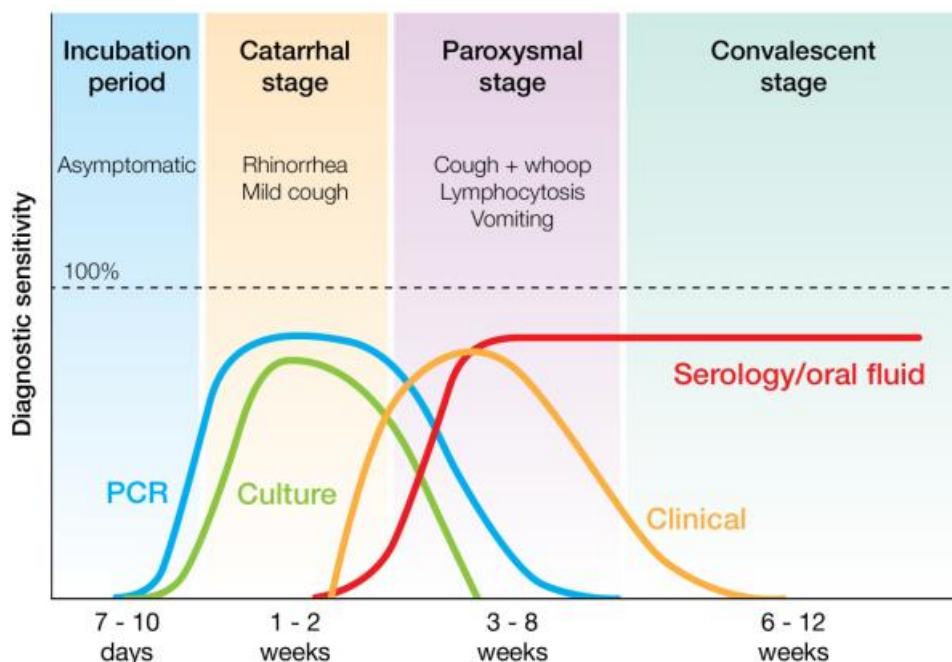


Garā klepus laboratoriskā diagnostika

SIA "Rīgas Austrumu klīniskās universiādes slimnīca" Nacionālās mikrobioloģijas referenes laboratorijas" rekomendācijas

Atbilstoši garā klepus gadījuma definīcijai, kura ir apstiprināta ar Eiropas Komisijas 2018. gada 22. jūnija lēmumu¹, laboratoriskie kritēriji saslimšanas **gadījuma apstiprināšanai** ir:

- *Bordetella pertussis* izolēšana no klīniskā parauga;
- *Bordetella pertussis* nukleīnskābju noteikšana klīniskajā paraugā;
- *Bordetella pertussis* specifisko antivielu noteikšana.



Garā klepus diagnostikas izvēle atbilstoši saslimšanas ilgumam.

Diagnozes apstiprināšanas metodes izvēle ir atkarīga no slimības ilguma kopš sākušās klepus lēkmes, pacienta vecuma un laika pēc pēdējās vakcinācijas vai revakcinācijas saņemšanas:

1. *Bordetella pertussis* izolēšana no klīniskā parauga tiek uzskatīta par diagnostikas „zelta standartu” ar augstu metodes specifiskumu. Izraisītāja izolēšanai jāņem nazofaringeālās iztriepes, nazofaringeālā aspirāta vai krēpu paraugs slimības sākuma stadijā cik vien iespējams ātri, bet ne vēlāk par otro slimības nedēļu. Nazofaringeālo iztriepi ievieto stobriņā ar *Reagan Lowe* transporta barotni vai *Amies* transporta barotnē ar ogli, vai izmanto universālo transporta barotni. Nazofaringeālo aspirātu šļircē vai krēpas ievieto sterilā transporta konteinerī. Pirms transportēšanas uz laboratoriju paņemto paraugu var uzglabāt istabas temperatūrā, lai izvairītos no baktēriju zuduma paraugā. Materiālu transportē uz

¹ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0945&from=EN#page=32>

laboratoriju četru stundu laikā apkārtējās vides temperatūrā. Baktērijas izdalīšana samazinās, ja paraugu transportē uz laboratoriju 4°C temperatūrā vai ilgāk par 48 stundām. *Bordetella pertussis* izolēšana no klīniskā materiāla ir noderīga zīdaiņiem un maziem bērniem.

2. *Bordetella pertussis* nukleīnskābju (DNS) noteikšana klīniskajā paraugā ar reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) metodi ir iespējama pacientiem, kuri klepo mazāk kā četras nedēļas (<28 dienas), tomēr jutīgums ir apgriezti saistīts ar laiku starp slimības sākumu un paraugu noņemšanu. Tāpēc paraugu noņemšana ir ieteicama pēc iespējas ātrāk un ideālā gadījumā līdz 21. dienai pēc simptomu parādīšanās.

B. pertussis galvenokārt piesaistās skropstiņu epitēlijam elpceļos. Tādējādi vēlamais paraugs ir nazofaringeālā iztriepe, nevis degunu eju vai rīkles gala iztriepe. Paraugu paņemšanai izmanto neilona vai dakrona tamponus, savukārt kokvilnas un kalcija algināta tamponus nerekomendē. Nazofaringeālo iztriepi ievieto *Amies* transporta barotnē ar ogli vai *Stuart* transporta barotnē, kā arī šķidrā transporta barotnē. Materiālu transportē uz laboratoriju apkārtējās vides temperatūrā. PĶR diagnostikai der arī tampons sausā stobriņā.

Ir vairāki “mērķa” gēni *Bordetella* sugu noteikšanai. Tā kā vairāki no šiem “mērķa” gēniem ir sastopami dažādās *Bordetella* sugu genomā, šo “mērķa” gēnu izvēle un rezultātu interpretācija ir ļoti svarīga.

Visbiežāk tiek izmantotas insercijas sekvences, jo īpaši IS481 un IS1001. Insercijas sekveni IS481 satur *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmesii* un daži *Bordetella bronchiseptica* celmi. Bet insercijas sekveni IS1001 – *Bordetella parapertussis* un daži *Bordetella bronchiseptica* celmi.

Daudzas laboratorijas un pieejamie komerciālie komplekti interpretē insercijas sekvences IS481 pozitīvs kā *B. pertussis* apstiprinājumu un insercijas sekvences IS1001 pozitīvs kā *B. parapertussis* apstiprinājumu. Tomēr tas īsti nav pareizi. Lai apstiprinātu *B. pertussis* papildus rekomendē noteikt garā klepus toksīna gēnu ptxP.

Šobrīd garā klepus diagnostikai izmanto PĶR, kas nosaka vairākus elpošanas ceļu patogēnus vienlaicīgi. Lai gan šī pieeja ir noderīga elpceļu patogēnu noteikšanai, identificēšanai un diferenciacijai, izstrādātie komplekti nav tik jutīgi kā PĶR, kas paredzēts tikai garā klepus diagnostikai. *Bordetella pertussis* apstiprināšanai rekomendē izmantot insercijas sekvenču (IS481 un IS1001) un toksīna gēna ptxP kombināciju.

Garā klepus diagnostiku ar PĶR rekomendē zīdaiņiem un maziem bērniem, jo ir lielāka iespēja šo infekciju diagnosticēt agrīnā stadijā. Ja pacients klepo divas līdz trīs nedēļas vai ilgāk, ieteicama seroloģiskā diagnostika (anti-PT IgG) vai otrreizēja diagnostika ar PĶR.

3. *Bordetella pertussis* specifisko IgG-anti-PT noteikšana (IgG klase antivielas pret *B. pertussis* toksīnu). Garā klepus seroloģiskā diagnostika visefektīvākā ir pacientiem, kuri klepo vismaz divas līdz trīs nedēļas vai ilgāk. Izmeklēšanas mērķis ir noteikt antivielas pret *Bordetella pertussis* toksīnu. Toksīnu ražo tikai *Bordetella pertussis* baktērija.

Seroloģiskā diagnostika tiek rekomendēta bērniem no divu gadu vecuma, pusaudžiem un pieaugušajiem. Zīdaiņu un mazu bērnu garā klepus saslimšanas diagnostikai izvēles metodes ir PĶR vai *Bordetella pertussis* izolēšana, jo, visticamāk, mazi bērni būs vakcinēti pret garo klepu un iegūtais IgG -anti-PT testēšanas rezultāts būs paaugstināts, kas var būt maldinoši.

Rekomendē izmantot kvantitatīvas ELISA metodes ar augstu specifiskumu un jutību. Seroloģisko metožu galvenie kritēriji ir:

- cietā fāze tiek pārklātas ar attīrītu dabisko *B. pertussis* toksīnu (PT);
- antivielu daudzumu nosaka IU/ml (International Unit/ml – Starptautiskās Vienības uz ml), izmantojot PVO starptautiskā standarta Pertussis antiserumu cilvēkiem ar NIBSC kodu 06/140 vai 06/142;
- noteiktas IgG klases antivielas pret *B. pertussis* toksīnu (PT).

Pašlaik ir pieejami vairāki komerciālie komplekti atbilstoši prasībām. Komplekti, kuros izmantoti citi antigēni nevis *B. pertussis* toksīna vai jauki antigēni un/vai rezultāti izteikti patvaļīgās vērtībās, nav ieteicami specifisko antivielu noteikšanai.

Rezultātu interpretācija ir svarīga. Diagnostiskais antivielu koncentrācijas līmenis 100 vai 125 IU/ml norāda uz nesenu pārslimotu infekciju gada laikā. Savukārt diagnostiskais antivielu koncentrācijas līmenis no 50/62,5 IU/ml līdz zem 100 IU/ml norāda uz nesenu pārslimotu infekciju dažu pēdējo gadu laikā.

Klīniskajā praksē diagnozes pamatā lielākoties ir viens seruma paraugs. Ja diagnozi nevar apstiprināt no viena parauga, tad atbilstoši klīniskajiem simptomiem nepieciešamības gadījumā var paņemt otru seruma paraugu divu līdz četrus nedēļu laikā pēc pirmā parauga paņemšanas. Ja otrā paraugā diagnostiskais antivielu koncentrācijas līmenis ir virs robežvērtības vai, ja starp pirmo un otro paraugu novēro vairāk kā 100% vērtības pieaugumu vai vairāk nekā 50% vērtības samazinājumu virs vai zem diagnostiskā antivielu koncentrācijas līmeņa, rezultātu interpretē kā apstiprinātu diagnozi.

Garā klepus diagnostika ar seroloģiskām metodēm nav ieteicama vismaz gadu pēc vakcinācijas, jo nesenu veiktā vakcinācija uzrādīs paaugstinātu specifisko IgG-anti-PT koncentrāciju asinīs.

Plašāka informācija par garā klepus seroloģisko testēšanu atrodama Eiropas Slimību profilakses un kontroles centra izstrādātajā dokumentā "Laboratory diagnosis and molecular surveillance of *Bordetella pertussis*"² un Pasaules Veselības organizācijas vadlīnijās "Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis*"³. Pēc asins paņemšanas IgG klases antivielu noteikšanai pret *Bordetella pertussis* toksīnu serums vai plazma jāatdala četrus līdz 24 stundu laikā. Ja paraugus testē vēlāk, atdalītu serumu var uzglabāt +2 - +8°C līdz septiņām dienām. Tomēr ilgstošai uzglabāšanai seruma paraugu jāsasaldē -20°C vai zemākā temperatūrā.

Kopsavilkums *Bordetella pertussis* diagnostikā. Galvenie secinājumi garā klepus laboratoriskajā diagnostikā:

- Lai gan paraugu skaits *Bordetella pertussis* izolēšanai no klīniskā materiāla gadu no gada samazinās, to joprojām rekomendē, jo baktēriju izolātus var izmantot cirkulējošo variantu uzraudzībai, vakcīnu efektivitātes novērtēšanai un nākotnes vakcīnu izstrādei. Turklāt nākotnē būs svarīgi noteikt *Bordetella pertussis* rezistenci pret makrolīdiem.
- PĶR ir ieteicama garā klepus diagnostikas metode zīdaiņiem un maziem bērniem, taču pielietotās diagnostiskās sistēmas ir dažādas (multiplex vai monoplex). Tas jāņem vērā izvēloties PĶR metodi diagnostikai.
- Seroloģiskā diagnostika ir visbiežāk izmantotā metode pusaudžiem un pieaugušajiem. Tomēr, lai iegūtu ticamus rezultātus, ir svarīgi noteikt antivielas pret *Bordetella pertussis* toksīnu, izmantojot PVO starptautiskā standarta *Pertussis antiserumu*, un rezultātus nosakot starptautiskajās vienībās uz ml.
- Ja antivielu līmenis zems vai tās ir negatīvas pret *Bordetella pertussis* toksīnu, rekomendēts paraugu izmeklēt arī uz *Bordetella parapertussis*, jo klīniskā aina līdzīga.

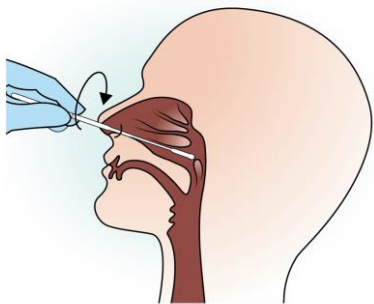
² <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/bordetella-pertussis-laboratory-diagnosis-molecular-surveillance.pdf>

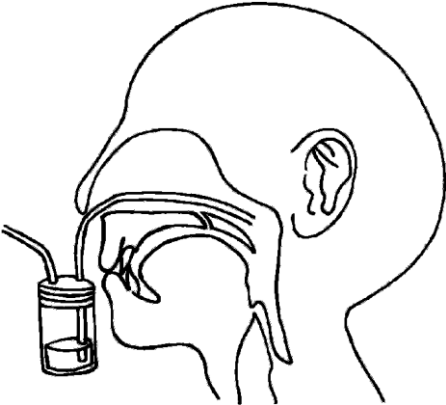


³ <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-manual-for-the-diagnosis-of-whooping-cough-caused-by-bordetella-pertussis-bordetella-parapertussis.-update-2014>

Materiāla ņemšana un transportēšana

Izmeklējumu joma	Parauga veids			
	Nazofaringeālā iztriepe	Nazofaringeālais aspirāts	Krēpas	Asinis (serums, plazma)
Bakterioloģija	Paraugu uzglabā istabas temperatūrā ne ilgāk kā 24 stundas. Transportē uz laboratoriju 4 stundu laikā apkārtējās vides temperatūrā.			
Molekulārā bioloģija	Paraugu šķidrā transporta barotnē vai sausā stobriņā var uzglabāt +4 - +25°C līdz 48 stundām.			
Imūnķīmija (infekciju slimību)				Pēc asins paņemšanas jāatdala serums vai plazma. Serumu var uzglabāt +20 - +25°C līdz 48 stundām, +2 - +8°C līdz septiņām dienām un ilgstošai uzglabāšanai jāsasaldē -20°C vai zemākā temperatūrā.

Paraugu ņemšanas tehnika

Materiāla ņemšana no aizdegunes (nazofarinfeāla iztriepe)	
<p>Ievadīt tamponu vienā nāsī deguna ejā, saudzīgi virzot tamponu gar deguna dobuma apakšu zem apakšējās gliemežnīcas, līdz sasniegta rīkles mugurējā siena (nekādā gadījumā nelietot spēku, lai pārvarētu jebkuru aizsprostojumu). Ar šo pašu tamponu ņemt paraugu arī no otras nāss.</p> <p>Tamponu ievietot:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Amies</i> transporta barotnē ar ogli (ar gēlu) bakterioloģiskiem izmeklējumiem. • Šķidrā transporta barotnē (UTM) vai sausā stobriņā molekulāri bioloģiskiem izmeklējumiem. 	

Materiāla ņemšana no aizdegunes (nazofaringeālais aspirāts)	
<p>Aspirāta ņem no rīkles mugurējās sienas caur degunu, līdzīgi kā iztriepi. Izmanto speciālu komplektu – šļirci ar fizioloģisko šķīdumu, lokanu caurulīti (zondi). Caurulīti pievieno šļircei, izspiež no šļirces lieko fizioloģisko šķīdumu, atstājot 3 ml šķīduma. Apstrādā caurulīti ar lubrikantu. Uzmanīgi, bet ātri ievada caurulīti paralēli deguna pamatnei līdz sasniedz aizdeguni. Ja ievadot caurulīti rodas pretestība, ievada otrā nāsī. Sasniedzot aizdeguni ātri piespiež un pēc tam ievilk atpakaļ šļirces virzuli, lai ātri izspiestu un ievilktu fizioloģisko šķīdumu. Tas jāda ātri, lai izvairītos no šķidruma notecēšanas pacienta rīklē.</p> <p>Atvieno zondi un šļircei uzliek uzgali ar šķidrumu ievieto transporta konteinerī.</p>	
Venozās asins ņemšana	
<p>Venozās asins (2,7–7,0 ml apjomā.) ņemšanai <i>vēlams</i> izmantot vienreizējas sistēmas asins noņemšanai (monovetes, vakutaineri u.tml.) bez antikoagulanta.</p>	
Krēpu paraugu savākšana	
<p>Krēpas (3-5ml) savāc tīrā, sausā, sterilā traukā ar platu atveri un vāciņu, kas cieši noslēdz trauku. Nepieļaut krēpu nokļūšanu uz trauka ārpuses.</p> <p>Ja krēpas atdalās daudz, tad vēlams, lai trauks, kurā tās savāc būtu bezkrāsains un caurspīdīgs, lai caur tā sienu var novērtēt krēpu sadalīšanos slāņos</p> <p>Ja pacientam ir grūtības atklepot, jāveic atkrēpojošo līdzekļu inhalācija un jāiegūst inducētas krēpas.</p>	

Vairāk informācijas par paraugu vākšanu skatīt <https://aslimnica.lv/wp-content/uploads/2021/11/Primaro-paraugu-nemšanas-kartiba-un-riciba-ar-tiem.pdf>

Atsauces:

- ECDC technical report “Laboratory diagnosis and molecular surveillance of *Bordetella pertussis*”⁴.

⁴ <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/bordetella-pertussis-laboratory-diagnosis-molecular-surveillance.pdf>

- WHO “Laboratory manual for Diagnosis of Whooping Cough caused by *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis*”, Update 2014⁵.

Direktore

Iveta Gavare

Ieva Rimšāne 67081520
ieva.rimsane@spkc.gov.lv

⁵ <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-manual-for-the-diagnosis-of-whooping-cough-caused-by-bordetella-pertussis-bordetella-parapertussis.-update-2014>