

PERTOSSE

MALATTIA RIEMERGENTE E TEST DI
LABORATORIO



PERTOSSE

- *La Bordetella(pertussis,parapertussis e bronchiseptica), è un patogeno esclusivamente umano,la trasmissione avviene quando il batterio supera le difese immunitarie delle vie aeree superiori.*
- *La Bordetella non supera l'epitelio respiratorio,a differenza della tossina e degli altri suoi componenti antigenici che con le loro azioni spiegano dal punto di vista patogenetico i sintomi respiratori della malattia.*

PERTOSSE

- Nel bambino la sintomatologia tipica è caratterizzata da tosse ripetitiva parossistica che frequentemente termina con un'inspirazione forzata tipo urlo, può essere presente vomito e nei casi più impegnativi, specialmente nei lattanti, si manifestano petecchie al volto ed emorragie sottocongiuntivali , polmonite, otite media, apnea con cianosi, vomito grave, convulsioni, emorragie cerebrali possono costituire importanti complicazioni della pertosse nel bambino.

PERTOSSE

- Nell'adulto la diagnosi di pertosse non è sempre agevole per la presentazione clinica spesso aspecifica e sfumata, dato che una tosse di lunga durata può essere espressione di diverse situazioni patologiche .

PERTOSSE

Nonostante il raggiungimento di una copertura vaccinale estesa, la pertosse è ancora endemica . Questa infezione è fortemente riemersa negli ultimi dieci anni nei Paesi industrializzati .



PERTOSSE

I vaccini ottenuti da organismi interi inattivati di *Bordetella pertussis* sono disponibili fin dal 1940 .

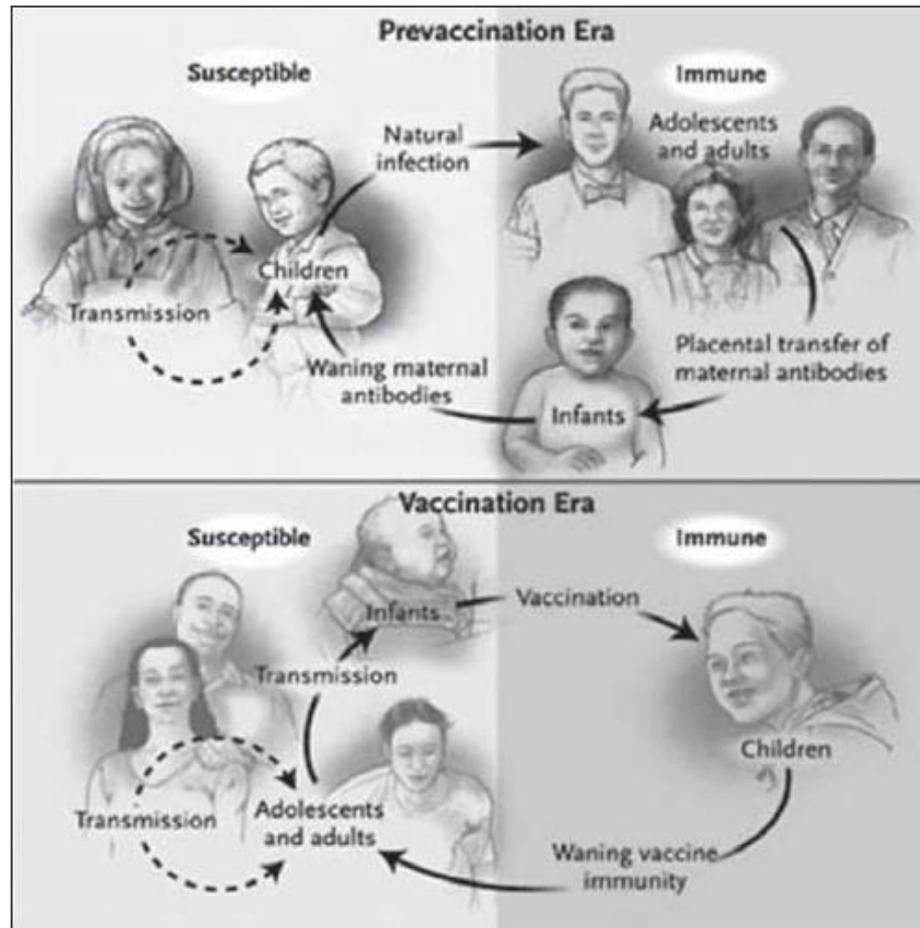
Sono stati somministrati come parte di un vaccino combinato contro difterite-tetano-pertosse, e sono stati molto efficaci, ma associati a un'alta reattogenicità. Questo ha portato nei primi anni '90 del secolo scorso allo sviluppo di vaccini acellulari (aP), anch'essi associati ai vaccini contro la difterite e il tetano (DTaP). Il DTaP è ora utilizzato normalmente in tutti i Paesi industrializzati.

PERTOSSE

- Nei paesi ad alta copertura vaccinale in età pediatrica, i bambini risultano immuni, ma l'immunità ha una durata limitata, la frequenza dei boosters naturali è ridotta e pertanto gli adolescenti e gli adulti divengono suscettibili insieme ai lattanti non ancora protetti dalla vaccinazione (Fig. 3).

PERTOSSE

Figura 3. Epidemiologic “Life Cycles” of *B. pertussis* before and after the Generalized Use of Pertussis Vaccine (da Hewlett et al., 2005) ⁶.



PERTOSSE

Dai dati della letteratura si può ipotizzare che l'aumento del numero dei casi di pertosse, soprattutto fra gli adolescenti e adulti, è dovuto alla diminuzione della protezione indotta dalla vaccinazione con i nuovi vaccini acellulari (aP) . Un esempio emblematico è l'epidemia di pertosse avvenuta in California nel 2010. In molti Stati americani, tra cui la California, è obbligatorio, per l'ingresso alla scuola, aver ricevuto cinque dosi di DTaP, con la quinta dose generalmente somministrata in bambini tra i 4 e i 6 anni di età.

Ciononostante, nel 2010, in California si è avuta una grande epidemia di pertosse, con tassi d'incidenza più alti dal 1958.

Questa epidemia ha permesso di quantificare il tempo di decadenza della protezione verso la pertosse indotta dal vaccino DTaP.

Gli autori dello studio hanno potuto determinare che la protezione viene meno in un lasso di tempo di 5 anni dopo la quinta dose di richiamo .

La situazione a livello mondiale, e ovviamente anche nei Paesi europei, induce quindi a definire la pertosse come una malattia riemergente.

PERTOSSE

- Nel 2002 è stata descritta una epidemia di pertosse a Catania con 72 casi ospedalizzati, di questi, 30 erano lattanti di età inferiore a 4 mesi, quindi non vaccinati. In questo gruppo, ben 10 risultavano contagiati da un soggetto di età superiore a 14 anni in ambito familiare.

Diagnosi di laboratorio della pertosse

L'ECDC(EUROPEAN CENTRE for DISEASE PREVENTION and CONTROL) ha posto l'accento sull'importanza di migliorare la diagnosi di laboratorio della pertosse per il trattamento, per la prevenzione e per la valutazione dei dati di sorveglianza.

PERTOSSE

- In Europa, l'Italia è uno dei pochi paesi che notifica i casi di pertosse per lo più clinicamente.
- A seguito di incontri avvenuti dal 2010 al 2012, organizzati dall'ECDC su queste problematiche, è stata intrapresa un'azione centrale del Ministero della Salute che ha tra gli obiettivi quello di uniformare anche l'Italia ai criteri diagnostici europei per la pertosse.
- In quest'ambito è iniziata un'azione di ricognizione da parte dell'ISS che ha permesso da un lato di individuare quali laboratori nel nostro Servizio Sanitario Nazionale (SSN) eseguano saggi per la diagnosi di pertosse e dall'altro capire quali saggi siano utilizzati e se conformi a quelli suggeriti a livello europeo.

Istituto Superiore di Sanità

**Pertussis in Italy: identification of the National Health Service
laboratories performing pertussis diagnosis and
evaluation of used procedures.**

Clara Maria Ausiello, Paola Stefanelli, Maria Carollo, Cecilia Fazio,
Anna Maria Marella, Stefania Iannazzo, Maria
Grazia Pompa
2014



RAPPORTI ISTISAN 14|3

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Pertosse in Italia: ricognizione dei laboratori
di diagnosi del Servizio Sanitario Nazionale
e valutazione delle tecniche utilizzate**

C.M. Ausiello, P. Stefanelli, M. Carollo, C. Fazio,
A.M. Marella, S. Iannazzo, M.G. Pompa



PERTOSSE

Rapporti ISTISAN 14/3

2. RISULTATI

2.1. Ricognizione dei laboratori che eseguono la diagnosi di pertosse

Un totale di 38 su 185 laboratori contattati, circa il 20%, hanno risposto al questionario. Dei laboratori che hanno risposto (i cui responsabili sono riportati in Appendice A), 25 hanno dichiarato di eseguire saggi diagnostici per la pertosse.

La Figura 3 riassume i risultati: sono indicati in ciascuna regione con il quadrato bianco i laboratori che non hanno risposto mentre con il quadrato grigio quelli che hanno risposto dei 185 laboratori contattati, di questi nel quadrato nero il numero di quelli che effettivamente eseguono i saggi diagnostici per la pertosse.

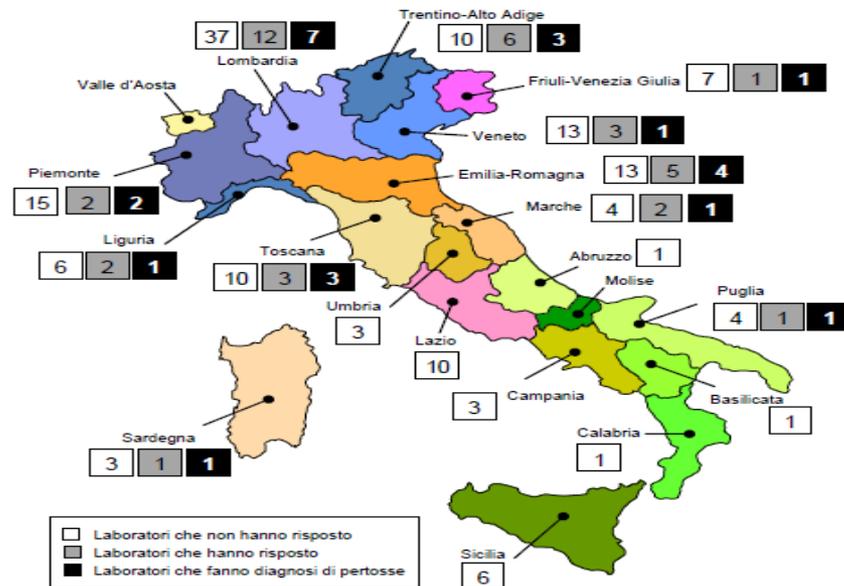


Figura 3. Numero di laboratori contattati (totale 185) che non hanno risposto, quelli che hanno risposto e che eseguono i saggi diagnostici per la pertosse, per Regione (i dati raccolti si riferiscono al 2009)

PERTOSSE

DIAGNOSI DI LABORATORIO

- 1) diagnostica colturale
- 2) diagnostica molecolare
- 3) diagnostica sierologica

Diagnosi di laboratorio della pertosse

Rapporti ISTISAN 14/3

Il saggio più idoneo per diagnosticare la pertosse dipende dalla fase temporale della malattia. Nelle indicazioni fornite dall'ECDC e dai *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* degli USA si raccomanda una combinazione di saggi diagnostici come schematizzato dalla Figura 5.

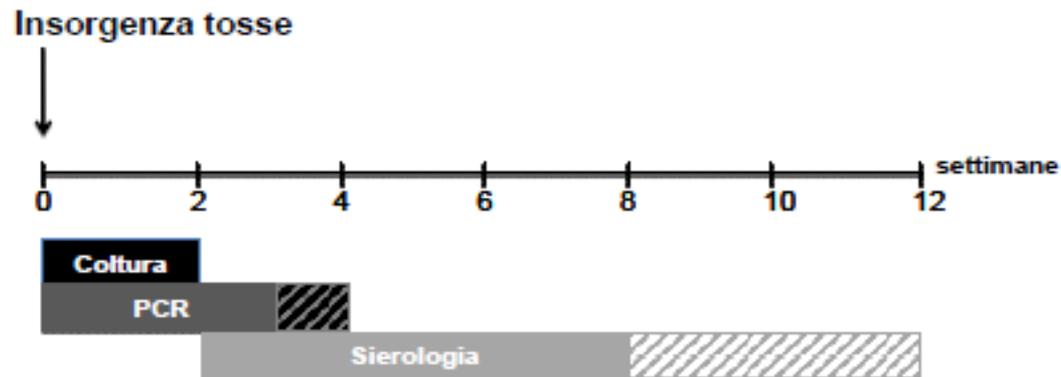


Figura 5. Saggi diagnostici ottimali a secondo della fase temporale della malattia (settimane)

In presenza di tosse fino a 2 settimane si suggerisce l'utilizzo simultaneo di coltura e PCR; in presenza di tosse da 2 a 4 settimane la PCR e il dosaggio delle IgGPT nel siero; in presenza di tosse per più di 4 settimane i saggi sierologici permettono una corretta diagnosi.

Diagnosi di laboratorio della pertosse

Diagnostica culturale pertosse

La *World Health Organization (WHO)* considera la diagnosi culturale il gold standard per la conferma di laboratorio di un caso sospetto di pertosse .

L'isolamento del ceppo batterico permette di conoscere le caratteristiche genetiche del ceppo e di investigare la sensibilità ai farmaci utilizzati per il trattamento terapeutico. Tuttavia, una criticità, che rende **poco sensibile** il metodo culturale, è rappresentata dalla somministrazione di farmaci prima del prelievo nel retro faringe. Il tasso più elevato di conferma tramite coltura si ha nelle prime due settimane, in corrispondenza della fase catarrale. Il campione va seminato entro 2 ore dal prelievo su piastre selettive e non per la crescita di *Bordetella*.

Diagnosi di laboratorio della pertosse

Diagnostica molecolare pertosse:

La diagnosi molecolare d'infezione da *Bordetellae* è eseguita su DNA estratto da un campione clinico, generalmente **tampone nasofaringeo o aspirato nasofaringeo**. È una diagnostica rapida (risultato entro 2-3 ore), utilizzabile entro 2-3 settimane dall'insorgenza della tosse, particolarmente utile nei neonati nei primi mesi di vita.

Diagnosi di laboratorio della pertosse

- **Diagnostica molecolare pertosse:**

La PCR ha una sensibilità ottimale nelle prime tre settimane di tosse quando il DNA batterico è ancora presente nel retrofaringe.

Dopo la quarta settimana la quantità di DNA batterico diminuisce rapidamente ed è preferibile l'utilizzo del dosaggio sierologico.

Diagnosi di laboratorio della pertosse

- **Diagnostica sierologica pertosse**
- I saggi ELISA possono essere fatti con antigeni purificati o misti, ma **solo la tossina della pertosse è specifica per *B. pertussis***
- . *L'emagglutinina filamentosa (FHA) e la pertactina (PRN) sono infatti presenti in altre specie di Bordetellae e in altri batteri quali Haemophilus species, Mycoplasma pneumoniae, Escherichia coli.*
- Gli studi si sono concentrati principalmente su anticorpi di isotipo IgG. Il ruolo degli anticorpi di isotipo IgA e IgM come indice di risposta protettiva non è ancora completamente chiaro .
- Concentrazioni di anticorpi specifici per gli antigeni di *Bordetella* possono essere misurati quantitativamente ed espressi in unità internazionali (*International Unit, IU*) per mL (*IU/mL*) rispetto a uno standard internazionale.(Siero di riferimento FDA)

Diagnostica sierologica di *Bordetella pertussis*

In accordo con le richieste dell'ECDC e del Ministero della Salute abbiamo implementato nel nostro laboratorio i saggi per la diagnosi della pertosse, utilizzando tecniche CLIA *per il dosaggio sierologico degli anticorpi di classe IgG specifici per la tossina della pertosse (IgGPT)* e stiamo cercando di adeguare le tecniche di diagnostica molecolare rapida (PCR) ai saggi proposti dall'ECDC

Diagnosi di laboratorio della pertosse

Diagnostica sierologica pertosse

Nel 2011 sono state pubblicate delle linee guida in cui un gruppo di esperti (EUPertstrain group) suggeriscono che, per una corretta diagnosi sierologica della pertosse, deve essere utilizzato come antigene di cattura la **tossina**.

Essi scoraggiano l'uso di altri antigeni nella diagnostica di routine come l'FHA in quanto non specifici per la B.pertussis .

Valori di IgG PT superiori a 120 IU/mL indicano un'infezione recente, mentre quelli compresi fra 60 e 120 IU/mL possono suggerire un contatto recente ma non sicuro.

Diagnosi di laboratorio della pertosse

- Utilizzando la sierologia sono generalmente necessarie almeno due determinazioni a distanza di tempo che possano dimostrare una **variazione del tasso anticorpale**, ma il riscontro di un titolo di IgG anti PT > 100-125 EU/ml (siero di riferimento FDA) può essere considerato un marcatore sufficiente di infezione batterica recente. Molti autori consigliano di utilizzare congiuntamente la PCR per Bordetella con la sierologia nelle prime 2-3 settimane di tosse, ma dato che la diagnosi è generalmente sospettata in periodi successivi, l'utilizzo di un singolo campione sierologico dove determinare le IgG anti tossina pertossica, può essere considerato idoneo.

Diagnosi di laboratorio della pertosse

- **Diagnostica sierologica pertosse**
- La diagnosi sierologica basata su campioni appaiati è un metodo sensibile e specifico e dovrebbe registrare un aumento di IgGPT dal primo al secondo campione.
- Tuttavia, anche in sieri appaiati, può succedere che non si verifichi un aumento di IgG specifiche dovuto alla non ottimale tempistica della raccolta dei sieri.
- In questi casi la diagnosi è basata su una diminuzione dei livelli di anticorpi tra il campione prelevato nella fase acuta e nella fase convalescente.
- La difficoltà di ottenere due prelievi fa sì che la diagnosi basata su un singolo campione sia quella prevalentemente utilizzata.

Diagnosi di laboratorio della pertosse

La diagnosi sierologica può essere validamente interpretata solo dopo almeno 1 anno dalla vaccinazione con vaccini aP che, come noto contengono la PT, FHAePRT (tossina, emoagglutinina filamentosa, pertactina).
come antigeni vaccinali.



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Unità Sanitaria Locale della Romagna

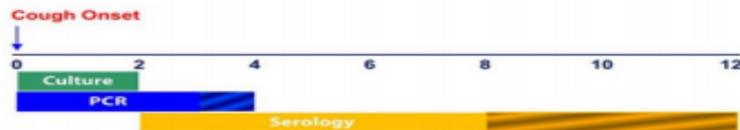


AUSLMicroLettera

n. 8: Febbraio 2015. LA DIAGNOSI DELLA PERTOSSE

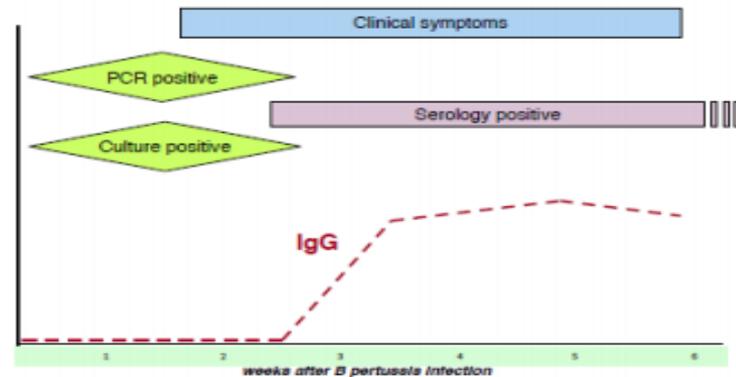
L' Unità Operativa di Microbiologia dell' AUSL della Romagna, allineandosi con le linee guida dell'ECDC che raccomandano l'impiego di test basati sulla ricerca di anticorpi anti-tossina pertussica, ha recentemente modificato l' algoritmo diagnostico per la diagnosi sierologica della pertosse. Il nuovo algoritmo prevede in prima battuta la determinazione degli anticorpi di classe IgG. Se questi risultano negativi (<40 UI/ml) o positivi (>100) si prosegue con la validazione, consigliando di effettuare un ricontrollo a distanza di 10-15 giorni nel caso di sintomatologia clinica all'esordio nel primo caso (nelle prime due settimane dall'infezione non è possibile rilevare gli anticorpi) o correlando la risposta immunitaria a possibile contatto recente (infezione o vaccinazione entro i 12 mesi) nel secondo caso. Nel caso in cui i valori di IgG risultano tra 40 e 100 UI/ml, il sistema procede con l'aggiunta automatica degli anticorpi di classe IgA: se risultano <15 U.I/ml si può escludere un'infezione recente, se risultano >20 U.I/ml, si ipotizza una possibile infezione recente.

Optimal Timing for Diagnostic Testing (weeks)

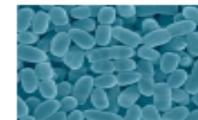


Laboratory confirmation of pertussis

EJMAC.NET



Al fine di garantire l'utilizzo di una combinazione di test, l'algoritmo diagnostico è stato completato con l'introduzione di metodiche di biologia molecolare. In particolare, è possibile eseguire una PCR multiplex che permette la rilevazione semiquantitativa di un pannello di patogeni respiratori (Batteri Respiratori ATIPICI) tra cui *B. pertussis* a partire da aspirato nasofaringeo. L'impiego di questo nuovo iter diagnostico permette di rendere la diagnosi di laboratorio relativa alla pertosse maggiormente specifica e significativa in tutte le fasi della malattia.



A cura di Patrizia Billi – Mara Della Strada – Simona Semprini – Anna Pierro - Vittorio Sambri
Info al numero 0547 39 4807/4808

conclusioni

- La condivisione delle linee guida europee e delle maggiori società scientifiche del settore e la definizione di nuovi protocolli diagnostici auspica il raggiungimento di una maggiore appropriatezza diagnostica.

conclusioni



Grazie per l'attenzione!