnosť ochorenia v populácii počas troch rokov sledovania ochorenia



**Graf 1** Rozdelenie pacientov: deti a dospelí za obdobie troch rokov

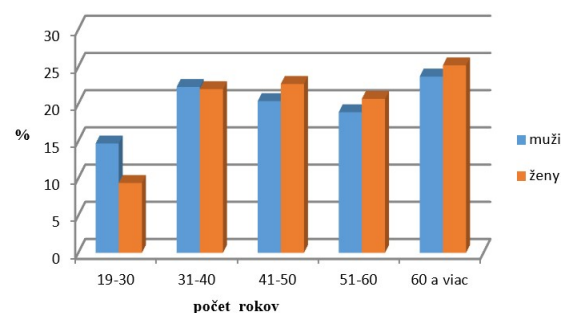


**Graf 2** Vekové rozmedzie – deti

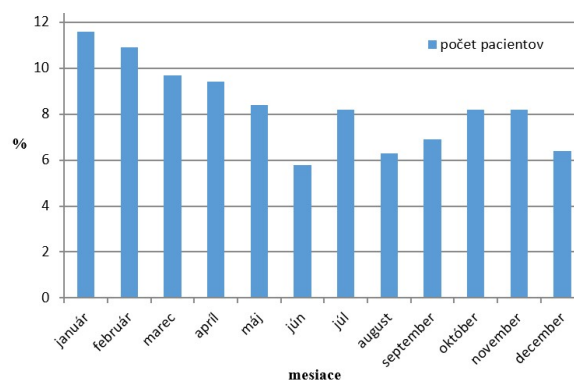
prevládalo v skupine „deti“ viac u mužského pohlavia a v skupine „dospelých“ u ženského pohlavia (Graf 1). Podľa epidemiologickej správy z roku 2014 boli vo väčšine vekových skupín dospelých častejšie postihované ženy ako muži, pričom pomer mužov a žien bol 0,8:1 u skupine „deti“ sa pohlavie neudávalo [9].

Výskyt infekcie *Bordetella pertussis* v závislosti od veku pacientov je zobrazený v grafoch 2 a 3. Vekové rozmedzie u detí sa pohybovalo od 4 do 9 rokov kedy boli zachytené najviac prípadov ochorenia *Bordetella pertussis* (Graf 2) a u dospelých prevládalo u žien aj mužov rovnaké vekové rozmedzie 60 a viac rokov (Graf 3).

Typická aktivita čierneho kašľa nemá zreteľný sezónny charakter, ale počet prípadov sa môže zvýšiť v lete aj na jeseň [9]. Štatistickým vyhodnotením sme zistili, že najvyšší počet prípadov bol zaznamenaný v januári a februári, potom postupne intenzita klesala a vystúpila v júli (Graf 4). Klinická prezentácia pertussis u dospievajúcich a dospelých môže byť mierna a často sa neuznáva a práve to môže byť riziko prenosu pre dojčatá, deti, kontaktom s infikovanou osobou a rodinou.



**Graf 3** Vekové rozmedzie – dospelí



**Graf 4** Rozdelenie pacientov podľa sezónnosti

**DISKUSIA**

Čierny kašeľ aj napriek dobrému preočkovaníu ostáva hrozbou pre verejné zdravie. Najviac postihnutou vekovou skupinou vo väčšine krajín sú deti mladšie ako jeden rok, 83 % týchto prípadov je mladších ako 6 mesiacov, čo je veková skupina príliš mladá, aby ukončila sériu primárnych očkovaní [13]. V niektorých členských štátoch však boli najviac postihnuté vekové skupiny dospelých, pričom väčšina prípadov bola vo veku 15 a viac rokov. Pertussis nie je len detskou chorobou ale rastúca incidencia u adolescentov a dospelých je dôvodom na obavy, pretože tieto vekové skupiny sú zdrojom prenosu u dojčiat [14, 15], najmä preto, že mierne a asymptomatické prípady u adolescentov a dospelých sú často neuznané ako pertussis [16]. Ohniská v oblastiach s vysokým stupňom očkovania poukazujú na to, že stratégie očkovania budú musieť byť opätovne preskúmané a že by sa mali zväziť posilňovače dospelých a dospelých, ako aj očkovanie zdravotníckych pracovníkov a tehotné ženy. Niektoré členské štáty už zahrnuli niektoré z týchto politík do svojho vnútroštátneho plánu očkovania. Napriek narastajúcemu počtu hlásených prípadov je pravdepodobné, že zaťaženie v Európe je stále podceňované [16]. Aby bolo možné presne vyhodnotiť zmeny v epidemiológii v priebehu času a optimalizovať kontrolu chorôb, je dôležité, aby sme naďalej zlepšovali dohľad nad pertussis, od klinického uznania až po laboratórnu diagnostiku [17].

**ZÁVER**

Ochorenie čierny kašeľ nielen u detskej populácie stále stúpa a predstavuje aktuálny problém v pediatrii. V poslednej dobe sa dostáva viac do povedomia lekárov ale problematika diagnostiky a interpretácia laboratórnych vyšetrení stále ostáva. *Bordetella pertussis* často ostáva nediagnostikovaná a uniká pozornosti lekárov. Zlepšený dohľad je ďalším dôležitým faktorom, ako je zvýšené povedomie o ochorení medzi klinikmi, zlepšenie prípadov a laboratórnych techník, napríklad použitie sérologických a PCR vyšetrení čo prispeje k zlepšeniu diagnózy ochorenia u dospelých a mladistvých.

**ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV**

[1] MURRAY, P., ROSENTHAL, K., PFALLER, M. *Medical microbiology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: ElsevierSaunders 2013: 888.

- [2] RUMLAROVÁ, Š. Očkování proti černému kašli – současný stav a výhledy do budoucna. *Remedia*. 2012; 22: 82-85.
- [3] World Health Organization. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiol Rec*. 2010; 40 (85): 385-400.
- [4] AVDIČOVÁ, M. Poznáme odpovede na otázky týkajúce sa prevencie pertussis? *Epidemiológia*. 2014; 2: 21-24.
- [5] CHERRY, J.D. Immunity of Pertussis. *CID*. 2007; 44: 1278-1279.
- [6] DE MELKER, H.E., VERSTEEGH, F.G.A., CONYN-VAN SPAENDONCH, M.A.E., et al. Specificity and Sensitivity of High Levels of Immunoglobulin G Antibodies against Pertussis Toxin in a Single Serum Sample for Diagnosis of Infection with *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 800-806.
- [7] HIJNEN, M., HE, Q., SCHEPP, R., et al. Antibody responses to defined regions of the *Bordetella pertussis* virulence factor pertactin. *Scand J Infect Dis*. 2008; 40: 94-104.
- [8] KHELEF, N., DANVE, B., QUENTIN-MILLET, M.J., et al. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: Two Immunologically Distinct Species. *Immun*. 1993; 61: 486-490.
- [9] European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2014. Stockholm: ECDC, 2016.
- [10] HUČKOVÁ, D., KOLLÁROVÁ, K. Možnosti včasnej diagnostiky pertussis. 2006; 181-182.
- [11] Vestník Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky na zabezpečenie surveillance pertussis v SR, čiastka 1-3, 22.2.2013, ročník 61, str.5.
- [12] WIRSING VON KÖNIG, Ch., HALPERIN, S., RIFFELMANN, M., et al. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2: 744-750.
- [13] CELENTANO, Z.P., MASSARI, M., PARAMATTI, D., et al. Obnova pertussis v Európe. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24 (9): 761-765.
- [14] SKOFF, T.H., KENYON, C., COCOROS, N., et al. Zdroje infekcie pertussis u detí v Spojených štátoch. *Pediatrics*. 2015; 136 (4): 635-641.
- [15] WILEY, K.E., ZUO, Y., MACARTNEY, K.K., et al. Zdroje pertusovej infekcie u malých detí. *Vakcína*. 2013; 31 (4): 618-625.

- [16] TAN, T., DALBY, T., FORSYTH, K., et al. Pertussis Across the Globe: Nedávne epide-miologické trendy od roku 2000 do roku 2013. *Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34 (9): 222-232.
- [17] GUIZO, N., BERBERS, G., FRY, N.K., et al. Čo robiť v sérologickej diagnostike pertussis: odporúčania referenčných laboratórií EÚ. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30 (3): 307-312.