



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



PATOLOGIE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

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

Clara Maria Ausiello (a), Paola Stefanelli (a),
Maria Carollo (a), Cecilia Fazio (a), Anna Maria Marella (a),
Stefania Iannazzo (b), Maria Grazia Pompa (b)

*(a) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immuno-mediate,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Ufficio V - Malattie Infettive e Profilassi Internazionale,
Direzione Generale Prevenzione, Ministero della Salute, Roma*

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

Rapporti ISTISAN
14/3

Istituto Superiore di Sanità

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

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

2014, 34 p. Rapporti ISTISAN 14/3

La pertosse è fortemente riemersa negli ultimi dieci anni ed è la meno controllata tra le malattie prevenibili da vaccino nel mondo. In Europa, l'Italia è uno dei pochi paesi che notifica i casi di pertosse per lo più clinicamente. Il Centro Europeo per la Prevenzione e Controllo delle Malattie ha richiesto di implementare la conferma della diagnosi con saggi di laboratorio. In questo rapporto, che riassume i dati riferiti agli anni 2009-2012, sono stati individuati i laboratori del Servizio Sanitario Nazionale in grado di eseguire saggi di laboratorio per la conferma della pertosse e si è vagliato se i saggi impiegati siano conformi a quelli suggeriti a livello Europeo. I dati raccolti sottolineano la necessità di ulteriori sforzi per ottimizzare la diagnosi di laboratorio della pertosse, utilizzando saggi molecolari e sierologici conformi alle indicazioni europee per rendere più omogenea la capacità diagnostica, ottenendo dati di incidenza più attendibili.

Parole chiave: Pertosse; Diagnosi; Sorveglianza; PCR-diagnostica; IgGPT-ELISA; Isolamento dei ceppi; Sierologia

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, 34 p. Rapporti ISTISAN 14/3 (in Italian)

In the last ten years, pertussis is strongly re-emerged in developed countries and is the least well controlled of all vaccine-preventable diseases in the world. In Europe, Italy is one of the few countries that notify cases of whooping cough most clinically. The European Centre for Disease Prevention and Control has requested Italy to implement its laboratory confirmations of pertussis diagnosis. In this report, summarizing activity data from 2009-2012, the laboratories of the Italian National Health Service performing pertussis diagnosis are identified and evaluated whether the assays used are in accordance with those suggested at European level. The collected data indicate the need for greater efforts to optimize the diagnosis of pertussis by using appropriate molecular and serological assays. The goal is to make the diagnostic capability of obtaining more reliable data on the incidence of the disease accessible and homogeneous on the whole Italian territory.

Key words: Pertussis; Diagnosis; Surveillance; PCR-diagnostics; IgGPT-ELISA; Isolation of strains; Serology

Si ringrazia il Ministero della Salute per il supporto finanziario (Progetto CCM "Sorveglianza di laboratorio di infezioni batteriche da patogeni sottoposti a sorveglianza europea").

Per informazioni su questo documento scrivere a: clara.ausiello@iss.it

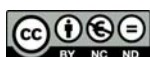
Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Ausiello CM, Stefanelli P, Carollo M, Fazio C, Marella AM, Iannazzo S, Pompa MG. *Pertosse in Italia: ricognizione dei laboratori di diagnosi del Sistema Sanitario Nazionale e valutazione delle tecniche utilizzate*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2014. (Rapporti ISTISAN 14/3).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Fabrizio Oleari*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Introduzione	1
1. Metodo per la raccolta dati	2
2. Risultati	4
2.1. Ricognizione dei laboratori che eseguono la diagnosi di pertosse	4
2.2. Diagnostica culturale, molecolare e sierologica di <i>Bordetella pertussis</i>	6
2.2.1. Diagnostica culturale	7
2.2.2. Diagnostica molecolare.....	8
2.2.3. Diagnostica sierologica.....	8
2.3. Saggi diagnostici utilizzati dai laboratori sul territorio nazionale.....	9
Conclusioni	13
Bibliografia	14
Appendice A	
Responsabili dei laboratori partecipanti.....	17
Appendice B	
Modalità di raccolta dei campioni e diagnosi culturale.....	21
Appendice C	
Diagnosi molecolare	25
Appendice D	
Diagnosi sierologica.....	29

INTRODUZIONE

Bordetella pertussis è un patogeno esclusivamente umano che causa la pertosse. Prima della introduzione della vaccinazione nell'infanzia, la pertosse era una delle principali cause di mortalità infantile in tutto il mondo (1-4). Tuttavia, nonostante il raggiungimento di una copertura vaccinale estesa, la pertosse è ancora endemica (1, 2, 4). Questa infezione è fortemente riemessa negli ultimi dieci anni nei Paesi industrializzati e rimane la malattia meno controllata tra quelle prevenibili da vaccino nel mondo e rappresenta un problema importante nell'ambito delle malattie prevenibili da vaccinazione in diversi Paesi europei (5-13).

I vaccini ottenuti da organismi interi inattivati di *Bordetella pertussis* sono disponibili fin dal 1940 (1). 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.

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) (14). 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 (15, 16). 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 (17).

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

Tra i Paesi europei, l'Italia notifica i casi di pertosse per lo più clinicamente. Il *Lo European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC: Centro europeo per la prevenzione e controllo delle malattie) ha chiesto di implementare anche nel nostro Paese la conferma della diagnosi di pertosse attraverso saggi di laboratorio.

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 abbiamo iniziato un'azione di ricognizione che permetta 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.

1. METODO PER LA RACCOLTA DATI

Al fine di uniformarsi alle direttive europee introducendo un saggio di laboratorio per la conferma di un caso sospetto di pertosse, si è concretizzata una sinergia tra l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l'Ufficio Malattie Infettive e Profilassi Internazionale della Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria del Ministero della Salute per sensibilizzare a livello regionale la necessità della conferma di laboratorio della diagnosi di pertosse.

Contemporaneamente c'è stata la necessità di individuare i laboratori in grado di fare diagnosi sul territorio nazionale e verificare se i saggi impiegati fossero adeguati.

A questo scopo, abbiamo inviato, via e-mail, un questionario a circa 200 laboratori distribuiti su tutto il territorio e già coinvolti in altri sistemi di sorveglianza, coordinati dall'ISS.

Ai responsabili dei laboratori sono state richieste informazioni relative agli approcci diagnostici utilizzati. Il questionario è stato formulato in modo da rispondere alle notizie richieste dall'ECDC agli organismi preposti.

Quest'attività di ricognizione, iniziata a gennaio 2010 è stata, poi, proseguita a febbraio 2011, aprile 2012 e a luglio-settembre 2013, per raccogliere i dati relativi alle diagnosi di pertosse effettuate negli anni 2009, 2010, 2011 e 2012, rispettivamente.

La Figura 1 riporta la scheda con cui sono state raccolte le informazioni relative all'anno 2009 e 2010.

Metodi di laboratorio utilizzati per la diagnosi di pertosse <i>(specificare il tipo di test se commerciale)</i>		
Coltura	<input type="checkbox"/> <i>si</i>	<input type="checkbox"/> <i>no</i>
PCR	<input type="checkbox"/> <i>si</i>	<input type="checkbox"/> <i>no</i>
ELISA	<input type="checkbox"/> <i>si</i>	<input type="checkbox"/> <i>no</i>
Luminex	<input type="checkbox"/> <i>si</i>	<input type="checkbox"/> <i>no</i>
Colorazione con anticorpi specifici in fluorescenza delle secrezioni nasofaringee	<input type="checkbox"/> <i>si</i>	<input type="checkbox"/> <i>no</i>
Altro		
Quanti campioni il vostro laboratorio riceve in un anno		
Quale è la proporzione di campioni saggiati in coltura		

Figura 1. Scheda di raccolta dati relativi al 2009-2010

Per la raccolta dei dati riguardanti gli anni 2011 e 2012 la scheda è stata modificata come indicato nella Figura 2. La modifica della scheda è stata dettata dalla necessità di capire meglio l'impatto della pertosse nei bambini al di sotto dell'anno di età e valutare la sua rilevanza sulla popolazione generale rispetto alle altre infezioni diagnosticate dal laboratorio. Serviva inoltre avere informazioni sui test diagnostici commerciali utilizzati nei laboratori per poter capire se fossero sufficientemente accurati rispetto agli standard suggeriti dall'ECDC.

Metodi di laboratorio utilizzati per la diagnosi di pertosse

Diagnosi sì no

Coltura sì no
 Se sì, quante? specificare.....

PCR sì no
 Se sì, quante? specificare.....

Sierologia sì no
 Se sì, quante? specificare.....

Altro.....

Campioni saggiati per la pertosse (n. totale).....

 Saggi positivi (n.).....

 Saggi positivi in bambini al di sotto dell'anno di età (n.).....

Esami microbiologici eseguiti nell'anno (n. totale).....

Nome dei test commerciali utilizzati... ..

.....

.....

Note

.....

.....

.....

Figura 2. Scheda di raccolta dati relativi al 2011-2012

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.

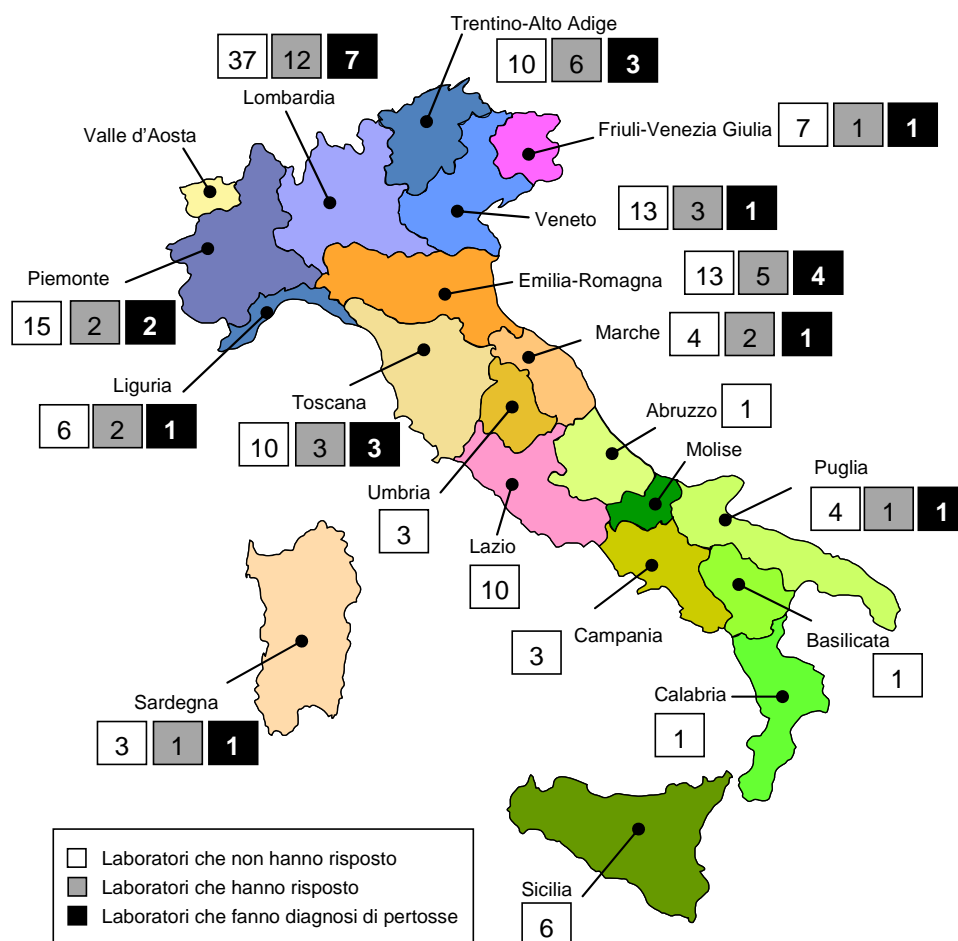


Figura 3. Numero di laboratori contattati (totale 185) che non hanno risposto, quelli che hanno risposto e che eseguono i saggi diagnostici per la pertosse, per Regione (i dati raccolti si riferiscono al 2009)

Il numero dei laboratori contattati nel Sud è stato inferiore rispetto al Nord del Paese, e i laboratori che hanno risposto sono stati meno nel Sud rispetto al Nord del Paese.

Nel 2011 abbiamo mandato una richiesta di aggiornamento analoga alla precedente per ottenere i dati riguardanti il 2010. Oltre ai 25 laboratori che avevano risposto abbiamo mandato la richiesta anche ai laboratori indicati dagli assessorati regionali della sanità e ad altri laboratori identificati tramite una richiesta inviata dalla Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) utilizzando il giornale dei soci.

La Figura 4 riassume i dati riguardanti il 2010. Con il quadrato bianco sono indicati i laboratori segnalati dagli assessorati regionali; i quadrati grigi rappresentano i laboratori contattati direttamente e i quadrati neri quelli che hanno risposto e che fanno diagnosi. In questo modo abbiamo identificato 32 laboratori che hanno dichiarato di eseguire saggi diagnostici per la pertosse.

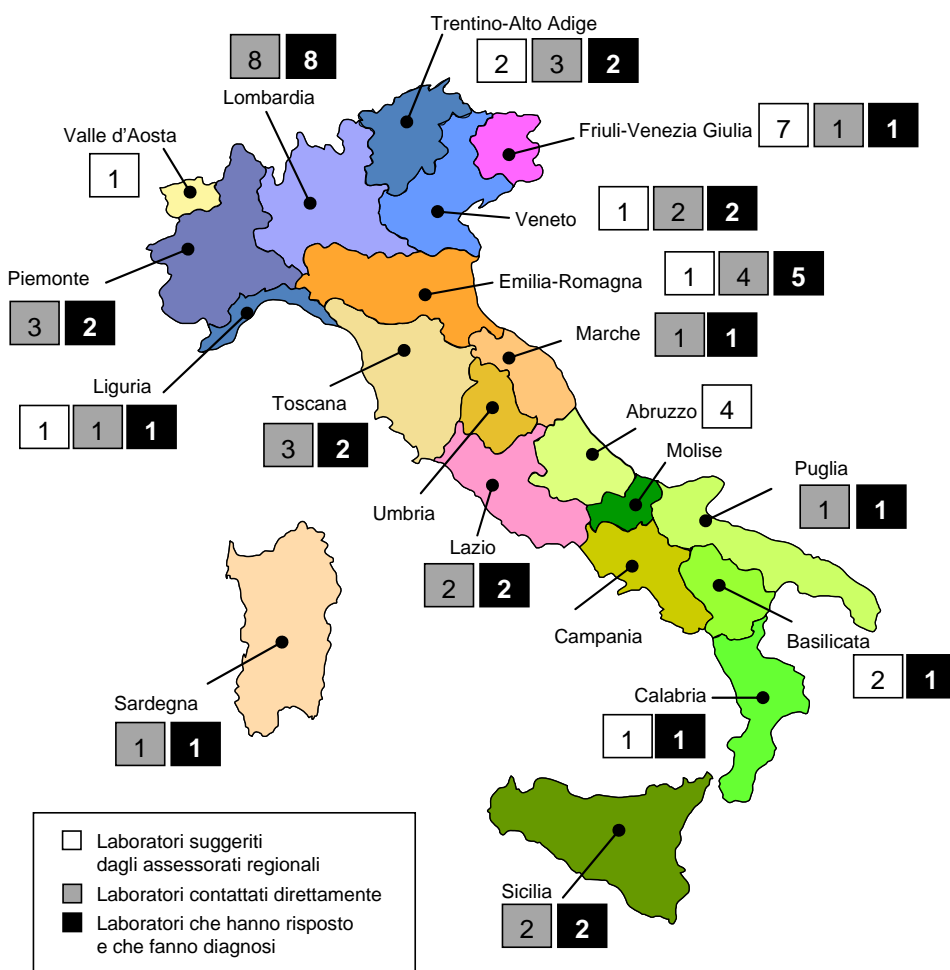


Figura 4. Numero di laboratori segnalati dagli assessorati regionali, quelli contattati direttamente e quelli che hanno risposto e che fanno diagnosi, per Regione (i dati raccolti si riferiscono al 2010)

Complessivamente i dati indicano una prevalenza di esecuzione dei saggi diagnostici nelle regioni del Centro-nord d'Italia. Inoltre, se si confrontano i dati del 2010 rispetto al 2009 si vede come si sia ottenuta una maggiore adesione anche nel sud Italia.

Una procedura analoga è stata eseguita per l'aggiornamento delle informazioni per il 2011 e il 2012. Oltre a coloro che avevano risposto precedentemente sono stati contattati anche nuovi laboratori. Nel questionario, oltre ai dati riguardanti l'esecuzione dei saggi diagnostici per la pertosse, con la richiesta di annotare il tipo di test usato, è stato chiesto anche il numero di saggi eseguiti per la diagnosi di pertosse rispetto al totale dei saggi microbiologici eseguiti nella struttura di appartenenza.

Insieme al questionario è stata inviata anche una selezione delle diapositive presentate al congresso dell'AMCLI tenutosi a novembre 2011. Una sessione, organizzata da noi in collaborazione con i membri della segreteria dell'AMCLI, è stata interamente dedicata ai problemi inerenti la sorveglianza e la diagnosi della infezione da *Bordetella pertussis*. La sessione del congresso ha visto riuniti gli operatori dei laboratori clinici operanti sul territorio ed è servita a sensibilizzare e a diffondere informazioni utili per uniformare la diagnosi della pertosse in Italia ai parametri europei.

Ai colleghi dei laboratori sono stati anche inviati due articoli, pubblicati su riviste internazionali da gruppi accreditati dall'ECDC, sulle metodiche più idonee per la diagnosi sierologica di pertosse e riconosciute a livello europeo (18, 19).

Dall'analisi dei dati riguardanti il 2011, il numero di laboratori che utilizzano test diagnostici per la pertosse non è aumentato.

Nel 2013 è stato richiesto un aggiornamento e con l'occasione sono stati inviati i protocolli consigliati dallo "EUpert-Labnet Surveillance network" nell'ambito dell'ECDC per il saggio diagnostico che utilizza la *Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction)* e il saggio sierologico per la determinazione delle immunoglobuline IgG anti-PT (IgGPT) (20, 21).

Dove l'informazione era disponibile (14 laboratori), va notato che la percentuale di saggi per la pertosse rispetto al numero dei saggi microbiologici totale eseguiti dal laboratorio è esigua e rappresenta in media solo lo 0,016, con un range che oscilla tra lo 0,001% e l'1,8%, di tutti i saggi microbiologici eseguiti dal laboratorio.

Ci sono ancora alcune regioni in cui non sono stati identificati i laboratori che eseguono saggi diagnostici per la pertosse e quindi quest'attività dovrà continuare, trovando possibilmente dei sistemi più efficienti e collegandosi più strutturalmente con le autorità competenti regionali. La percentuale dei laboratori che rispondono su base volontaria è ancora troppo bassa e in qualche modo va implementata.

2.2. Diagnostica colturale, molecolare e sierologica di *Bordetella pertussis*

In accordo con le richieste dell'ECDC e del Ministero della Salute abbiamo implementato nel laboratorio di riferimento in ISS i saggi per la diagnosi della pertosse, utilizzando l'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) per il dosaggio sierologico degli anticorpi di classe IgG specifici per la tossina della pertosse (IgGPT) e adeguando le tecniche di diagnostica molecolare rapida (PCR) ai saggi proposti dall'ECDC.

I saggi sierologici e PCR sono stati validati a livello europeo ed hanno superato i test EQA (*Interlab Quality Assurance*). I dettagli dei protocolli utilizzati per la PCR diagnostica e il saggio ELISA IgGPT e sono riportati negli Appendice C e D, rispettivamente.

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.

2.2.1. Diagnostica colturale

La *World Health Organization* (WHO) considera la diagnosi colturale il *gold standard* per la conferma di laboratorio di un caso sospetto di pertosse (22). 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 colturale, 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*.

I terreni più idonei sono l'agar Reagan Lowe, contenente carbone, e il Bordet Gengou con e senza cefalexina. La composizione dei terreni è descritta nelle linee guida della WHO "Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*" (22). Le piastre vanno incubate a 35-37°C in aerobiosi, con elevata concentrazione di umidità, e ispezionate a giorni alterni fino a 7 giorni.

Per l'identificazione microbiologica delle colonie isolate, sono previste, oltre all'osservazione della morfologia e della colorazione GRAM, l'esecuzione di saggi biochimici, quali il test dell'ossidasi e dell'ureasi, e la crescita su agar sangue. Per le colonie con il profilo biochimico corrispondente al genere *Bordetella*, si procede con l'agglutinazione su vetrino con antisiero specifico per *B. pertussis* e *B. parapertussis*. Sui ceppi isolati è valutata la sensibilità ad eritromicina, claritromicina e azitromicina, utilizzando il metodo E-test. Maggiori dettagli sul metodo sono riportati nell'Appendice B.

2.2.2. Diagnostica molecolare

La diagnosi molecolare d'infezione da *Bordetellae* è eseguita su DNA estratto da un campione clinico, generalmente tampone nasofaringeo o aspirato nasofaringeo, per mezzo della Real-Time PCR (RT-PCR). Il tempo stimato dall'arrivo al laboratorio del campione clinico al risultato finale è di circa 4 ore. Per l'esecuzione del saggio sono stati scelti target genici multipli per l'amplificazione, per consentire l'identificazione di genere e di specie e per aumentare la specificità del metodo. In breve, la positività per l'Insertion Sequence IS481 e per il promotore della tossina (ptx-pr) indica la presenza di DNA di *B. pertussis*; la positività per l'Insertion Sequence IS1001 e una sequenza specifica del gene *recA* sono invece specifici per *B. parapertussis* e *B. holmesii*, rispettivamente. Tutte le amplificazioni sono state messe a punto utilizzando il termociclatore LightCycler 2.0 (Roche), utilizzando come piattaforme sia sonde FRET che Taqman (23, 24). Per la diagnosi molecolare di *B. bronchiseptica* si esegue una PCR sul gene *fla*, seguendo il protocollo descritto da Hozbor *et al.* (25).

Per l'individuazione del DNA di *B. pertussis* e *B. parapertussis*, parallelamente ai metodi descritti, possono essere utilizzati kits diagnostici commerciali, quali il kit Dia-Bor-020 (Diagenode) e il kit Simplexa *Bordetella pertussis/parapertussis* (Focus Diagnostic). Maggiori dettagli sui metodi sono riportati nell'Appendice C.

2.2.3. Diagnostica sierologica

Per i saggi sierologici, gli ELISA per la pertosse sono stati impiegati nelle sperimentazioni sui vaccini acellulari e in studi sieroepidemiologici, e sono utilizzati per la diagnostica in vari paesi. I saggi ELISA possono essere fatti con antigeni purificati o misti, ma solo la PT è specifica per *B. pertussis* (1). 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* (19).

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 (1, 2, 19, 26, 27).

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 (28).

Nella pratica clinica, la diagnosi sierologica della pertosse è basata per lo più su un solo campione. 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 e l'incertezza nei valori diagnostici fa sì che la diagnosi basata su un singolo campione sia quella prevalentemente utilizzata.

Vi è un urgente bisogno di standardizzazione dei saggi ELISA per la diagnostica sierologica, come recentemente sottolineato anche dall'ECDC nello studio pubblicato da Tondella *et al.* (29).

Nel 2011 è stato pubblicato un articolo scritto dagli esperti dello *EUPertstrain group* (19) che suggerisce le linee guida per una corretta diagnosi sierologica della pertosse. Le raccomandazioni del gruppo di esperti possono essere riassunte nei seguenti punti:

1. Gli ELISA devono utilizzare come antigene di cattura la PT purificata, i campioni vanno saggiati in diluizione e la concentrazione di anticorpi va calcolata sulla parte lineare della curva rispetto a uno standard internazionale; i risultati vanno espressi quantitativamente in IU/mL.

2. I valori di IgG PT superiori a 120 IU/mL indicano un'infezione recente, mentre quelli compresi fra 50 e 120 IU/mL possono suggerire un contatto recente ma non sicuro.
3. La determinazione delle IgA anti-PT può essere utilizzata ma solo con livelli indeterminati di IgG anti-PT.
4. La diagnosi sierologia può essere validamente interpretata solo dopo almeno un anno dalla vaccinazione con vaccini aP che, come è noto contengono, la PT, FHA e PRN come antigeni vaccinali.

Il gruppo di esperti scoraggia l'uso di:

1. altri antigeni nella diagnostica di routine, come l'FHA, in quanto non sono specifici per la *B. pertussis*;
2. immunoblot per la sierodiagnosi di pertosse, perché i risultati non possono essere quantitativi;
3. microagglutinazione, a causa della sua mancanza di sensibilità;
4. altri metodi, come la fissazione del complemento o l'immunofluorescenza indiretta, perché presentano una bassa sensibilità e/o specificità.

I dettagli del metodo ELISA IgGPT utilizzato dal nostro laboratorio sono riportati nell'Appendice D.

2.3. Saggi diagnostici utilizzati dai laboratori sul territorio nazionale

La Figura 6 riassume i tipi di saggi diagnostici utilizzati dai laboratori. I dati sono stati raccolti nel corso degli anni dal 2009 al 2012.

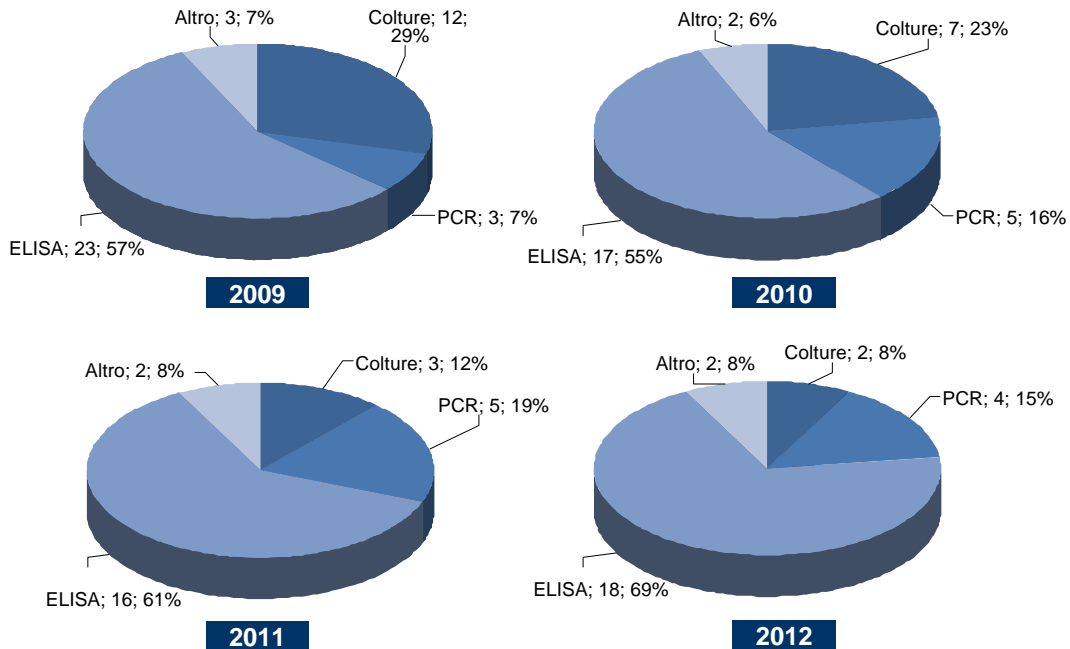


Figura 6. Distribuzione dei saggi diagnostici per la pertosse rilevata negli anni 2009-2012

I saggi ELISA sono quelli più usati segue poi la diagnostica su base colturale del batterio e quindi la PCR. Appare evidente che con il passare degli anni diminuiscono i laboratori che fanno diagnosi sulla base della coltura del batterio mentre si ha un incremento, anche se ancora limitato, dei laboratori che utilizzano la PCR.

Dall'analisi dei dati raccolti dal 2009 al 2012 nell'ambito della ricognizione dei laboratori che eseguono la diagnosi di pertosse, i kit commerciali ELISA sono il saggio preferibilmente utilizzato (Figura 7).

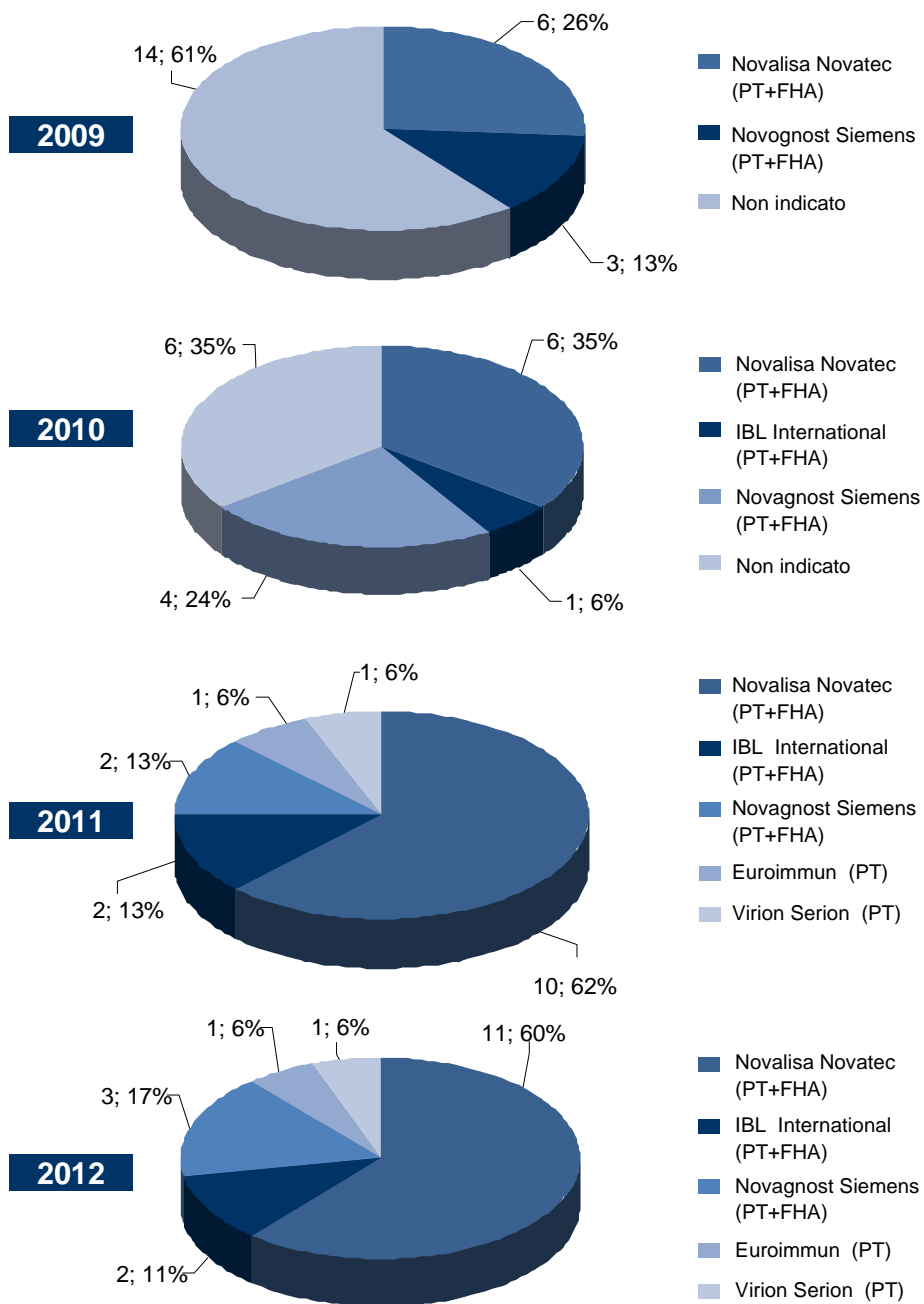


Figura 7. Tipo di kit ELISA utilizzato dai laboratori per nome commerciale e composizione di antigeni utilizzata per catturare gli anticorpi nel saggio negli anni 2009-2012

La PT in associazione con l’FHA sono gli antigeni presenti nella maggior parte dei kit ELISA commerciali. Purtroppo, ancora troppo pochi sono i laboratori che utilizzano kit ELISA che fanno uso della sola PT purificata, unico antigene specifico per la *Bordetella pertussis* (19).

A questo proposito nel 2011 il lavoro pubblicato da Riffelmann e von Koenig (18) è stato inviato ai laboratori a supporto del suggerimento relativo all’uso di kit ELISA contenenti la PT come unico antigene. Questo lavoro ha valutato la specificità e sensibilità dei kit ELISA disponibili in commercio per il dosaggio degli anticorpi anti *Bordetella pertussis*. Gli ELISA commerciali sono stati confrontati con un saggio ELISA *in-house* con antigeni purificati e standard forniti dalla WHO. I kit ELISA che utilizzano la PT come antigene hanno mostrato un correlazione lineare rispetto alla preparazione di riferimento della WHO mentre i kit ELISA che utilizzano antigeni misti non hanno mostrato una correlazione lineare con le preparazioni di riferimento. Questi dati sono stati anche confermati da studi condotti nell’ambito dell’ECDC a cui abbiamo partecipato (26, 30).

In conclusione le evidenze raccolte fortemente suggeriscono che i kit ELISA commerciali per essere attendibili devono usare, come antigene per rilevare gli anticorpi specifici, la PT purificata e devono avere al loro interno uno standard di riferimento internazionale.

Purtroppo, nonostante si sia sottolineato più volte la scarsa attendibilità dei risultati sierologici ottenuti con i kit ELISA commerciali che fanno uso di più antigeni, questa indicazione non è stata ancora recepita da tutti i laboratori a giudicare dai dati raccolti per l’anno 2012. Infatti, come risulta evidente dalla Figura 7, la percentuale dei laboratori che usano kit ELISA con la sola PT è ancora minoritaria. Dovremmo quindi operare più a fondo per meglio incidere sulle scelte dei laboratori, sensibilizzando anche i produttore/distributori dei kit ELISA.

Il saggio PCR è eseguito in un limitato numero di laboratori (Figura 8), mentre dovrebbe essere il test di elezione soprattutto nei reparti di neonatologia/pediatria.

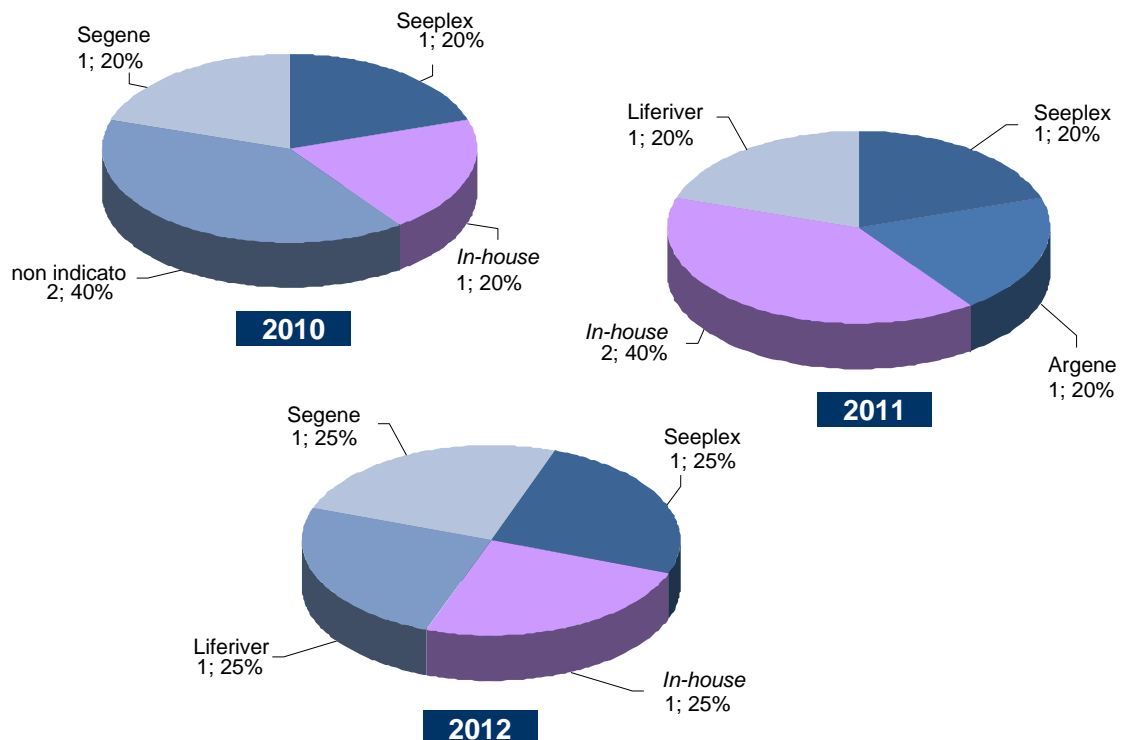


Figura 8. Tipo di kit utilizzati per il saggio di PCR dai laboratori negli anni 2010-2012 per nome commerciale del kit o se *in-house* (standardizzato in laboratorio)

Solo i pazienti con segni e sintomi compatibili con la pertosse devono essere saggiati con la PCR per confermare la diagnosi. Nel caso di soggetti asintomatici e neonati l'uso della PCR deve essere attentamente valutato in relazione alla definizione di caso sospetto di pertosse. Attualmente, è in corso di valutazione anche a livello europeo una revisione ed eventualmente una diversa definizione di caso di sospetta pertosse per i neonati.

La PCR ha una sensibilità ottimale nelle prime tre settimane di tosse quando il DNA batterico è ancora presente nel retro-faringe. Dopo la quarta settimana di tosse, la quantità di DNA batterico diminuisce rapidamente ed è preferibile l'utilizzo del saggio ELISA IgGPT.

Sono in commercio diversi kit per eseguire la diagnosi di pertosse tramite PCR. Uno studio recente (31) ha valutato 4 kit commerciali, tre dei quali si sono rivelati idonei. Tutti e quattro i kit erano altamente specifici ma con sensibilità diverse. I kit dell'Argene, Focus Diagnostics, e Cepheid presentano una buona sensibilità e specificità. Questi tre kit hanno un controllo interno per rilevare inibitori della PCR, cosa molto importante, ma solo due di loro, i test diagnostici Argene e Focus, hanno anche controlli interni relativi all'estrazione del DNA.

Dai dati raccolti dalla ricognizione dei saggi per PCR impiegati dei laboratori italiani si evince che almeno la metà dei laboratori utilizza i kit tra i più idonei (*vedi* Figura 8).

CONCLUSIONI

Perché è necessaria una sorveglianza per la pertosse? In ottemperanza alle dispositive europee, per valutare a livello nazionale ed europeo l'efficacia dei programmi vaccinali, è necessario condividere una definizione di caso di pertosse basata su saggi di laboratorio per la conferma del caso sospetto a livello clinico.

L'ECDC ha posto l'accento sulla importanza della conferma di laboratorio per la diagnosi di pertosse, per il trattamento, per la prevenzione e per il miglioramento dei dati di sorveglianza.

L'uso della diagnostica di laboratorio per un caso di sospetta pertosse migliora il sistema di sorveglianza e limita la diffusione della malattia, suggerendo le procedure più idonee per la prevenzione della malattia. Inoltre, la conferma dei casi sospetti permette una valutazione più corretta dell'incidenza della malattia. L'isolamento del ceppo batterico, inoltre, permette di eseguire tutte quelle indagini microbiologiche ormai necessarie per conoscere le caratteristiche genetiche dei ceppi circolanti e di identificare "cluster" emergenti nel Paese.

I dati di sorveglianza sono inoltre essenziali nello sviluppo di strategie di controllo della malattia con strategie vaccinali più efficaci, quali immunizzazioni di fasce di popolazione maggiormente a rischio di trasmissione del batterio ai neonati non ancora protetti dalla vaccinazione o l'inserimento nel calendario vaccinale di ulteriori richiami.

A livello europeo e nazionale c'è una grande eterogeneità nei metodi di laboratorio impiegati per la diagnosi di pertosse, è quindi necessario implementare una standardizzazione e armonizzazione dei saggi utilizzati. È, quindi, auspicabile riuscire a creare con i laboratori periferici che eseguono diagnosi di pertosse una stretta collaborazione.

Nell'ambito delle attività di sorveglianza è stata messa in atto una ricognizione dei laboratori che eseguono i saggi per la conferma della diagnosi di pertosse e della tipologia di diagnostica utilizzata dai laboratori operanti all'interno dell'SSN. È probabile che le informazioni acquisite fino a questo punto siano solo parziali e quest'attività necessariamente dovrà continuare.

Si dovrà introdurre e/o migliorare nella routine diagnostica l'isolamento colturale del ceppo di *B. pertussis*, i metodi sierologici e molecolari rapidi, organizzare incontri per introdurre linee guida e criteri di accettabilità comuni per la conferma di laboratorio alla diagnosi di pertosse in accordo alle linee guida che dall'ECDC, in via di definizione, e a cui stiamo partecipando come laboratorio di riferimento.

Quest'attività tesa a migliorare l'accessibilità e l'omogeneità dei protocolli diagnostici utilizzati, permetterà di migliorare i dati epidemiologici e microbiologici della pertosse in Italia e, allo stesso tempo, di ottemperare al flusso di dati per l'ECDC.

BIBLIOGRAFIA

1. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:362-82.
2. Crowcroft NS, Pebody RG. Recent developments in pertussis. *Lancet* 2006;367(9526):1926-36.
3. He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* 2008;3(3):329-39.
4. Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010;10(1):36-49.
5. Celentano L, Massari M, Paramatti D, Salmaso S, Tozzi A; EUVAC-NET Group. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(9):761-65.
6. de Greeff S, Mooi FR, Westerhof A, Verbakel JM, PeetersMF, Heuvelman CJ, et al. Pertussis disease burden in the household: how to protect young infants. *Clin Infect Dis* 2010;50(10):1339-45.
7. Bonmarin I, Levy-Bruhl D, Baron S, Guiso N, Njamkepo E, Caro V, et al. Pertussis surveillance in French hospitals: results from a 10 year period. *Euro Surveill* 2007;12(1):pii=678. Disponibile all'indirizzo: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EM/V12N01/art678.pdf>; ultima consultazione 18/6/14.
8. Hellenbrand W, Beier D, Jensen E, Littmann M, Meyer C, Oppermann H, et al. The epidemiology of pertussis in Germany: past and present. *BMC Infect Dis* 2009;9:22.
9. Lutsar I, Anca I, Bakir M, Usonis V, Prymula R, Salman N, et al. Epidemiological characteristics of pertussis in Estonia, Lithuania, Romania, the Czech Republic, Poland and Turkey –1945 to 2005. *Eur J Pediatr* 2009;168(4):407-15.
10. Torm S, Meriste S, Tamm E, Alusalu S, Järviste A, Lang K. Pertussis outbreak in a basic school in Estonia: description, contributing factors and vaccine effectiveness. *Scand J Infect Dis* 2005;37(9):664-68.
11. Grgic-Vitek M, Klavs I, Kraigher A. Re-emergence of pertussis in Slovenia: time to change immunization policy. *Vaccine* 2008;26(15):1874-8.
12. Barret A, Ryan A, Breslin A, Cullen L, Murray A, Grogan J, et al. Pertussis outbreak in northwest Ireland, January-June 2010. *Euro Surveill* 2010;15(35):pii=19654. Disponibile all'indirizzo: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N35/art19654.pdf>; ultima consultazione 18/6/14.
13. Theodoridou M, Hadjipanagis A, Persianis N, Makri S, Hadjichristodoulou C. Pertussis outbreak detected by active surveillance in Cyprus in 2003. *Euro Surveill* 2007;12(5):pii=709. Disponibile all'indirizzo: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EM/V12N05/art709.pdf>; ultima consultazione 18/6/14.
14. Ausiello CM, Cassone A. Acellular pertussis vaccines and pertussis resurgence: revise or replace? *Mbio* 2014;5(3): pii: e01339-14.
15. Bacci S. *European surveillance network for vaccine-preventable diseases. Pertussis surveillance report 2010*. EUVAC.NET; 2011. Disponibile all'indirizzo: http://www.euvac.net/graphics/euvac/pdf/pertussis_2010.pdf; ultima consultazione 18/6/14.
16. Notes from the field: pertussis – California, January-June 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59:817.

17. Klein NP, Bartlett J, Rowhani-Rahbar A, Fireman B, Baxter R. Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. *N Engl J Med* 2012;367:1012-9.
18. Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J, Wirsing von Koenig CH. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4459-63.
19. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann M, Wirsing von König CH, EUPertstrainingroup. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories *Eur J Microbiol Infect Dis* 2011;30:307-12.
20. European Centre for Disease Prevention and Control. *Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with Bordetella pertussis or Bordetella parapertussis*. Stockholm: ECDC; 2012. Disponibile all'indirizzo: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Guidance-protocol-PCR-laboratory-diagnosis-bordetella-pertussis-parapertussis.pdf>; ultima consultazione 02/07/2014.
21. European Centre for Disease Prevention and Control. *Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with Bordetella pertussis*. Stockholm: ECDC; 2012. Disponibile all'indirizzo: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/bordetella-pertussis-guidance-protocol-serological-diagnosis.pdf>; ultima consultazione 02/07/2014.
22. World Health Organization. *Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis*. Geneva: WHO; 2007. (WHO/IVB/04.14). Disponibile all'indirizzo: http://eupert.org/sites/default/files/WHO_guidelines.pdf; ultima consultazione 18/6/14.
23. Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, Doshi N, Litt DJ, *et al*. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J Med Microbiol* 2008;58:1023.
24. Guthrie JL, Robertson AV, Tang P, Jamieson F, Drews SJ. Novel duplex Real-Time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in specimens from patients with pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1435-7.
25. Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1999;150(5):333-41.
26. He Q, Barko AM, Mertsola J, Glismann S, Bacci S on behalf of the European *Bordetella* expert group (EUPertstrain)4, the European surveillance network for vaccine-preventable diseases (EUVAC.NET). High heterogeneity in methods used for the laboratory confirmation of pertussis diagnosis among European countries, 2010: integration of epidemiological and laboratory surveillance must include standardisation of methodologies and quality assurance. *Euro Surveill* 2012;17(32):pii=20239. Disponibile all'indirizzo: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N32/art20239.pdf>; ultima consultazione 02/07/2014.
27. Riffelmann M, Hunfeld K-P, Müller I, Xing D, Kennerknecht N, Wirsing von König C H. External quality assessment of pertussis serology in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:421-3.
28. Xing D, Wirsing von König CH, Newland P, Riffelmann M, Meade B, Corbel M, *et al*. Characterization of reference material for human antiserum to pertussis antigens proposed by an international collaborative study. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:303-11.
29. Tondella ML, Carlone GM, Messonnier N, Quinn CP, Meade BD, Burns DL, *et al*. International *Bordetella pertussis* assay standardization and harmonization meeting report. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States, 19-20 July 2007. *Vaccine* 2009;27:803-14.

30. Xing D, Markey K, Newland P, Rigsby P, Hockley J, He Q EUVAC.NET collaborative study: evaluation and standardisation of serology for diagnosis of pertussis. *J Immunol Methods* 2011; 372(1-2):137-45.
31. Lanotte P, Plouzeau C, Buruoa C, Grélaud C, Guillot S, Guiso N, *et al.* Evaluation of four commercial Real-Time PCR assays for detection of *Bordetella spp.* in nasopharyngeal aspirates. *J Clin Microbiol* 2011;3943-6.

APPENDICE A
Responsabili dei laboratori partecipanti

Piemonte

Carmelo Ginardi (ginardi.c@ospedale.cuneo.it)
Federica Piana (piana.f@ospedale.cuneo.it)
Giuseppe Molinari (gmolinari@aslcn2.it)

Lombardia

Claudio Farina (farina.claudio@sancarlo.mi.it)
Bianca Osnaghi (bianca.osnaghi@ao-legnano.it)
Elda Suigo (elda.suigo@ao-legnano.it)
Gabriele Bordoni (laboratorio2.so@aovv.it)
Marcello Marinelli (marinelli.marcello@hsr.it)
Marina Re (Mre@aogarbagnate.lombardia.it)
Pietro Marone (pmarone@smatteo.pv.it)
Sara Rimoldi (rimoldi.sara@hsacco.it)
Loredana Tocalli (tocalli.loredana@hsacco.it).

Trentino Alto Adige:

Cristina Pedrotti (cristina.pedrotti@apss.tn.it)
Elisabetta Pagani (elisabetta.pagani@asbz.it)
Rossi Patrizia (patrizia.rossi@asbz.it)
Paolo Lanzafame (paolo.lanzafame@apss.tn.it).

Veneto

Daniela Signori (laboratorio.analisi@ulssfeltre.veneto.it)
Celio Lazzarini (celio.lazzarini@ulss10.veneto.it)
Gianpaolo Piaserico (gianpaolo.piaserico@ulssasolo.veneto.it)
Graziano bordignon (graziano.bordignon@ulssasolo.veneto.it)
Patrizia Reatto (patrizia.reatto@ulssvicenza.it)
Mario Rassu (mario.rassu@ulssvicenza.it)
Marzia Battistel (marzia.battistel@ulss.belluno.it)

Friuli-Venezia Giulia:

Rita De Rosa (rita.derosa@aopn.fvg.it)
Alessandro Camporese (alessandro.camporese@aopn.fvg.it).

Liguria:

Filippo Ansaldi (filippo.ansaldi@unige.it)
Pier Andrea Dusi (a.dusi@asl1.liguria.it)

Emilia Romagna

Maria Paola Landini (mariapaola.landini@unibo.it)
Maria Rita Rossi (r.rossi@ospfe.it)
Marisa Meacci (meacci.marisa@policlinico.mo.it)
Massimo Confalonieri (m.confalonieri@ausl.pc.it)
Patrizia Billi (p.billi@ausl.ra.it)
Roberto Cevenini (roberto.cevenini@unibo.it)
Tiziana Lazzarotto (tiziana.lazzarotto@unibo.it)

Toscana

Chiara Azzari (c.azzari@meyer.it)
Furio Parri (parrif@aou-careggi.toscana.it)

Patrizia Pecile (pecilep@aou-careggi.toscana.it)
Romano Mattei (r.mattei@usl2.toscana.it).

Marche

Esther Manso (e.manso@ao-umbertoprime.marche.it)

Umbria

Alessandra Sensini (sensini@unipg.it)

Lazio

Carla Fontana (carla.fontana@uniroma2.it)
Cartesio Favalli (favalli@uniroma2.it)

Campania

Maria Grazia Coppola (coppola.cotugno@libero.it)
Luciana Petruzzo (lucianapetruzzo@yahoo.it)

Puglia

Maria Chironna (m.chironna@igiene.uniba.it)

Calabria

Alfredo Focà (afoca@unicz.it)
Cristina Giraldi (c.giraldi54@gmail.com)

Sardegna

Elena Muresu (muresu@uniss.it)

Sicilia

Anna Giammanco (anna.giammanco@unipa.it)

APPENDICE B
Modalità di raccolta dei campioni
e diagnosi colturale

Raccolta del campione

La raccolta del campione dovrebbe essere eseguita prima dell'inizio della terapia antibiotica per aumentare la probabilità di isolare il batterio e per garantire la presenza di una quantità più elevata di DNA. Si hanno maggiori probabilità di isolare il batterio se il prelievo viene eseguito entro le prime due settimane dall'inizio della sintomatologia.

La raccolta del campione per la ricerca di DNA attraverso metodi molecolari rapidi deve essere eseguita al massimo entro 3-4 settimane dall'insorgenza dei sintomi (Figura 4).

I campioni clinici idonei per la ricerca di *Bordetella* sono:

- tampone nasofaringeo;
- aspirato nasofaringeo.

Tampone nasofaringeo

Tipologia di tampone

È consigliabile l'esecuzione di due tamponi, uno per la ricerca colturale e uno per la ricerca del DNA. Il tampone deve essere in Dacron o rayon, con bastoncino sottile e flessibile in polistirene. Non devono essere utilizzati tamponi in cotone o alginato di calcio, controindicati per l'amplificazione in PCR.

Per la ricerca colturale viene generalmente raccomandato un tampone Copan con terreno di trasporto Amies Charcoal - Flexible twisted wire.

Per le indagini molecolari è consigliato l'uso di un tampone asciutto (es. Copan – Dry swab twisted wire rayon, mini tip).

Esecuzione del tampone

Il tampone deve essere eseguito nel nasofaringe posteriore.

L'Istituto Pasteur (Parigi-Francia) ha realizzato un video contenente le indicazioni per la corretta esecuzione del prelievo (1).

Trasporto del campione

Il tampone destinato alla indagine colturale deve essere trasportato a temperatura ambiente ed entro 4 ore dal prelievo al laboratorio di microbiologia per la semina su piastra. La frequenza di isolamento colturale diminuisce, infatti, se il trasporto avviene a 4°C e/o dura più di 48 ore.

Il tampone dal quale deve essere estratto il DNA può essere trasportato a temperatura ambiente o conservato a 4°C.

Aspirato nasofaringeo

Prelievo dell'aspirato

Il prelievo deve essere eseguito a livello del nasofaringe posteriore.

L'Istituto Pasteur (Parigi-Francia) ha realizzato un video contenente le indicazioni per il corretto prelievo dell'aspirato (1).

Deve essere prelevata una quantità di campione compresa tra 0,6 mL e 1 mL.

Trasporto del campione

Il campione destinato all'indagine colturale deve essere raccolto in una provetta sterile, trasportato a temperatura ambiente ed entro 4 ore dal prelievo al laboratorio di microbiologia per la semina. La frequenza di isolamento colturale diminuisce se il trasporto avviene a 4°C e dura più di 48 ore.

La quota di aspirato destinata alla ricerca di DNA viene raccolta in una provetta sterile idonea al congelamento, trasportata a temperatura ambiente o, se possibile, refrigerata, e conservata a -80°C.

Note

In tutte le procedure di prelievo del campione clinico devono essere utilizzati i guanti per limitare il rischio di contaminazione del campione. È, inoltre, importante fare attenzione a non contaminare il bastoncino del tampone e/o il catetere dell'aspirato che potrebbero venire a contatto con i terreni di trasporto.

Criteri di scelta tra tampone e aspirato

Nei neonati e nei bambini fino ad 1 anno di età gli aspirati presentano una frequenza di isolamento di *Bordetella* maggiore del 15% rispetto ai tamponi. Il tampone risulta, invece, più idoneo dell'aspirato nasofaringeo quando la produzione di muco è scarsa.

Diagnosi colturale

La ricerca colturale di *Bordetella* deve essere eseguita su due piastre, una di terreno non selettivo e una di terreno selettivo contenente cefalexina (40 µg/mL). I terreni più idonei sono l'agar Reagan Lowe, contenente carbone, e il Bordet Gengou. La composizione dei terreni è descritta nelle linee guida della WHO (2).

Le piastre vanno incubate a 35-37°C in aerobiosi, con elevata concentrazione di umidità, e ispezionate a giorni alterni fino a 7 giorni. Lo sviluppo delle sottocolture richiede un'incubazione più breve, generalmente di 3 giorni. Le colonie sono lisce, convesse, perlacee, brillanti e grigie-bianche. Le colonie di *B. parapertussis* sono simili, ma leggermente più grandi e si sviluppano più precocemente.

Al microscopio i batteri appartenenti al genere *Bordetella* si presentano come cocco-bacilli gram-negativi, isolati o accoppiati.

Per l'identificazione microbiologica delle colonie isolate, sono previste, oltre all'osservazione della morfologia e della colorazione GRAM, l'esecuzione di test biochimici, quali il test dell'ossidasi e dell'ureasi, e la crescita su agar sangue.

Per le colonie con il profilo biochimico corrispondente al genere *Bordetella*, si procede con l'agglutinazione su vetrino con antisieri specifici per *B. pertussis* e *B. parapertussis*.

I ceppi isolati vengono congelati a -80°C in terreno Brain Heart Infusion con l'aggiunta del 70% di glicerolo.

Sui ceppi di *Bordetella* isolati è valutata la sensibilità agli antibiotici eritromicina, claritromicina e azitromicina mediante metodo E-test su piastre di Mueller-Hinton agar arricchito con il 10% di sangue. I valori di MIC sono letti dopo un'incubazione delle piastre di 2-7 giorni (3).

Fonti

1. Boucherat M, Guiso N, de la Roque F, Doré G. *Technique of naso-pharyngeal sampe for PCR of B. pertussis*. Paris: Institut Pasteur; 2009. Disponibile all'indirizzo http://www.youtube.com/watch?v=d6d-y7SX_dY; ultima consultazione 02/07/2014.
2. World Health Organization. *Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis*. Geneva: WHO; 2007. (WHO/IVB/04.14). Disponibile all'indirizzo: http://eupert.org/sites/default/files/WHO_guidelines.pdf; ultima consultazione 18/6/14.
3. Fry NK, Duncan J, Vaghji L, George RC, Harrison TG. Antimicrobial susceptibility testing of historical and recent clinical isolates of *Bordetella pertussis* in the United Kingdom using the Etes method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2010) 29:1183-1185.

APPENDICE C
Diagnosi molecolare

Protocollo utilizzato per la PCR diagnostica

La diagnosi molecolare di infezione da *Bordetellae* viene eseguita su DNA estratto da un campione clinico, per mezzo della *Real-Time* PCR. Il tempo stimato dall'arrivo al laboratorio del campione clinico al risultato finale è di circa 4 ore.

Per eseguire l'estrazione del DNA è necessario un volume minimo di campione pari a 200 µL.

In una eppendorf sterile, ai 200 µL di campione va aggiunto un pari volume di proteinasi K con concentrazione iniziale di 0,4mg/mL. I 400 µL ottenuti vengono incubati a 62°C per 1 ora.

Per l'estrazione viene utilizzato il kit QIAGEN QIAamp DNA Minikit (Cod. 51304). L'eluizione finale deve essere eseguita con 70 µL di tampone.

Il DNA estratto può essere conservato in congelatore a -20°C.

Sono stati scelti target genici multipli per l'amplificazione, per consentire l'identificazione di genere e di specie e per aumentare la specificità del metodo.

In particolare, la positività per l'Insertion Sequence IS481 e del promotore della tossina (ptx-pr) indica la presenza di DNA di *B. pertussis*; la positività per l'Insertion Sequence IS1001 e una sequenza specifica del gene recA sono invece specifici per *B. parapertussis* e *B. holmesii*, rispettivamente.

Tutte le amplificazioni sono state messe a punto utilizzando il termociclatore LightCycler 2.0 (Roche) utilizzando 5 µL del DNA estratto indiluito e 5 µL del DNA diluito 1:10, con piattaforme differenti in base al bersaglio da identificare:

- sonde FRET o SybrGreen per IS481 e ptx-pr (1,2);
- SybrGreen per IS1001;
- sonde TaqMan per *B. Holmesii recA* (3);

Linee guida per l'uso della *Real-Time* PCR nella diagnosi di laboratorio di *Bordetella* sono state indicate dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) nel documento "Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*" (4).

Nella tabella seguente è indicato uno schema interpretativo dei risultati.

Schema interpretativo dei risultati

IS481	ptxA-Pr	IS1001	<i>B. holmesii recA</i>	Risultati
+	-	-	-	<i>Bordella spp.</i>
+	+	-	-	<i>B. pertussis</i>
-	-	+	-	<i>B. parapertussis</i> o <i>B. bronchiseptica</i>
+	-	-	+	<i>B. holmesii</i>
+	-	+	-	Possibile coinfezione con diverse specie
+	+	+	-	

Ai fini pratici, la positività del target IS481 può essere considerata indicativa di una probabile infezione da *B. pertussis*, quando il quadro clinico del paziente è in accordo con tale diagnosi.

Similmente, la positività del target IS1001 può essere considerata indicativa di una probabile infezione da *B. parapertussis*.

Per la diagnosi molecolare di *B. bronchiseptica* si esegue una PCR sul gene *fla*, seguendo il protocollo descritto da Hozbor *et al.* (5).

Parallelamente ai metodi descritti, per l'individuazione del DNA di *B. pertussis* e *B. parapertussis* possono essere utilizzati kits diagnostici commerciali, quali il kit Dia-Bor-020 (Diagenode) e il kit Simplexa *Bordetella pertussis/parapertussis* (Focus Diagnostic).

Fonti

1. Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, Doshi N, Litt DJ, *et al.* Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J Med Microbiol* 2008;58:1023.
2. Xu Y, Xu Y, Hou Q, Yang R, Zhang S. Triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *APMIS* 2010;118(9):685-91.
3. Guthrie JL Robertson AV, Tang P, Jamieson F, Drews SJ. Novel Duplex Real-Time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in specimens from patients with pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1435-7.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. *Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with Bordetella pertussis or Bordetella parapertussis*. Stockholm: ECDC; 2012. Disponibile all'indirizzo: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Guidance-protocol-PCR-laboratory-diagnosis-bordetella-pertussis-parapertussis.pdf>; ultima consultazione 02/07/2014
5. Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1999;150(5):333-41.

APPENDICE D
Diagnosi sierologica

Protocollo utilizzato per il saggio ELISA IgGPT

Dosaggio delle IgG specifiche per la tossina della pertosse (PT)

Indicazione

Analisi basata sull'immunogenicità per la diagnosi sierologica di sospetta malattia/infezione e per la sorveglianza sierologica.

Principio di misurazione

ELISA indiretto per gli anticorpi IgG contro la PT. La concentrazione di anticorpi è espressa in unità internazionali/mL (IU/mL).

Raccolta e trasporto e conservazione dei campioni

Sono idonei per il saggio sia il siero che il plasma, raccolti dopo 2 settimane dall'inizio dei sintomi. Va evitata l'emolisi del sangue e a questo proposito è importante che il siero o plasma siano separati prima del trasporto.

Il campione di siero o plasma deve essere stoccato in due provette da conservare, rispettivamente la prima a -20°C per l'uso di routine, la seconda a -40°C (o inferiore), per costituire una banca dei sieri.

Materiali

- Micropiastre: Immulon 2 M129B (Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA 3V-Chimica, Italy). Ogni lotto va convalidato rispetto al precedente. L'uso di nuove micropiastre deve essere saggiato prima di utilizzarle nei saggi di routine.
- Strisce sigillanti per micropiastra: Primo® Adhesive transparent seals, Euroclone n. ECPCR0510
- Guanti.
- Asciugamani di carta assorbente.
- Puntali: volume 100-1000 µL e volume 0,5-300 µL, universale (Gilson Italia srl)
- Pipette:
 - Falcon 25 mL (3V-Chimica srl, Roma; Italia, n. 357525)
 - Falcon 10 mL (3V-Chimica srl, Roma; Italia, n. 357551)
 - Falcon 5 mL (3V-Chimica srl, Roma; Italia, n. 357543)
- Tubi:
 - Falcon 50 mL (3V-Chimica srl, Roma; Italy, n. 352070)
 - SAFE-Lock Tubes 1,5 mL (Eppendorf n. 0030- 123.328, 3V-Chimica srl, Roma; Italia)
 - Cluster tubes 1,2 mL (Costar, n. 4401, Euroclone)
- Tubi per la conservazione:
 - Cryogen® Tubes, 2 mL (ClearLine n. CL2ARBEPS, 3V-Chimica srl, Roma; Italia)
 - SAFE-Lock Tubes 1,5 mL (Eppendorf n. 0030- 123.328, 3V-Chimica srl, Roma; Italia)

Software

Microplate Manager, ver 2.2, Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547) and Microsoft Excel.

Reagenti

Antigene

PT purificata ottenuta dallo Statens Serum Institut (SSI, Danimarca), conservato in frigorifero. L'antigene deve essere una tossina purificata.

Calibratori: sieri umani di riferimento internazionale e controlli *in-house*

1. Primo siero umano di riferimento

Antisiero umano 06/142 (National Institute of Standard Biological and Control, Potters Bar, Hertfordshire, Regno Unito) 10⁶ IU/mL anti-PT IgG. Il siero risospeso va conservato a -18°C o inferiore. Il siero liofilizzato è conservato in -18°C o inferiore. La diluizione di lavoro è 1:5 (1+4) in PBS.

2. Secondo siero umano di riferimento

Antisiero umano 06/140 (National Institute of Standard Biological and Control, Potters Bar, Hertfordshire, Regno Unito) 335 IU/mL anti-PT IgG. Il siero risospeso va conservato a -18°C o inferiore. Il siero liofilizzato è conservato in -18°C o inferiore. La diluizione di lavoro è 1:30 (1+29) in PBS. Il siero non diluito e le diluizioni del siero sono conservati in frigorifero.

3. Terzo siero umano di riferimento

SBL 42 IgG ottenuto dallo Smittskyddsinstitutet (SMI, Svezia) 930 IU/mL anti-PT. Diluizione di lavoro 1:100 (1 + 99) in PBS.

4. Controlli *in-house*

1. controllo positivo a bassa concentrazione (10 IU/mL). Siero non diluito
2. controllo positivo a alta concentrazione (40 IU/mL). Siero non diluito
3. controllo negativo: Lasciare vuota la prima colonna della piastra.

5. Procedure per la preparazione di sieri di riferimento e sieri di controllo

Ogni pre-diluizione è utilizzata in 3-4 analisi (in frigorifero a 4°C per un massimo di 7 giorni). I sieri diluiti sono conservati in aliquote (0,15-0,5 mL) a -18°C o inferiore, SBL 42 IgG è conservato in frigorifero. Le diluizioni sono conservate per un massimo di 6 mesi. Le diluizioni più vecchie possono essere utilizzati dopo la nuova analisi della concentrazione. Ogni aliquota non deve essere scongelata più di quattro volte.

Coniugato

L'anticorpo specifico per le IgG umane è generato in capra, marcato con fosfatasi alcalina ed è ottenuto dalla Kirkegaard & Perry Laboratories Inc. Il coniugato liofilizzato va risospeso in 1 mL di glicerolo al 50% PBS e conservato in freezer a -18°C o inferiore. Il coniugato risospeso può essere conservato per almeno 6 mesi.

Al momento del saggio ELISA l'anticorpo coniugato è diluito 1+ 8000 in tampone di incubazione.

Tamponi e soluzioni

- Tampone di rivestimento o *coating*

PBS: Tampone fosfato pH 7,4.

- Tampone di lavaggio

Saline, 9 g/L di NaCl, PA-ACS-ISO n. 131659.1211, in bottiglie da 1000 mL (Panreac Quimico Sau, Barcelona, Spagna). Aggiungere lo 0,1% di Tween 20, CAS 9005-64-5 (USB Corporation Cleveland). La soluzione preparata può essere conservata a temperatura ambiente per due giorni.

- Tampone di incubazione

Va preparato al momento dell'uso.

Siero albumina bovina, Frazione V (BSA, Sigma-Aldrich, 3V-Chimica, Roma, Italia, A2153, lot. n. 128K1125), 1,0 g (NB: controllare ogni nuova partita di BSA, la concentrazione di BSA in soluzione può variare tra 0,1 e 1,0%).

Tween 20 0,5 mL

PBS è aggiunto fino ad arrivare al volume totale di 1000 mL.

Invece della BSA si può usare il latte scremato. Se si utilizza il latte scremato, le micropiastre vanno bloccate per 30 minuti a 37°C con una soluzione 1% di latte scremato. Utilizzare una soluzione 0,1% di latte scremato come tampone d'incubazione.

- Tampone per il substrato
1 mol/L Tris + 0,3 mmol/L di MgCl₂:
Tris (idrossimetil) amminometano 121,1 g
700 mL dH₂O
1 mol /L di MgCl₂ 0,3 mL
pH a 9,8
dH₂O è aggiunta fino ad un volume totale di 1000 mL
Conservare a temperatura ambiente fino ad un anno.
- Compresse di substrato fosfatasi:
p-nitrofenil fosfato (PNPP), conservare al buio a meno di 0°C.
1 compressa da 5 mg (prodotto n. S0942, Sigma-Aldrich, Italia) in 5 mL di tampone del substrato.
La soluzione va utilizzata immediatamente (perché è fotosensibile).
- Soluzione di stop:
3 mol/L di NaOH, caustica (prodotto n. 102525P, VWR International Ltd, Poole, Regno Unito).
Conservare a temperatura ambiente fino a 3 mesi.
- 50% Glicerina
Conservare a temperatura ambiente fino ad un anno.

Procedura di analisi

1. Coating delle piastre

0,5 mg/L PT TOH 15 in PBS, pH 7,4.
Aggiungere 100 µL di antigene diluito alle colonne da 2 a 12 di una micropiastra.
Sigillare per evitare l'evaporazione.
Incubare a temperatura ambiente (20-22°C) per tutta la notte (16-24 ore).
Conservare le piastre -20 o -70°C. Le piastre possono essere conservate per almeno 4 settimane.

2. Protocollo

Preparare un protocollo per l'analisi dell'ELISA, annotare se ci sono prediluizioni dei sieri. Annotare la data del *coating*.

Prima piastra

- Colonna 1: Vuota (controllo negativo o bianco), aggiungere solo tampone substrato e soluzione di stop
- Colonna 2: Primo siero umano di riferimento (antisiero umano 06/142)
- Colonna 3: Secondo siero umano di riferimento (antisiero umano 06/140)
- Colonna 4: Terzo siero umano di riferimento (SBL 42 IgG: 930 IU/mL anti-PT).
- Colonna 5: Controllo positivo *in-house* a bassa concentrazione, per la parte inferiore dell'intervallo di misurazione cioè 10 IU/mL
- Colonna 6: Controllo positivo *in-house* ad alta concentrazione, per la parte superiore dell'intervallo di misurazione da 50-100 IU/mL
- Colonna 7-12: Sieri da saggiare

Piastre seguenti

Lo standard positivo a bassa concentrazione e il controllo negativo sono sostituiti con i sieri da saggiare.

Commento:

- Se ci sono due sieri accoppiati di un individuo, questi devono essere saggiati nella stessa piastra.
- Per ciascuna piastra va fatta una nuova serie indipendente di diluizioni dei sieri di controllo. La ragione è che i controlli sono utilizzati per calcolare il coefficiente di variazione (CV) tra le piastre e tra giorni.

3. Aggiunta di sieri da saggiare

Mettere le piastre, le soluzioni e sieri a temperatura ambiente.

Preparare una diluizione iniziale di 1 + 59 per ciascun siero. Questo può essere fatto manualmente o in un robot.

Manuale:

Mettere 11 tubi Cluster 1,2 mL (Costar, n. 4401, Euroclone) in un rack (11 tubi corrispondenti alle 11 colonne da 2 a 12 dove verranno aggiunti i campioni). Aggiungere ad ogni tubo 590 microlitri di tampone di incubazione e 10 µL di campioni secondo il protocollo stabilito per le colonne da 2-11.

Lavare le piastre quattro volte con tampone di lavaggio.

Girare le piastre su asciugamani di carta assorbente puliti per rimuovere tutto il tampone di lavaggio.

Aggiungere 100 µL di tampone di incubazione in ogni pozzetto della piastra (no nella colonna 1 e nella fila A).

Mescolare e trasferire da ogni microtubo 100 µL del siero diluito alla piastra riga A + B/colonna 2-12 (no nella colonna 1).

Effettuare diluizioni a raddoppio (1:2) nella piastra utilizzando una pipetta multicanale: Mescolare il contenuto della riga B e trasferire 100 µL alla riga C e così via fino alla riga H; eliminare 100 µL dalla fila H.

Sigillare e incubare a 28°C per due ore.

Un robot può diluire i sieri e il trasferimento dei volumi della micropiastra.

4. Aggiunta di coniugato

Diluire il coniugato in tampone di incubazione per la diluizione di lavoro definita prima dell'uso.

Lavare le piastre quattro volte in tampone di lavaggio.

Girare le piastre su asciugamani di carta assorbente puliti per rimuovere tutto il tampone di lavaggio.

Aggiungere 100 µL di coniugato diluito ad ogni pozzetto nelle colonne 2-12.

Sigillare la piastra e incubare a 28°C durante la notte (16-24 ore).

5. Aggiunta del substrato

Preparare una soluzione di 1 g/L di p-Nitrofenilfosfato (PNPP) in tampone substrato appena prima dell'uso (2 pastiglie/10 mL di substrato/piastra).

Lavare le piastre quattro volte con tampone di lavaggio.

Girare piatti a testa in giù su asciugamani di carta assorbente puliti per rimuovere tutti i buffer di lavaggio.

Aggiungere 100 µL di soluzione di substrato in tutti i pozzetti della piastra. Annotare il tempo.

Incubare a temperatura ambiente (20-22°C) al buio per un'ora. Leggere e annotare la temperatura nella stanza.

Aggiungere 50 µL di soluzione di stop (3 mol/L NaOH) a tutti i pozzetti.

6. Misurazione dell'assorbanza

Misurare l'assorbanza di un lettore di micropiastre a 405 nm, utilizzando la prima colonna come un bianco. Il valore medio del bianco viene quindi sottratto dai valori di assorbanza del campione.

7. Quantificazione dei risultati

Le concentrazioni per ogni singolo campione sono calcolate utilizzando il software Microplate Manager, ver 2.2, Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547).

La serie di diluizioni dello standard è usata per fare una curva standard lineare. Tutti i risultati dei campioni sono calcolati con l'equazione di regressione dalla curva standard. I risultati, espressi in IU/mL, sono trasferiti a un foglio Excel e mediati tenendo conto delle diluizioni effettuate per ogni singolo siero, escludendo eventuali valori di assorbanza overflow e/o negative.

Qualora i sieri siano troppo concentrati e quindi non sia possibile mediare almeno 4 diluizioni del siero, lo stesso viene saggiato nuovamente utilizzando una pre-diluizione 1+9 oppure 1+ 29; la pre-diluizione verrà usata e diluita nella riga A come sopra descritto (10 µL + 590 µL).

Risultati sono validi se il CV% è inferiore a 10%. Un CV superiore è consentito se la differenza tra i campioni duplicati è inferiore a 0,05 DO (Densità Ottiche). Risultati con valori di DO di cui sopra 2,0 o inferiore a 0,02 sono al di fuori della gamma lineare della curva standard e devono essere interpretate come “superiore” o “inferiore” ai valori IU/mL corrispondenti dalla curva standard di quella particolare piastra.

Fonti

- Dalby T, Seier-Petersen M, Kristiansen MP, Harboe ZB, Krogfelt KA. Problem solved: a modified enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human antibodies to pertussis toxin eliminates false-positive results occurring at analysis of heat-treated sera. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;63(4):354-60.
- Giammanco A, Chiarini A, Maple PA, Andrews N, Pebody R, Gay N, Olander RM, Fivet-Groyne F, Baron S, Tischer A, Swidsinski S, Schellekens J, Reizenstein E. European Sero-Epidemiology Network: standardisation of the assay results for pertussis. *Vaccine* 2003;22(1):112-20.
- Giammanco A, Nardone A, Pebody R, Kafatos G, Andrews N, Chiarini A, Taormina S, de Ory F, Prosenk K, Krize B, Hallander H, Ljungman M, Marva E, Tsakris A, O'Flanagan D, Schneider F, Griskevicius A, Vranckx R, Karacs I. European Sero-Epidemiology Network 2: standardisation of immunoassay results for pertussis requires homogeneity in the antigenic preparations. *Vaccine* 2008;26(35):4486-93.
- Hallander HO, Ljungman M, Storsaeter J, Gustafsson L. Kinetics and sensitivity of ELISA IgG pertussis antitoxin after infection and vaccination with *Bordetella pertussis* in young children. *APMIS* 2009;117(11):797-807.
- Reizenstein E, Hallander HO, Blackwelder WC, Kühn I, Ljungman M, Möllby R. Comparison of five calculation modes for antibody ELISA using pertussis serology as a model. *J Immunol Methods* 1995;183:279-90.
- Xing D, Wirsing von König CH, Newland P, Riffelmann M, Meade BD, Corbel M, Gaines-Das R. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(3):303-11.

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali
Istituto Superiore di Sanità*

Roma, giugno 2014