

Katarzyna Piekarska¹, Magdalena Rzeczowska¹, Waldemar Rastawicki¹,
Anna Dąbrowska-Iwanicka³, Iwona Paradowska-Stankiewicz²

PRZYDATNOŚĆ DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ W ROZPOZNANIU KRZTUŚCA U OSOBY DOROSŁEJ Z NAPADOWYM KASZLEM *

¹Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

²Zakład Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

³Centrum Onkologii – Instytut

STRESZCZENIE

WSTĘP. Krztusiec jest ostrą, wysoce zaraźliwą chorobą układu oddechowego człowieka, wywołowaną przez pałeczki *Bordetella pertussis*. Choroba występuje głównie u dzieci, choć w ostatnich latach coraz częściej stwierdza się ją także u młodzieży i osób dorosłych. Ze względu na nietypowe objawy krztuśca u osób dorosłych, ograniczające się do suchego, napadowego i przedłużającego się kaszlu, choroba ta rzadko jest u nich rozpoznawana.

CEL PRACY. Celem pracy było wykazanie przydatności laboratoryjnej diagnostyki mikrobiologicznej w rozpoznaniu krztuśca u osób dorosłych na przykładzie osoby z suchym, napadowym, przewlekłym kaszlem.

MATERIAŁ METODY. Materiał do badań stanowiła płwocina (pobrana 25 stycznia 2013 roku) i dwie próbki surowicy (pobrane odpowiednio, 13 lutego i 19 kwietnia 2013 roku). Do mikrobiologicznej diagnostyki krztuśca zastosowano hodowlę, metodę in-house PCR, real-time PCR oraz test ELISA.

WYNIKI. Bakteriologiczne badanie płwociny przeprowadzone przy użyciu komercyjnego podłoża Bordetella Selective Medium firmy Oxoid nie wykazało obecności pałeczek *B. pertussis*. Badania przeprowadzone techniką real-time PCR, jak i PCR potwierdziły natomiast w badanej próbce płwociny obecność sekwencji insercyjnej IS481 oraz sekwencji promotora toksyny krztuścowej *ptx-Pr*, markerów typowych dla pałeczek *B. pertussis*. Badania serologiczne wykazały także diagnostycznie znamienne poziomy swoistych przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla pałeczek *B. pertussis* już w pierwszej uzyskanej próbce surowicy. W drugiej próbce surowicy, uzyskanej po ponad dwóch miesiącach od pierwszej, stwierdzono dodatkowo diagnostycznie znamienne spadki poziomu przeciwciał klasy IgA.

WNIOSKI. Przedstawione dane wskazują na wysoką przydatność laboratoryjnych metod w diagnostyce krztuśca u osób dorosłych z przewlekłym kaszlem. Zastosowanie tych metod umożliwia prawidłowe rozpoznanie choroby, szybkie wdrożenie właściwego leczenia, jak i zastosowanie odpowiednich procedur zapobiegających szerzeniu się zakażenia.

Słowa kluczowe: krztusiec u osoby dorosłej, *Bordetella pertussis*, diagnostyka mikrobiologiczna krztuśca, napadowy kaszel

WSTĘP

Krztusiec jest ostrą, wysoce zaraźliwą chorobą układu oddechowego, wywołowaną przez *Bordetella pertussis*, Gram-ujemną, tlenową pałeczkę. Działanie patogeniczne pałeczek krztuśca polega głównie na wy-

tworzeniu toksyn, w tym toksyny krztuścowej – pertussis toxin (PT), które uszkadzają urzęsiony nabłonek oddechowy i są odpowiedzialne za występowanie charakterystycznych objawów choroby. Transmisja drobnoustroju następuje drogą powietrzno-kropelkową lub w wyniku bezpośredniego kontaktu z wydzieliną

* praca została wykonana w ramach zadania nr 6/EM/2013.

dróg oddechowych osoby zakażonej. Okres wylęgania krztuśca wynosi średnio od 7 do 10 dni. W zależności od stopnia zaawansowania choroby, w jej przebiegu wyróżnić można fazy: nieżytową, kaszlu napadowego i zdrowienia (9, 12, 16).

Charakterystyczne objawy krztuśca tj. napadowy kaszel ze świstem wdechowym (tzw. „pianiem koguta”), wykrztuszaniem śluzu i następującymi po ataku kaszlu wymiotami, najczęściej występują u niemowląt i małych dzieci. Obecnie w wielu rozwiniętych krajach, w tym także i w Polsce, na krztusiec coraz częściej chorują osoby ze starszych grup wiekowych (2, 3, 5, 8, 12, 13). W odróżnieniu od małych dzieci, u młodzieży i osób dorosłych krztusiec przebiega z reguły łagodnie i mniej charakterystycznie. Często jedynym zauważalnym objawem choroby jest suchy, męczący i przedłużający się kaszel, występujący zwłaszcza w nocy (www.who). Należy podkreślić, że wczesna diagnostyka krztuśca u osób dorosłych jest niezmiernie istotna ze względu na to, że mogą oni stanowić źródło zakażenia pałeczkami *B. pertussis* dla niemowląt, wywołując u nich chorobę potencjalnie zagrażającą życiu.

Diagnostyka laboratoryjna stosowana w rozpoznawaniu krztuśca obejmuje: izolację drobnoustroju na podłożach sztucznych, metody serologiczne i molekularne.

Według ECDC (www.ecdc.europa.eu), oprócz kryteriów klinicznych, potwierdzeniem rozpoznania krztuśca jest dodatni wynik badania laboratoryjnego, uzyskany przynajmniej jedną z trzech metod, tj. hodowli, technik molekularnych lub serologicznych, jak również udowodniony związek epidemiologiczny z osobą z laboratoryjnie potwierdzonym krztuścem. W Polsce, zgodnie z ustawą o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (z dn. 5 grudnia 2008 r.) krztusiec podlega obowiązkowi zgłaszania, a potwierdzany jest głównie na podstawie objawów klinicznych i/lub wyników badań serologicznych.

Krztusiec nadal jest dość powszechnie występującą chorobą zakaźną, z okresowym wzrostem zachorowań pojawiającym się co 3 - 5 lat (www.cdc.gov). Według danych WHO, obecnie na całym świecie rocznie notuje się około 16 mln przypadków krztuśca, przy czym blisko 195 tys. kończy się zgonem. Według danych ECDC (1) w 2011 roku w 27 krajach UE i EEA, zgłoszono 19 743 (w tym 16 897 potwierdzonych) przypadków zachorowań na krztusiec, co dało zapadalność 5,57 na 100 tys. ludności. W Polsce, w 2011 roku, zarejestrowano 1 669 przypadków, przy zapadalności wynoszącej 4,33 na 100 tysięcy, natomiast w 2012 roku zarejestrowano 4 684 zachorowań, (w tym aż 32% - 1 501 osób wymagało hospitalizacji, przy zapadalności 12,16 na 100 tysięcy (10)).

Celem pracy było wykazanie przydatności laboratoryjnej diagnostyki mikrobiologicznej w rozpoznaniu krztuśca u osób dorosłych na przykładzie badania osoby z suchym, napadowym, przewlekłym kaszlem.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań. Materiał do badań bakteriologicznych i genetycznych stanowiła próbka płwociny uzyskana 25 stycznia 2013 roku od niehospitalizowanej, 43 letniej kobiety z suchym, męczącym kaszlem. W celu potwierdzenia krztuśca i określenia dynamiki poziomu swoistych przeciwciał, od pacjentki dwukrotnie uzyskano próbkę surowicy (tj. 13 lutego i 19 kwietnia 2013 roku).

Zastosowane metody diagnostyczne:

- 1. Hodowla.** Bakteriologiczne badanie płwociny w kierunku pałeczek *Bordetella* przeprowadzono przy użyciu komercyjnego podłoża Bordetella Selective Medium firmy Oxoid.
- 2. Metody molekularne.** Preparat genomowego DNA badanej próbki uzyskano przy użyciu komercyjnego zestawu „High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche) postępując zgodnie z zaleceniami producenta.

DNA *B. pertussis* poszukiwano przy zastosowaniu komercyjnego zestawu „Bordetella pertussis/parapertussis Real-Time Kit” firmy Diagenode. Reakcję real-time PCR przeprowadzono zgodnie z dołączoną do zestawu instrukcją producenta.

Obecności DNA pałeczek *Bordetella* poszukiwano również przy użyciu metody in-house PCR. Do identyfikacji wykorzystano chromosomalne markery, tj. poszukiwano sekwencji insercyjnej IS481 oraz sekwencji promotora toksyny krztuścowej *ptx*-Pr. Sekwencje użytych starterów oraz oczekiwaną wielkość produktów PCR podano w tabeli I. W celu amplifikacji wybranych markerów zastosowano następujące warunki termiczne: wstępna denaturacja DNA w temperaturze 94°C przez 10 min., a następnie 35 cykli reakcyjnych obejmujących trzy etapy: denaturację DNA w 94°C przez 45 s, przyłączanie starterów w temperaturze 68°C przez 45 s, polimeryzację DNA prowadzono w 72°C przez 60 s oraz końcową polimeryzację przebiegającą w temperaturze 72°C przez 5 min.

Jako kontrole dodatnie w reakcji PCR wykorzystano DNA wyizolowane ze szczepów referencyjnych: *Bordetella pertussis* Tohamal (CIP 81.32=NCTC 13251=ATCC BAA-589) oraz *Bordetella parapertussis* (CIP12822=NCTC 13253=ATCC BAA-587).

- 3. Odczyn immunoenzymatyczny ELISA:** Oznaczenie poziomu przeciwciał dla toksyny krztuścowej i włókienkowej hemaglutyniny pałeczek *B. pertussis* w trzech klasach immunoglobulin przeprowadzono komercyjnym odczynem ELISA NovaLisa Bordetella (NovaTec Immunodiagnostica), zgodnie z instrukcją podaną przez producenta.

WYNIKI I DYSKUSJA

Przez wielu lekarzy krztusiec nadal utożsamiany jest z chorobą zakaźną wieku dziecięcego, rzadko uwzględnianą w diagnostyce różnicowej przewlekłego kaszlu u osób dorosłych. Jednakże w świetle zachodzących zmian obserwowanych na świecie dotyczących epidemiologii krztuśca, konieczne wydaje się uwzględnienie pałeczek *Bordetella* wśród potencjalnych czynników zakażeń układu oddechowego także u młodzieży i osób dorosłych (2, 3, 5, 11).

W omawianym przypadku, u pacjentki występował powodujący ból mięśni brzucha suchy, męczący kaszel o charakterze napadowym, z liczbą ok. 12 ataków na dobę, pojawiający się zarówno w dzień, jak i w nocy, trwających od kilku do kilkunastu minut. Atakom kaszlu nie towarzyszyła gorączka ani inne objawy kliniczne. Po około dwóch tygodniach od pojawienia się kaszlu, od pacjentki pobrano płwocinę, którą przekazano do Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH. W przeprowadzonym wywiadzie ustalono, że na początku stycznia 2013 roku u 9 letniego dziecka pacjentki, które przeszło pełny cykl szczepień wg programu, występował suchy, męczący i napadowy kaszel kończący się wymiotami, zaś wyniki badań serologicznych sugerowały przebyte zakażenie pałeczkami krztuśca. W związku z tym, otrzymaną od pacjentki próbkę płwociny zbadano metodami biologii molekularnej w kierunku atypowych czynników powodujących zakażenie dróg oddechowych oraz krztuśca.

Pomimo, że hodowla pałeczek *B. pertussis* jest metodą zalecaną przez WHO i nadal uznawaną jako „złoty standard” w laboratoryjnym potwierdzeniu krztuśca, w omawianym przypadku z badanego materiału klinicznego, tj. płwociny nie udało się wyhodować pałeczek *B. pertussis*. Mogło to się wiązać z faktem, że próbka płwociny została pobrana do badania w późnym okresie choroby (ponad dwa tygodnie od początku objawów klinicznych), gdy prawdopodobieństwo wyhodowania *B. pertussis* gwałtownie spada (3, 5). Przyczyną braku sukcesu w uzyskaniu hodowli mógł być także nie do końca właściwy, choć u dorosłych dopuszczalny (3, 14), materiał kliniczny przeznaczony do diagnostyki krztuśca tj. płwocina. Najbardziej wiarygodną i zalecaną próbką do badań w kierunku wykrywania pałeczek *Bordetella* jest aspirat lub wymaz z nosogardła (9, 16). Dodatkowym czynnikiem, mogącym mieć wpływ na ujemny wynik hodowli, był również wiek pacjentki. Uważa się bowiem, że szansa wyhodowania pałeczek *B. pertussis* od osób dorosłych jest niższa niż u dzieci (3).

Obecnie, w wielu laboratoriach na świecie zajmujących się diagnostyką krztuśca, hodowla zastępowana jest przez łańcuchową reakcję polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*). Przy jej użyciu możliwe jest wykrywanie DNA *Bordetella* w próbkach materiału

klinicznego uzyskanego już od wczesnego etapu choroby aż do 5 tygodnia jej trwania. W porównaniu z hodowlą, PCR jest metodą zdecydowanie bardziej czułą (zwłaszcza w późnej fazie choroby, czy po rozpoczętej antybiotykoterapii) (7, 14). Ponadto, metoda ta pozwala na uzyskanie wyniku w krótkim czasie, tj. 1-2 dni, co jest bardzo istotne ze względu na możliwość wdrożenia odpowiedniego leczenia (7). Najbardziej zalecaną i najczęściej stosowaną przez ośrodki referencyjne techniką jest *real – time* PCR. Na rynku dostępnych jest wiele zestawów komercyjnych do *real – time* PCR, zawierających primery amplifikujące tylko jedną sekwencję docelową, tj. sekwencję insercyjną *IS481 B. pertussis*. Według najnowszych danych piśmiennictwa przy zastosowaniu tylko sekwencji *IS481*, uzyskać można fałszywie dodatnie wyniki. Stwierdzono bowiem, że *IS481* może występować także w genomie innych gatunków *Bordetella*, tj. *B. bronchiseptica* i *B. holmesii* (4, 14). W świetle tych informacji specjaliści z ośrodków referencyjnych, w celu zwiększenia czułości wykrywania *B. pertussis*, zalecają stosowanie dodatkowej sekwencji docelowej, tj. regionu promotora genu toksyny krztuścowej.

W omawianym przypadku, w płwocinie pacjentki, DNA *B. pertussis* wykryto zarówno komercyjnym zestawem *real – time* PCR, jak i opracowanym we własnym zakresie testem PCR, w którym potwierdzono również obecność drugiego markera charakterystycznego dla pałeczki krztuśca, tj. promotora toksyny krztuścowej.

Na podstawie wyników uzyskanych metodami molekularnymi u pacjentki wdrożono 7 dniowe leczenie klarytromycyną, początkowo w dawce 2 x 500 mg/dzień, a następnie 2 x 250 mg/dzień.

W Polsce, w mikrobiologicznej diagnostyce krztuśca stosowane są przede wszystkim badania serologiczne wykrywające w surowicy osób chorych swoiste przeciwciała. W rutynowej serodiagnostyce najczęściej używany jest komercyjny test immunoenzymatyczny – ELISA, umożliwiający określenie poziomu przeciwciał w poszczególnych klasach immunoglobulin dla toksyny krztuścowej i/lub włókienkowej hemaglutyniny. W przeciwieństwie do badań genetycznych, które umożliwiają potwierdzenie zakażenia już w jego początkowej fazie, badania serologiczne pozwalają na potwierdzenie etiologii choroby w późniejszej fazie, zazwyczaj dopiero w 2-3 tygodniu od wystąpienia objawów klinicznych. Dodatkową trudność w interpretacji wyników badań serologicznych u osób podejrzanych o krztusiec, stanowi obecność w krwi przeciwciał poszczepiennych, szczególnie klasy IgG. Tak więc, podstawową zasadą w serologicznej diagnostyce krztuśca powinno być dążenie do wykazania serokonwersji, tj. diagnostycznie znamiennego przyrostu poziomu przeciwciał w co najmniej dwóch próbkach surowicy uzyskanych w odstępie 2-4 tygodni (6). Trzeba mieć

jednak na uwadze fakt, że w przypadku uzyskania pierwszej próbki surowicy do badań w późniejszym okresie choroby, poziom przeciwciał może być już na tyle wysoki że nie można oczekiwać znamiennego przyrostu jego poziomu w drugiej próbce. Przyjmuje się więc, że wzrost poziomu przeciwciał o 100% lub spadek tego poziomu o 50% w kolejnej próbce surowicy jest najlepszym dowodem na aktualne zakażenie pałeczkami krztuśca (6). W opisywanym przypadku, w pierwszej próbce surowicy uzyskanej od pacjentki 13 lutego, diagnostycznie znamienne poziomy swoistych przeciwciał dla pałeczek *B. pertussis* (powyżej 11 jednostek NTU) wykryto w trzech klasach immunoglobulin, tj. IgA (20,26), IgG (17,52) i IgM (20,08). W drugiej próbce surowicy, uzyskanej 19 kwietnia, stwierdzono diagnostycznie znamienne spadek poziomu przeciwciał w klasie IgA (9,87 jednostek NTU). Ponadto, odnotowano również spadek poziomu przeciwciał w klasie IgG i IgM (odpowiednio 13,44 i 19,65).

PODSUMOWANIE

Ze względu na obserwowany w wielu krajach, w tym także i w Polsce, wzrost liczby zachorowań na krztusiec, chorobę tę należy oceniać jako powracające zagrożenie dla zdrowia publicznego, nie tylko wśród dzieci, ale również młodzieży i osób dorosłych. Wzrastająca liczba osób chorych na krztusiec w starszych grupach wiekowych stanowi istotny czynnik transmisji zakażeń występujących u nieuodpornionych lub nie w pełni uodpornionych noworodków i małych dzieci, dla których choroba ta może stanowić poważne zagrożenie dla

życia. Ponadto, nierozpoznanie i niediagnozowanie krztuśca u młodzieży i osób dorosłych przekładać się może na niedoszacowanie danych epidemiologicznych (15). Osoby dorosłe z długotrwałym kaszlem, który jest dominującym i często jedynym objawem choroby, rzadko badane są w kierunku zakażenia pałeczkami *B. pertussis*. Może to być uwarunkowane trudnościami związanymi z diagnostyką krztuśca, tj. kosztem badań diagnostycznych czy możliwością wykonania tylko oznaczeń serologicznych. Na obserwowaną sytuację wpływa także powszechnie stosowana w leczeniu chorób układu oddechowego antybiotykoterapia empiryczna, która eliminuje możliwość wykrycia etiologicznego czynnika odpowiedzialnego za zakażenie. Przedstawiony przypadek pokazuje, jak pomocna okazuje się diagnostyka mikrobiologiczna w rozpoznaniu krztuśca, zwłaszcza u osób dorosłych. Wykonanie badań diagnostycznych oraz właściwy dobór metod w zależności od fazy choroby umożliwia szybkie wdrożenia ukierunkowanego leczenia, jak również pozwala na zastosowanie odpowiednich procedur zapobiegających szerzeniu się zakażenia.

Otrzymano: 3.06.2014 r.

Zaakceptowano do publikacji: 5.09.2014 r.

Adres do korespondencji:

Dr Katarzyna Piekarska
Zakład Bakteriologii
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
-Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24
00-791 Warszawa
e-mail: kpiekarska@pzh.gov.pl