

Laboratoriumdiagnostiek van infecties met *Bordetella* spp. bij patiënt en populatie

J.F.P. SCHELLEKENS, H.E. DE MELKER

In ongevaccineerde populaties, zoals tot voor kort die van Duitsland, Italië en Zweden, is de circulatie/transmissie van de obligaat humane respiratoire pathogeen *Bordetella pertussis* zo intens dat het grootste deel van de bevolking in de eerste levensjaren en vóór de tienerleeftijd de infectie doormaakt. Een belangrijk deel, naar schatting circa 30 procent, heeft daarbij de typische symptomen van kinkhoest.^{1,3} In gevaccineerde populaties is de situatie veel gunstiger. In Nederland is na introductie van vaccinatie de incidentie van typische kinkhoest, en sterfte daaraan bij de jongste kinderen, enorm teruggedrongen (met meer dan 95 procent). Van eradicatie is echter geen sprake: ook bij gevaccineerden zijn symptotomatische luchtweginfecties met *B. pertussis* (of, veel minder frequent, *Bordetella parapertussis*) blijven voorkomen, en de laatste jaren is de incidentie weer hoger dan voorheen (zie De Melker et al.). De oorzaak is dat enkele jaren na vaccinatie er afname is van vaccingéinduceerde immuniteit. Het gevaccineerde individu wordt weer gevoelig voor infectie. Dit leidt onvermijdelijk, bij persisterende circulatie van de pathogenen, op enig moment tot natuurlijke infectie en tot booster van vaccingéinduceerde immuniteit. Die natuurlijke infecties bij ooit gevaccineerden gaan over het algemeen gepaard met atypische, milde symptomen ('enkele weken hoesten') of zijn zelfs zonder enig symptoom; slechts bij een klein deel ontwikkelt zich het typische ziektebeeld. Een belangrijke consequentie is dat nog steeds besmetting kan optreden in de eerste levensmaanden wanneer kinderen nog niet of onvoldoende gevaccineerd zijn. Op die leeftijd zijn kinderen bovendien het meest kwetsbaar voor complicaties van kinkhoest. Per jaar worden 100 tot 300 kinderen jonger dan zes maanden wegens kinkhoest in het ziekenhuis opgenomen met vaak ernstige respiratoire complicaties leidend tot een tot drie (geregistreerde) sterfgevallen per jaar.⁴ De persisterende endemiciteit van symptotomatische luchtweginfecties met *B. pertussis* en *B. parapertussis* onderstreept het belang van het beschikbaar hebben, onderhouden en verbeteren van laboratoriumdiagnostiek. De klinische diagnose is onvoldoende specifiek. Luchtweginfecties met adenovirus, para-influenza virus, RS-virus of *Mycoplasma pneumoniae* kunnen alle een kinkhoest-achtig ziektebeeld geven.⁵ Bevestiging van klinische verdenking is temeer noodzakelijk wanneer zich in het gezin van een verdacht geval een jong ongevaccineerd kind bevindt, omdat profylactische behandeling van het hele gezin met een macrolide dan ernstige ziekte van het kwetsbare kind kan voorkomen. Men kan echter aannemen dat in een groot deel van de symptotomatische, en dus besmettelijke, luchtweginfecties met *B. pertussis* en *B. parapertussis* de symptomen zo mild zijn dat de arts niet geconsulteerd wordt, of indien wel, de arts de etiologie van de ziekte niet herkent of onderzoekt. Zelfs klassieke kinkhoest bij kinderen wordt slechts in een minderheid van de gevallen door de arts herkend.⁶ Een consequent profylaxebeleid zoals boven beschreven zal daarom nooit het

vóórkomen van ernstige, potentieel fatale kinkhoest bij de jongsten geheel kunnen voorkomen. Verdere verbetering van de bescherming van hen zou kunnen worden bereikt door het populatiecohort dat het vaakst de besmettingsbron is een boostervaccinatie te geven. Maar, is zo'n cohort (kleuters, schoolgaande kinderen, adolescenten, volwassenen, ouders) aan te wijzen? Het achterhalen van de leeftijdspecifieke infectiefrequentie in de populatie met behulp van antistofmetingen zou meer inzicht in die kwestie kunnen geven. Laboratoriumdiagnostiek van infectie met *B. pertussis* of *B. parapertussis* en de opbrengst daarvan, op zowel individueel als populatieniveau wordt hieronder besproken.

Laboratoriumdiagnostiek van ziekte

Voor diagnostiek zijn beschikbaar: kweek en PCR (alleen bevestiging) en serologie (bevestiging of ontkenning). De theoretisch meest snelle test, directe detectie van *B. pertussis* of *B. parapertussis* in microscopie van materiaal uit de nasofarynx met behulp van fluorescerende antistoffen, wordt niet gebruikt in Nederland. Dat is terecht omdat dit onderzoek waarbij gebruik gemaakt wordt van polyvalente antistoffen onacceptabel vaak foutpositief is.⁷ Een nieuw ontwikkelde test met monoklonale antistoffen specifiek voor lipo-oligosaccharide van respectievelijk *B. pertussis* en *B. parapertussis* toonde daarentegen in een Canadese studie een zeer hoge specificiteit. De gevoeligheid was echter slechts 65 procent met kweek en 32 procent met PCR als gouden standaard.⁸ De test met monoklonale antistoffen is inmiddels commercieel beschikbaar (Acc-MAB, S.P.I. Diagnostics Inc., Edmonton, Canada). Er is nog geen ervaring mee in Nederland.

Omdat dragerschap van *B. pertussis* of *B. parapertussis* niet of nauwelijks voorkomt⁹, betekent een positieve kweek of PCR bij een patiënt met symptomen van een luchtweginfectie met zekerheid 'kinkhoest' ofwel symptotomatische luchtweginfectie door *B. pertussis* of *B. parapertussis*. Een negatieve kweek of PCR sluit die diagnose echter geenszins uit. In veel gevallen is de bacterie bij klinische presentatie al niet (meer) detecteerbaar. Symptomen kunnen voortduren als de bacterie niet meer aantoonbaar is. De gevoeligheid in het catarrale stadium is 80 tot 100 procent, maar in de paroxysmale fase - waarin veelal de patiënt de arts consulteert - neemt de gevoeligheid met de tijd snel af. De gevoeligheid van PCR is echter wel nog steeds beter dan die van kweek.⁷ Bij gevaccineerden en oudere ongevaccineerden met verdenking op kinkhoest is kweek of PCR niet zinvol indien de ziekteverschijnselen al langer duren dan drie à vier weken. Serologie is dan de eerste en enige aangewezen diagnostische methode. Bij ongevaccineerde of onvolledig gevaccineerde kinderen tot en met vier jaar is PCR of kweek echter in elke fase van de ziekte zinvol, ook na reeds lange ziekteduur.¹⁰ Zij hebben immers een nog onrijpe mucosale immunrespons met als gevolg dat eradicatie van de bacterie veel trager verloopt.¹⁰

Bij patiënten bij wie kweek of PCR wordt ingezet is het verstandig alvast een 'spijts serum' af te nemen om onmiddellijk serologie te kunnen inzetten wanneer kweek of PCR negatief blijkt. Omdat de immuunrespons zeer traag kan zijn, vooral bij ongevaccineerden, is het uitblijven van een positieve uitslag van een eerste serum dat minder dan zes weken na de eerste ziektedag is afgenomen niet informatief. In zo'n geval dient minimaal twee weken later een tweede serum te worden onderzocht.

Kweek

Een kweek kan foutnegatief zijn door suboptimale procedures.^{7,11,12} Optimaal is afname van materiaal van de achterste nasofarynx (via de neus, met een flexibele wattendrager), onmiddellijke beënting van media, onmiddellijke aërobe incubatie tussen 34 en 36 (!) °C in een stoof met hoge vochtigheidsgraad, en dagelijkse beoordeling van groei, te beginnen na twee à drie dagen. De flexibele wattendrager voor afname van materiaal mag niet van katoen zijn omdat katoen toxisch is voor *Bordetella*. Wattendragers van dacron of calciumalginat zijn wel geschikt. Specifieke, selectieve, vers bereide media zijn noodzakelijk. Bordet Gengou-medium, waarin zich zetmeel en een hoge concentratie bloed bevinden, wordt vaak toegepast. Het Engelse referentielaboratorium voor pertussis gebruikt media van dikgegoten charcoal-agar (Oxoid) met 10 procent paardenbloed, 1 procent proteosepepton (Difco nr. 3) en 0,25 E/ml benzylpenicilline (of 40 mg/l cefalexine).⁷ Bewaard bij 4 °C zijn die media tot maximaal tien dagen na bereiding bruikbaar. Hoge concentraties bloed (Bordet Gengou) of charcoal en bloed absorberen toxische metabolieten waarvoor de bacterie zeer gevoelig is. *B. pertussis* is bovendien extreem gevoelig voor uitdroging (vandaar dikgegoten media) en groeit langzaam. Groei wordt zelden gezien vóór de derde dag van incubatie, en meestal pas na vijf tot zeven dagen incubatie. Zelfs na zeven dagen, de gebruikelijke totale incubatietijd, kan de kweek nog positief worden. Een verlenging van de totale incubatietijd tot 14 dagen wordt daarom door sommigen aanbevolen.¹³ *B. pertussis*-kolonies zijn typisch parelgrijs-wit, convex en glanzend. Het Gram-preparaat toont kleine Gram-negatieve staafjes. *B. pertussis* is zwak oxidasepositief. *B. parapertussis* groeit sneller met soms al zichtbare kolonies na twee dagen incubatie en is oxidasenegatief. Voor definitieve identificatie zijn polyvalente specifieke antisera nodig: een suspensie in fysiologisch zout van *B. pertussis* agglutineert met specifiek antiserum en niet of zwak met antiserum gericht tegen *B. parapertussis*. Voor *B. parapertussis* geldt het omgekeerde. Wanneer onmiddellijke beënting van media niet mogelijk is dient de wattendrager in een transportmedium met charcoalagar (met of zonder bloed en penicilline) of in Amies-transportmedium te worden gestoken, dat vervolgens bij 4 °C wordt bewaard of verzonden, totdat, liefst binnen 24 uur, de vers bereide media kunnen worden beënt.^{7,11,12}

Kweek of PCR?

Internationaal zijn verschillende PCR's voor detectie van *B. pertussis* of *B. parapertussis* beschreven en klinisch gevalideerd, met iedere keer als uitkomst dat PCR even specifiek als, én gevoeliger is dan kweek.^{10,14-18} Er zijn geen onderzoeken verricht waarbij de verschillende PCR's onderling zijn vergeleken. De winst van PCR ten opzichte van kweek is het grootst in gevallen van milde ziekte, bij oudere kinderen en volwassenen, en in gevallen van reeds begonnen antibiotische

behandeling. De PCR zoals die in Nederland wordt toegepast, voldoet aan internationaal geformuleerde kwaliteitscriteria¹⁹, detecteert en differentieert *B. pertussis* en *B. parapertussis* en is tweeënhalve keer gevoeliger dan kweek.¹⁰ Bedacht moet worden dat in die Nederlandse klinische validatie alle PCR's werden verricht in één centraal laboratorium terwijl kweek in vele verschillende deelnemende laboratoria werd verricht. Zo'n opzet geeft een 'gemiddelde' gevoeligheid van kweek. Het kan zijn dat een individueel laboratorium een wat hogere gevoeligheid ten opzichte van PCR bereikt door bijzondere aandacht te geven aan de uitvoering van kweek zoals boven beschreven. In genoemd onderzoek was een kwart van de kweekpositieve gevallen negatief in PCR; toepassing van beide methoden tezamen had de grootste opbrengst. Kweek heeft een theoretische meerwaarde ten opzichte van PCR omdat de groei van bacteriën een zekere reden geeft voor antibiotische behandeling. Bovendien kan het isolaat worden getest op antibiotische gevoeligheid, en onderworpen aan moleculair-epidemiologisch onderzoek. Met kweek en niet met de pertussis/parapertussis-PCR kunnen ook andere (zeldzame) *Bordetella* spp. worden gevonden, bijvoorbeeld *B. bronchiseptica*. Een enkele kweek is goedkoper en vergt minder analytische tijd dan een enkele PCR²⁰, maar bij aanbod van veel monsters vervalt dat voordeel van kweek. De uitvoering van PCR neemt theoretisch enkele uren in beslag. Uitslag van de kweek vergt zoveel dagen als het duurt tot positiviteit blijkt (gemiddeld vier dagen) of tot negativiteit blijkt (na zeven dagen incubatie of langer). De methode van afname van patiëntmateriaal voor PCR is identiek aan die voor kweek. Flexibele wattendragers hebben de voorkeur.²¹ Er zijn geen transportmedia vereist. Na afname kan de wattendrager worden teruggeschoven in het hoesje en verzonden naar het laboratorium (Streeklaboratorium Tilburg; ook andere laboratoria zijn doende de PCR te implementeren). Een groot voordeel van PCR ten opzichte van kweek is dat transport geen invloed heeft op de gevoeligheid van de PCR. De PCR-methode is daarom, in tegenstelling tot kweek, toepasbaar bij patiënten die zich ver buiten het laboratorium bevinden, bijvoorbeeld in de huisartspraktijk. Wanneer optimale logistiek voor kweek beschikbaar is, zoals in de intramurale setting, lijkt keuze voor zowel kweek als PCR aan te bevelen. Commerciële PCR-kits voor detectie van pertussis en parapertussis zijn in statu nascendi. Grondige klinische validatie vóór acceptatie is aan te bevelen.

Serologie

De gevoeligheid van PCR en kweek neemt af naarmate de ziekteduur toeneemt. Voor serologie geldt het omgekeerde. Wanneer men aanneemt dat iedere infectie een immuunrespons geeft, is serologie in theorie honderd procent gevoelig. Onderzoek naar IgM heeft beperkte waarde omdat een IgM-respons meestal afwezig is, mogelijk door voorafgaande vaccinatie of eerdere infectie. De IgA-respons is leeftijdafhankelijk en ontbreekt meestal bij de jongste kinderen.¹⁰ De IgG-respons is de meest gevoelige, maar is relatief traag. Toepassing in onderzoek naar antistoffen met gebruikmaking van gezuiverde antigenen van *B. pertussis*, zoals pertactin (PTN), filamenteus hemagglutinine (FHA) of pertussistoxine (PT), vergroot de gevoeligheid én de specificiteit in vergelijking met toepassing van hele bacteriën als antigeen.²²⁻²⁴ Er zijn echter aanwijzingen dat antistoffen die binden aan PRN of FHA niet altijd door *B. pertussis* zijn

geïnduceerd.²⁵ Meting van IgG-PT is de meest specifieke en gevoelige test.²²⁻²⁴ De IgG-respons tegen pertussistoxine bereikt haar piek gemiddeld vier en halve week na de eerste ziektedag.¹⁰ Bevestiging of ontkenning van de klinische verdenking op kinkhoest vergt derhalve in veel gevallen onderzoek van seriële sera tot maximaal acht weken na begin van ziekte. Pas als dan nog lage waarden worden gevonden kan de diagnose kinkhoest onwaarschijnlijk worden geacht. Bij pasgeborenen en in de eerste maanden na de vierde DKTP-vaccinatie moeten IgG-titers voorzichtig worden beoordeeld wegens placentaire overdracht van IgG en inductie van IgG door vaccinatie. In beide gevallen is er een korte halfwaardetijd van die titers.

RIVM-serologie

De historie, validatie en interpretatie van de in Nederland beschikbare niet-commerciële serologische onderzoeken van het RIVM, bestaande uit IgA-ELISA met als antigeen *B. pertussis* (IgA-Bp EIA) en IgG-ELISA met als antigeen pertussistoxine (IgG-PT EIA), is eerder uitgebreid beschreven in dit tijdschrift.²⁶ Recentelijk is de IgG-PT EIA, die aanzienlijk gevoeliger is dan IgA-Bp, opnieuw onderworpen aan een grondig onderzoek met primair als doel een eerder vastgestelde cut-off voor positiviteit van eenpuntsserologie opnieuw te evalueren.²⁷ Daartoe werden getest:

1. sera van 7.756 niet zieke individuen (een gewogen dwarsdoorsnede van de bevolking),
2. gepaarde sera van 89 patiënten met kweek en/of PCR bevestigde kinkhoest (gouden standaard voor bepaling van gevoeligheid), en
3. seriële sera van 57 patiënten met klinisch gedocumenteerde kinkhoest met een mediane follow-up van 1,4 jaar (van zes maanden tot acht jaar).

Tevens werden uit het diagnostische gegevensbestand van RIVM-LIS de gepaarde sera geselecteerd die een gelijk aan of meer dan viervoudige titerstijging van IgG-PT (= zeker diagnostisch) hadden opgeleverd. Daarvan werden de waarden in het tweede (reconvalescentie-)serum geanalyseerd. De hoogte en de spreiding van de immuunrespons tegen IgG-PT in reconvalescentiesera waren leeftijdonafhankelijk en onderscheidden zich sterk van de (wel leeftijdafhankelijke) hoogte en spreiding van IgG-PT in de bevolking. Waarden van respectievelijk meer dan of gelijk aan 50 E/ml en meer dan of gelijk aan 100 E/ml werden in 3,6 procent en 0,8 procent van de populatiesera gevonden en in 92,7 procent en 81,0 procent van de reconvalescentiesera. Opmerkelijk was dat de individuen in de bevolking die een IgG-PT van meer dan 50 E/ml hadden, significant vaker positief antwoordden op de vraag of zij het jaar vóór de serumafname kinkhoest of een ernstige hoestepisode hadden doorgemaakt dan individuen met lage IgG-PT waarden. Van de 57 kinkhoestpatiënten van wie seriële sera beschikbaar waren had 100 procent en 90 procent een IgG-PT-waarde in reconvalescentieserum van respectievelijk meer dan of gelijk aan 50 E/ml en meer dan of gelijk aan 100 E/ml. Zes tot elf maanden na begin van de kinkhoest was in 80 procent en 40 procent de IgG-PT gedaald naar respectievelijk minder dan 100 E/ml en minder dan 50 E/ml. Na vier tot zeven jaar vervolgonderzoek was 100 procent gedaald naar minder dan 50 E/ml en 88 procent naar minder dan 20 E/ml. Geconcludeerd werd dat een meer dan of gelijk aan viervoudige titerstijging van IgG-PT in gepaarde sera of een waarde van meer dan of gelijk aan 100 E/ml in eerste of tweede serum

diagnostisch zijn voor actuele of recente *B. pertussis*-infectie. De gevoeligheid van die interpretatie werd nagegaan in de kweek of bij PCR-positieve patiënten. Van hen had 77,5 procent een meer dan of gelijk aan viervoudige IgG-PT-stijging en werd een IgG-PT van meer dan of gelijk aan 100 E/ml gevonden in 11 procent van eerste sera en in 79 procent van tweede sera. Negentig procent voldeed aan de regel "meer dan of gelijk aan viervoudige IgG-PT-stijging of IgG-PT meer dan of gelijk aan 100 E/ml in eerste of tweede serum". De 'specificiteit' van deze interpretatie is meer dan 99 procent, dat wil zeggen minder dan één procent van de algemene bevolking heeft dergelijke hoge waarden.

Men moet zich realiseren dat in dit onderzoek de goudenstandaardgroep wordt gevormd door kweekpositieve of PCR-positieve patiënten. Positief zijn in PCR of kweek betekent selectie van relatief jonge individuen die zich relatief vroeg in het ziektebeloop bij de arts hebben gemeld. Slechts enkelen in deze groep hebben al hoge IgG-PT waarden in eerste serum (11 procent). De praktijk van alledag is echter dat de meeste patiënten bij wie kinkhoest wordt vermoed en laboratoriumdiagnostiek wordt ingezet al geruime tijd ziek zijn. Uit de serodiagnostische database van RIVM-LIS blijkt dat over een bepaalde tijdsperiode gemiddeld vier en half keer meer patiënten worden gediagnosticeerd op basis van positiviteit van eenpuntsserologie dan op basis van positiviteit van tweepuntsserologie. De gemiddelde tijd tussen afname eerste serum en eerste ziektedag voor degenen die uiteindelijk positief zijn in tweepuntsserologie is 17 dagen. Voor degenen die positief zijn in eenpuntsserologie, ofwel in wier eerste serum de IgG-PT reeds meer dan 100 E/ml was, is 30 dagen.²⁷

De genoemde bevindingen hebben geleid tot een geringe verandering van de eerder weergegeven interpretatie van de kinkhoestserologie van het RIVM waarin hoogtecategorieën van combinaties van IgG-PT en IgA-Bb-waarden worden beoordeeld.²⁶ Indien de combinatie van IgG/IgA-waarden positief is maar IgG minder is dan 50 E/ml, dan wordt de uitspraak "positief voor recente of actuele infectie met *B. pertussis*" vermeden en wordt gerapporteerd: "suspect, geen bewijs, graag tweede serum". Indien de combinatie van IgG/IgA-waarden 'niet positief' is maar IgG-PT meer dan of gelijk aan 100 E/ml, dan wordt de uitspraak "non-conclusief, graag tweede serum" vermeden en wordt gerapporteerd "positief voor recente of actuele infectie met *B. pertussis*".

Serologie met commercieel verkrijgbare EIA's

Sinds begin 1998 wordt kinkhoestserologie door een aantal laboratoria in eigen beheer uitgevoerd met een commercieel verkrijgbare test (Virotech). Het antigeen in die EIA is een mengsel van gezuiverd FHA en PT. Commerciële testen met gesoniceerde *B. pertussis*-bacteriën als antigeen voldoen niet, hebben een lage sensitiviteit én een lage specificiteit.²⁸ De EIA van Virotech omvat een IgM-, een IgA- en een IgG-component. De extinctie van één verdunning van het te testen serum wordt vergeleken met die van een positief referentieserum en wordt uitgedrukt in een OD-ratio (gecorrigeerde OD patiëntserum / gecorrigeerde OD standaardserum x 10). Omdat er geen sprake is van titers of relatieve titers bestaat er onzekerheid over wanneer dynamiek in gepaarde sera significant is, en de bijsluiters rept daar niet over. De bijsluiters geeft wel aan welke waarden 'negatief', 'borderline' of 'positief'

zijn. De opbrengst van de IgG- en IgA-componenten van de test van Virotech is vergeleken met die van IgA/IgG-serologie van het RIVM in serumparen van kweek- of PCR-positieve patiënten en serumparen van een controlegroep.²⁸ Interpretatie volgens de bijsluiter (IgA- of IgG-positief indien meer dan 10) bleek volstrekt onvoldoende. Van de kinkhoestgroep was weliswaar 74 procent IgA-positief en 98 procent IgG-positief volgens de criteria van de bijsluiter, maar ook in de controlegroep waren velen volgens die interpretatie positief (IgA 12 procent en IgG 32 procent). Verhoging van de afsnijwaarde voor 'IgA-positief' leverde weliswaar een acceptabele specificiteit op, maar leidde tot een lage sensitiviteit. Verhoging van de afsnijwaarde voor 'IgG-positief' van 11 virotech-eenheden (VE) naar 28 VE en benoeming van een stijging in gepaarde sera met minimaal 8 VE (waarde tweede serum minus waarde eerste serum!) als 'significant' gaf een zeer acceptabele sensitiviteit en specificiteit van de IgG-Virotech van respectievelijk 91 procent en 96 procent. Zo geïnterpreteerd was de concordantie tussen de uitkomsten van de IgG-PT-meting van het RIVM en die van de Virotech-IgG-PT/FHA 98 procent. De conclusie van dit onderzoek was derhalve dat de IgG-component van de test van Virotech, indien geïnterpreteerd volgens de beschreven aangepaste criteria, een praktisch bruikbare assay is.

In bovengenoemd onderzoek kon niet worden nagegaan of de variabiliteit in kwaliteit tussen verschillende partijen van de test en met name die van het standaardserum constant is. Juist als kwantitatieve criteria een rol spelen (afsnijwaarde voor 'positief') is nauwkeurige standaardisatie van die kwantificering essentieel. Een garantie voor constante kwaliteit zou calibratie per partij inhouden van de kwaliteit van het referentieserum van de test ten opzichte van een internationale standaard, te weten de 'lot 3'- en 'lot 4'-sera van de FDA in de VS.²⁹ Inmiddels zijn de Streeklaboratoria Tilburg, Nieuwegein en Groningen en RIVM-LIS doende een drietal commerciële EIA's te evalueren die gezuiverde antigenen (PT, FHA of een mengsel van PT en FHA) toepassen (waaronder opnieuw de test van Virotech). De resultaten zullen eind dit jaar bekend zijn. Bij de beoordeling van de waarde van die commerciële EIA's zullen gegevens over de standaardisatie tussen partijen van het referentieserum een belangrijke rol spelen.

Infectiefrequentie in de bevolking

Er is geconstateerd dat hoge IgG-PT-waarden die zijn geïnduceerd door natuurlijke infectie, consistent en relatief snel weer dalen naar waarden onder de afsnijwaarde voor positief. Dit was een extra argument voor de stelling dat hoge waarden specifiek zijn voor recente of actuele infectie.²⁷ Het betekent echter ook dat degenen in de bevolking die een IgG-PT van meer dan 50 E/ml hebben, relatief kort tevoren een natuurlijke infectie hebben doorgemaakt. Regressie-analyse van de dalende IgG-PT-patronen na natuurlijke infectie gaf aan dat de hoge IgG-PT na natuurlijke infectie *gemiddeld* acht maanden na de eerste ziektedag weer was gedaald tot 50 E/ml.²⁷ Dat 3,6 procent van de populatie IgG-PT-waarden had van meer dan 50 E/ml kan dus betekenen dat 3,6 procent in de acht maanden voor serumafname een infectie met *B. pertussis* had doorgemaakt. Men neemt dan aan dat de snelheid van daling van IgG-PT na natuurlijke infectie onafhankelijk is van de leeftijd, terwijl de groep waarin die daling met volgende sera werd vastgesteld vrijwel uitsluitend bestond uit kinderen. Uitgaande van die

aanname kan de incidentie van infectie met *B. pertussis* in de populatie geschat worden op $12/8 \times 3,6 = 5,4$ procent per jaar ofwel 5.400/100.000 per jaar. Ter vergelijking: in het epidemische jaar 1996 was de incidentie van serologisch bevestigde ziekte door *B. pertussis* 62/100.000 en de incidentie van kinkhoest volgens aangifte 28/100.000.

Bij beschouwing van de distributie van IgG-PT in de populatie per vijfjaars-leeftijdscategorie viel op dat de proportie met meer dan 50 E/ml vrijwel onafhankelijk was van de leeftijd met als enige duidelijke uitzonderingen de categorieën van 10- tot 14-jarigen (hoger dan gemiddeld) en 0- tot 4-jarigen (lager dan gemiddeld).²⁷ Vooralsnog kan daarom voorzichtig worden geconcludeerd dat de hoogste incidentie van infectie in de populatie de 10- tot 14-jarigen betreft, maar dat de incidentie bij adolescenten en volwassenen evenzeer aanzienlijk is en mogelijk niet of nauwelijks lager dan bij 5- tot 9-jarigen. Een dergelijk patroon staat in schril contrast met de leeftjidsverdeling van aangegeven gevallen van ziekte of serologisch bewezen ziektegevallen die aangeven dat de incidentie van ziekte door *B. pertussis* bij 4- à 5-jarigen het hoogst is, daarna geleidelijk afneemt en bij 10-tot 14-jarigen en daaropvolgende leeftjidscohorten zeer veel lager is (De Melker et al, zie elders in dit tijdschrift). Momenteel wordt gepoogd de gegevens van IgG-PT-daling na natuurlijke infectie en de IgG-PT-distributie in de bevolking met biomathematische technieken te modelleren. Bovengenoemde berekening is waarschijnlijk té eenvoudig en geeft een grove schatting. De vermelding van die schatting dient dan ook veeleer ter illustratie van het sterke vermoeden dat er een zeer grote discrepantie is tussen het voorkomen van infectie en geregistreerde ziekte, zowel wat betreft incidentie als wat betreft leeftjidsverdeling.

Conclusies

De mogelijkheden om infectie met *Bordetella* spp. met laboratoriumdiagnostiek aan te tonen zijn sterk toegenomen door de komst van PCR (*B. pertussis* en *B. parapertussis*) en door definiëring van afsnijwaarden voor positiviteit van eenpuntsserologie voor recente of actuele infectie (*B. pertussis*). Toepassing van een commercieel beschikbare antistoftest (Virotech) is in beginsel mogelijk, zij het dat het alleen voor de IgG-component van die test mogelijk bleek om criteria voor positiviteit van eenpuntsserologie en voor significante stijging in gepaarde sera te formuleren zodanig dat een goede sensitiviteit en, vooral, specificiteit het resultaat was. Nader onderzoek van een drietal commerciële EIA's met gezuiverde antigenen is momenteel gaande.

De bevinding dat hoge IgG-PT-waarden na natuurlijke infectie met *B. pertussis* relatief snel weer dalen had belangrijke consequenties voor de interpretatie van IgG-PT-distributies in de populatie. Een grove analyse leverde een schatting van de infectiefrequentie in de bevolking op van 5.400/100.000 per jaar, en gaf het inzicht dat de infectiefrequentie bij adolescenten en volwassenen veel hoger is dan men op grond van de leeftjidsverdeling van geregistreerde ziektegevallen zou vermoeden. Deze bevindingen, indien toegankelijk voor modellering, kunnen een rol spelen bij bepaling van de leeftijd waarop boostervaccinatie zou kunnen worden ingevoerd om de overdracht van *B. pertussis* naar de jongste kinderen in de periode dat zij nog onbeschermd zijn, te verminderen.

Tot slot: het valt te overwegen om in gevallen van 'ziekte met hoesten' of 'tracheitis/bronchitis' waarbij de arts laboratoriumonderzoek naar microbiële etiologie aanvraagt (syndroomdiagnostiek: bijvoorbeeld para-influenzavirus, adenovirus, RS-virus, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*) ook laboratoriumdiagnostiek naar infectie met *B. pertussis* of *B. parapertussis* te adviseren, ongeacht de leeftijd van de patiënt.

Summary

Pertussis has persisted, though much reduced, in developed countries despite high vaccination rates. Vaccination complicates diagnosis because the classic symptoms are often moderated. Neonates, the age group most at risk from lethal complications, still can acquire severe disease. In this article laboratory diagnosis of pertussis is described, focussing on culture, PCR and antibody-assays. PCR is more sensitive than culture and both methods have very low sensitivity late in disease. Most patients are diagnosed with serology

because most patients consult the physician late in disease (long lasting cough). Measurement of IgG antibodies to pertussis toxin (IgG-PT) is the most sensitive and specific immunoassay. Comparison of the rapid decline of IgG-PT after the peak-response after natural infection with the IgG-PT distribution in the population strongly suggests that the incidence of infection with *Bordetella pertussis* in the population may be approximately 100-fold higher than the incidence of registered disease due to *B. pertussis*, and that these infections occur at all ages.

Dr. J.F.P. Schellekens, medisch microbioloog, Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en Screening;

Mw. Dr. H.E. de Melker, epidemioloog, Centrum voor Infectieziekten Epidemiologie;

beiden RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven

Literatuur

- Giammanco A, Chiarini A, Stroffonili T et al. Seroepidemiology of pertussis in Italy. *Rev. Infect Dis* 1991;13:1216-20.
- Schmitz M, Wassilak SGF, Schulte-Wissermann H, Wirsing von König CH. Schätzung zur Pertussisinzidenz am linken Niederrhein. *Monatsschr Kinderheilkd* 1994;142:41-4.
- Mark A, Granström M. Cumulative incidence of pertussis in an unvaccinated preschool cohort based on notifications, interview and serology. *Eur J Epidemiol* 1991;7:121-6.
- Neppelenbroek SE, Melker HE de, Schellekens JFP, Rümke HC, Suijkerbuijk AWM, Conyn-van Spaendonck MAE. Severity of pertussis. Paediatric surveillance and Notification study in the Netherlands in 1997. RIVM-rapport nr. 128507006. Bilthoven, juni 1999.
- Wirsing von König CH, Rott H, Bogaerts H, Schmitt HJ. A serologic study of organisms possibly associated with pertussis-like coughing. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:645-9.
- Deeks S, De Serres G, Boulianne N, Duval B, Rochette L, Dery P, Halperin S. Failure of physicians to consider the diagnosis of pertussis in children. *Clin Infect Dis* 1999;28:840-6.
- Matthews R. The diagnosis of pertussis infections: a recurring challenge. *PHLS Microbiology Digest* 1997;14(2):79-84.
- McNicol P, Giercke SM, Gray M, Martin D, Brodeur B, Pepler M, Williams T, Hammond G. Evaluation and validation of a monoclonal immunofluorescent reagent for direct detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1995;33:2868-71.
- Anonymous. Pertussis: adults, infants, and herds. *Lancet* 1992;339:526-7.
- Zee A van der, Agterberg C, Peeters MF, Mooi F, Schellekens JFP. A clinical validation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* polymerase chain reaction: comparison with culture and serology using samples of patients suspected for whooping cough from a highly immunized population. *J Infect Dis* 1996;174:89-96.
- Hoppe JE. Methods for isolation of *Bordetella pertussis* from patients with whooping cough. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;5:616-20.
- Hewlett EL. *Bordetella* species. In: Mandell et al. (eds). *Principles and practice of infectious diseases*, Churchill Livingstone USA, 3rd edition 1990, chapter 208, pages 1756-62.
- Katzko G, Hofmeister M, Church D. Extended incubation of culture plates improves recovery of *Bordetella* spp. *J Clin Microbiol* 1996;34:1563-4.
- He Q, Mertsola J, Soini H, Skurnik M, Ruuskanen O, Viljanen MK. Comparison of Polymerase Chain Reaction with Culture and Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Pertussis. *J Clin Microbiol* 1993;31:642-5.
- Schlöpfer G, Senn HP, Berger R, Just N. Use of the Polymerase Chain Reaction to detect *Bordetella pertussis* in patients with mild or atypical symptoms of infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:459-63.
- Reizenstein E, Johansson B, Mardin L, Abens J, Möllby R, Hallander HO. Diagnostic Evaluation of Polymerase Chain Reaction discriminative for *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *B. bronchiseptica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:185-91.
- Wadowsky RM, Michaels RH, Libert T, Kingsley LA, Ehrlich GD. Multiplex PCR-based assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:2645-9.
- Schmidt-Schlöpfer G, Liese JG, Porter F, Stojanov S, Just M, Belohradsky BH. Polymerase Chain reaction (PCR) compared with conventional identification in culture for detection of *Bordetella pertussis* in 7153 children. *Clin Microbiol Infect* 1997;3(4):462-7.
- Meade BD, Bollen A. Recommendations for use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. *J Med Microbiol* 1994;41:51-5.
- Erlandsson A, Bäckman A, Törnqvist E, Olsen P. PCR assay or culture for diagnosis of *Bordetella pertussis* in the routine diagnostic laboratory? *Journal of Infection* 1997;35:221-4.
- Wadowsky RM, Laus S, Libert T, States SJ, Ehrlich GD. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminium shaft components of a nasopharyngeal swab. *J Clin Microbiol* 1994;32:1054-7.
- Mertsola J, Ruuskanen O, Kuronen T, Meurman O, Viljanen MK. Serologic diagnosis of pertussis: evaluation of pertussis toxin and other antigens in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Infect Dis* 1990;161:966-71.
- Granström M, Granström G. Serological correlates in whooping cough. *Vaccine* 1993;11:445-8.
- Hallander HO, Storsaeter J, Möllby R. Evaluation of serology and nasopharyngeal cultures for diagnosis of pertussis in a vaccine efficacy trial. *J Infect Dis* 1991;163:1046-54.
- Carlsson RM, Claesson BA, Lagergard T, Trollfors B. Acquisition of serum antibodies against filamentous hemagglutinin and pertactin unrelated to *B. pertussis* infection. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:709-12.
- Schellekens JFP, Melker HE de, Conyn-van Spaendonck MAE. De laboratoriumdiagnostiek en de aangifte van kinkhoest: een grillige pas de deux. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 1996;4(5):93-6.
- Melker HE de, Versteegh FGA, Conyn-van Spaendonck MAE, Elvers LH, Berbers GAM, Zee A van der, Schellekens JFP. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:800-6.
- Meijer BC, Peeters MF, Schellekens JFP. Serodiagnostiek van kinkhoest met commerciële ELISA's. Voorjaarsdagen NVMM, Veldhoven, 20-21 april 1999. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 1999;7 (suppl):S15.
- Lynn F, Reed G, Meade BD. Collaborative study for the evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays used to measure human antibodies to *Bordetella pertussis* antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:689-700.