



Čierny kašeľ (pertussis)

Stúpajúca incidencia a možnosti laboratórnej diagnostiky

Hučková D., Kollárová K.

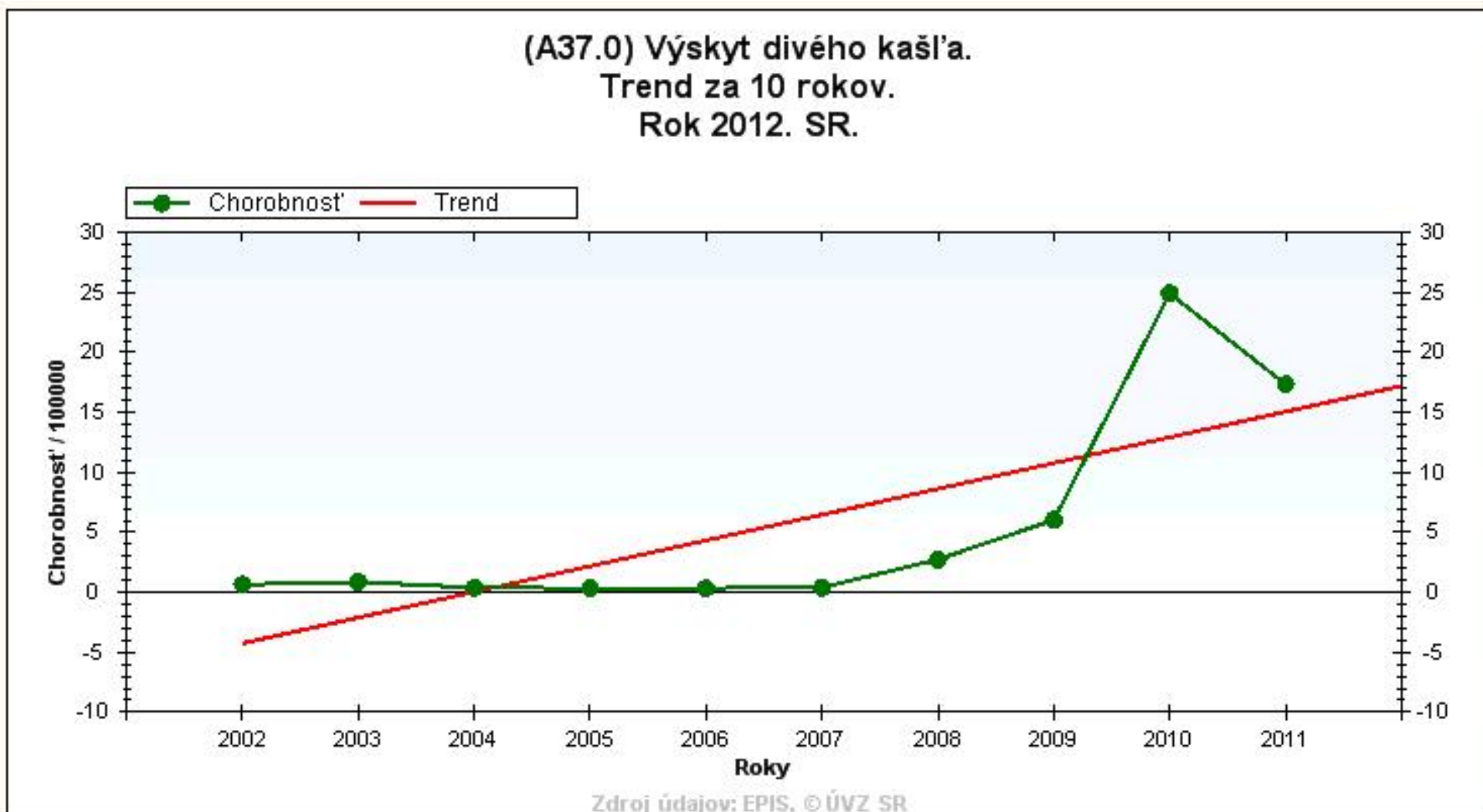
HPL spol. s r.o., Bratislava

**Narastá počet ochorení a sú zmeny
v prejavoch?**

Ak áno → Prečo ?

Hlásenie ochorenia

(A37.0) Výskyt divého kašľa.
Trend za 10 rokov.
Rok 2012. SR.



plán WHO

- dosiahnuť do roku 2 000 incidenciu <1 prípad / 100 tisíc obyvateľov

očkovanie

- kombinovaná trojvakcína DTP – ČSSR od roku 1958 (celobunková vakcína proti pertussis)
- DTaP – vakcína s acelulárnou zložkou proti pertussis – čiastočne od r. 2005 a od roku 2006 celoplošne pre základné očkovanie
 - 3 dávky (3.-4. m., 5.-6. m., 11.-12. m.)
 - od 1.4.2009 preočkovanie v 6. roku života
 - od 1.7.2010 preočkovanie v 13. roku života
- dTap – vakcína pre mladistvých a dospelých
 - nižší obsah difterickej a pertusovej zložky

Zmeny v pertussis

- **vzostup incidencie** (i napriek vysokej preočkovanosti >97%)
 - 75 % ochorenia bolo u očkovaných (1998 - 2008) (zprávy CEM SZU Praha)
- **vekový shift**
- **strata sezonality** u adolescentov a dospelých
- **strata typických klinických** príznakov - miernejší priebeh, ale viac komplikácií (u 23 – 28 % dospelých)
 - príznaky (ak sú prítomné):
 - nádcha, slzenie, kýchanie, konjunktivitída, horúčka, chraptot, bolesť hrdla, kašeľ
- **nárast komplikácií** najmä u osôb > 60 ročných
 - druhá najčastejšia skupina hospitalizovaných

Príčiny nárastu?

- postvakcinačná ani postinfekčná imunita nie je celoživotná
 - presná dĺžka postinfekčnej imunity nie je známa (7-21 r. ?)
 - postvakcinačná imunita po vakcinácii wP
 - min. **3-5 rokov** s rýchlym poklesom za 3-10 rokov od vakcinácie
 - imunita po vakcinácii aP
 - **min. 5 rokov** po primovakcinácii (3-4 dávky), **5-8 rokov** od posledného boosteru
- citlivejšie metódy detekcie v laboratórnej diagnostike
- nové genetické varianty kolujúcich kmeňov *B. pertussis* v populácii
- **zavedenie acelulárnych vakcín** (cca posledné desaťročie)

Kvízová otázka

V ktorom veku nie je podaná vakcína proti pertussis v rámci pravidelného očkovania detí a dospelých ?

- A. v 1. roku života
- B. v 3. roku života
- C. v 6. roku života
- D. v 13. roku života

Správna odpoveď

V ktorom veku nie je podaná vakcína proti pertussis v rámci pravidelného očkovania detí a dospelých ?

- A. v 1. roku života
- B. v 3. roku života**
- C. v 6. roku života
- D. v 13. roku života

Laboratórna diagnostika pertussis

□ priama diagnostika

- izolácia patogéna (kultivácia)
- detekcia nukleovej kyseliny (PCR)

□ nepriama diagnostika

- vyšetrenie a interpretácia z jednej vzorky
 - ELISA
 - imunoblot
 - nepriama imunofluorescencia
 - mikroaglutinácia

Kultivácia

□ odber materiálu do 2 týždňov po začatí kašľa

- materiál – najlepšie nazofaryngeálny výter, n. aspirát
- tampóny – kalcium-alginátový alebo dakrónový
- transport max. do 24 hodín po odbere pri 4 °C

□ **výhody**

- vysoká špecifickosť (100 %)
- sledovanie rezistencie a genetických zmien izolátov kolujúcich v populácii

□ **nevýhody**

- nízka citlivosť (12 - 60 %)
- špeciálne kultivačné médiá
- dĺžka kultivácie (7 - 10 dní)

PCR

- ❑ **odber prvé 2 - 3 týždne po začatí klinických príznakov**
 - materiál – nazofaryngeálny aspirát /výter, BAL, spútum, laryngeálny výter (tampón – nylon (typu flocked)/polyester (dakron, rayon) – do prázdnej skúmavky)
 - transport do 2 dní pri 4 °C, do 2 týždňov pri uskladnení pri -20 °C

- ❑ **real-time PCR** - *B. pertussis* a *B. parapertussis* v jednej reakcii

- ❑ **výhody**
 - rýchlosť (do 8 hodín)
 - citlivosť (70 – 99 %)
 - špecifickosť (86 – 100 %)
 - patogén nemusí byť životaschopný
 - detekcia aj po začatí ATB terapie

- ❑ **nevýhody**
 - bez štandardizácie
 - potenciónálna mýlna pozitivita
 - DNA cross-kontaminácia

Kvízová otázka

Aký materiál nie je vhodný pre vyšetrenie metódou PCR ?

- A. nasopharyngeálny aspirát
- B. výter tonzíl
- C. nasopharyngeálny výter
- D. BAL

Správna odpoveď

Aký materiál nie je vhodný pre vyšetrenie metódou PCR ?

- A. nazofaryngeálny aspirát
- B. **výter tonzíl**
- C. nazofaryngeálny výter
- D. BAL

Výsledky vyšetrenia HPL za obdobie 2009-2011

B. pertussis/B. parapertussis DNA (PCR)

spolu vyšetrení 2 188
pozitívne: *B. pertussis* 59 (2,7 %)
 B. parapertussis 16 (0,7 %)
(z toho *B. pertussis* + *B. parapertussis* 8)

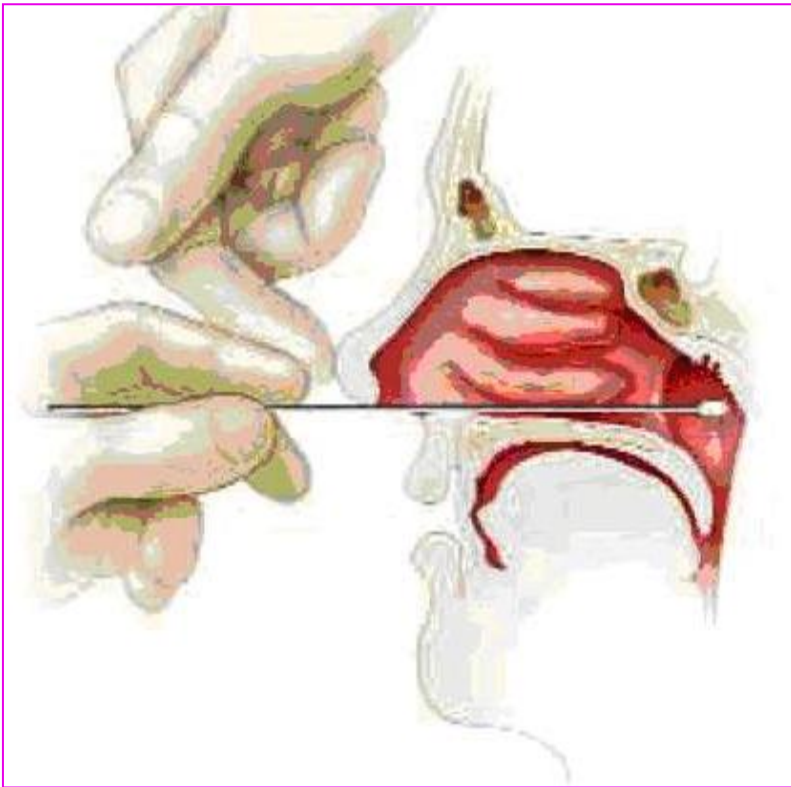
- Dragsted a kol., 2004: Dánsko - 3 096 pacientov
 - B. pertussis*: 15,5 % (PCR)
 9,3 % (kultivácia)
 - B. parapertussis*: 2,0 % (PCR + kult.)

□ prečo i napriek vysokej citlivosti nízky záchyt ?

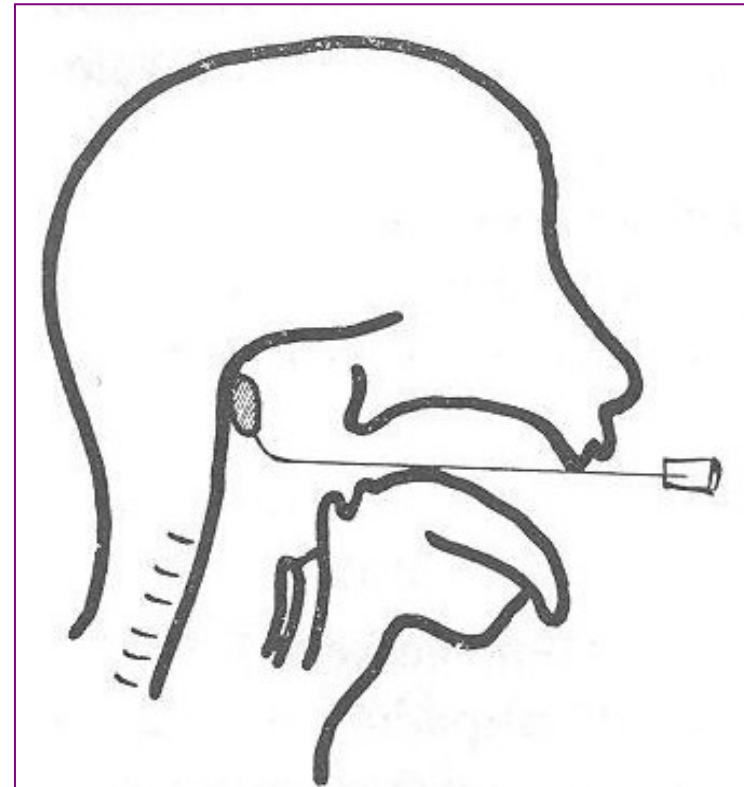
- **KEDY ?** - odber materiálu prvé 2 týždne ochorenia
- **KDE ?** - miesto odberu (klasický výter tonzíl a nosa je nedostatočný)

Odber materiálu

nazofaryngeálny výter cez **dutinu:**



nosovú



ústnu

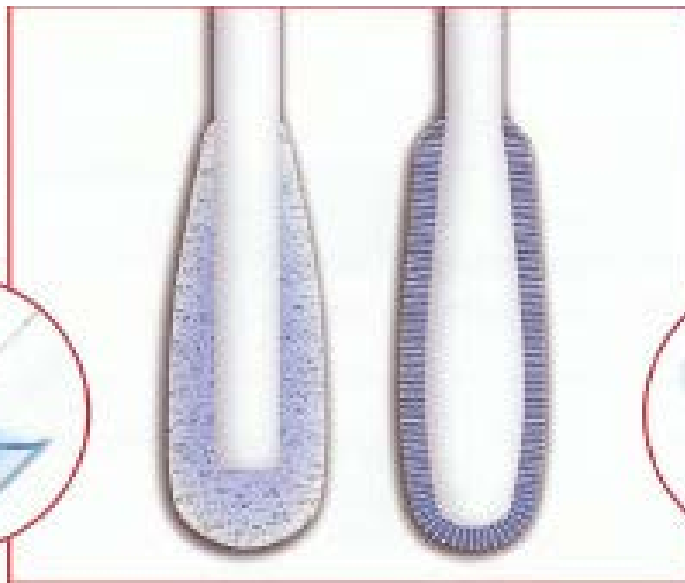
Čím odoberat' materiál ?

Nazofaryngeálny flexibilný tampón



Klasický tampón

navinuté vlákna
buničiny



Tampón typu flocked

nylonové vlákna orientované
rovnobežne



pôsobí ako mäkká kefka

- rýchlo a účinne zachytí bunky (elektrostatická + kapilárna sila)
- okamžité a spontánne uvoľňovanie do média

Kde nás posunuli zmeny v stanovení protilátok ?

Dynamika tvorby protilátok

□ primárna infekcia

- **IgM** - detekcia 5. - 10. deň od začiatku ochorenia, pretrvávanie 6 - 12 týždňov
 - **IgA** - detekcia od 12. dňa po nástupe ochorenia, pretrvávanie 6 - 24 mesiacov
 - **IgG** sa objavujú 2 - 3 týždne po začatí ochorenia, pretrvávanie roky
- reinfekcie bývajú sprevádzané zvýšenými hladinami IgG (IgA)

Sérologické metódy

- vyšetrenie izotypov (IgM, **IgA, IgG**)
 - ELISA**
 - western blot (PT-100)
 - nepriama imunofluorescencia
 - mikroaglutinácia (EU Perstrain group neodporúča)

- diagnostické súbavy môžu obsahovať rôzne antigény:
 - **pertusický toxín (PT)**
 - vysoko špecifický exotoxín (detekčný proteín infekcie)
 - IgG** detegované u ~ 90 % prípadov
 - IgA a IgM ~ 40 - 50 %

 - filamentózny hemaglutinín (FHA)
 - adenylát cykláza
 - pertaktín

Limitácie dôkazu protilátok proti BP

- ❑ diagnostika je zameraná na dôkaz ochorenia, nie na detekciu postvakcinačných protilátok
 - ❑ výnimočne sa detegujú i protilátky po očkovaní – interpretácia s ohľadom na očkovací kalendár
 - ❑ nález vysokých hladín IgG (IgA) > 1 rok po očkovaní môže svedčiť pre ochorenie
 - ❑ **postvakcinačná imunita krátka (cca 3-5 rokov)**
 - ❑ metóda voľby – PCR
- ❑ skřížená reaktivita *B. pertussis* / *B. parapertussis*
- ❑ u malého počtu pacientov sme zachytili IgG pred nástupom IgA (v kontrolnom vyšetrení)

Kvízová otázka

Nález IgG protilátok proti *B. pertussis* vo vyšetrovanej vzorke môže svedčiť pre:

- A. prekonanie infekcie v minulosti
- B. protilátky po očkovaní
- C. prebiehajúcu infekciu
- D. všetky možnosti sú správne

Správna odpoveď

Nález IgG protilátok proti *B. pertussis* vo vyšetrovanej vzorke môže svedčiť pre:

- A. prekonanie infekcie v minulosti
- B. protilátky po očkovaní
- C. prebiehajúcu infekciu
- D. **všetky možnosti sú správne**

Interpretácia anti-*B. pertussis* (ELISA)

- ❑ ak je nález jednoznačný – interpretácia z 1 vzorky
- ❑ ak nie je jednoznačný – odporúčaný odber 2. vzorky (odstup 2 - 3 týždne)
- ❑ pri interpretácii sa zohľadňuje:
 - výška hladiny IgG/IgA (prítomnosť IgA) v jednej vzorke
 - vek pacienta (očkovací kalendár, novorodenci)
 - výsledky:
 - ❑ predchádzajúcich vyšetrení (perzistencia)
 - ❑ PCR/kultivácie
 - ❑ ďalších vyšetrení (*B. parapertussis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* a pod.) – možná skřížená reaktivita napr. FHA
 - klinická diagnóza
 - poznámky ošetrojúceho lekára (vyšetrenie kontaktov, posledné očkovanie)

Kvízová otázka

Ktorá metóda sa v súčasnosti najviac používa pre dôkaz protilátok?

- A. aglutinačná mikrometóda s vyšetrením párových sér
- B. ELISA pre vyšetrenie izotypov Ig
- C. Western blot
- D. PCR

Správna odpoveď

Ktorá metóda sa v súčasnosti najviac používa pre dôkaz protilátok?

- A. aglutinačná mikrometóda s vyšetrením párových sér
- B. ELISA pre vyšetrenie izotypov Ig**
- C. Western blot
- D. PCR

Aké sú zmeny v diagnostike *B. parapertussis* ?

Sérologická diagnostika anti-*B. parapertussis* (MIF)

- IgG/IgA – **kvalitatívna metóda** (semikvantitatívna)
 - celobunkový antigén (konjugát – kozí anti-ľudský IgX značený fluoresceínom)
- skríning IgG; v prípade positivity doplnené o IgA
- možná skrížená reaktivita i s inými patogénmi
 - *B. pertussis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*,
H. influenzae
 - infekcia *B. parapertussis* možná aj napriek imunite proti
Bordetella pertussis (Wolfe a kol., 2007)

Kvízová otázka

Ktoré metódy sa v súčasnosti používajú pri diagnostike parapertussis?

- A. aglutinačná mikrometóda s vyšetrením párových sér
- B. mikroimunofluorescencia
- C. Western blot
- D. PCR

Správna odpoveď

Ktoré metódy sa v súčasnosti používajú pri diagnostike parapertussis?

- A. aglutinačná mikrometóda s vyšetrením párových sér
- B. mikroimunofluorescencia**
- C. Western blot
- D. PCR**

Výsledky stanovenia špecifických protilátok v HPL za obdobie 05/2009-2011

anti-*B. pertussis* (ELISA):

spolu vyšetrení	25 585
akútna alebo suspektne recentná infekcia	2 908 (11,4 %)
z toho 1 218 bez IgA (42 %)	

anti-*B. parapertussis* (MIF):

spolu vyšetrení anti- <i>B. parapertussis</i>	4 901
akútna alebo suspektne recentná infekcia	626 (12,8 %)

Možnosti terapie

- ❑ **cielená** – ATB

- **makrolidy**: (erytromycín), azitromycín, klaritromycín
- **kotrimoxazol**

➔ **PNC a CFS I. a II. generácie nie sú účinné !!!**

- ❑ **včasná** – katarálne štádium

- ❑ **podporná liečba**

- tlmenie kašľa, oxygenoterapia (krátkodobá – po záchvate)

- ❑ deti < 6 mesiacov a pacienti s ťažkým priebehom:

HOSPITALIZÁCIA + INTENZÍVNA STAROSTLIVOSŤ

Starostlivosť o kontakty

Domáce a úzke kontakty

- **imunizácia**
 - neimunizované deti
 - deti od 7 rokov a dospelí
- **chemoprofylaxia** – podľa veku, rizika, imunitného stavu
- **monitorovanie** – 21 dní po poslednom kontakte s chorým
- **izolácia hospitalizovaných** – 5 dní po začatí ATB liečby alebo 21 dní od začiatku paroxyzmov ak neindikované ATB

Ďakujem za pozornosť