



RAPPORTI ISTISAN 18|23

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

La pertosse, una malattia prevenibile con la vaccinazione: priorità diagnostiche

P. Stefanelli, G. Fedele, P. Leone, L. Ambrosio, P. Vacca,
I. Schiavoni, T. Lazzarotto, P. Clerici, G. Buttinelli



PATOLOGIE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

La pertosse, una malattia prevenibile con la vaccinazione: priorità diagnostiche

Paola Stefanelli (a), Giorgio Fedele (a), Pasqualina Leone (a),
Luigina Ambrosio (a), Paola Vacca (a), Ilaria Schiavoni (a),
Tiziana Lazzarotto (b), Pierangelo Clerici (b), Gabriele Buttinelli (a)

(a) Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Milano

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

Rapporti ISTISAN
18/23

Istituto Superiore di Sanità

La pertosse, una malattia prevenibile con la vaccinazione: priorità diagnostiche.

Paola Stefanelli, Giorgio Fedele, Pasqualina Leone, Luigina Ambrosio, Paola Vacca, Ilaria Schiavoni, Tiziana Lazzarotto, Pierangelo Clerici, Gabriele Buttinelli
2018, 35 p. Rapporti ISTISAN 18/23

La pertosse è una infezione acuta del tratto respiratorio che, negli ultimi anni, torna a manifestarsi più frequentemente. Malgrado l'utilizzo della vaccinazione, questa malattia sta riemergendo in numerosi Paesi; i neonati non ancora vaccinati costituiscono la categoria maggiormente a rischio. Tra le cause della ri-emergenza ci sono: una maggiore capacità diagnostica, la circolazione di ceppi varianti, la riduzione nel tempo della protezione conferita dall'immunizzazione. I sintomi si manifestano come lievi negli adulti, più gravi nei neonati. In Italia, la pertosse è una malattia a notifica obbligatoria. La diagnosi è spesso basata su criteri clinici e non sempre viene confermata con saggi di laboratorio. La coltivazione e l'amplificazione del DNA batterico mediante approcci molecolari rapidi, sono le tecniche più specifiche per la diagnosi della pertosse nelle prime fasi della malattia. La diagnosi sierologica può essere utilizzata nelle fasi più tardive della malattia, anche se l'interpretazione del risultato può essere inficiata dalla presenza di anticorpi indotti dalla vaccinazione. In generale, è auspicabile utilizzare esclusivamente saggi diagnostici rispondenti alle linee guida condivise a livello europeo. I risultati di un sondaggio effettuato per conoscere i saggi diagnostici maggiormente utilizzati nel 2015 e 2016 nei laboratori afferenti al Servizio Sanitario Nazionale in Italia sono presentati in questo documento.

Parole chiave: *Bordetella pertussis*; Diagnosi; Pertosse; Ri-emergenza; Sistema di sorveglianza

Istituto Superiore di Sanità

Pertussis, a vaccine preventable disease. Diagnostic priorities.

Paola Stefanelli, Giorgio Fedele, Pasqualina Leone, Luigina Ambrosio, Paola Vacca, Ilaria Schiavoni, Tiziana Lazzarotto, Pierangelo Clerici, Gabriele Buttinelli
2018, 35 p. Rapporti ISTISAN 18/23 (in Italian)

Pertussis is an acute respiratory tract infection, with an increasing proportion of cases in recent years. Despite widespread immunization, the disease reemerged in several countries; infants, too young to be vaccinated, are the most vulnerable individuals. The increased awareness of pertussis, the spreading of variant strains and the waning of vaccine-induced protection have been shown as the main causes of the pertussis reemergence. Clinical manifestations are of variable entity from very light, in adults, to extremely serious, in newborns. Pertussis is a notifiable disease in Italy. The diagnosis mainly relies on clinical criteria and laboratory confirmation; the latter is rarely performed in Italy. Both culture and rapid molecular methods can be used for pertussis diagnosis with a good performance in the early phase of infection. Serology assay is recommended in a later phase of the disease, even though the interpretation of the results may be influenced by the presence of antibodies induced by previous vaccination. Standardized diagnostic assays following EU recommendations are foreseen. A survey about the tests currently in use in 2015-2016 in the microbiology laboratories through the country within the National Health Service was enclosed to the report.

Key words: *Bordetella pertussis*; Diagnosis; Whooping cough; Re-emergence; Surveillance system

Per informazioni su questo documento scrivere a: paola.stefanelli@iss.

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

Citare questo documento come segue:

Stefanelli P, Fedele G, Leone P, Ambrosio L, Vacca P, Schiavoni I, Lazzarotto T, Clerici P, Buttinelli G. *La pertosse, una malattia prevenibile con la vaccinazione: priorità diagnostiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2018. (Rapporti ISTISAN 18/23).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Introduzione.....	1
Vaccini e vaccinazioni.....	5
Aspetti clinici della pertosse.....	7
Diagnosi microbiologica della pertosse	8
Metodi diretti	8
Raccolta e trasporto dei campioni	9
Diagnosi di pertosse mediante tecniche colturali	9
Diagnosi di pertosse mediante tecniche molecolari	9
Metodi indiretti	12
Sierologia	12
La pertosse in Italia.....	15
Diffusione della malattia.....	15
Ricognizione delle tecniche diagnostiche	15
Bibliografia.....	23
APPENDICE A	
Questionario conoscitivo per l'utilizzo di test diagnostici per la pertosse	27
APPENDICE B	
Laboratori partecipanti al questionario conoscitivo per l'utilizzo di test diagnostici per la pertosse	31

INTRODUZIONE

Bordetella pertussis, un coccobacillo Gram-negativo, patogeno del tratto respiratorio umano, è l'agente causale della pertosse. La malattia fu riconosciuta per la prima volta nel Medioevo e da allora sono state descritte varie epidemie. Jules Bordet e Octave Gengou isolarono *Bordetella pertussis* nel 1906.

La pertosse è una malattia infettiva altamente contagiosa. Come suggerisce il nome, la malattia è responsabile di una tosse persistente che può durare anche fino a dieci settimane, e che, nel culmine dell'infezione, può manifestarsi sotto forma di vere e proprie crisi tussive. Può presentarsi a qualsiasi età, ma in genere è più frequente nella prima infanzia, in cui, nei casi più gravi, può arrivare a causare gravi complicanze tra cui otite, polmonite o problemi neurologici e, nei bambini più piccoli, persino il decesso. Negli adulti, invece, raramente si manifestano quadri clinici severi.

La pertosse è endemica in tutto il mondo con picchi epidemici che si presentano ogni 3-5 anni. La maggior parte dei casi di malattia si verifica generalmente nel periodo estivo-autunnale. Un adeguato trattamento antibiotico, con macrolidi, permette la completa guarigione.

Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) la pertosse è una delle principali malattie infettive causa di morte, se pur prevenibile da vaccino, soprattutto nei bambini molto piccoli (1). Sono stimati circa 24 milioni di nuovi casi di pertosse e 160.700 decessi in bambini al di sotto dei cinque anni di età (2). Nel 2016, nei Paesi dell'Unione Europea e dell'area Economica Europea, il tasso di notifica era pari a 10,77 casi/100.000 abitanti, per un totale di circa 50.000 casi (Figura 1), in crescita rispetto all'anno precedente – dati del *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* dell'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) disponibile all'indirizzo <https://ecdc.europa.eu/en/pertussis/surveillance-and-disease-data/atlas>).

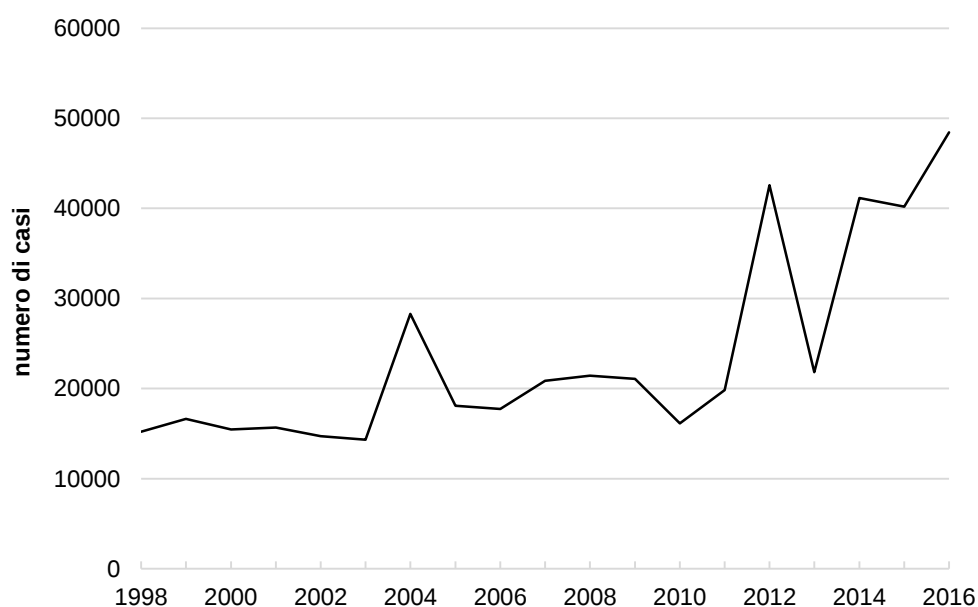


Figura 1. Numero di casi notificati di pertosse dal 1998 al 2016 in Europa
(fonte *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* dell'ECDC)

La mortalità più elevata si evidenzia nei Paesi in via di sviluppo, principalmente a causa di un'inadeguata copertura vaccinale che aumenta la suscettibilità della popolazione (2). Tuttavia, negli ultimi anni la pertosse è ri-emersa anche in Paesi con elevate coperture vaccinali, determinando vere e proprie epidemie (3-7) e riportando un'elevata letalità (Figura 2).

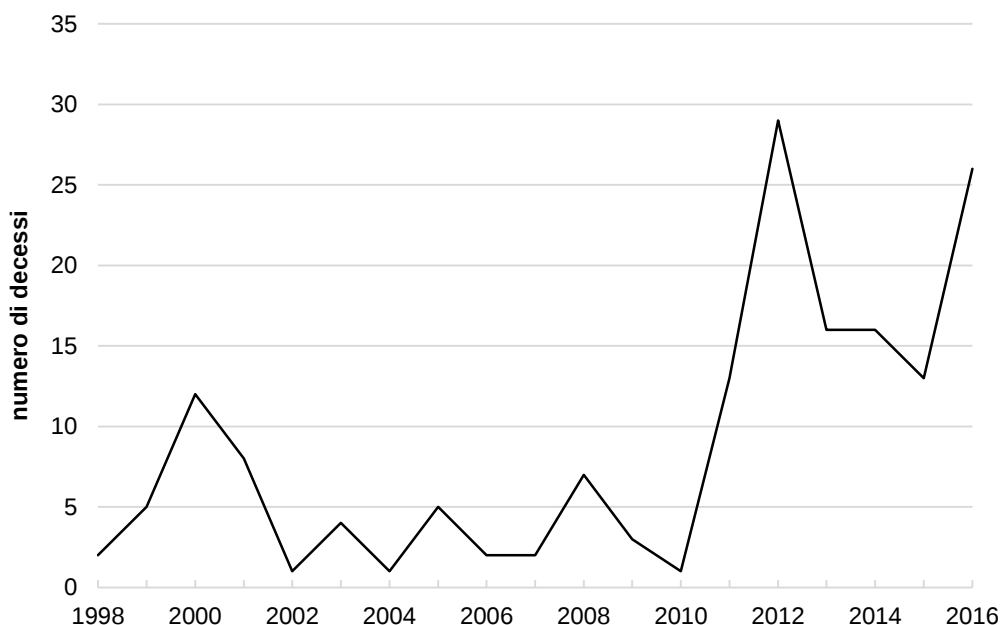


Figura 2. Numero di morti per pertosse dal 1998 al 2016 in Europa
(fonte *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* dell'ECDC)

Diversi fattori sono stati indicati come possibili cause di questa ri-emergenza (8), tra cui:

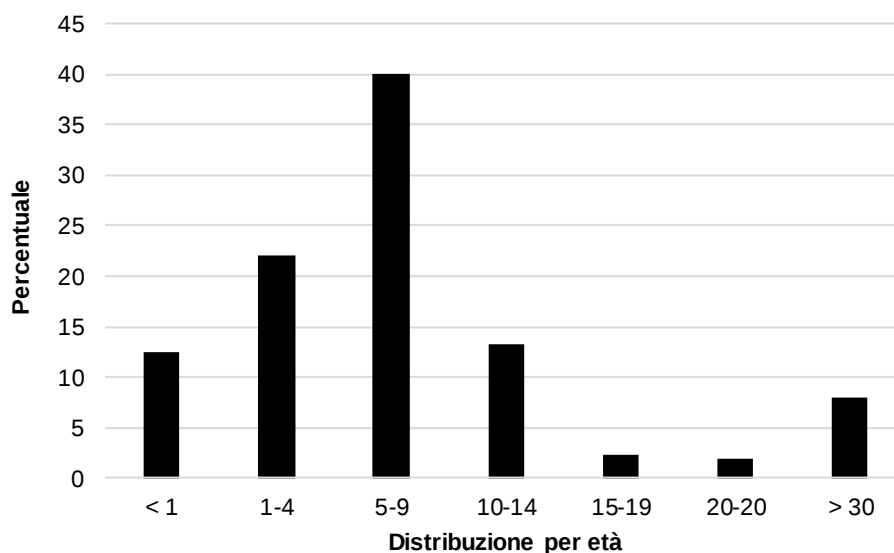
- a) una migliore capacità diagnostica nei laboratori ospedalieri;
- b) la circolazione di ceppi di *B. pertussis* varianti nei geni codificanti antigeni vaccinali, o in regioni geniche regolatorie correlate alla patogenicità del batterio;
- c) la diminuzione nel tempo di titoli anticorpali protettivi indotti dalla vaccinazione.

L'adattamento genomico di *B. pertussis* è stato recentemente descritto in uno studio europeo a cui ha partecipato anche il laboratorio di riferimento nazionale dell'Istituto Superiore di Sanità. In questo studio, sono stati analizzati 265 ceppi di *B. pertussis* isolati da nove Paesi europei nel periodo 2012-2015 e confrontati con ceppi isolati in un periodo precedente, 1998-2009 (9). Da questo studio si evince che la popolazione dei ceppi di *B. pertussis* in Europa sta cambiando e sta diventando più omogenea dopo l'introduzione del vaccino acellulare; i ceppi di *B. pertussis* circolanti più di recente presentano caratteristiche molecolari in parte diverse dai ceppi di *B. pertussis* circolanti nell'era pre-vaccinale. Naturalmente, i sistemi di sorveglianza attivi nei Paesi Europei permetteranno un costante monitoraggio dei ceppi responsabili di casi di pertosse evidenziando, eventualmente, l'emergenza di cloni più virulenti e caratterizzati dall'espressione di specifici geni importanti nelle varie fasi del processo patogenetico.

Nel ciclo di trasmissione interumana tipica della pertosse, gli adolescenti e gli adulti, fasce di età in cui l'incidenza della malattia sta aumentando (Figura 3), costituiscono una sorgente di

infezione che permette il mantenimento della circolazione del batterio nella popolazione. Nelle fasce di età più avanzate, l'infezione si presenta spesso in modo asintomatico o con sintomi di lieve entità (10).

1998



2016

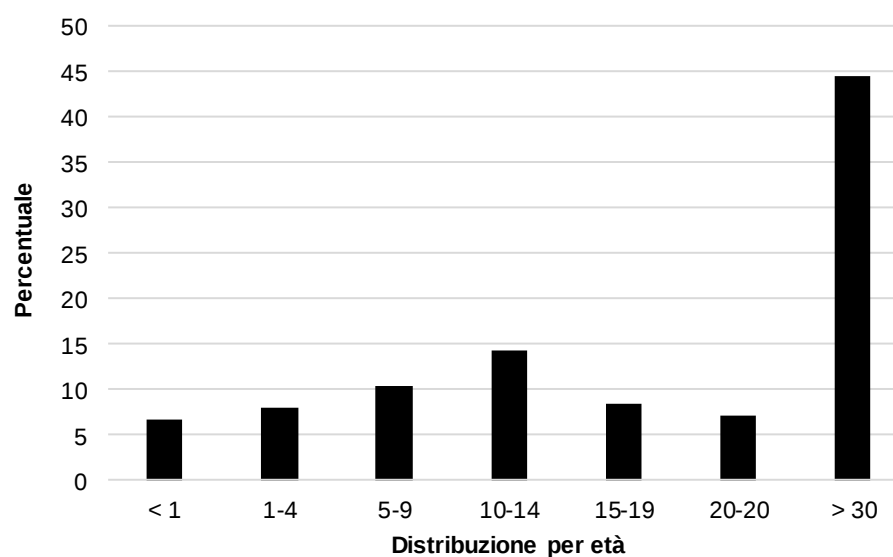


Figura 3. Distribuzione per classi di età dei casi di pertosse nell'Unione Europea nel 1998 e nel 2016 (fonte *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* dell'ECDC)

A conferma di quanto detto sono i numerosi reports di trasmissione intra-familiare per i casi di pertosse tra i neonati (11-13).

Inoltre, diversi studi dimostrano che né l'infezione naturale né la vaccinazione conferiscono un'immunità duratura nel tempo. Gli anticorpi specifici diminuiscono a partire da circa 9 mesi dopo l'esposizione naturale; i livelli di anticorpi protettivi persistono per non più di 10 anni dopo la vaccinazione con vaccino acellulare nell'adulto o per non più di 20 anni dopo l'infezione.

Si osservano, infatti, un maggior numero di casi di pertosse in soggetti vaccinati all'aumentare del tempo, fenomeno descritto in letteratura come *waning immunity* (14) (Figura 4). Per questo, anche nel nuovo Piano di Immunizzazione Nazionale (15) è raccomandata una dose di richiamo in età prescolare, in adolescenza e ogni 10 anni per gli adulti.

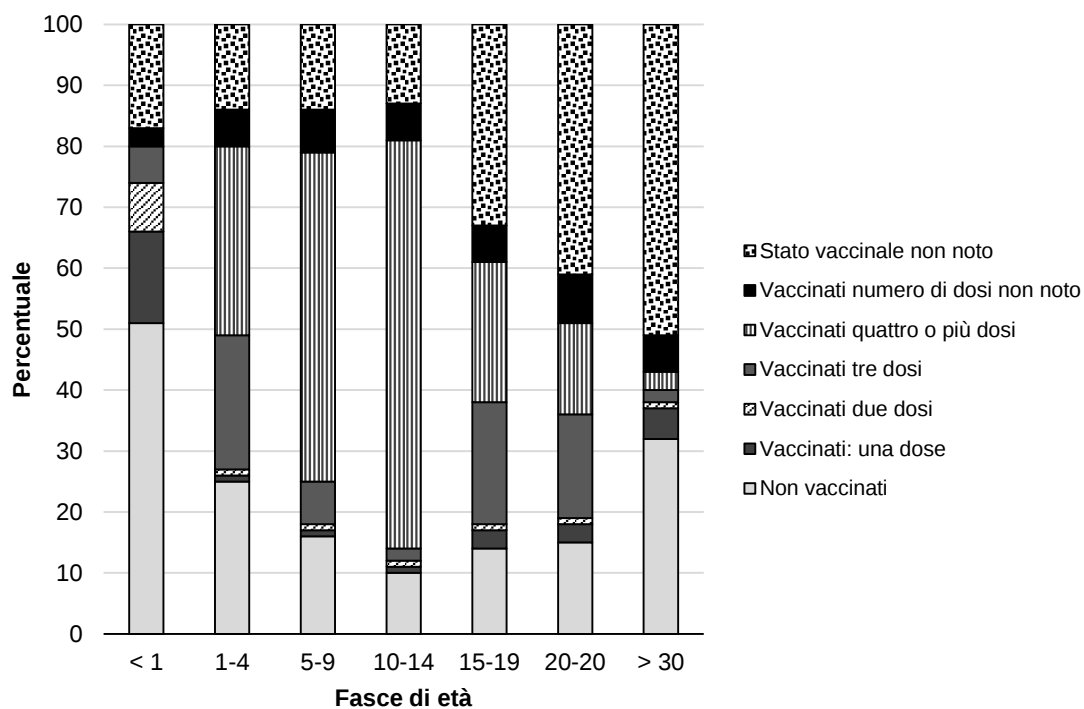


Figura 4. Distribuzione percentuale dei casi di pertosse per stato vaccinale e per classi di età in Europa nel 2016 su un totale di 46953 casi (fonte *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* dell'ECDC)

VACCINI E VACCINAZIONI

I vaccini di vecchia generazione erano costituiti da una preparazione di batteri inattivati chimicamente (vaccini a cellule intere). Sebbene presentassero un'elevata efficacia, erano caratterizzati dalla frequente insorgenza di reazioni avverse, per lo più di tipo moderato, ma più spesso anche molto gravi (16). Per questa ragione, nel tempo, sono stati sviluppati vaccini acellulari costituiti, cioè, da antigeni batterici purificati e inattivati o chimicamente o geneticamente. I vaccini acellulari sono stati introdotti negli schemi di immunizzazione della popolazione a partire dagli anni '90 e soprattutto nei Paesi industrializzati, tra cui l'Italia. A quel tempo, i trials clinici per la valutazione dell'efficacia dei vaccini acellulari dimostrarono la capacità di queste nuove formulazioni vaccinali di proteggere dalla malattia tanto quanto i vaccini a cellule intere (17) ma senza le reazioni avverse delle composizioni cellulari. Tuttavia, diversi anni dopo la loro introduzione, studi di popolazione dimostrarono che l'immunità umorale indotta dai vaccini acellulari tendeva a diminuire nel tempo. È stata stimata la durata della protezione dopo immunizzazione primaria del bambino per un periodo che va dai 5 agli 8 anni (18, 19). Per questo motivo, è stata introdotta una dose di richiamo in età prescolare. Oltre al declinare dell'immunità dopo immunizzazione con vaccini acellulari, è stato dimostrato nel modello animale che, sebbene la vaccinazione protegga dalla malattia, non evita la colonizzazione delle vie aeree superiori aumentando, quindi, la possibilità di trasmissione anche da un soggetto vaccinato (20). Questa osservazione sperimentale è stata successivamente confermata dall'elaborazione di un modello matematico sulle modalità di trasmissione della pertosse nell'uomo (21).

Tutti i vaccini contro la pertosse contengono l'antigene della tossina pertussica (PT). Questo antigene, che in alcuni vaccini è l'unico componente, evoca la produzione di anticorpi protettivi, così come accade per altri antigeni inclusi nelle composizioni vaccinali, quali l'emoagglutinina filamentosa, la pertactina (PRN), le fimbrie di tipo 2 e 3.

Lo studio dei meccanismi della risposta immunitaria all'infezione e alla vaccinazione ha permesso di dimostrare che l'infezione naturale e l'immunizzazione con i vaccini a cellule intere inducono una risposta immunitaria di tipo misto T-helper (Th)-1 / Th-17 (22, 23), finalizzata all'attivazione di macrofagi e neutrofili in sede mucosale. Al contrario, i vaccini acellulari inducono una risposta immunitaria di tipo Th-2 (20, 22, 24) finalizzata alla produzione di anticorpi neutralizzanti le tossine batteriche. L'attivazione di un differente profilo immunitario potrebbe, almeno in parte, spiegare la mancata prevenzione della colonizzazione delle vie respiratorie superiori in individui vaccinati con il vaccino acellulare. La tossina della pertosse, presente come antigene nei vaccini acellulari sembra avere, a causa dell'inattivazione chimica, una capacità sub-ottimale di indurre una memoria immunologica a lungo termine, spiegando così il rapido declino dell'immunità umorale indotta dai vaccini acellulari.

Studi di epidemiologia molecolare hanno dimostrato come negli ultimi anni si sia verificata una divergenza antigenica tra gli isolati clinici di *B. pertussis* e i ceppi vaccinali, per quanto riguarda le proteine superficiali del batterio, come la PT e la PRN, capaci di conferire immunità protettiva (25-27). In particolare, nel corso degli ultimi trenta anni, sono emersi in Europa, Asia, Nord e Sud America, ceppi di *B. pertussis* con una variante allelica del promotore della PT (*ptxP3*) responsabile di una maggior produzione di tossina, rendendo il ceppo e, quindi, il quadro clinico della malattia, particolarmente grave, come osservato nei neonati (28, 29). I ceppi *ptxP3* sono stati identificati per la prima volta nel 1988, sostituendo, ad oggi, quasi la totalità dei ceppi *ptxP1* in quasi tutti i Paesi del mondo (28). Un altro antigene che sta assumendo sempre maggiore rilevanza è la PRN. Ceppi PRN negativi (PRN-), ovvero mancanti della proteina sulla loro superficie

cellulare, sono oggetto di numerosi studi e dibattiti per considerare o meno la necessità di mantenere questo antigene nelle composizioni degli attuali vaccini acellulari (30, 31).

La pertosse nel neonato si presenta con un quadro clinico spesso molto grave, con elevati tassi di letalità. Per prevenire la pertosse nei neonati di pochi giorni o mesi di vita, troppo piccoli per iniziare la vaccinazione antipertosse così come previsto nello schema di immunizzazione primaria (prima dose a tre mesi di vita), la strategia più efficace sembra essere l'immunizzazione della madre durante la gestazione.

La vaccinazione nel terzo trimestre di gravidanza (idealmente intorno alla 28^a settimana) permette la trasmissione transplacentare degli anticorpi anti-pertosse al nascituro. Questo garantirebbe livelli anticorpali protettivi appena dopo la nascita e prima di iniziare l'immunizzazione prevista nel primo anno di vita. Inoltre, la vaccinazione in gravidanza permetterebbe un aumento di anticorpi specifici di classe IgA nel latte materno, importante per l'immunità mucosale. L'efficacia di questa strategia, ampiamente dimostrata da studi nel Regno Unito (32) ha permesso di ridurre l'incidenza della malattia e la mortalità dei neonati in modo significativo.

ASPETTI CLINICI DELLA PERTOSSE

La definizione di caso di pertosse risponde ai criteri Europei ed elaborati dall'ECDC (Commission Implementing Decision 2012/506/EU of 8 August 2012 of the European Parliament and of the Council).

In base alle raccomandazioni fornite dall'ECDC, sono stati suggeriti i criteri di definizione e classificazione dei casi (Tabella 1 e 2).

Tabella 1. Pertosse: criteri e loro definizione

Criterio	Definizione
Clinico	Qualsiasi individuo con tosse di durata almeno di 2 settimane e almeno 1 dei seguenti sintomi: tosse parossistica, urlo inspiratorio, vomito post-tussivo; o qualsiasi individuo con una diagnosi clinica di pertosse o episodi apneici nel neonato. <i>Nota: adulti, adolescenti o bambini vaccinati possono presentare un quadro clinico atipico. Dovrebbero essere investigate le caratteristiche della tosse, in particolare, se la tosse è parossistica, aumenta durante la notte e in assenza di febbre.</i>
Microbiologico	Almeno uno dei seguenti eventi: a) isolamento di <i>Bordetella pertussis</i> da campione clinico; b) identificazione dell'acido nucleico di <i>Bordetella pertussis</i> in un campione clinico. Come diagnosi indiretta identificazione di anticorpi specifici anti <i>Bordetella pertussis</i> utilizzando metodi ELISA con tossina della pertosse altamente purificata e sieri di riferimento WHO. I risultati dovranno essere interpretati in relazione allo stato vaccinale dell'individuo.
Epidemiologico	Accertata trasmissione da individuo a individuo.

Tabella 2. Classificazione di un caso di pertosse

Tipologia	Definizione
Caso possibile	Qualsiasi individuo che risponda ai criteri clinici
Caso probabile	Qualsiasi individuo che rientri nei criteri clinici con un link epidemiologico
Caso confermato	Qualsiasi individuo che rientri nei criteri clinici e di laboratorio.

A differenza dei pazienti in età pediatrica, gli adolescenti e gli adulti tendono ad avere una malattia con sintomatologia meno grave o, non di rado, con un decorso asintomatico. La sintomatologia spesso si limita ad una tosse non specifica, prolungata e persistente, per cui la conferma di laboratorio per la diagnosi di pertosse in questi pazienti viene raramente richiesta (33). A questo proposito è bene ricordare che, nel 2016, l'ECDC ha riportato 48.466 casi di pertosse con una prevalenza maggiore negli adulti con più di 30 anni di età ovvero il 44,6% del totale dei casi notificati, e una prevalenza nei giovani di età compresa tra i 10 e i 14 anni, pari al 14,4% (vedi Figura 3).

DIAGNOSI MICROBIOLOGICA DELLA PERTOSSE

Esistono due tipi di approccio diagnostico per la pertosse: diretto e indiretto.

I metodi diretti consistono nell'identificazione del microorganismo responsabile della patologia, mediante metodi colturali o molecolari per la rilevazione di materiale genetico. La diagnosi indiretta è essenzialmente di tipo sierologico e consiste nella determinazione di anticorpi specifici nel siero dei pazienti. Tra i metodi diretti, la coltura è universalmente considerata il "golden standard" per la conferma di laboratorio. Questo metodo, però, potrebbe risultare meno sensibile in presenza di una precedente terapia antibiotica e richiede diversi giorni di incubazione e ispezione della piastra di coltura (fino a 7 giorni) per la crescita di *B. pertussis*. La coltura, inoltre, è consigliata solo nelle prime due settimane dalla comparsa dei sintomi. Tuttavia, ottenere il ceppo di *B. pertussis* è di fondamentale importanza per studi genomici e di antibiotico sensibilità dei ceppi circolanti. La ricerca di acidi nucleici specifici di *B. pertussis*, e in particolare la *real time* PCR, risulta essere molto più sensibile oltre che più rapida; ed è, inoltre, raccomandata fino a quattro settimane dall'inizio della sintomatologia. La ricerca tramite immunofluorescenza diretta non viene raccomandata a causa della bassa specificità e non più utilizzata ai fini diagnostici.

La diagnosi sierologica è raccomandata nelle fasi successive della malattia. Da tener presente che i risultati sierologici possono essere influenzati da anticorpi evocati da una precedente vaccinazione antipertosse. In generale, è consigliabile raccogliere in questi casi una coppia di sieri, in fase acuta e in fase convalescente. Per i casi di pertosse con sintomatologia grave che richiedono un rapido ed efficace trattamento del paziente la diagnosi sierologica deve essere sostituita da quella molecolare rapida.

La diagnosi di pertosse, quindi, deve tenere conto della tempistica dell'insorgenza dei sintomi e dello stato vaccinale. Il saggio più idoneo per diagnosticare la pertosse dipende dalla fase temporale della malattia. Nelle indicazioni dell'ECDC (34, 35) in presenza di tosse fino a 2 settimane si suggerisce l'utilizzo simultaneo di coltura e test molecolare; in presenza di tosse da 3 a 4 settimane il test molecolare e il dosaggio nel siero delle immunoglobuline di isotipo IgG dirette contro la PT; in presenza di tosse per più di 4 settimane, invece, si suggeriscono i saggi sierologici (Figura 5).

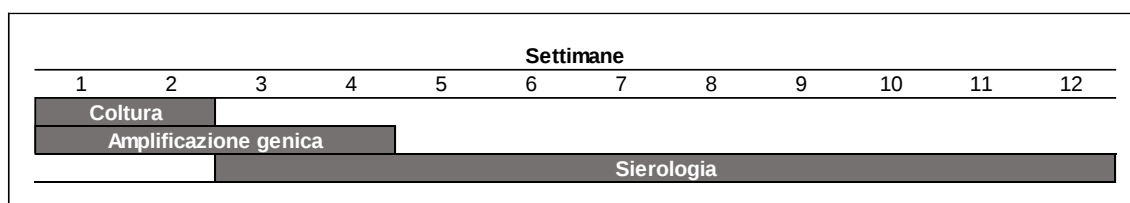


Figura 5. Metodo di conferma di laboratorio per l'infezione da *B. pertussis* in relazione all'inizio della sintomatologia

Metodi diretti

Le principali organizzazioni internazionali – ECDC, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e WHO – hanno emanato delle linee guida per l'adozione di specifici test per la diagnosi di laboratorio. Oltre a considerare la tempistica nell'approccio diagnostico da adottare, come descritto nel paragrafo precedente, è molto importante distinguere tra varie specie di

Bordetella che possano essere causa di una sintomatologia simil-pertussica. Il genere *Bordetella* comprende, infatti, diverse specie patogene per l'uomo. *B. pertussis* è il principale agente eziologico della pertosse; *B. parapertussis* può causare un quadro clinico con manifestazioni cliniche più lievi così come *B. holmesii* e *B. bronchiseptica*. *B. bronchiseptica* è stata identificata come batterio responsabile di infezioni respiratorie in soggetti a contatto con animali, essendo un patogeno per alcune specie di animali domestici.

Raccolta e trasporto dei campioni

I campioni clinici di elezione per la sua ricerca e identificazione possono essere prelevati nel retrofaringe con:

- *tampone nasofaringeo*
semplice da effettuare e senza necessità di strumenti particolari, si utilizza soprattutto negli adulti in quanto è necessaria la collaborazione del paziente. Il tampone, in dacron o nylon, e non in cotone o alginato di calcio, deve essere sottile e flessibile in quanto deve raggiungere l'area posteriore del faringe. Per la ricerca colturale il tampone deve essere trasportato in apposito terreno, Regan-Lowe o Amies; per le indagini molecolari il tampone può essere trasportato senza terreno di trasporto o in soluzione fisiologica.
- *aspirato nasofaringeo*
è il sistema suggerito per entrambi i metodi diagnostici, sia molecolare che colturale, in quanto garantisce un miglior recupero del batterio. Richiede, però, personale specializzato e un appropriato dispositivo.

Per la ricerca colturale i campioni devono essere seminate il prima possibile e entro le quattro ore dal prelievo, mantenendo il campione a temperatura ambiente. I campioni per la ricerca molecolare possono essere, invece, conservati a lungo congelati a -20°C o -80°C e trasportati refrigerati.

Diagnosi di pertosse mediante tecniche colturali

Per la coltivazione di *B. pertussis* vengono utilizzati i terreni Bordet-Gengou (BG) o Regan-Lowe. Per la crescita di *Bordetella spp.* è indispensabile la presenza di sangue di montone o cavallo ad una concentrazione del 10%. Per inibire la crescita della flora commensale il terreno selettivo prevede l'aggiunta di cefalexina (40 µg/mL). Le piastre vengono incubate a 35-36°C in atmosfera umidificata fino a 7-10 giorni, ispezionando le piastre giornalmente. Le colonie su terreno BG presentano la tipica morfologia simile ad una goccia di mercurio. L'identificazione viene condotta sulla base di colorazione di Gram, identificazione biochimica o MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), agglutinazione su vetrino con sieri anti *B. pertussis* oppure tramite metodi molecolari.

Diagnosi di pertosse mediante tecniche molecolari

Sistemi di estrazione degli acidi nucleici

Esistono numerosi kit commerciali per l'estrazione degli acidi nucleici dai campioni biologici. È necessario, tuttavia, aggiungere un controllo nelle fasi di estrazione. È suggerito, inoltre, aggiungere un pretrattamento del campione con un pari volume di proteinasi K alla

concentrazione di 0,4 mg/mL per 60 minuti per fluidificare il campione, soprattutto se prelevato ad un adulto, prima di procedere con l'estrazione dell'acido nucleico.

Target genici per la diagnosi molecolare

I target genici per la diagnosi differenziale di *B. pertussis* vs altre specie del genere *Bordetella* in *real time* PCR sono molteplici. In Tabella 3 sono illustrate la specificità e il numero di copie di ciascun target in ciascun genoma batterico. Quest'ultimo parametro è particolarmente importante in quanto influisce sulla sensibilità e interpretazione del test.

Tabella 3. Target genici per la diagnosi molecolare del genere *Bordetella*

Target	Specificità	Numero di copie per genoma
IS481	<i>B. pertussis</i>	50-200
	<i>B. holmesii</i>	8-10
	<i>B. bronchiseptica</i>	0-5*
IS1001	<i>B. parapertussis</i>	~20
	<i>B. bronchiseptica</i>	0-7*
IS1002	<i>B. pertussis</i>	4-9
	<i>B. parapertussis</i>	9
	<i>B. bronchiseptica</i>	1
<i>h-IS1001</i>	<i>B. holmesii</i>	3-5
<i>ptxA-Pr</i>	<i>B. pertussis</i>	1
<i>recA</i>	<i>B. holmesii</i>	1
<i>flaA</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	1

*Raramente presente.

I target più comunemente utilizzati nei test diagnostici sono *IS481* e, più raramente, *IS1001*, comunemente considerati, soprattutto in passato, specifici per *B. pertussis* e *B. parapertussis*. Attualmente, le maggiori conoscenze di questi elementi genici suggeriscono che, per una corretta identificazione delle varie specie di *Bordetella*, devono essere utilizzati una combinazione di target (27, 36, 37) (Tabella 4).

Tabella 4. Combinazioni dei target genici così come raccomandate da linee guida internazionali

Organizzazione	Target
ECDC	<i>IS481, IS1001, ptxA-Pr</i>
CDC	<i>ptxS1, IS481, IS1001, hIS1001</i>
WHO	<i>IS481, IS1001, IS1002, hIS1001, ptxA-Pr</i>

Nella maggior parte dei casi l'esigenza principale è differenziare *B. pertussis* dalle altre specie di *Bordetella*; questo obiettivo viene raggiunto verificando che i campioni positivi per la presenza di *IS481* siano positivi anche al test per *ptxA-Pr*, tenendo conto che il secondo target è presente in un'unica copia nel genoma dei batteri appartenenti al genere *Bordetella*. Si può verificare, quindi, che campioni positivi per *IS481*, ma a basse concentrazioni, risultino negativi al test per *ptxA-Pr*.

In altri casi, anche a causa della possibile circolazione di *B. parapertussis*, *B. holmesii* e *B. bronchiseptica*, si rende necessario effettuare anche i test per l'identificazione di queste specie.

Generalmente, in parallelo al test per *IS481*, si effettua il test per *IS1001*; in caso di positività deve essere effettuato il test per il gene strutturale della flagellina (*flaA*) al fine di discriminare tra *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*.

Nei casi in cui i test siano positivi per *IS481* e negativi per *ptxA-Pr*, si procede con la ricerca del target *hIS100* specifico per *B. holmesii*. Quanto detto è riassunto nel diagramma a flusso di Figura 6 e lo schema interpretativo è indicato in Tabella 5 che fa riferimento alla raccomandazione condivisa con ECDC (Tabella 4).

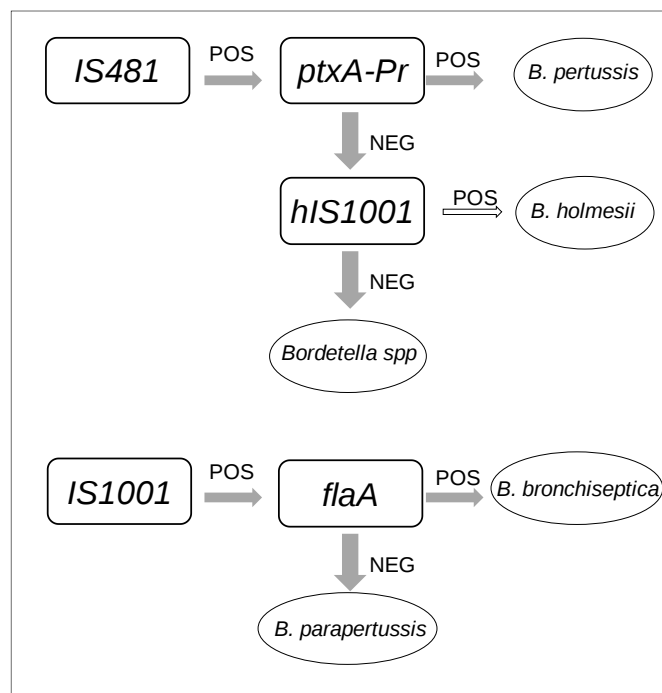


Figura 6. Diagramma a flusso per la diagnosi differenziale tra le varie specie di *Bordetella*.

Tabella 5. Schema interpretativo dei risultati

					Risultato
<i>IS481</i>	<i>IS1001</i>	<i>h-IS1001</i>	<i>ptxA-Pr</i>	<i>flaA</i>	
+	-	-	+	-	<i>B. pertussis</i>
-	+	-	-	-	<i>B. parapertussis</i>
+	-	+	-	-	<i>B. holmesii</i>
-	+	-	-	+	<i>B. bronchiseptica</i>

Nella Tabella 4 sono riportati i dettagli degli oligonucleotidi (27, 36, 37) per tutti i test di amplificazione per singolo target genico e per tipologia di test molecolare, se realtime PCR o PCR.

Tabella 4. Primer e probe per la diagnosi molecolare differenziale del genere *Bordetella*

Target genico	Oligonucleotidi	Sequenze
<i>IS481</i> *	Primer IS481 sense	5' – CAAGGCCGAACGCTTCAT
	Primer IS481 antisense	5' – GAGTTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA
	Probe IS481	6FAM – CAGTCGGCCTTGCGTGAGTGGG – BHQ1
<i>IS1001</i> *	Primer pIS1001 sense	5' – TCGAACGCGTGGAATGG
	Primer pIS1001 antisense	5' – GGCCGTTGGCTTCAAATAGA
	Probe pIS1001	Cy3 – AGACCCAGGGCGCACGCTGTC – BHQ1
<i>hIS1001</i> *	Primer hIS1001 sense	5' – GGCGACAGCGAGACAGAATC
	Primer hIS1001 antisense	5' – GCCGCCTTGGCTCACTT
	Probe hIS1001	Cy3 – CGTGCAGATAGGCTTTTAGCTTGAGCGC – BHQ2
<i>ptxA-pr</i> *	Primer ptxA-Pr sense	5' – CGCCAAGCTGAAGTAGCA
	Primer ptxA-Pr antisense	5' – AAGGAGCGTTCATGCCG
	Probe ptxA-Pr	6FAM - AGAATCGAGGGTTTTGTACGACGAATC—BBQ
<i>flaA</i> **	Primer fla2	5' - AGGCTCCCAAGA GAGAAAGGCTT - 3'
	Primer fla4	5' - TGGCGCCTGCCCTATC - 3'

* TaqMan Real-time PCR

** PCR

Metodi indiretti

Sierologia

I test sierologici possono essere utilizzati dopo tre settimane dall'esordio dei sintomi e sono soprattutto utilizzati per la diagnosi di pertosse negli adolescenti e negli adulti per studi sierologici. Il significato diagnostico, può essere influenzato dalla presenza di anticorpi evocati da una precedente vaccinazione. In questi casi, si suggerisce di eseguire il test sierologico su una coppia di sieri prelevati in fase acuta e in fase convalescente, e valutare una sieroconversione dimostrata da un innalzamento del titolo anticorpale di almeno il 100%.

Gli anticorpi anti-*B. pertussis* possono essere rilevati mediante test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); di recente sono stati sviluppati metodi di rilevazione basati sulla chemiluminescenza (*ChemiLuminescence ImmunoAssay*, CLIA).

Le linee guida elaborate a livello europeo richiedono l'utilizzo di PT purificata come unico antigene nei test sierologici sia commerciali che *in-house*, in quanto solo gli anticorpi anti-PT sono specifici per *B. pertussis*, mentre anticorpi diretti contro altri antigeni quali la emagglutinina filamentosa (FHA) possono dare luogo a falsi positivi a causa di cross-reattività con altre specie batteriche.

Nella diagnosi sierologica un aspetto fondamentale riguarda la classe di immunoglobuline (Ig) da analizzare. È ampiamente dimostrato che la misurazione delle immunoglobuline di isotipo G (IgG) anti-PT è l'unica altamente sensibile e specifica. L'efficacia diagnostica della misurazione degli anticorpi di isotipo IgA non è del tutto chiarita; per questo, si raccomanda la loro misurazione solo in un secondo momento per confermare un eventuale risultato indeterminato delle IgG. La misurazione degli anticorpi di isotipo IgM, invece, manca di sensibilità ed è, pertanto, inutile ai fini diagnostici (38-40).

Le concentrazioni di anticorpi anti-PT (IgG o IgA) devono essere espresse in unità internazionali per mL (IU/mL), a tal fine è necessario che nel saggio sierologico sia incluso uno

standard di riferimento internazionale (*First WHO International Standard for Pertussis Antiserum Human*) (41). L'interpretazione del dato sierologico presenta alcune difficoltà, infatti la risposta immunitaria contro l'infezione o la vaccinazione non può essere distinta poiché i titoli anticorpali IgG anti-PT rimangono elevati (> 100 IU/mL) fino a circa un anno dopo la vaccinazione. Pertanto, è necessario conoscere la storia vaccinale dei pazienti prima di procedere ad eventuale saggio sierologico e per una corretta interpretazione.

Nel caso di indisponibilità di un secondo campione di siero, il test sierologico può essere eseguito solo a supporto di una diagnosi clinica e non come conferma di laboratorio. Non esiste, inoltre, un valore di *cut-off* univoco per stabilire la positività o meno del campione e ne sono stati proposti diversi.

Recentemente, un documento tecnico dell'ECDC (35) ha suggerito l'utilizzo di un algoritmo per la corretta diagnosi sierologica (Figura 7).

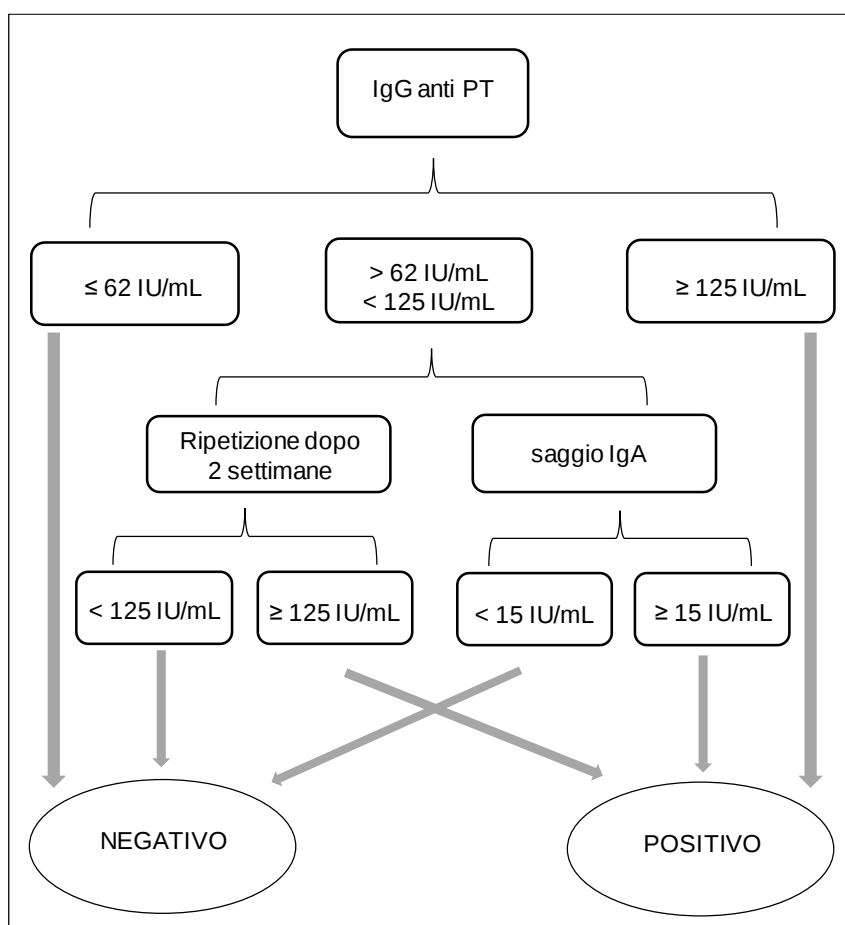


Figura 7. Algoritmo per la diagnosi sierologica di pertosse

Recentemente abbiamo confrontato l'efficacia diagnostica di test ELISA e CLIA disponibili in commercio in Italia (42). A questo proposito è importante sottolineare come la scelta del *cut-off* di positività nella grande maggioranza dei kit di diagnosi sierologica faccia riferimento allo studio condotto da Riffelmann e colleghi che ha suggerito la definizione di campioni negativi con concentrazioni IgG-PT inferiori a 40 UI/mL, campioni intermedi con concentrazioni IgG-PT che

vanno da 40 a 100 IU/mL e campioni positivi con concentrazioni IgG-PT uguali a o superiore a 100 IU/mL (43). Il nostro studio ha permesso di stabilire che solo i kit diagnostici con la PT come unico antigene, ed esprimendo i risultati in IU/mL, hanno una performance diagnostica elevata (42) utilizzando come cut-off di positività e negatività valori ≥ 100 IU/mL e ≤ 40 IU/mL, rispettivamente.

Altri metodi di indagine sierologica, come la micro-agglutinazione, la fissazione del complemento e l'immunofluorescenza indiretta non sono raccomandati in quanto, si è dimostrato, presentano una bassa sensibilità e/o specificità.

LA PERTOSSE IN ITALIA

Diffusione della malattia

In Italia, la vaccinazione antipertosse è raccomandata dal 1961 quando è stato introdotto il vaccino inattivato a cellule intere. Le coperture vaccinali sono rimaste basse, sotto il 20%, fino all'introduzione del vaccino acellulare nel 1995 con il quale le coperture hanno raggiunto il 90%. L'ulteriore incremento delle coperture vaccinali si è verificato dal 2002 con l'introduzione dei vaccini combinati e disponibili in tutte le Regioni italiane.

Nonostante le limitate coperture vaccinali a quel tempo, nel periodo di utilizzo del vaccino a cellule intere l'incidenza della pertosse e la relativa mortalità si era drasticamente ridotta, anche se epidemie ogni 3-5 anni venivano comunque notificate in Italia (44).

In Italia, la pertosse è una malattia a notifica obbligatoria (DM 15/12/1990), ma la diagnosi si basa soprattutto su sintomi clinici (caso possibile) e la conferma di laboratorio è raramente eseguita (45, 46).

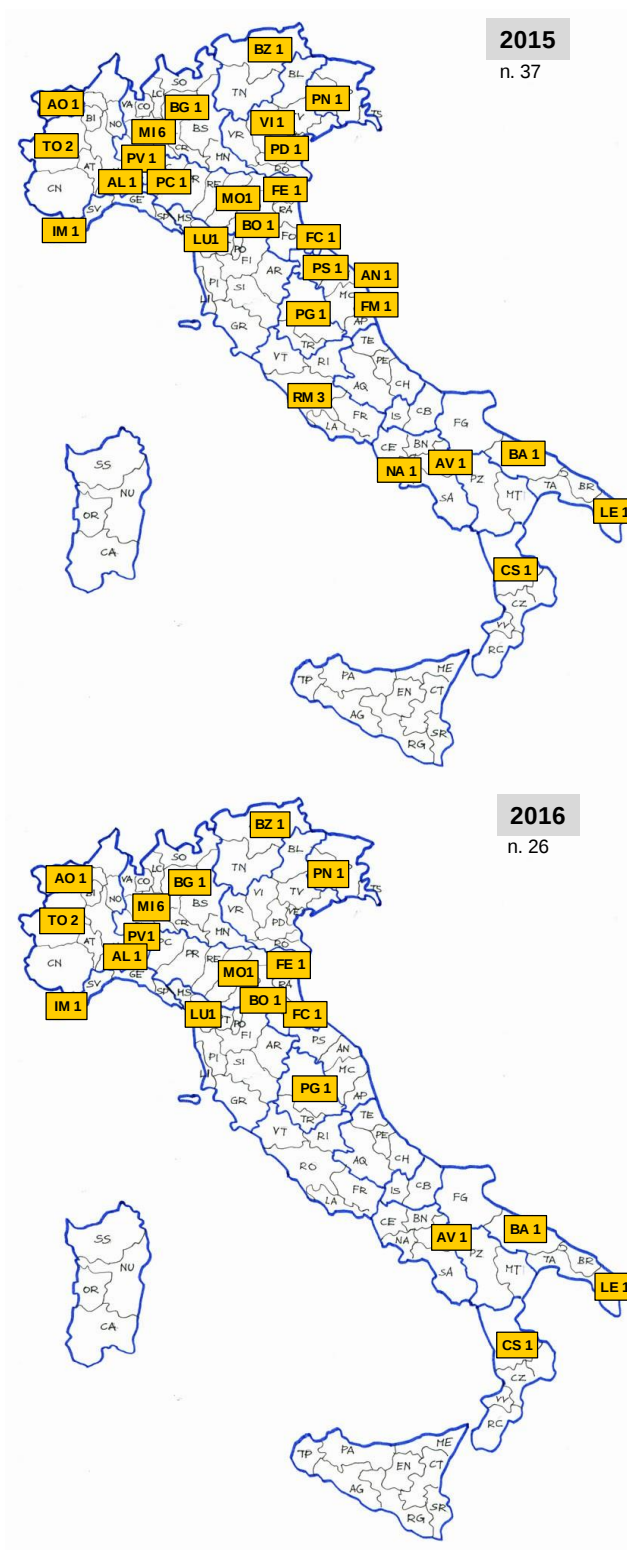
In base ai dati del Ministero della Salute (consultabili all'indirizzo <http://www.salute.gov.it/portale/temi/dati/defcons/Malattie.jsp>), nel nostro Paese l'incidenza della pertosse è in diminuzione, anche se i neonati di età inferiore ad un anno hanno i tassi di incidenza più elevati (44). Tuttavia, vi è da considerare una percentuale di sottonotifica e di sottodiagnosi che probabilmente sottostima la reale situazione nel Paese.

Studi di sieroprevalenza hanno dimostrato come nella popolazione adulta italiana anticorpi anti *B. pertussis* siano presenti a suggerire un mantenimento della circolazione del patogeno nella popolazione (47), confermando dati precedenti (45). Questo potrebbe spiegare, almeno in parte, diversi casi di pertosse segnalati in numerose regioni italiane (48, 49). La scarsa richiesta di una conferma di laboratorio nella diagnosi di un caso sospetto di pertosse (50) costituisce un aspetto critico per la valutazione del reale impatto della malattia insieme alla mancata diagnosi differenziale tra le varie specie di *Bordetella*.

Il problema della sottostima, o del non corretto utilizzo dei test diagnostici, assume una rilevanza particolare per la stima dei casi di pertosse nei neonati, sotto i 6 mesi di età. Tra i neonati, soprattutto durante la stagione invernale, la possibilità di coinfezioni con virus quali il virus respiratorio sinciziale (VRS) (51-53) dovrebbe essere sempre presa in considerazione negli approcci diagnostici di routine. I neonati sono considerati i soggetti più a rischio non solo per la malattia ma anche per il numero di gravi conseguenze. La tosse parossistica, il vomito post-tussivo, insieme a cianosi e apnea sono i sintomi clinici più frequentemente registrati nei bambini non ancora immunizzati o con una immunizzazione incompleta e affetti da pertosse (29).

Ricognizione delle tecniche diagnostiche

Nel 2015 e nel 2016 sono stati inviati dei questionari a cento laboratori di microbiologia sul territorio nazionale allo scopo di conoscere i test diagnostici utilizzati nella pratica routinaria nella conferma di laboratorio di un caso sospetto di pertosse (Appendice A). Ai responsabili dei laboratori sono state richieste informazioni relative agli approcci diagnostici utilizzati e al numero di campioni analizzati nell'anno. La ricognizione è stata effettuata con il supporto dell'Associazione dei Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI). I laboratori che hanno risposto al questionario sono riportati in Figura 8, suddivisi per anno di attività e provincia (Appendice B).



**Figura 8. Numero di laboratori per provincia
partecipanti alla ricognizione per gli anni 2015 e 2016**

Hanno risposto 37 laboratori per il 2015 e 26 laboratori per il 2016, concentrati prevalentemente nel centro-nord del Paese. I dati ottenuti non hanno mostrato variazioni particolari tra il 2015 e il 2016 nella tipologia di test utilizzati (Figura 9). Il test diagnostico più diffuso risulta quello sierologico, mentre solo circa la metà dei laboratori utilizza un test molecolare. In un terzo dei laboratori viene effettuata la coltura che permette studi di genomica e di sensibilità agli antibiotici (Figura 9A). La metà dei laboratori ha capacità per un unico tipo di esame diagnostico (Figura 9B); questo dato, piuttosto preoccupante, limita il successo e l'adeguatezza del saggio diagnostico vista la necessità di utilizzare test diversi a seconda della fase della malattia in cui viene prelevato il campione e la necessità di fare riferimento ad un algoritmo specifico dei target genici utilizzati per la diagnosi differenziale tra le varie specie di *Bordetella*.

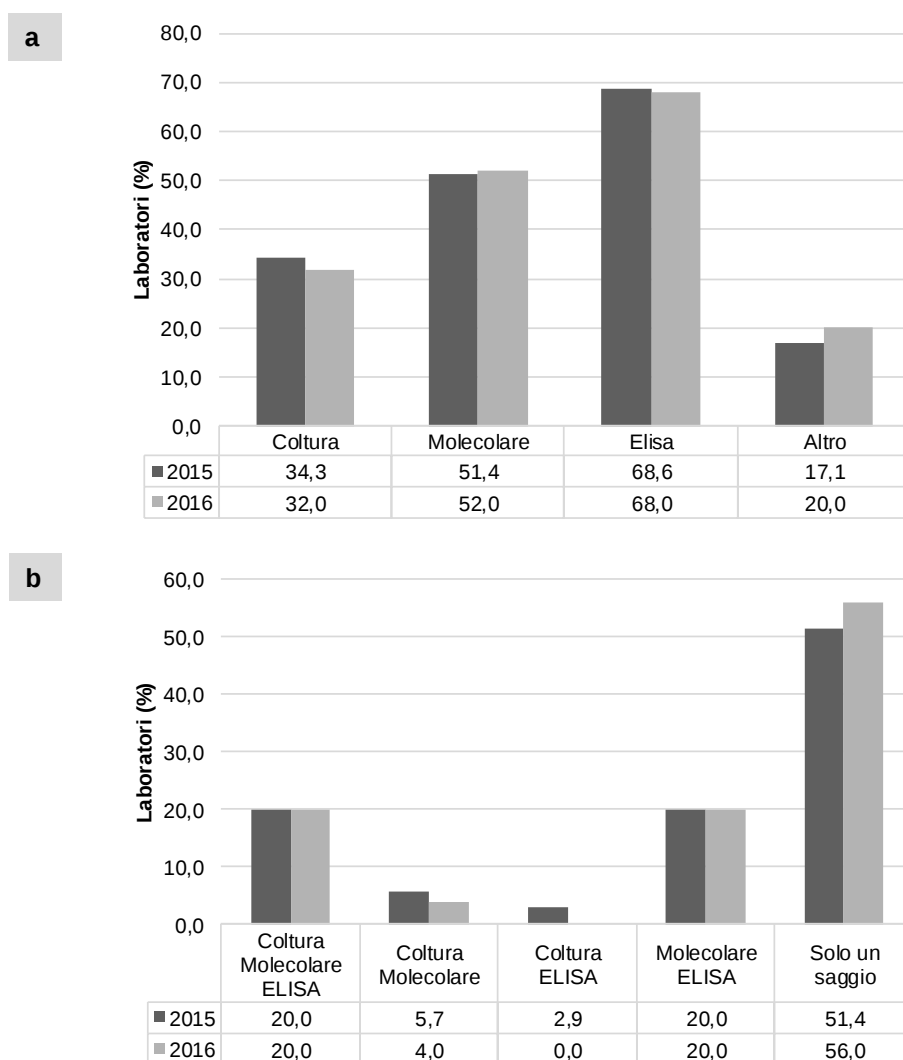


Figura 9. Saggi diagnostici utilizzati nei laboratori partecipanti alla ricognizione: per ciascun saggio (a); per combinazione di saggi (b)

Per quanto riguarda i sistemi di ricerca molecolare di pertosse si è osservato che sono in uso diversi sistemi e kit commerciali che sono, però, tutti basati esclusivamente sulla rilevazione del target *IS481* (Figura 10). L'utilizzo di questo target garantisce, a parità di metodica, una maggiore sensibilità per la presenza ripetuta della sequenza nel genoma del batterio fino a 200 volte, ma, per quanto già discusso, non sufficiente ad una interpretazione univoca del risultato. È necessario sempre l'utilizzo di una combinazione di target genici negli approcci molecolari diagnostici per la pertosse.

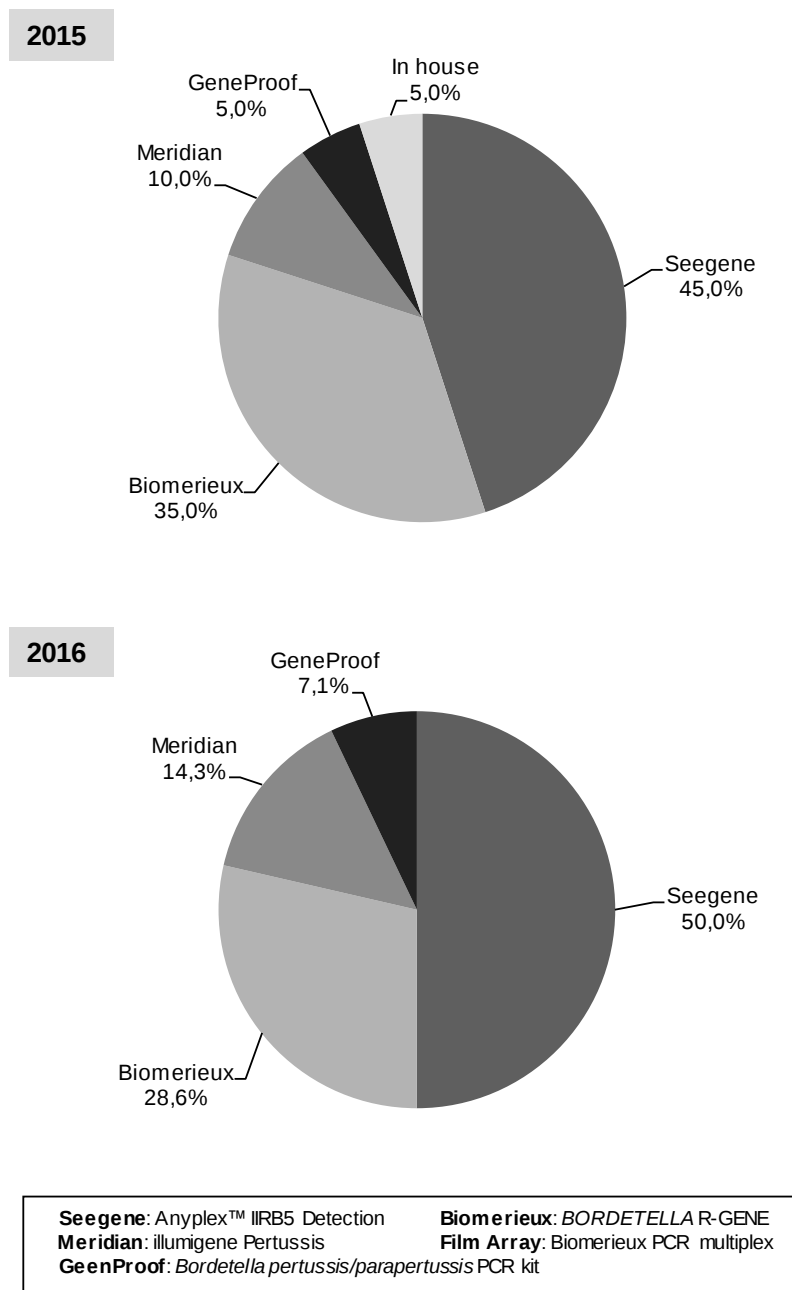


Figura 10. Test molecolari utilizzati nel 2015 e 2016

Sebbene molti laboratori utilizzino saggi commerciali ELISA per la diagnosi della pertosse, un'analisi dei kit utilizzati ha permesso di evidenziare numerose criticità. È, infatti, un dato ormai acquisito che la corretta diagnosi sierologica di pertosse richieda come unico antigene la PT purificata al fine di evitare cross-reazioni con antigeni di altre specie batteriche. Inoltre, solo le IgG e le IgA consentono di ottenere un dato che abbia sufficiente specificità (44). Tuttavia, solo un terzo dei saggi commerciali utilizzati conteneva come unico antigene la PT purificata (Figura 11 e 12).

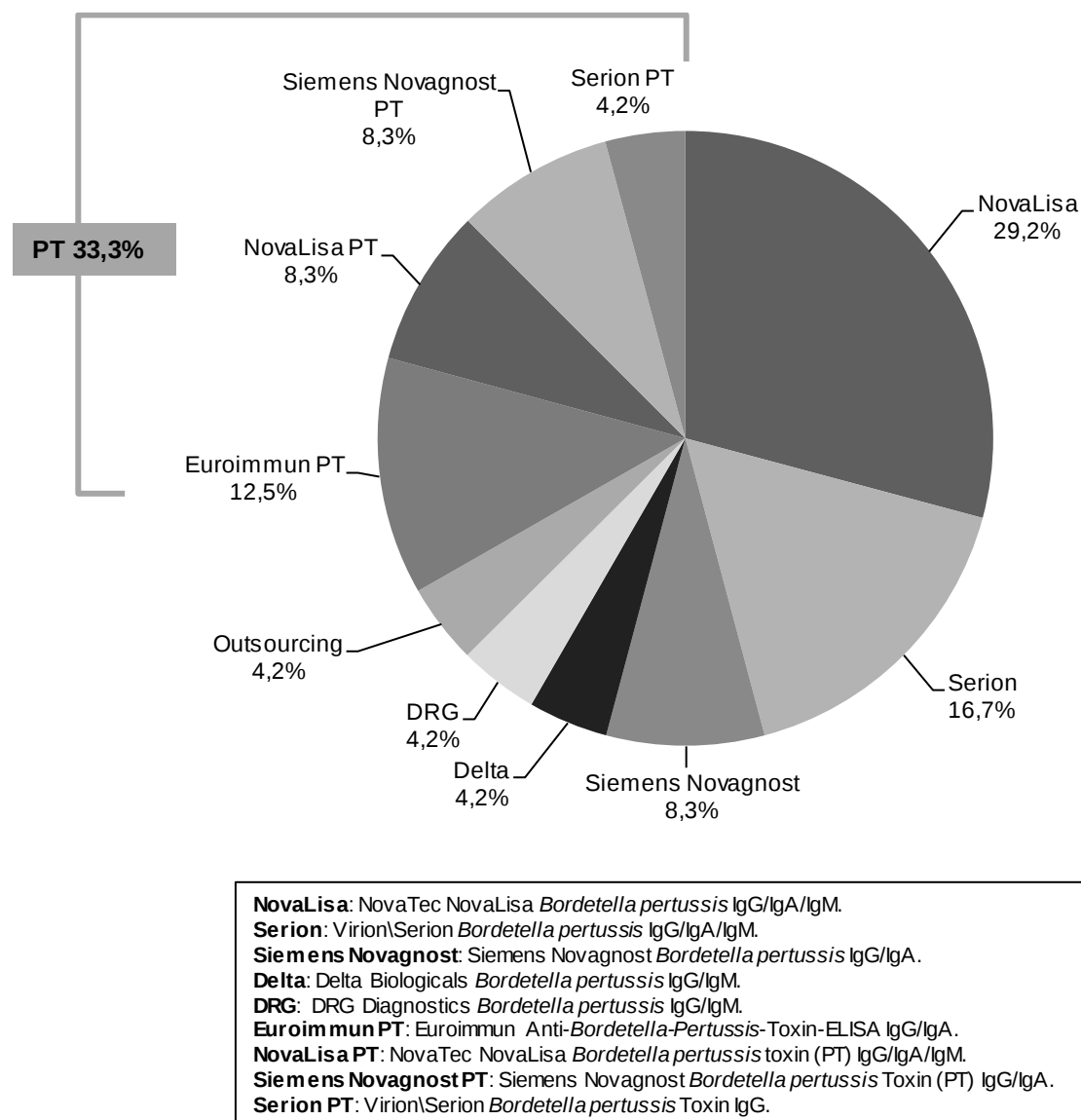


Figura 11. Saggi ELISA utilizzati nel 2015

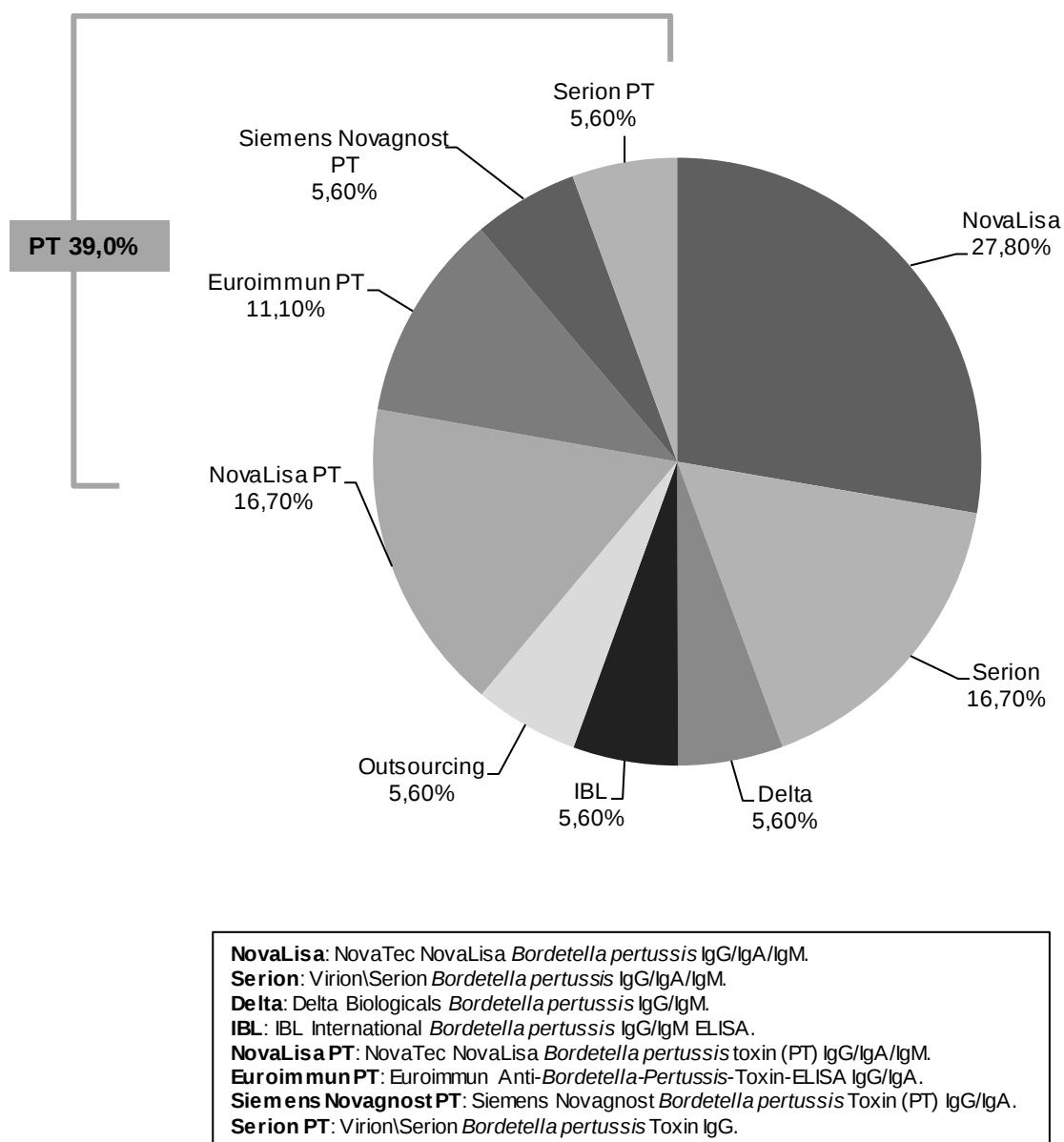


Figura 12. Saggi ELISA utilizzati nel 2016

La metà dei laboratori interpellati utilizzava saggi in grado di determinare le IgM (Figure 13 e 14) che, come già ricordato, sono inutili ai fini diagnostici.

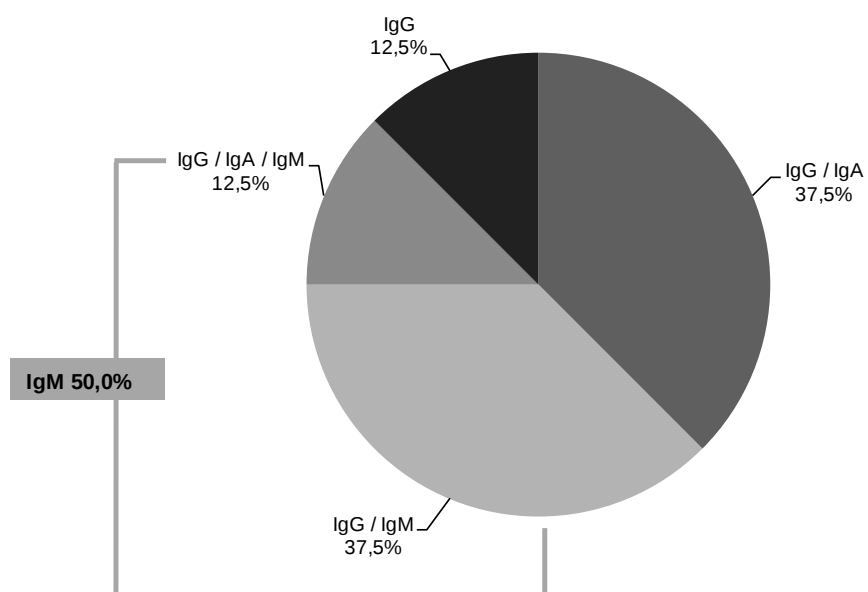


Figura 13. Saggi ELISA utilizzati nel 2015 ripartiti per tipologia di Ig identificate

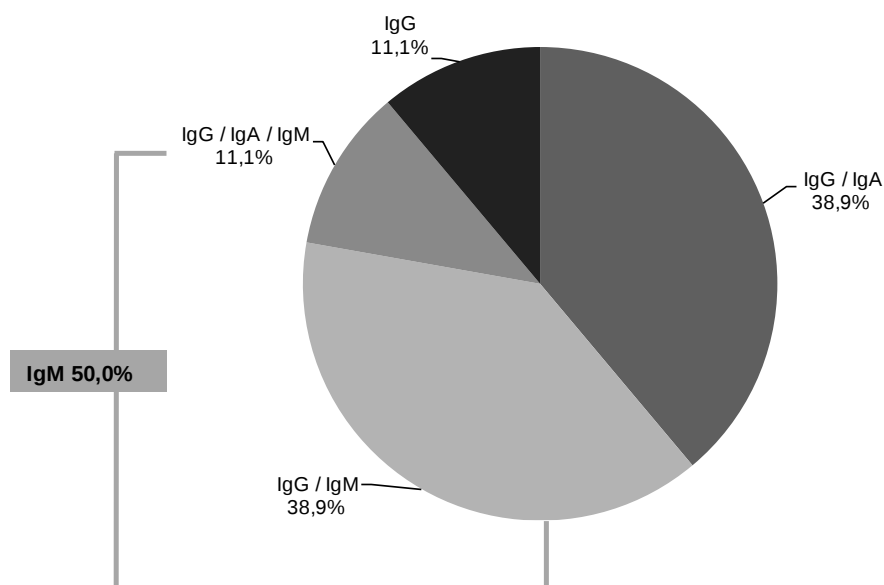


Figura 14. Saggi ELISA utilizzati nel 2016 per tipologia di Ig identificate

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper, August 2015--Recommendations. *Vaccine* 2016;34(12):1423-5.
2. Yeung KHT, Duclos P, Nelson EAS, Hutubessy RCW. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 2017;17(9):974-80.
3. Winter K, Glaser C, Watt J, Harriman K, (CDC) CfDCaP. Pertussis epidemic--California, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63(48):1129-32.
4. Cherry JD. Epidemic pertussis in 2012--the resurgence of a vaccine-preventable disease. *N Engl J Med* 2012;367(9):785-7.
5. van der Maas NA, Mooi FR, de Greeff SC, Berbers GA, Spaendonck MA, de Melker HE. Pertussis in the Netherlands, is the current vaccination strategy sufficient to reduce disease burden in young infants? *Vaccine* 2013;31(41):4541-7.
6. Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Donegan K, *et al.* Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet* 2014;384(9953):1521-8.
7. Elomaa A, He Q, Minh NN, Mertsola J. Pertussis before and after the introduction of acellular pertussis vaccines in Finland. *Vaccine* 2009;27(40):5443-9.
8. Burns DL, Meade BD, Messonnier NE. Pertussis resurgence: perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge. *J Infect Dis* 2014;209 Suppl 1:S32-5.
9. Barkoff AM, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Hoegh SV, Guillot S, *et al.* Surveillance of Circulating *Bordetella pertussis* Strains in Europe during 1998 to 2015. *J Clin Microbiol* 2018;56(5).
10. Clark TA. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis* 2014;209(7):978-81.
11. Fedele G, Carollo M, Palazzo R, Stefanelli P, Pandolfi E, Gesualdo F, *et al.* Parents as source of pertussis transmission in hospitalized young infants. *Infection* 2017;45(2):171-8.
12. Wiley KE, Zuo Y, Macartney KK, McIntyre PB. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine* 2013;31(4):618-25.
13. Sali M, Buttinelli G, Fazio C, Vacca P, La Sorda M, Carannante A, *et al.* Pertussis in infants less than 6 months of age and household contacts, Italy, April 2014. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11(5):1173-4.
14. Kurova N, Timofeeva EV, Guiso N, Macina D. A cross-sectional study of *Bordetella pertussis* seroprevalence and estimated duration of vaccine protection against pertussis in St. Petersburg, Russia. *Vaccine* 2018;36(52):7936-42.
15. Ministero della Salute. *Piano Nazionale Prevenzione Vaccinale. PNPV 2017-2019*. Roma: Ministero della Salute; 2017.
16. Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics* 1981;68(5):650-60.
17. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, *et al.* A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med* 1996;334(6):341-8.
18. Gustafsson L, Hessel L, Storsaeter J, Olin P. Long-term follow-up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5, and 12 months of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age. *Pediatrics* 2006;118(3):978-84.

19. Misegades LK, Winter K, Harriman K, Talarico J, Messonnier NE, Clark TA, *et al.* Association of childhood pertussis with receipt of 5 doses of pertussis vaccine by time since last vaccine dose, California, 2010. *JAMA* 2012;308(20):2126-32.
20. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(2):787-92.
21. Althouse BM, Scarpino SV. Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*. *BMC Med* 2015;13:146.
22. Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, Misiak A, *et al.* Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog* 2013;9(4):e1003264.
23. Fedele G, Spensieri F, Palazzo R, Nasso M, Cheung GY, Coote JG, *et al.* *Bordetella pertussis* commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways. *PLoS One* 2010;5(1):e8734.
24. Ausiello CM, Lande R, Urbani F, Di Carlo B, Stefanelli P, Salmaso S, *et al.* Cell-mediated immunity and antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens in children with a history of pertussis infection and in recipients of an acellular pertussis vaccine. *J Infect Dis* 2000;181(6):1989-95.
25. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 1998;66(2):670-5.
26. Kallonen T, He Q. *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev Vaccines* 2009;8(7):863-75.
27. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, *et al.* Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect.* 2009;59(4):225-31.
28. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, *et al.* *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1206-13.
29. Stefanelli P, Buttinelli G, Vacca P, Tozzi AE, Midulla F, Carsetti R, *et al.* Severe pertussis infection in infants less than 6 months of age: clinical manifestations and molecular characterization. *Hum Vaccin Immunother* 2017:0.
30. Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, Qin X, *et al.* Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis* 2015;60(2):223-7.
31. Stefanelli P, Fazio C, Fedele G, Spensieri F, Ausiello CM, Mastrantonio P. A natural pertactin deficient strain of *Bordetella pertussis* shows improved entry in human monocyte-derived dendritic cells. *New Microbiol* 2009;32(2):159-66.
32. Dabrera G, Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, *et al.* A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012-2013. *Clin Infect Dis* 2015;60(3):333-7.
33. Senzilet LD, Halperin SA, Spika JS, Alagaratnam M, Morris A, Smith B, *et al.* Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. *Clin Infect Dis* 2001;32(12):1691-7.
34. 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.
35. European Centre for Disease Prevention and Control. *Guidance and Protocol for the serological diagnosis of human infection with Bordetella pertussis*. Stockholm: ECDC; 2012.

36. Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, Tondella ML. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2011;49(12):4059-66.
37. 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* 2009;58(Pt 8):1023-9.
38. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann M, Wirsing von König CH, *et al.* What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(3):307-12.
39. Watanabe M, Connelly B, Weiss AA. Characterization of serological responses to pertussis. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(3):341-8.
40. Crowcroft NS, Pebody RG. Recent developments in pertussis. *Lancet* 2006;367(9526):1926-36.
41. Xing D, Wirsing von König CH, Newland P, Riffelmann M, Meade BD, Corbel M, *et al.* Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(3):303-11.
42. Fedele G, Leone P, Bellino S, Schiavoni I, Pavia C, Lazzarotto T, *et al.* Diagnostic performance of commercial serological assays measuring *Bordetella pertussis* IgG antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90(3):157-62.
43. 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.
44. Gonfiantini MV, Carloni E, Gesualdo F, Pandolfi E, Agricola E, Rizzuto E, *et al.* Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Euro Surveill* 2014;19(40):20921.
45. Gabutti G, Bergamini M, Bonanni P, Guido M, Fenoglio D, Giammanco A, *et al.* Assessment of humoral and cell-mediated immunity against *Bordetella pertussis* in adolescent, adult, and senior subjects in Italy. *Epidemiol Infect* 2008;136(11):1576-84.
46. He Q, Barkoff AM, Mertsola J, Glismann S, Bacci S, (EUpertstrain) EBeg, *et al.* 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).
47. Palazzo R, Carollo M, Bianco M, Fedele G, Schiavoni I, Pandolfi E, *et al.* Persistence of T-cell immune response induced by two acellular pertussis vaccines in children five years after primary vaccination. *New Microbiol* 2016;39(1):35-47.
48. Chiappini E, Berti E, Sollai S, Orlandini E, Galli L, de Martino M. Dramatic Pertussis Resurgence in Tuscan Infants in 2014. *Pediatr Infect Dis J* 2016;35(8):930-1.
49. Loconsole D, De Robertis AL, Morea A, Metallo A, Lopalco PL, Chironna M. Resurgence of Pertussis and Emergence of the Ptxp3 Toxin Promoter Allele in South Italy. *Pediatr Infect Dis J* 2018;37(5):e126-e31.
50. Gonfiantini MV, Villani A, Gesualdo F, Pandolfi E, Agricola E, Bozzola E, *et al.* Attitude of Italian physicians toward pertussis diagnosis. *Hum Vaccin Immunother* 2013;9(7):1485-8.
51. Hall CB. The burgeoning burden of respiratory syncytial virus among children. *Infect Disord Drug Targets* 2012;12(2):92-7.
52. Korppi M, Hiltunen J. Pertussis is common in nonvaccinated infants hospitalized for respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(4):316-8.
53. Nicolai A, Nenna R, Stefanelli P, Carannante A, Schiavariello C, Pierangeli A, *et al.* *Bordetella pertussis* in infants hospitalized for acute respiratory symptoms remains a concern. *BMC Infect Dis* 2013;13:526.

APPENDICE A
Questionario conoscitivo
per l'utilizzo di test diagnostici per la pertosse

Scheda di ricognizione per la diagnosi di *Bordetella pertussis* anni 2015 - 2016

Laboratorio/Struttura: _____
 Indirizzo _____
 Nome del Direttore _____
 Regione: _____
 Città: _____
 Nome compilatore + indirizzo di posta elettronica
 (in stampatello): _____

Parte 1 – Tecniche diagnostiche utilizzate

1. Quali metodiche sono utilizzate per la diagnosi di pertosse?

(sono possibili risposte multiple)

Anno 2015

- ☐ Coltura
☐ PCR o altro test molecolare
☐ ELISA o altro test sierologico
☐ Altro (specificare): _____

Anno 2016

- ☐ Coltura
☐ PCR o altro test molecolare
☐ ELISA o altro test sierologico
☐ Altro (specificare): _____

2. Su quali campioni biologici viene effettuata la diagnosi di pertosse nel vostro laboratorio?

(sono possibili risposte multiple)

Anno 2015

- ☐ Aspirato naso-faringeo
☐ Tampone naso-faringeo
☐ Siero
☐ Altro (specificare): _____

Anno 2016

- ☐ Aspirato naso-faringeo
☐ Tampone naso-faringeo
☐ Siero
☐ Altro (specificare): _____

3. Quale tipo di tampone viene principalmente utilizzato per la coltura nel vostro laboratorio?

Anno 2015

- ☐ Cotone
☐ Nylon
☐ Dacron
☐ Altro (specificare): _____

Anno 2016

- ☐ Cotone
☐ Nylon
☐ Dacron
☐ Altro (specificare): _____

4. Quale terreno di coltura viene utilizzato nel vostro laboratorio per la crescita di *B. pertussis*?

Anno 2015

- ☐ Regan-Lowe
☐ Bordet-Gengou
☐ Stainer-Scholte broth
☐ Altro (specificare): _____

Anno 2016

- ☐ Regan-Lowe
☐ Bordet-Gengou
☐ Stainer-Scholte broth
☐ Altro (specificare): _____

5. Quale metodo molecolare viene utilizzato nel vostro laboratorio per la diagnosi di pertosse?

(sono possibili risposte multiple)

Anno 2015

- ☐ Real-Time PCR
☐ PCR
☐ Altro test molecolare (specificare): _____

Anno 2016

- ☐ Real-Time PCR
☐ PCR
☐ Altro test molecolare (specificare): _____

6. Quale test molecolare viene utilizzato nel vostro laboratorio per la diagnosi di pertosse?

Anno 2015

- ☐ Metodica "in-house"
☐ Kit commerciale (specificare) :

Anno 2016

- ☐ Metodica "in-house"
☐ Kit commerciale (specificare) :

7. Il laboratorio esegue un programma di verifica esterna della qualità (VEQ) dei test molecolari in uso? Se sì specificare:

8. Quale target viene utilizzato mediante test molecolare per l'identificazione di *B. pertussis*?

Anno 2015

- ☐ IS481
☐ Pertussis toxin promoter ptxA-Pr
☐ IS481 e Pertussis toxin promoter ptxA-Pr
☐ Altro (specificare):

Anno 2016

- ☐ IS481
☐ Pertussis toxin promoter ptxA-Pr
☐ IS481 e Pertussis toxin promoter ptxA-Pr
☐ Altro (specificare):

9. Quale test ELISA o altro test sierologico viene utilizzato nel vostro laboratorio?

Anno 2015

- ☐ Metodica "in-house"
☐ Kit commerciale (specificare) :

Anno 2016

- ☐ Metodica "in-house"
☐ Kit commerciale (specificare) :

10. Quali antigeni purificati sono utilizzati nel coating del test sierologico

Anno 2015

- ☐ PT
☐ PT+FHA
☐ Altro (specificare):

Anno 2016

- ☐ PT
☐ PT+FHA
☐ Altro (specificare):

11. Quale classe immunoglobulinica viene misurata nel vostro laboratorio per la diagnosi sierologica di pertosse?

Anno 2015

- ☐ IgG
☐ IgA
☐ IgM

Anno 2016

- ☐ IgG
☐ IgA
☐ IgM

Parte 2 – Valutazione quantitativa

Campioni saggiati per la diagnosi di pertosse (nr. Totale)

con gli esami sierologici	2015: _____	2016: _____
con gli esami colturali	2015: _____	2016: _____
con gli esami molecolari	2015: _____	2016: _____

Saggi positivi (nr. Totale)

esami sierologici	2015: _____	2016: _____
esami colturali	2015: _____	2016: _____
esami molecolari	2015: _____	2016: _____

Nr. totale di saggi positivi su bambini di età <2 mesi: **2015:** _____ **2016:** _____

Nr. totale di saggi positivi su bambini di età <7 mesi: **2015:** _____ **2016:** _____

N. totale di saggi positivi su bambini di età <12 mesi: **2015:** _____ **2016:** _____

APPENDICE B
Laboratori partecipanti al questionario conoscitivo
per l'utilizzo di test diagnostici per la pertosse

Laboratori che hanno partecipato al questionario conoscitivo per l'utilizzo di test diagnostici per la pertosse, anni 2015 e 2016, suddivisi per Regione.

VENETO

Vicenza

Ospedale S. Bortolo, ULSS 6

Patrizia Reatto

Padova

Azienda ospedaliera Padova
UOC microbiologia e virologia

Lucia Rossi

FRIULI VENEZIA GIULIA

Pordenone

Ospedale Pordenone AAS5
Friuli Occidentale Microbiologia e Virologia

Rita De Rosa / Alessandro Camporese

TRENTINO-ALTO ADIGE

Bolzano

Ospedale di Bolzano, Laboratorio aziendale
di Virologia e Microbiologia

*Elisabetta Pagani / Patrizia Rossi
e Patrizia Innocenti*

VALLE D'AOSTA

Aosta

AUSL VDA SS Microbiologia

*Lisa Lucia Chenal, Diego Personettaz,
Massimo di Benedetto*

LIGURIA

Sanremo

ASL 1 Imperiese SSD Microbiologia

Pier Andrea Dusi

PIEMONTE

Torino

AOU Città della salute e della scienza
SC Microbiologia e Virologia

Rossana Cavallo, Anna Maria Barbui

Ospedale Amedeo di Savoia
Lab. Microbiologia e Virologia

Elisa Burdino / Valeria Ghisetti

OR Pinerolo ASL TO3

Valentino Granero

Alessandria

ASO SC Microbiologia

Andrea Rocchetti

Vercelli

ASL VC Laboratorio Analisi e di Microbiologia

Fulvia Milano

LOMBARDIA

Legnano

ASST Ovest Milanese, UOC Microbiologia

Pierangelo Clerici / Massimo De Pachale

Milano

ASP Golgi Redaelli

Roberto D'Angelo

ASST- FBF SACCO

UOC Microbiologia Virologia

Alessandra Lombardi / Maria Rita Gismondo

ASST Grande Ospedale

Metropolitano Niguarda

*Daniela Campisi, Luisa Grassi, Carlo
Federico Perno*

Ospedale San Raffaele

Servizio di medicina di Laboratorio

Marcello Marinelli / Massimo Locatelli

Bergamo

ASST Papa Giovanni XXIII

Claudio F. Farina

Pavia

IRCCS Fondazione Policlinico

San Matteo

Patrizia Cambieri / Piero Marone

EMILIA ROMAGNA

Modena

AOU Policlinico di Modena

Microbiologia e Virologia

Marisa Meacci / Tommaso Trenti

Ferrara

AUSL FE

Laboratorio Unico Provinciale

Enrica Montanari

Cesena

Centro Servizi AUSL Romagna

UO Microbiologia Laboratorio unico

Patrizia Billi / Vittorio Sambri

Bologna

AOU Policlinico Sant'Orsola-Malpighi

Tiziana Lazzarotto / Maria Carla Re

Piacenza

Ospedale Guglielmo da Saliceto

Massimo Confalonieri

TOSCANA

Lucca

Ospedale Versilia USL Nord Ovest

Chiara Vettori / Roberto Diodati

MARCHE

Ancona

Ospedali Riuniti Ancona

Morena Galeazzi

Pesaro

AO Ospedali Riuniti Marche Nord

Enzo Pazzaglia

Fermo

AVG Fermo Laboratorio
di Patologia Clinica

Salvatore Licitra

UMBRIA

Perugia

AO Santa Maria della Misericordia

Antonella Mencacci

LAZIO

Roma

Ospedale Spallanzani - INMI
Policlinico Agostino Gemelli
Ospedale Pediatrico Bambino Gesù

Eugenio Bordi
Maurizio Sanguinetti
Carlo Concato

CAMPANIA

Avellino

AO S.G. Moscato
UOC Microbiologia e Virologia

Annamaria d'Argenio / Anna Todisco

Napoli

Ospedale Cotugno
Microbiologia e Virologia

Novella Carannante / Carlo Tascini

PUGLIA

Lecce

Lab. Dr. Pignatelli Gruppo Lifebrain

Luigi Tagliaferro, Francesco Pignatelli

Bari

Policlinico Bari - UOC di Igiene

Maria Chironna

CALABRIA

Cosenza

Ospedale Annunziata
UO Microbiologia e Virologia

Francesca Greco / Cristina Giraldi

SICILIA

Catania

AOU Policlinico Vittorio Emanuele

Agata Sciacca / Guido Scalia

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2018, 8° Suppl.*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, marzo 2019