

**Univerzita Karlova v Praze**

**3. lékařská fakulta**



Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Obor: Preventivní lékařství

Disertační práce

**Epidemiologické aspekty pertuse v ČR**

*Epidemiological Aspects of Pertussis*

*in the Czech Republic*

Školitel: Doc. MUDr. Bohumír Kříž, CSc.

Praha, 2016

Termín obhajoby: 27. června 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému (SIS 3. LF UK) jsou totožné.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 3. 5. 2016

MUDr. KATEŘINA FABIÁNOVÁ

-----

**Identifikační záznam:**

FABIÁNOVÁ, Kateřina. *Epidemiologické aspekty pertuse v ČR.* [Epidemiological Aspects of Pertussis in the Czech Republic.]. Praha, 2016. 182 stran. Dizertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Ústav epidemiologie 3. LF UK. Vedoucí závěrečné práce doc. MUDr. Bohumír Kříž, CSc.

**Klíčová slova:**

Pertuse, *Bordetella*, nemocnost

**Key Words:**

Pertussis, *Bordetella*, incidence

## **Poděkování**

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli, panu docentu MUDr. Bohumíru Křížovi, CSc. za jeho vstřícnost, trpělivost a za mnoho cenných rad ve vedení, přípravě podkladů a zpracování disertační práce. Pane docente, velmi si Vás vážím za vše, co jste pro mne udělal.

Mé velké poděkování patří emeritní vedoucí Národní referenční laboratoře pro pertusi a parapertusi, MUDr. Marině Maixnerové, CSc., která se mi vždy trpělivě věnovala, poskytovala mi mnoho odborných materiálů a velmi užitečných rad a vždy si našla čas k diskuzi. Marino, moc děkuji!

Chtěla bych poděkovat všem kolegům, kteří mi během celého disertačního období pomáhali a podporovali mne.

Velké poděkování patří také mé rodině, která mne vždy po celé dlouhé disertační období podporovala a zejména mému manželovi, který mi dodával sebedůvěru, vždy stál při mne a byl přesvědčen více než já, že práci skutečně dokončím. Petře, Týno, Honzo, moc Vám děkuji!

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY .....</b>	<b>16</b>
3.1	STRUČNÁ HISTORIE ONEMOCNĚNÍ.....	16
3.2	PERTUSE, DÁVIVÝ KAŠEL, SYNDROM PERTUSOIDNÍHO KAŠLE .....	17
3.3	VÝSKYT .....	17
3.4	PŮVODCE ONEMOCNĚNÍ.....	17
3.4.1	<i>Bordetella pertussis</i> .....	19
3.4.2	<i>Bordetella parapertussis</i> .....	26
3.4.3	<i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	26
3.4.4	<i>Bordetella holmesii</i> .....	27
3.4.5	<i>Bordetella avium</i> .....	27
3.4.6	<i>Bordetella hinzii</i> .....	27
3.4.7	<i>Bordetella trematum</i> .....	28
3.4.8	<i>Bordetella ansorpii</i> .....	28
3.4.9	<i>Bordetella petrii</i> .....	28
3.5	PATOGENEZE.....	28
3.6	ZDROJ NÁKAZY.....	29
3.7	PŘENOS.....	30
3.8	INKUBAČNÍ DOBA .....	31
3.9	OBDOBÍ NAKAŽLIVOSTI .....	31
3.10	VNÍMAVOST.....	31
3.11	KLINICKÝ OBRAZ.....	32
3.11.1	<i>Komplikace</i> .....	34
3.11.2	<i>Významné klinické, patologické a histopatologické změny u zemřelých dětí s pertusí ..</i>	<i>35</i>

3.12	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA.....	35
3.13	TERAPIE .....	38
3.13.1	<i>Postexpoziční profylaxe .....</i>	<i>39</i>
3.14	EPIDEMIOLOGICKÁ SITUACE VE SVĚTĚ .....	40
3.14.1	<i>Příčiny návratu pertuse a zvýšení počtu hlášených případů .....</i>	<i>41</i>
3.14.2	<i>Polymorfismus B. pertussis .....</i>	<i>42</i>
3.15	EPIDEMIOLOGICKÁ SITUACE V ČR .....	44
3.16	PREVENCE ONEMOCNĚNÍ .....	48
3.16.1	<i>Stručná historie očkování.....</i>	<i>48</i>
3.16.2	<i>Celobuněčná vakcína proti pertusi (wP).....</i>	<i>48</i>
3.16.3	<i>Acelulární vakcína proti pertusi (aP).....</i>	<i>51</i>
3.16.4	<i>Iminita navozená po vakcínách proti pertusi .....</i>	<i>54</i>
3.16.5	<i>Experimentální zvířecí model .....</i>	<i>54</i>
3.16.6	<i>Současné strategie prevence onemocnění.....</i>	<i>55</i>
3.16.7	<i>Postexpoziční profylaxe.....</i>	<i>55</i>
3.16.8	<i>Očkování dětí .....</i>	<i>55</i>
3.16.9	<i>Očkování adolescentů a dospělé populace .....</i>	<i>56</i>
3.16.10	<i>Cocoon strategie .....</i>	<i>60</i>
3.16.11	<i>Očkování novorozenců.....</i>	<i>60</i>
3.16.12	<i>Očkování zdravotníků proti pertusi .....</i>	<i>61</i>
3.16.13	<i>Očkování těhotných proti pertusi.....</i>	<i>62</i>
3.17	OČKOVÁNÍ V ČR .....	65
<b>4</b>	<b>POPIS POUŽITÝCH METOD .....</b>	<b>70</b>
4.1	SURVEILLANCE A DATA O VÝSKYTU PERTUSE .....	70
4.2	DATA O POČTECH ZEMŘELÝCH NA PERTUSI.....	71
4.3	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA.....	71
4.3.1	<i>Izoláty Bordetella pertussis.....</i>	<i>72</i>

4.3.2	Molekulárně biologické metody .....	72
4.4	VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM VOLBY A ALTERNATIVÁM U KMENŮ <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> .....	73
4.5	STATISTICKÉ METODY .....	73
<b>5</b>	<b>PŘEHLED DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ .....</b>	<b>75</b>
5.1	TREND PERTUSE U DĚTÍ DO JEDNOHO ROKU ŽIVOTA V ČESKÉ REPUBLICE V LETECH 1997 - 2013 .....	75
5.2	VYPRACOVÁNÍ PODKLADŮ K NÁVRHU AKTUALIZACE VAKCINAČNÍ STRATEGIE .....	78
5.3	STUDIUM SOUBORU IZOLÁTŮ <i>B. PERTUSSIS</i> MOLEKULÁRNÍMI METODAMI .....	79
5.3.1	Výsledky sekvenace, MAST .....	80
5.3.2	Výsledky metody MLVA .....	81
5.3.3	Výsledky MLST .....	83
5.4	SROVNÁNÍ ČESKÝCH IZOLÁTŮ <i>B. PERTUSSIS</i> V MEZINÁRODNÍ STUDII .....	84
5.5	VYŠETŘENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE ANTIBIOTIK U KMENŮ <i>B. PERTUSSIS</i> .....	85
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>88</b>
6.1	EPIDEMIOLOGICKÁ SITUACE A VAKCINACE .....	88
6.2	ANTIGENNÍ VARIABILITA KMENŮ <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> IZOLOVANÝCH V ČESKÉ REPUBLICE .....	93
6.3	MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE U KMENŮ <i>B. PERTUSSIS</i> .....	95
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR A ZHODNOCENÍ CÍLŮ .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ .....</b>	<b>101</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>102</b>
<b>12</b>	<b>PŘEHLED PRACÍ (ČLÁNKY A ABSTRAKTA) AUTORA V SOUVISLOSTI S DIZERTACÍ .....</b>	<b>129</b>
<b>13</b>	<b>PUBLIKACE AUTORA BEZ VZTAHU K DIZERTACI.....</b>	<b>136</b>
<b>14</b>	<b>PŘEDNÁŠKY .....</b>	<b>139</b>



<b>15</b>	<b>VÝZKUMNÁ ČINNOST .....</b>	<b>144</b>
<b>16</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>146</b>
16.1	ČLÁNEK 1: FABIÁNOVÁ K. ET AL., 2014 .....	147
16.2	ČLÁNEK 2: VAN GENT M. ET AL., 2015 .....	154
16.3	ČLÁNEK 3: JAKUBŮ V. ET AL., 2015 .....	166
16.4	ČLÁNEK Č. 4: ZAVADILOVÁ J. ET AL., 2015 .....	172

## Seznam zkratk

ACIP	Advisory Committee on Immunization Practices
ACT	Adenylátcyklázový toxin
aP	Vakcína s acelulární pertusovou složkou
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ČR	Česká republika
ČSÚ	Český statistický úřad
DNT	Dermonekrotický toxin
DTP	kombinovaná vakcína s difterickým a tetanickým toxoidem a pertusovou složkou
dt aP	Kombinovaná vakcína se sníženým obsahem difterického a tetanického toxoidu a pertusovou složkou
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
FIM	Fimbrie
Ig	Imunoglobulin
IS	Insertní sekvence
MAST	Multilokusová antigenní sekvenační typizace
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MLVA	Multilocus variable number tandem repeat analysis
MLST	Multilokusová sekvenční typizace
MT	MLVA typ
NRL	Národní referenční laboratoř
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PRN	Pertaktin
PT	Pertusový toxin
SPC	Souhrn údajů o přípravku
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TCT	Tracheální cytotoxin
VAERS	Vaccine Adverse Event Reporting System
VNTR	Variable number of tandem repeat
WHO	Světová zdravotnická organizace
wP	Vakcína s celobuněčnou pertusovou složkou

# 1 Úvod

---

V roce 2016 uplyne 110 let od průkazu bakterie *Bordetella pertussis* - původce závažného onemocnění - pertuse. Pertuse (černý kašel, kašel zádušní, zajíkový, dávivý) je jednou z nález, která postihovala tisíce malých i větších dětí a ohrožovala vážně jejich zdraví i životy. Pertuse se vyskytovala čas od času ve velkých epidemiích, s vysokou úmrtností dětí do jednoho roku života. Úmrtnost kojenců a dětí do 1 roku věku převyšovala mnohonásobně (3 - 4 x) úmrtnost na všechny ostatní běžné nákazy. Udává se, že pertuse způsobila úmrtnost 3x vyšší u kojenců a malých dětí než poliomyelitida, spála, záškrt, spalničky, příušnice a zánět mozkových plen dohromady (Raška K., 1954).

Pertuse je vysoce nakažlivé onemocnění, a proto se velmi snadno šíří ve vnímavé populaci. Většina lidí si pertusi prožije již v dětském věku. Pro nejmenší děti je onemocnění závažnější, často s výskytem život ohrožujících komplikací. Pertusí mohou onemocnět i dospívající a dospělí. Průběh onemocnění bývá většinou mírnější, ale ani hospitalizace nebo úmrtí nebyly a nejsou v dospělosti vzácností.

Onemocnění je preventabilní očkováním; většina států zahájila plošné očkování proti pertusi již v 50. a 60. letech dvacátého století. Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) se proočkovanost dětské populace základními třemi dávkami DTP, kombinované vakcíny s difterickým a tetanickým toxoidem a pertusovou složkou – celobuněčnou anebo acelulární, udržuje dlouhodobě na vysoké úrovni (WHO, 2016).

I přes deklarovanou vysokou proočkovanost se však pertuse v populaci stále vyskytuje a od 80. let dochází k nárůstu hlášené nemocnosti v rozvinutých státech ve všech věkových skupinách. Závažným problémem je zejména zvýšená nemocnost a úmrtnost u dětí do jednoho roku života. Dramatický nárůst případů je registrován zejména v posledních deseti letech. Nárůst onemocnění pertusí se objevuje v zemích s vysokou proočkovaností, a to nejen ve státech, kde se očkuje acelulární pertusovou vakcínou, ale i tam, kde se dosud používá celobuněčná pertusová vakcína (Gzyl A. et al., 2004, Fabiánová K. et al., 2010, Da Silva FR. et al., 2014).

Hlášená onemocnění pertusí vykazují v současnosti pravidelný cyklický charakter podobně jako v předvákcinaci éře, což znamená, že *B. pertussis* stále koluje v populaci (Cherry JD., 2012, Mattoo S. et al., 2005).

U adolescentů a dospělých má onemocnění pertusí často atypický průběh a zůstává proto nepoznáno. Zvýšený výskyt osob s pertusí v populaci může vést ke zvýšení nemocnosti a úmrtnosti u dětí (WHO, 2014). Právě dospělí a dospívající, zejména úzké kontakty, rodina a nejbližší příbuzní, jsou nejčastějším zdrojem onemocnění pro vnímavé kojence (Bisgard KM. et al., 2004, Wendelboe AM. et al., 2007, Skoff TH. et al., 2015).

Děti, které mají nízký věk pro očkování nebo nejsou plně očkované třemi dávkami vakcíny proti pertusi, jsou ve vysokém riziku onemocnění a případných komplikací (Baptista PN. et al., 2010, Frumkin K., 2013). K většině úmrtí spojených s pertusí dochází u kojenců mladších tří měsíců věku. Zvýšení nemocnosti a úmrtnosti u dětí do jednoho roku života hlášené z většiny vyspělých zemí, například z USA, Kanady, Austrálie, Velké Británie, je alarmující (CDC 2012, CDC 2013, Haberling DL. et al., 2009, Vitek CR. et al., 2003, Winter K. et al., 2010, Paddock CD. et al., 2008, Van Hoek AJ. et al. 2013, Swamy G. a Wheeler SM., 2014). Pertuse způsobuje na celém světě každý rok přes 249 000 úmrtí dětí a řadí se tak mezi 10 hlavních příčin dětské mortality (Kretsinger K. et al., 2006).

Ve světové literatuře se vyskytuje řada hypotéz o příčinách recentního vzestupu nemocnosti pertuse, zejména se uvažuje o nízké proočkovanosti populace, o zlepšení a zpřesnění hlášení onemocnění, o zkvalitnění diagnostiky onemocnění, o vyvanutí „waning“ imunity po očkování i po onemocnění, o neúčinnosti vakcín proti pertusi nebo postvákcinaci selekci nových linií *Bordetella pertussis* (vaccine escape) (Cherry JD., 2007, Cherry JD., 1996, Edwards KM. a Decker MD., 2013).

Přes geneticky značně monomorfní strukturu populace *B. pertussis* byla u jednotlivých kmenů dominujících v podmínkách hostitelských populací Evropy a Severní Ameriky popsána pozvolná strukturální dynamika u imunodominantních antigenů s možnou tendencí adaptivního úniku hostitelské imunitě dosažené plošným očkováním. V nizozemské studii ukázala redukce genotypové diverzity u izolátů z 60. - 80. let

minulého století spojená s expanzí kmenů *B. pertussis* antigenně odlišných od kmenů vakcinačních na polymorfismus pertusového toxinu a pertaktinu (Versteegh FGA., 2005).

Zahraniční výsledky molekulární analýzy kmenů *B. pertussis* naznačují, že v postvakcinačním období predominují nové linie *B. pertussis*, které souvisejí se vzestupem nemoci v některých evropských zemích. Analýza švédských izolátů *B. pertussis* z let 1970 - 2003 ukázala významné změny během sledovaných let a naznačuje, že některé z těchto změn mohou být výsledkem adaptace *B. pertussis* na postvakcinační imunitu populace (Hallander HO. et al., 2005). Studium nizozemských izolátů *B. pertussis* z let 1949 - 1999 molekulární metodou u genů povrchových antigenů bylo popsáno pět komplexů, které vykazovaly významné změny v průběhu sledovaného období v souvislosti se zavedením vakcíny proti pertusi (van Loo IH. et al., 2002).

Byla vyslovena hypotéza, že v postvakcinačním období se vyskytují nové, „úspěšné“ klony *B. pertussis*, které se mohou šířit i v očkované populaci (Mosiej E. et al., 2011).

Jedním z důvodů nárůstu nemoci pertusů v České republice (ČR), která je evidována od 90. let dvacátého století, může být přechod z „domácí“, celobuněčné československé očkovací látky vyráběné z aktuálně kolujících kmenů, na acelulární, zahraniční očkovací látku, která nereflektuje současný stav kmenů *B. pertussis* převažujících v současné době v ČR. Mohlo dojít ke změně v antigenním složení kmenů cirkulujících v ČR, ať už vývojem domácích kmenů *B. pertussis* nebo importem antigenně odlišných kmenů z jiných zemí.

## 2 Cíle dizertační práce

---

- Cílem předložené práce bylo zdokumentovat vývoj a výskyt onemocnění pertusí v České republice a vyhodnotit okolnosti, které tento vývoj ovlivňovaly, zejména s ohledem na skupinu dětí do jednoho roku života nejohroženější pertusí.
- Součástí práce bylo zodpovězení otázky, zda recentní vzestup nemoci v ČR není způsoben novými liniemi *B. pertussis*, na něž mohou být současné vakcíny neúčinné.
- Jedním z důležitých cílů bylo vyšetření citlivosti k antibiotikům volby a alternativám při léčení pertuse u 70 kmenů *B. pertussis* izolovaných od pacientů s pertusí v letech 1967 – 2010 v rámci národní surveillance pertuse v ČR.

## **I. OBECNÁ ČÁST**

## 3 Literární přehled problematiky

---

### 3.1 Stručná historie onemocnění

Pertuse – z lat. *per* – velmi, *tussis* – kašel, těžký kašel, synonyma: černý kašel, dávivý kašel, zajíkový kašel, stodenní kašel, whoopingh cough, oslovskij kašel

Podle Lapinovy monografie z roku 1943 byla první zmínka o onemocnění v Evropě nalezena v Moultonově *The Mirror of Health* v roce 1540. První známý popis epidemie pertuse v Paříži v roce 1578 podal Guillaume de Baillou; posmrtně vydaný jeho synovcem v roce 1640. V roce 1697 Sydenham onemocnění pojmenoval pertussis. Anglický název „whooping cough“ se objevil v roce 1701 v londýnské Bills of mortality (*Cherry JD., 1996*).

V roce 1900 pozoroval mikrobiolog Jules Bordet ve sputu vlastního syna drobné protáhlé koky. Později v roce 1906 se Bordetovi a jeho spolupracovníkovi z Bruselského Pasteurova institutu Octavianu Gangouvi podařilo tyto koky vykultivovat na půdě s glycerol-bramborovým extraktem a 25 - 30% beraní krví. Podle ústního sdělení profesora Bordeta ml. z Bruselu izoloval jeho otec původce onemocnění od nemocného syna tak, že před ústa kašlajícího dítěte nastavil plotnu s živným médiem (Bordet-Gengouova půda) (*Vysoká-Buriánová B., 1961*).

Bordet a Gangou označili mikroorganismus za původce dávivého kašle a nazvali *Haemophilus pertussis*; později byl na počest jednoho z objevitelů pojmenován *Bordetella pertussis*.

V roce 1937 - 1938 byla poprvé popsána další bakterie způsobující podobné onemocnění, *B. parapertussis* (Grace Eldering a Pearl Kendrick, Bradford a Slavin).

Původ onemocnění zůstává nejasný, ačkoli má typické symptomy a bylo jednou z hlavních příčin dětské úmrtnosti. Absence zmínek o onemocnění s příznaky pertuse v raně středověké evropské literatuře a absence genetické diverzity kmenů *B. pertussis* vedou k domněnce, že se onemocnění v lidské populaci objevilo z historického hlediska teprve nedávno a že monomorfní charakter *B. pertussis* je dán recentním celosvětovým rozšířením klonu *B. pertussis* souvisejícím s lidskou migrací (*Locht C. et al., 2007*).



### 3.2 Pertuse, dávivý kašel, syndrom pertusoidního kašle

**Pertuse** je bakteriální, vysoce nakažlivé onemocnění respiračního traktu. Jedním z typických příznaků onemocnění je dávivý kašel. Záchvaty kašle mohou přetrvávat několik týdnů. Onemocnění pertusí je nejrizikovější pro neočkované nebo neúplně očkované malé děti vzhledem k možnému rozvoji závažných komplikací i případnému úmrtí.

**Původcem dávivého kašle** jsou bakterie *B. pertussis* nebo *B. parapertussis*, případně *B. bronchiseptica* nebo *B. holmesii*.

U **syndromu pertusoidního kašle** se uplatňují i jiná agens, zejména viry a bakterie, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* a viry parainfluenzy, adenoviry, respiračně syncytiální viry (Čáp P. et al. 2013).

### 3.3 Výskyt

Pertuse se vyskytuje na celém světě bez ohledu na podnebí, místo nebo rasu, ve všech hustě zalidněných oblastech, sporadicky a endemicky. Hlášená onemocnění pertusí vykazují v současnosti i v dobře proočkovaných populacích pravidelný 3 až 5 letý cyklický charakter podobně jako v předvaccinační éře, což znamená, že *B. pertussis* stále koluje v populaci. Cyklický charakter závisí na zvyšujícím se počtu vnímavých jedinců, neimunních nebo nedostatečně imunních, který je dán také poklesem postvaccinační a postinfekční imunity. Ženy onemocní častěji než muži. Typický sezónní výskyt u pertuse není, onemocnění se vyskytuje v průběhu celého roku; nemocnost stoupá v letních a podzimních měsících (Cherry JD., 2005).

### 3.4 Původce onemocnění

Rod *Bordetellae* jsou striktně aerobní, Gram negativní kokobacili a řadí se do čeledi *Alcaligenaceae*. V současné době do rodu *Bordetellae* patří 9 druhů: *Bordetella bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *B. holmesii*, *B. avium*, *B. trematum*, *B. hinzii*, *B. petrii* a *B. ansorpii*. *B. parapertussis* se navíc dělí na dva poddruhy podle

svého hostitele; u člověka se vyskytuje *B. parapertussis<sub>hu</sub>* a pro *B. parapertussis<sub>ov</sub>* jsou hostitelem ovce (Locht C., 2007).

Klasifikace bordetel se mnohokrát upravovala. Například současné jméno druhu *B. bronchiseptica* (1980) se v průběhu času změnilo dokonce pětkrát – *Bacillus bronchicanis* (1910), *Bacterium bronchisepticus* (1913), *Alcaligenes bronchisepticus* (1925), *Brucella bronchiseptica* (1929), *Alcaligenes bronchicanis* (1935) a *Haemophilus bronchisepticus* (1946) (Locht C., 2007).

Při studiu genové sekvenace bordetel, DNA hybridizačních studií, identifikace insertní sekvence (IS) a metabolických charakteristik se ukázalo, že *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis<sub>hu</sub>* a *B. pertussis* tvoří samostatnou klonální populaci, poddruh jednoznačně odlišný od ostatních druhů bordetel a označovaný jako kluster *B. bronchiseptica* (Gerlach G. et al., 2001, Musser JM. et al., 1986, Loch C., 2007).

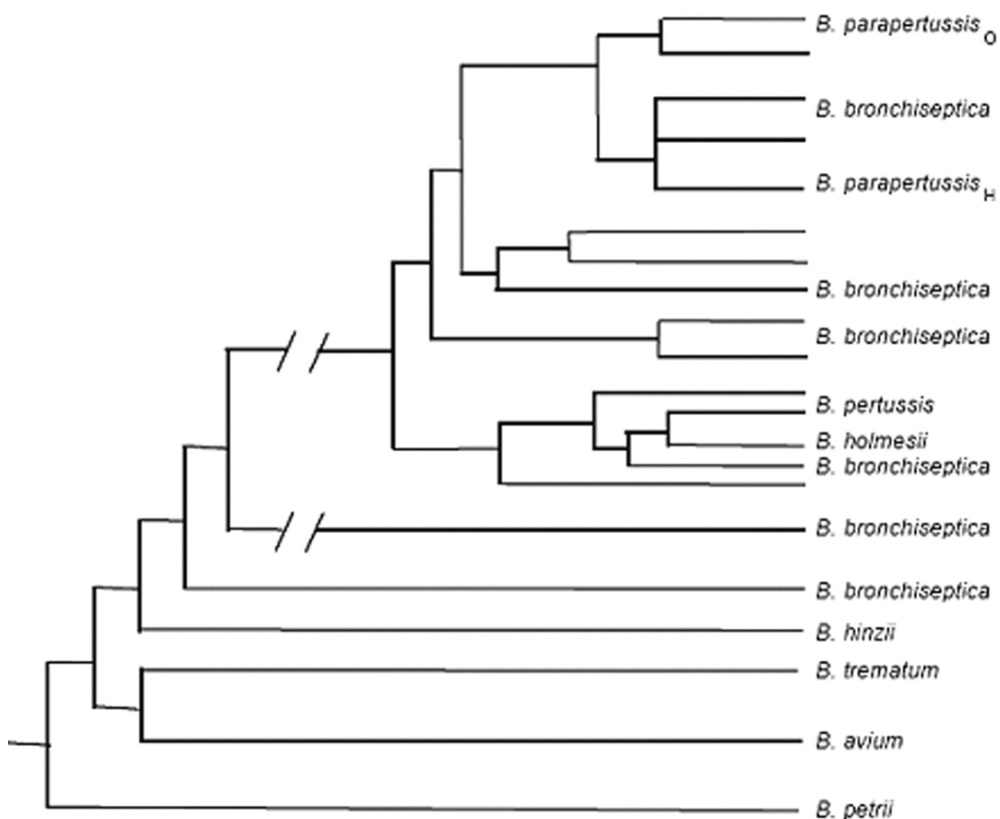
*B. bronchiseptica* je považována za evolučního původce *B. pertussis* a *B. parapertussis* (Bjornstad ON. a Harvill ET., 2005, Parkhill J. et al. 2003).

Bakterie patřící do rodu *Bordetella* jsou významné v humánní i veterinární medicíně, protože jsou schopny osidlovat zejména řasinkový epitel respiračního traktu savců a ptáků, množit se zde a následně způsobovat bronchiální a plicní poškození. Mezi bordetely izolované u lidí patří *B. pertussis*, *B. parapertussis<sub>hu</sub>*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* a *B. ansorpii* (Locht C., 2007). Respirační infekce lidí vyvolává vedle *B. pertussis* zejména *B. parapertussis<sub>hu</sub>* a s menší frekvencí také *B. bronchioseptica* a *B. holmesii* (Mattoo S. a Cherry JD., 2005).

**Obrázek č. 1** ukazuje fylogenetický vztah mezi devíti druhy rodu *Bordetella* vytvořený na základě molekulárních metod, zejména multilokusové enzymatické elektroforézy, identifikace insertní sekvence (IS) a sekvenační analýzy. Dendrogram potvrzuje blízký vztah mezi všemi bordetelami.

**Obr. č. 1: Fylogenetický dendrogram rodu *Bordetella*.**

(Převzato z: Mattoo S, Cherry JD. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. Clin Microbiol Rev. 2005;18(2): 326-82).



### 3.4.1 *Bordetella pertussis*

*Bordetella pertussis* je původcem onemocnění pertuse. *B. pertussis* je drobný, Gram-negativní, nepohyblivý, striktně aerobní kokobacil s mnohočetnou biologickou aktivitou.

*B. pertussis* je extracelulární patogen, kolonizuje řasinkový aparát respiračního traktu. Není považována za invazivní bakterii, nicméně některé recentní studie upozorňují na přítomnost *B. pertussis* v alveolárních makrofázích. Imunomodulační vlastnosti

některých faktorů virulence pravděpodobně umožňují bakteriím vstup do buněk epitelu, do makrofágů a leukocytů hostitele (*Lamberti YA. et al., 2010, Bassinet L. et al. 2000, Masure HR., 1992*).

*B. pertussis* je citlivá na zevní podmínky a mimo lidský organismus rychle hyne. Běžné dezinfekční prostředky bordetely rychle ničí.

*B. pertussis* je nejnáročnější ze všech bordetel na podmínky růstu; vyžaduje speciální kultivační půdy obsahující dřevěné uhlí, krev nebo škrob. Cefalexin přidáný do půdy pomáhá potlačit růst ostatních bakterií. Nejběžněji používanými půdami pro kultivaci *B. pertussis* jsou Bordet-Gengou a Regan-Lowe.

*B. pertussis* syntetizuje *in vivo* i *in vitro* řadu virulentních faktorů, biologicky aktivních a antigenních látek, zejména toxinů a adhesinů (*Crowcroft NS. a Pebody RG., 2006, Loch C., 2007*). Faktory virulence *B. pertussis* jsou důležité pro úspěšnou adhezi a kolonizaci v respiračním traktu hostitele a zároveň se podílejí na rozvoji klinického onemocnění. Některé z faktorů mají rovněž imunomodulační funkci a umožňují tak bakterii obejít hostitelský imunitní systém, **Tab. č. 1**. Jejich kompletní a přesná funkce není zcela jasná a je stále předmětem výzkumu.

#### **3.4.1.1 BVG (Bordetella virulence gene) systém**

Podobně jako mnoho jiných patogenních bakterií jsou také bordetely schopny regulovat expresi mnoha genů, včetně svých virulentních faktorů, toxinů a adhesinů. BVG systém umožňuje bordetelám přizpůsobovat se změnám okolního zevního a vnitřního prostředí, jako je například teplota, pH apod., a v závislosti na tom negativně nebo pozitivně ovlivňovat genovou expresi (*Heininger U., 2001, Loch C., 2007, Melvin JA., 2014*).

#### **3.4.1.2 Toxiny**

K významným toxinům *B. pertussis* patří pertusový toxin (PT), adenylátcyklázový toxin (ACT, CyaA), dermonekrotický toxin (DNT), tracheální cytotoxin (TCT), sekreční systém typ III, endotoxin lipopolysacharid (LPS) a tzv. „toxin kašle“.

**Tab. č. 1: Hlavní biologicky aktivní látky *B. pertussis*.**

**\* Faktory označené hvězdičkou jsou součástí aP vakcín.**

<b>Faktor</b>	<b>Hlavní funkce</b>
<b>Pertusový toxin*</b>	Toxin, faktor adheze a kolonizace, jeho přesná funkce není dosud známa, zodpovědný za systémové projevy
<b>Filamentózní hemaglutinin*</b>	Faktor adheze a kolonizace (především trachea)
<b>Fimbrie 2 a 3*</b>	Faktor adheze (především trachea)
<b>Pertaktin*</b>	69 kDa, protein zevní membrány (omp), faktor adheze
<b>Vnější membránové proteiny (omps)</b>	např. "brk" - rezistence ke komplementu
<b>Adenylátcykláza</b>	Toxin, lokální inhibice fagocytózy, chemotaxe, apoptóza makrofágů
<b>Tracheální cytotoxin</b>	Toxin, paralýza mukociliárního systému, ztráta mechanismu sloužícího k odstraňování hlenu
<b>Aglutinogeny</b>	Povrchové antigeny zodpovědné za aglutinaci bakteriálních buněk v přítomnosti odpovídajících protilátek
<b>Dermonekrotický toxin</b>	Toxin, způsobuje vazokonstrikci, zánět a lokální nekrózu v místě působení <i>B. pertussis</i> , termolabilní

### 3.4.1.2.1 *Pertusový toxin*

Mezi hlavní toxiny *B. pertussis* se řadí pertusový toxin (*Pittman M., 1979*), toxin s mnohočetnou biologickou aktivitou, označovaný také jako pertusigen, faktor podporující lymfocytózu, histamin senzitivní faktor, protein aktivující ostrůvky. Pertusový toxin mimo jiné usnadňuje vazbu bordetel na hostitelovy epiteliální buňky a podporuje výraznou aktivaci lymfocytárního systému hostitele (*Carbonetti NH. et al., 2003, Carbonetti NH., 2010*). Vyvolává tedy paradoxně imunitní odpověď, která redukuje klinickou závažnost onemocnění, ale zároveň působí inhibičně na buněčné složky zánětu, na neutrofile a makrofágy (*Meade BD. et al., 1984, Loch C., 2007, Carbonetti NH., 2010*).

Pertusový toxin se skládá z šesti subjednotek, z toxické subjednotky S1 a pěti vazebných S2 – S5. Pomocí subjednotky S2 se bordetela naváže na glykolipidy buněk řasinkového epitelu hostitele. Subjednotka S3 následně zvýší počet glykoproteinových receptorů na fagocytech a vytvoří tak větší počet míst pro filamentozní hemaglutinin. Po navázání na buňku subjednotka S1 inaktivuje regulační protein navázaný na membránu, který normálně inhibuje adenylátcyklázu. Tak nepřímo stimuluje adenylátcyklázu, což vede ke zvýšení sekrece na sliznici dýchacích cest a k produkci hlenu (*Votava M. et al., 1996*).

Přesný mechanismus vazby a vstupu PT do buněk stále není znám, nicméně PT ovlivňuje eukaryotické buňky, které mají na povrchu sialovou kyselinu obsahující glykoproteiny, a způsobuje jejich aktivaci, například aktivaci trombocytů a buněk ostrůvků pankreatu (*Locht C., 2007*).

Prostřednictvím pertusového toxinu mohou vznikat vzdálené systémové projevy onemocnění, i když již *B. pertussis* není v těle přítomna (*Pittmann M., 1986, Votava M. et al., 1996*). PT způsobí vyplavení lymfocytů z depot, z kostní dřeně, sleziny a lymfatických uzlin, což vede k výrazné lymfocytóze. Lymfocyty, které jsou morfologicky zcela normální, nejsou schopny se do lymfoidních tkání vracet (*Votava M. a kol., 2006*). K hlavním systémovým účinkům pertusového toxinu patří výrazná leukocytóza, lymfocytóza, změny vaskulární permeability a neurologické komplikace

(Munoz JJ. et al., 1981, Pittmann M., 1986, Bakoss P., 2005, Christodoulides M., 1990).

Pertusový toxin ze všech druhů bordetel exprimuje pouze *B. pertussis*, ačkoliv geny pro PT jsou přítomny i v *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica*, ale díky inaktivaci promotoru nejsou exprimovány (Aricò B. a Rappuoli R., 1987).

Recentní studie z Francie popsala izolaci kmene *B. pertussis* bez produkce pertusového toxinu u neočkovaného dítěte, které bylo hospitalizováno s podezřením na onemocnění pertusí. Izoláty bez PT byly méně patogenní na zvířecím nebo buněčném modelu, nicméně jejich cirkulace v lidské populaci může zvyšovat problémy s klinickou a laboratorní diagnostikou (Bouchez V. et al., 2009).

Na druhou stranu nárůst případů pertuse v Nizozemí od 90. let minulého století je spojen s výskytem kmenů *B. pertussis* s vyšší virulencí a se zvýšenou produkcí pertusového toxinu, která je dána změnami v promotorové oblasti genu *ptx* (Mooi FR. et al., 2009). Dříve v populaci dominovaly izoláty *B. pertussis* s alelou *ptxP1*, od 90. let je postupně nahrazována alelou *ptxP3*. Její záchyt v klinických izolátech *B. pertussis* narůstá a je popisován z mnoha zemí (Advani A., et al., 2013, Octavia S. et al., 2012, Schmidtke AJ. et al., 2012, Advani A. et al., 2011, Mooi FR. et al., 2009). Kmeny *B. pertussis* s alelou *ptxP3* jsou více virulentní, produkují více pertusového toxinu, ale o něco méně pertaktinu.

#### **3.4.1.2.2 Adenylátcyklázový toxin**

Adenylátcyklázový toxin patří k důležitým faktorům virulence *B. pertussis* (Weiss AA. et al., 1984). Má dvě složky, vazebnou a katalytickou doménu. Vazebná část toxinu umožňuje vazbu na buněčnou membránu a vstup do cytozolu buněk (El-Azami-El-Idrissi M. et al., 2003). Zde se aktivuje druhá katalytická složka toxinu a spustí přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cyklický adenosin monofosfát (cAMP). Adenylátcyklázový toxin rovněž způsobuje apoptózu makrofágů a dalších buněk (Khelef N. a Guiso N., 1995). ACT je významný pro patogenezi infekce; je schopen negativně ovlivňovat funkci fagocytů, zejména neutrofilů, a tím hraje primární roli v ochraně *B. pertussis* proti hostitelské imunitě.

#### **3.4.1.2.3 Dermonekrotický toxin**

Dermonekrotický toxin (DNT) byl původně znám jako tepelně labilní toxin, protože je inaktivován při teplotě 56°C. Způsobuje zánět a lokální nekrotické léze v místech, kde *B. pertussis* adhezuje k epitelu, a ovlivňuje stavbu cytoskeletu (Masuda M. et al., 2000). Funkce DNT není zcela objasněna, ale předpokládá se, že jeho úloha v patogenezi onemocnění nebude významná (Locht C., 2007).

#### **3.4.1.2.4 Tracheální toxin**

Tracheální toxin je toxický pro ciliární aparát respiračního epitelu; zastavuje pohyb řasinek, zabíjí řasinkové buňky a snižuje tak samočistící funkci dýchacích cest. Toxin rovněž stimuluje uvolňování cytokinů IL-1, čímž způsobuje zvýšenou teplotu hostitele (Locht C., 2007, Todar K., 2016).

#### **3.4.1.3 Adhesiny**

Virulence bordetel je významně závislá na schopnosti adherovat na různé cílové buňky hostitele prostřednictvím specifických druhů adhezínů. Produkci adhezínů zcela kontroluje BVG systém. K hlavním povrchovým proteinům a autotransportérům *B. pertussis* se řadí filamentozní hemaglutinin (FHA), fimbrie (FIM), pertaktin (PRN) a tracheální kolonizující faktor (TcfA) (Cherry JD., 2007, Locht C., 2007, Cherry JD., 1996).

##### **3.4.1.3.1 Filamentozní hemaglutinin**

Filamentozní hemaglutinin patří k nejvýznamnějším adhezínům, který *B. pertussis* produkuje. FHA je produkován ve velkém množství. Obsahuje několik vazebných struktur, které se vážou na glykolipidy epiteliálních membrán a na glykoproteinový receptor na povrchu polymorfonukleárních leukocytů hlenu (Votava M. et al., 1996). FHA tak zprostředkovávají vazbu *B. pertussis* na buňky epitelu respiračního traktu hostitele a také na povrch monocytů a makrofágů (Ishibashi Y. et al., 1994).



### **3.4.1.3.2 Fimbrie**

Fimbrie jsou drobná vlákna na povrchu Gram-negativních bakterií, která umožňují adhezi bakterií na buňky hostitele a na ostatní bakterie. Biosyntéza fimbrií je složitá a vyžaduje zapojení více genů. *B. pertussis* exprimuje dvě hlavní fimbriální podjednotky, podle kterých se rozlišují sérotypy *B. pertussis* - Fim2 a Fim3 (Willems RJ., 1992). Fimbrie bordetel spolupracují s FHA na kolonizaci trachey hostitele. Fimbrie jsou hlavním cílem imunitního systému v rámci obrany před infekcí (Locht C., 2007).

U cirkulujících izolátů *B. pertussis* byl pozorován antigenní drift fimbrií daný pravděpodobně selekčním tlakem. Nizozemské izoláty *B. pertussis* z období před očkováním a po zahájení očkování vykazovaly významné změny v četnosti fimbriálních sérotypů v populaci *B. pertussis* (Van Loo IH. a Mooi FR., 2002).

### **3.4.1.3.3 Pertaktin**

Pertaktin je protein, který *B. pertussis* exprimuje na svém povrchu. Pertaktin ovlivňuje virulenci *B. pertussis*. Pomocí vazebné domény umožňuje adhezi bakterie na buňky epitelu respiračního traktu hostitele (Leininger E. et al., 1991).

Od roku 2000 je pozorován antigenní posun z predominantní varianty pertaktinu *prn1* k variantě *prn2* nebo *prn3* (Cassiday P. et al., 2000, Fry NK. et al., 2001, Weber C. et al., 2001). Antigenní divergence byla pozorována i mezi vakcinálními a cirkulujícími kmeny *B. pertussis*; vakcinální kmeny obsahují variantu pertaktinu *prn1*, v cirkulujících kmenech predominuje varianta *prn2* (He Q. et al., 2003, Hijnen M. et al., 2004).

V poslední době jsou z mnoha států hlášeny záchyty izolátů *B. pertussis*, které neexprimují pertaktin, tedy jeden z antigenů obsažený v acelulární složce očkovací látky proti pertusi. V Austrálii identifikovali v souboru izolátů *B. pertussis* získaných při epidemii pertuse z let 2008 – 2012 celkem 30 % izolátů, které neexprimovali pertaktin (Lam C. et al., 2014). V USA bylo mezi 753 izoláty *B. pertussis* z let 2011 až 2013 celkem 640 izolátů (85 %) pertaktin negativních (Martin SW. et al., 2015). Vliv na účinnost očkování nebo patogenezí onemocnění není znám (Lam C. et al., 2014),

nicméně u dětí s pertusí nebyl nalezen vztah mezi přítomností pertaktinu a závažností onemocnění (Clarke M. et al., 2016).

### 3.4.2 *Bordetella parapertussis*

*Bordetella parapertussis* je mikroskopicky a biochemicky velmi podobná *B. pertussis*, liší se však svými antigenními vlastnostmi a není tak náročná na laboratorní podmínky. Byla izolována u lidí a ovcí. Genetické studie lidských a ovčích izolátů *B. parapertussis* prokázaly, že patří k odlišným liniím, a jsou proto označovány jako *B. parapertussis<sub>hu</sub>* a *B. parapertussis<sub>ov</sub>* (Locht C., 2007).

*B. pertussis* a *B. parapertussis<sub>hu</sub>* jsou striktně humánní patogeny. Fylogenetické analýzy naznačují společný původ pocházející z *B. bronchiseptica* nebo podobného předchůdce (Locht C., 2007, Melvin JA., et al., 2014).

*B. parapertussis* způsobuje lehčí, výjimečně i život ohrožující onemocnění. Onemocnění způsobená *B. parapertussis* tvoří 5 – 30 % všech případů dáivého kašle, ale celková nemocnost je výrazně podhlášena; v dospělé populaci má protilátky 40 – 90 % osob (Linnemann CC. a Perry EB., 1977, Mertsola J., 1985).

Finská studie pacientů s dáivým kašlem ukázala, že až 32 % případů jsou způsobena právě *B. parapertussis* a navíc, 7 % pacientů má duální infekci oběma patogeny, *B. pertussis* a *B. parapertussis* (He Q., et al. 1998).

### 3.4.3 *Bordetella bronchiseptica*

*Bordetella bronchiseptica* může u lidí dlouhodobě kolonizovat respirační trakt. Ojedinele je jako oportunní patogen schopna infikovat člověka, zejména osoby imunosuprimované nebo s chronickým onemocněním dýchacího traktu, a způsobit podobné klinické projevy jako *B. pertussis* a *B. parapertussis*. *B. bronchiseptica* je zejména důležitým patogenem respiračního traktu u zvířat. Vyvolává vysoce infekční respirační onemocnění prasat, králíků, koček, laboratorních zvířat a u psů tzv. „kennel cough“ (Goodnow RA., 1980, Woolfrey BF. et al., 1991, Bille E. et al., 2011)

#### 3.4.4 *Bordetella holmesii*

*Bordetella holmesii* je považována za oportunní patogen. Poprvé byla izolována z krevní kultury u pacientů v USA, Saudské Arábii a Švýcarsku (Weyant RS. et al., 1995).

*B. holmesii* se vyskytuje u pacientů s chronickým onemocněním, zejména u asplenických a imunosuprimovaných pacientů. *B. holmesii* způsobuje pertusi podobné onemocnění respiračního traktu včetně pneumonie, ale také meningitidy, artritidy, perikarditidy a endokarditidy (Pittet LF. et al., 2014, Pittet LF. et al., 2015).

V genomu *B. holmesii* byly nalezeny insertní sekvence IS481 a IS1001, které mohou způsobovat diagnostickou nespecificitu při PCR vyšetření na základě přítomnosti IS481 pro *B. pertussis* a IS1001 pro *B. parapertussis* a tedy neschopnost odlišit *B. holmesii* od těchto dvou druhů bordetel (Reischl U. et al., 2001).

#### 3.4.5 *Bordetella avium*

*Bordetella avium* byla považována za striktně ptačí patogen způsobující tzv. bordetelózy, respirační onemocnění, zejména tracheobronchitidy divokého ptactva a domácí drůbeže. Byla izolována v roce 1970 z respiračního traktu krůt a zařazena mezi bordetely jako *B. avium* v roce 1984 (Kerstens KH. et al., 1984).

*B. avium* se může vyskytnout vzácně jako oportunní patogen u osob s onemocněním respiračního traktu, u osob s cystickou fibrózou nebo u imunosuprimovaných osob (Harrington AT. et al., 2009, Spilker T. et al., 2008).

#### 3.4.6 *Bordetella hinzii*

*Bordetella hinzii* je komenzálem respiračního traktu drůbeže. Izolace *B. hinzii* od lidí je velmi vzácná, byla popsána u imunokompromitovaných pacientů (Cookson BT. et al., 1994, Vandamme P. et al. 1995, Kattar MM. et al., 2000, Fry NK. et al., 2007).

### 3.4.7 *Bordetella trematum*

*Bordetella trematum* byla izolována u infekčních onemocnění ucha a v kožních ranách u lidí, např. v diabetickém vředu, v respiračním traktu zachycena nebyla. Patogenita bakterie *B. trematum* zůstává neobjasněna (Vandamme P. et al., 1996, Daxboeck F. et al., 2004).

### 3.4.8 *Bordetella ansorpii*

*Bordetella ansorpii* byla popsána v roce 2005 jako nový druh, byla izolována z purulentního exudátu epidermálních cyst u imunosuprimovaného pacienta. Její patogenní význam není dosud objasněn (KO KS. et al., 2005).

### 3.4.9 *Bordetella petrii*

*Bordetella petrii* je posledním objeveným kmenem z rodu *Bordetella* a zároveň první, který byl izolován z prostředí, z říčního sedimentu. *B. petrii* je schopna růst za aerobních i anaerobních podmínek. Zdroj a případná patogenita *B. petrii* zůstávají nejasné. Byla izolována u chronicky nemocných a u pacientů s cystickou fibrózou (Von Wintzingerode F. et al., 2001, Le Custoumier A. et al., 2011).

## 3.5 Patogeneze

Na základě účinků pertusového toxinu byla v minulosti pertuse označena jako onemocnění zprostředkované toxinem (Pittman M., 1984), nicméně dnes je jasné, že patogenese onemocnění je složitá a podílí se na ní i ostatní toxiny, adhesiny a další bakteriální produkty.

Patogenezi onemocnění je možno rozdělit na dvě fáze – kolonizaci a toxémií.

První fáze začíná vstupem bakterie do vnímavého hostitelského organismu, adherencí k řasinkovému epitelu, pomnožením a kolonizací. Po uplynutí inkubační doby se pertuse projevuje jako onemocnění horních cest dýchacích s mírně zvýšenou teplotou, nevolností a kašlem, jehož intenzita se zvyšuje asi 10. den po vypuknutí onemocnění. Během tohoto období se *B. pertussis* vyskytuje hojně v nazofaryngu a laryngu. Předpokládalo se, že *B. pertussis* trvale zůstává na povrchu respiračního epitelu

a nepenetruje do organismu. Recentní studie ukazují, že *B. pertussis* je schopna přežívat uvnitř alveolárních makrofágů, adaptuje se na intracelulární prostředí a může se dále vyvíjet (Valdez H. et al., 2010, Lamberti YA. et al., 2010, Bassinet L. et al. 2000, Masure HR., 1992).

Bordetely osídlují řasinkový epitel respiračního traktu, kde způsobují paralýzu až nekrózu řasinek a spolu se ztrátou čistící funkce dochází ke katarálnímu zánětu postižené sliznice. Nekrotické části jsou bohatě infiltrovány polymorfonukleárními leukocyty, vzniká peribronchiální zánět a intersticiální pneumonie. Drážděním receptorů pro kašel spolu se ztrátou mechanismu, kterým je za normálních okolností z povrchu sliznice odstraňován hlen, vzniká typický kašel. Závažnost a trvání onemocnění mohou být v tomto stádiu omezeny cílenou antibiotickou terapií.

Druhá fáze, toxémie, začíná postupně s prodlužováním záchvatů kašle, které končí charakteristickým usilovným nádechem. Toxiny produkované *B. pertussis* se dostávají do krevního oběhu a způsobují systémové účinky, zejména zprostředkované pertusovým toxinem, jako je hyperinsulinémie s následnou hypoglykemií, lymfocytóza, leukocytóza, snížená chemotaxe, zvýšená citlivost na histamin s následně zvýšenou vaskulární permeabilitou (Pittman M., 1986, Mattoo S. a Cherry JD., 2005, Melvin JA. Et al., 2014).

### **3.6 Zdroj nákazy**

Zdrojem onemocnění je výlučně infikovaný člověk, který šíří onemocnění na blízké vnímavé osoby.

V dnešní dobře proočkované populaci se průběh onemocnění mění, nemá „učebnicový“ průběh. Osoby s atypickým, často oligosymptomatickým, proto mnohdy nepoznaným průběhem onemocnění, především adolescenti a dospělí, jsou nejčastějším zdrojem pertuse pro ostatní, zejména pro malé dosud neočkované nebo neúplně očkované děti. Studie z USA, Kanady a Francie ukázaly, že 12 - 32 % dospělých s dlouhotrvajícím kašlem nad 1 - 2 týdny má pertusi (Wright SW. et al., 1995, Senzilet LD. Et al., 2001, Gilberg S. et al., 2002).

Matky s onemocněním pertusí během těhotenství mohou být zdrojem nemoci pro své novorozené dítě. V nizozemské studii bylo onemocnění sérologicky potvrzeno u 6,3 % těhotných žen (*Nooitgedagt JE. et al., 2009*).

Vysoká nakažlivost onemocnění byla známa; „...pertusí onemocnění každé dítě, dříve nebo později...“ (*Edwards KM. a Deckert MD., 2013*)

Přenos mezi vnímavými spolužáky ve škole dosahuje 50 - 80 % (*Rodman AC. et al., 1946*). Séroprevalenční studie v neočkované populaci potvrdila, že do 19 let věku onemocní pertusí 95 % vnímavých osob (*Giammanco A. et al., 1991*).

Rodinní příslušníci a příbuzní jsou zdrojem onemocnění pro 75 % dětí ve věku 0 – 3 měsíce a pro 73 % dětí od 4 do 11 měsíce. Dalšími zdroji onemocnění pro děti jsou osoby pečující o děti, například chůvy, sousedé, přátelé rodiny a další. Osoby mimo domácnost jsou zdrojem pertuse v 18 – 29 % (*Bisgard KM. et al., 2004, Schellekens J. et al., 2005, Kretsinger K. et al., 2006, Wendelboe AM. et al., 2007, Wendelboe AM. et al., 2007*).

Chronické nosičství *B. pertussis* nebylo potvrzeno (*Linnemann CC. et al., 1968*), ale recentní studie upozorňují na přechodné asymptomatické infekce u některých osob (*Broome CV. A Fraser DW., 1981, Mertsola J. et al., 1983*). Právě tito jedinci budou pravděpodobnějším zdrojem infekce než osoby s mírnějším symptomatickým onemocněním (*Locht C., 2007*).

### **3.7 Přenos**

Pertuse se přenáší osobním kontaktem vzdušnou cestou kapénkami, které vznikají hlavně při kašlání a kýchání infikovaného jedince a mohou se zachytit na sliznicích vnímavých osob. Dolet infekčních kapének je běžně kolem 90 cm, ale i více než jeden metr (*Warfel JM. et al., 2012*).

Rychlé je šíření obzvláště v uzavřených dětských kolektivech, jako jsou jesle, školky, školy, ale i v kolektivech adolescentů a mladých dospělých, např. v ubytovnách a vysokoškolských kolejích, kasárnách apod. Výjimečně je možný i přenos nepřímý prostřednictvím předmětů, které jsou čerstvě kontaminovány sekrety horních cest

dýchacích (*Heymann DL., 2008*). V zaschlém sekretu horních cest dýchacích se udrží několik hodin (*Vysoká-Buriánová B., 1961*).

### **3.8 Inkubační doba**

Inkubační doba je nejčastěji 7 - 10 dní (rozmezí 1 - 3 týdny), ale u 22 % tzv. kontaktů v domácnosti bylo zaznamenáno prodloužení inkubační doby až na 28 dní po vzniku primárního případu (*Mattoo S. a Chery JD., 2005*).

### **3.9 Období nakažlivosti**

Pertuse je vysoce nakažlivá, sekundární attack rate mezi domácími vnímavými kontakty dosahuje až 80 %. Infikovaný jedinec šíří nákazu již koncem inkubační doby, 3 - 4 dny před prvními příznaky onemocnění, a během katarálního období. Nakažlivost obvykle klesá k minimu do 3 - 4 týdnů po vzniku kašle. Bez antibiotické terapie může být jedinec nakažlivý po celé paroxysmální období až do rekonvalescence (*CDC, 2011*).

### **3.10 Vnímovost**

Vnímovost je všeobecná. V předvakační éře se předpokládalo, že pertusí onemocní každé dítě, dříve nebo později. Pertuse je vysoce nakažlivá; více než 90 % vnímavých tzv. domácích kontaktů onemocní. Attack rate mezi úzkými vnímavými kontakty nemocného s pertusí závisí na počtu a věku kontaktů; může dosahovat 80 až 100 %. (*Edwards KM. a Decker MD., 2013, Rodman AC. et al., 1946*).

Očkování ani prožitá onemocnění neposkytuje celoživotní imunitu (*Grimprel E. et al., 1996, Thomas MG., 1989*).

Po onemocnění dochází k poklesu protilátek proti pertusi za 4 až 20 let, po očkování v průběhu 3 až 12 let podle typu použité očkovačiny (*Kretsinger K. et al., 2006, Wendelboe AM. et al., 2007, Fabiánová K. et al., 2007, Lavine JS. et al., 2012*).

Osoby se tak stávají vůči onemocnění opět vnímavé, nejdříve v asymptomatické formě, a následně s různě rozvinutými typickými klinickými příznaky pertuse. Dospělý člověk obvykle prodělá mírnou formu pertuse průměrně 2,6krát za život (*Gustafsson L. et al., 2006, Witt MA. et al., 2012*).

Pokud má těhotná žena dostatečné množství IgG protilátek proti pertusi, přenášejí se aktivně přes placentu do oběhu plodu. Po porodu ale dochází u novorozenců k rychlému poklesu hladin pasivně získaných mateřských specifických IgG protilátek vzhledem k jejich přirozenému biologickému odbourávání. Během prvních dvou měsíců života klesají tyto protilátky na nedetekovatelné hladiny. Na konci 4. týdne života má mateřské protilátky 21 % dětí, na konci 8. týdne již jen 4,7 % dětí. Tedy ve věku 2 měsíců nelze detekovat mateřské protilátky u 95 % dětí (*Vysoká-Buriánová B., 1961, Čelko A. et al., 1984, Van Savage J. et al., 1990, Gonik B. et al., 2005, Healy CM. et al., 2015*).

### **3.11 Klinický obraz**

Klinický obraz pertuse vykazuje velkou variabilitu podle věku nemocného, předcházející expozici nebo očkování.

Typický průběh pertuse má obvykle tři stádia: katarální, paroxysmální a stádium rekonvalescence.

Po inkubační době nastupuje stádium katarální, normálně trvající 10 - 15 dní, které začíná ve většině případů podobně jako zánět horních cest dýchacích s nepříliš významnou teplotou, nevolností, slzením, kýčáním a kašlem, zpočátku občasným, postupně se zhoršujícím.

Stádium paroxysmální, které obvykle trvá 1 - 4 týdny, ale i déle, je charakteristické nástupem typického dráždivého, záchvatového kašle, s rudnutím a modráním (cyanózou) v obličeji, někdy končícím vykašláním sputa nebo zvracením (dávivý kašel). Lze pozorovat i apnoickou pauzu, po které následuje hlasité, zajímavé inspirium připomínající zakokrhání kohouta. Námaha při paroxysmech kašle může vést často k subkonjunktiválním sufuzím („černý kašel“). Záchvaty kašle mohou být vyvolány jídlem, pláčem, smíchem a dalšími podněty a obvykle se zhoršují v noci. Po záchvatu bývají děti ale i dospělí velmi vyčerpaní. Mezi jednotlivými záchvaty může být pacient bez jakýchkoliv příznaků.

Se snižující se četností a závažností záchvatů kašle nastupuje stádium rekonvalescence, které trvá obvykle několik týdnů. V období rekonvalescence může neparoxysmální kašel přetrvávat mnoho týdnů i měsíců, zvláště u neurolabilních jedinců (*Marešová V.,*



2003, *Mattoo S. a Chery JD., 2005*). U dlouhotrvajícího kašle je v rekonvalescenci doporučováno radikálně změnit prostředí pacienta a přerušit tak vzniklý podmíněný reflektorický kašel vázaný na místo, ve kterém onemocnění probíhalo. Paroxysmy kašle se mohou znovu objevit při jiné infekci dýchacích cest i mnoho měsíců po proběhlé pertusi (*Lobovská A., 2002, CDC, 2011*).

Pertuse je nejzávažnější pro novorozence a kojence pro rozvoj možných život ohrožujících komplikací; 86 % dětí zemřelých na pertusi v USA v letech 1990 - 2004 bylo mladší než 4 měsíce. U těchto dětí byly častou smrtelnou komplikací závažné plicní hypertenze. Vývoj refrakterní plicní hypertenze, která vede k šoku a selhání srdce, je v současné době považován za kauzální faktor u dětí s fatální pertusí (*Vitek CR. et al., 2003, Donoso A. et al., 2005, Paddock CD. et al., 2008*).

Maligní pertuse je kritický stav u nejmenších dětí spojený až se 70% smrtností (*Chantreuil J. et al., 2015*).

U starších dětí, adolescentů, dospělých a očkovaných je průběh onemocnění obvykle mírnější nebo atypický, ale je velmi obtěžující pro dlouhotrvající úporný kašel, ale také může probíhat asymptomaticky. Protrahovaný kašel je u dospělých s pertusí běžný. Až 61 % dospělých kašlalo průměrně ještě 94 dní po začátku onemocnění (*Lee GM. et al., 2004*).

Na možnost pertuse u adolescentů a dospělých by se mělo pomýšlet, trvá-li kašel déle než dva týdny, raději již při kašli trvajícím týden. Onemocnění pertusí zpočátku vypadá jako běžná respirační infekce; může se vyskytnout rýma, slzení, kýčání, konjunktivitida, subfebrilie, chrapot, bolesti v krku, ale dominantní je rozvoj záchvatovitého, neproduktivního kašle, který se zhoršuje v noci a nereaguje na běžnou léčbu. Mezi záchvaty kašle pacient nemá obvykle žádné symptomy, to je důležité odlišení od respiračních viróz nebo alergických stavů. Symptomy typické pro pertusi, jako jsou paroxysmy, apnoe, zajímavé inspirium a zvracení po záchvatu kašle, se často mohou vyskytovat i v dospělé populaci (*Lee GM. et al., 2004*).

Neustávající kašel nereagující na běžnou antitusickou léčbu je pro pacienta velmi nepříjemný a stává se důvodem opakovaných návštěv v ordinacích praktických lékařů, případně alergologů a imunologů. Na druhé straně, u osob s chronickým onemocněním

dýchacích cest je v případě infekce pertusí vyšší riziko těžšího a delšího průběhu a zhoršení základní choroby. Až u 30 % pacientů se stabilním astmatem byla nalezena *B. pertussis*; tito pacienti měli horší plicní funkce a více projevů astmatu než pacienti bez *B. pertussis*. Až u 30 % pacientů s exacerbací chronické obstrukční nemoci byla zachycena právě *B. pertussis* (Bonhoeffer J. et al., 2005, Bos AC. et al., 2011, Pesek R. a Lockey R., 2011).

### **3.11.1 Komplikace**

Pravděpodobnost, že se při onemocnění pertusí vyskytnou komplikace, se zvyšuje s klesajícím věkem nemocného – děti do jednoho roku života patří mezi nejvíce ohroženou skupinu.

Mezi časté komplikace onemocnění patří různé hemoragické projevy dané zvýšeným tlakem při záchvatu kašle např. subkonjunktivální hemoragie, epistaxe, petechie, edém obličeje, vzácněji meléna, subdurální a míšní hematomy. Opakované zvracení po záchvatech kašle může vést až k malnutrici, dehydrataci, případně anorexii. Ke komplikacím pertuse se řadí mezotitidy, pneumonie primární nebo sekundární, případně atelektázy plic trvající i měsíce. Bronchopneumonie je hlavní komplikací, často fatální, a vyskytuje se až u 54 % úmrtí spojených s pertusí. Ke komplikacím vzniklým mechanicky a zvýšeným intrathorakálním a intraabdominálním tlakem patří zejména ulcerace frenula, pupeční a tříselné kýly, prolaps rekta, pneumothorax, mediastinální a podkožní emfyzém, ruptura bránice apod.

U kojenců s pertusí je postižení centrálního nervového systému relativně časté; vyskytují se křeče, encefalopatie až komatózní stav. Z ložiskových příznaků je přítomna hemiplegie, případně paraplegie (Lobowská A., 2002). Po těžkém nebo komplikovaném průběhu mohou někdy zůstat trvalé změny (slepota, hluchota, mentální retardace), pravděpodobně důsledkem mozkové anoxie a lokálních hemoragií (Procházka J. a Kryl R., 1959).

Mezi komplikace u adolescentů a dospělých s pertusí patří zejména nechutenství, zvracení, poruchy spánku, inkontinence moči při záchvatech kašle, záchvatovitý kašel, apnoe, pneumonie, ruptury mezižeberních svalů a vzácně i fraktury žeber (Postels-Multani S. et al., 1995, De Serres G. et al., 2000, Kretsinger K. et al., 2006).

### ***3.11.2 Významné klinické, patologické a histopatologické změny u zemřelých dětí s pertusí***

Působením pertusových antigenů, zejména pertusového toxinu, dochází v organismu ke změnám, které mohou významně ovlivnit průběh onemocnění. U souboru dětí, které zemřely v souvislosti s pertusí, byla nalezena výrazná kortikální deplece thymu, deplece lymfocytů v lymfatických uzlinách a deplece bílé pulpy sleziny. Tyto nálezy odpovídají situaci v krevním obraze; u dětí s pertusí je obvykle nalezena extrémní leukocytóza s lymfocytózou. Přítomnost velkého množství krevních elementů v cévním řečišti vede k zpomalení krevního proudu, k agregaci v arteriolách, venulách a lymfatických cévách s následnou tromboembolií. V plicní tkáni byla s různou četností popisována difúzní infiltrace makrofágy, neutrofilní bronchopneumonie, bilaterální pulmonární edém a fokální hemoragie, pleurální edém, pleurální a intraalveolární hemoragie, interlobulární septální edém, nekrotizující bronchitida, bronchiolitida a pneumonie různého stupně. Pneumonie, plicní hypertenze a následné pravostranné srdeční selhání jsou nejčastější příčinou úmrtí v souvislosti s pertusí u nejmenších dětí (*Cherry JD. a Paddock CD., 2014, Sawal M. et al., 2009, Christie CD. a Baltimore RS., 1989*).

### **3.12 Laboratorní diagnostika**

Přesto, že za jednu z příčin nárůstu pertuse jsou považovány zlepšující se diagnostické možnosti, podhlášenost pertuse je stále značná; hlášené případy onemocnění tvoří jen „špičku ledovce“, pouhých 1 – 36 % (*Miller E. et al., 2000, Strebel P. et al., 2001*). Mnoho lidí s kašlem zprvu ani nevyhledá lékaře a teprve, když potíže trvají neobvykle dlouho a běžně dostupné léky proti kašli nezabírají, objevují se v ordinaci. Proto je pertuse u dospělých často nediodagnostikována nebo považována za jinou infekci horních cest dýchacích, bronchitidu nebo alergii, a i proto je značně podhlášena.

Navíc, onemocnění vyvolaná jinými druhy bordetel než *B. pertussis* jsou často chybně diagnostikována a rovněž podhlášena vzhledem k tomu, že rutinně používané diagnostické testy nejsou druhově specifické.

Pokud přicházejí pacienti do ordinace až v pozdějším stádiu pertuse, je přímá diagnostika onemocnění, tedy kultivační průkaz nebo PCR detekce, značně

problematická. Onemocnění tak může být mylně diagnostikováno, není proto správně léčeno, dochází k šíření onemocnění na další vnímavou populaci a zvyšuje se tak nemocnost pertusí (*Leschke TM. et al., 2014*).

Rychlá a přesná diagnostika onemocnění pertusí je důležitá pro včasné nasazení správné antibiotické léčby a tím i pro výrazné ovlivnění průběhu celého onemocnění. U typického průběhu v paroxysmálním stádiu bývá diagnóza snadná. Odhalit etiologického původce u atypických průběhů a v katarálním stádiu onemocnění není jednoduché, proto je třeba cílenými dotazy pátrat po kontaktu s jiným nemocným pertusí nebo přítomnosti kašlající osoby v okolí nemocného a diagnózu podpořit laboratorním vyšetřením.

Kauzální diagnostika pertuse se opírá o přímý průkaz agens, tedy kultivační průkaz a izolaci agens a PCR detekci (polymerázovou řetězovou reakci). Jako nejvhodnější a nejrychlejší řešení diagnostiky pertuse je doporučována kombinace PCR a odběru aspirátu nebo nazofaryngeálního výtěru na kultivační vyšetření.

Odběry k průkazu DNA *B. pertussis* se provádějí co nejdříve, nejlépe ráno nalačno před napitím a před ústní hygienou. DNA lze v nazofaryngeálním výtěru prokázat i po zahájení antibiotické léčby. Odběr se provádí speciálním tampónem přes nosní průduch ze zadní stěny nazofaryngu. Metoda PCR má optimální senzitivitu v prvních třech týdnech, ale PCR může být pozitivní 5 až 21 dní, výjimečně i měsíc po léčbě antibiotiky (*Riffelmann M. et al., 2005, Bidet P. et al., 2008, Zavadilová J. et al., 2009*).

Zlatým standardem je kultivační průkaz *B. pertussis* na speciální půdě. Odběr se provádí speciálním tampónem přes nosní průduch ze zadní stěny nazofaryngu. Již jedna dávka antibiotik omezí růst *B. pertussis* a sníží záchytnost. Izolace bývá obtížnější. Kultivační záchyt se snižuje s dobou, která uplynula od vzniku kašle. Kultivace je méně citlivá než PCR, 15 - 45 % v prvních třech týdnech, méně než 1 - 3 % po více než třech týdnech, ale je 100 % specifická (*Kretsinger K. et al., 2006*).

U novorozenců a dětí do 3 let věku je doporučeno provést odběr na kultivační vyšetření a/nebo PCR vyšetření co nejdříve po vyslovení podezření na onemocnění. Doporučená laboratorní diagnostika v závislosti na délce trvání příznaků u očkovaných dětí a dospělých je uvedena v **tabulce č. 2:**

**Tab. č. 2: Doporučená laboratorní diagnostika pertuse v závislosti na délce trvání příznaků u očkovanych dětí a dospělých**

Metoda	Materiál	Do 2 týdnů trvání příznaků	Do 4 týdnů trvání příznaků	Nad 4 týdny trvání příznaků
<b>Kultivační průkaz</b>	Výtěr z nosohltanu nebo aspirát	Ano	Ne	Ne
<b>Detekce nukleové kyseliny</b>	Výtěr z nosohltanu nebo aspirát	Ano	Ano	Ne
<b>Průkaz specifických protilátek IgG proti pertusovému toxinu</b>	Žilní krev - srážlivá	Ne	Ano	Ano

Třetí možností laboratorní diagnostiky pertuse je nepřímý průkaz, tedy odběr krve k sérologickému vyšetření specifických protilátek proti pertusi. Sérologická diagnostika určuje diagnózu retrospektivně, má význam epidemiologický. Potvrzení výsledků sérologického vyšetření je vzhledem k technice a trvání vyšetření opožděné, konečná diagnostika onemocnění na základě sérologie je možná obvykle až v rekonvalescenci. K diagnostice onemocnění se odebírají dva vzorky srážlivé krve, akutní a rekonvalescentní. První vzorek se odebere co nejdříve po vyslovení podezření na pertusi, druhý vzorek nejdříve 21 dní po odběru prvního vzorku, u malých dětí se doporučuje až 6 týdnů. Párová séra se vždy vyšetřují současně v téže laboratoři.

Pro sérologickou diagnostiku pertuse by se podle doporučení dvanácti evropských referenčních laboratoří „EU Pertstrain Group“ měly používat pouze ELISA testy s vysoce purifikovaným nedetoxifikovaným pertusovým toxinem. Nejlepší sensitivity a specificita je dosažena stanovením protilátek třídy IgG proti PT.

Stanovení hladiny protilátek třídy IgA anti PT je doporučeno používat pouze tehdy, pokud je stanovení IgG anti PT nejasné nebo pokud není možné získat druhý vzorek séra.

Ostatní pertusové antigeny by se pro rutinní diagnostiku neměly používat, protože nejsou dostatečně specifické. Zároveň se nedoporučuje používat ELISA kity s více

pertusovými antigeny, mikroaglutinaci (pro nedostatečnou sensitivitu), imunoblot, KFR (komplement fixační reakce) a nepřímou imunofluorescenci.

Zatím nelze odlišit imunitní odpověď organismu na očkování od imunitní odpovědi na probíhající infekci; interpretace hladin protilátek proti PT u nedávno očkovaných osob je problematická. Pokud byl tedy pacient očkován acelulární vakcínou proti pertusi, je správná a validní interpretace sérologických testů možná teprve až za rok po očkování aP vakcínou (*Guiso N. et al., 2011, Watanabe M. et al., 2006*).

Při laboratorním vyšetření krve stoupá u většiny dětí nemocných pertusí na konci katarálního a během paroxysmálního stádia počet leukocytů a v diferenciatu se zvyšuje počet lymfocytů na 80 - 90 %. Hodnoty krevního obrazu však nejsou spolehlivým vodítkem; u řady lehčích i zcela jasných onemocnění a u dospělých nebyly změny v bílé krevní řadě nalezeny. Důsledkem produkce pertusového toxinu je hypoglykémie, rovněž častější u dětí. Rentgenové vyšetření plic bývá u pertuse negativní, pokud není onemocnění komplikováno sekundární infekcí.

### **3.13 Terapie**

Podpůrná, symptomatická léčba spočívá zejména v tlumení kašle, oxygenoterapii a režimových opatření, jako je zvýšený dohled a izolace.

Lékem volby je erytromycin, případně další makrolidová antibiotika klaritromycin nebo azalid azitromycin, v případě přecitlivělosti tetracykliny nebo cotrimoxazol, v běžných dávkách po dobu dvou týdnů, aby se předešlo relapsu onemocnění (*Hoppe JE., 1998, Mandell GL. et al., 2009, Blechová Z., 2008*).

Makrolidy podané v časných fázích onemocnění mohou redukovat trvání a závažnost symptomů a zkracují dobu, po kterou je pacient nakažlivý (*Bortolussi R. et al., 1995, Tiwari T. et al., 2005*).

U 80 – 90 % pacientů s neléčenou pertusí je *B. pertussis* v nazofaryngu přítomna 3 – 4 týdny po vzniku kašle (*Kwantes W. et al., 1983*). Neléčené a neočkované děti mohou být kultivačně pozitivní delší dobu než starší děti a dospělí, i déle než 6 týdnů (*Henry R. et al., 1981, Riitta H., 1982, Kwantes W., 1983*).

S celosvětovým nárůstem laboratorně potvrzených případů infekcí způsobených *B. pertussis* jsou od devadesátých let minulého století zaznamenávány sporadické zprávy o rezistenci některých kmenů k erytromycinu (Bartkus JM. et al., 2003, Lewis K. et al., 1995, Korgenski K. a Daly JA., 1997, Yao SM. et al., 2008, Bannatyne RM. a Cheung R., 1984, Bannatyne RM. a Cheung R., 1982, Halsey N. et al., 1980, Hill BC. et al., 2000).

Efektivní v terapii pertuse je pouze časná antibiotická léčba v katarálním stádiu. V paroxysmálním stádiu je antibiotická terapie bez vlivu na průběh infekce, ale podání antibiotik je důležité i v paroxysmálním stádiu z epidemiologických důvodů, tedy k zamezení šíření infekce na kontakty nemocného, případně k zabránění sekundární infekce.

Makrolidová antibiotika působí na bordetely bakteriostaticky; *B. pertussis* může být proto zachycena z výtěru i 3 - 5. den léčby. Pro možnost šíření onemocnění na další osoby je důležitá izolace pacienta s pertusí (Mertsola J. a He Q. 2016, Siegel JD. et al., 2007).

Pacienti s těžším průběhem pertuse a nemocní kojenci by měli být vždy hospitalizováni pro možnost závažných komplikací.

Současné strategické postupy léčby u pertusí kriticky ohrožených nejmenších dětí zahrnují oxygenoterapii, vysokofrekvenční oscilační ventilaci (HFOV - high-frequency oscillatory ventilation), extrakorporální membránovou oxygenaci (ECMO), inhalaci oxidu dusného pro zlepšení funkce plic u novorozenců s plicním selháním s vysokým krevním tlakem v plicích, transfúzi a plazmaferézu. Cílem terapie je rychlá leukodeplece u dětí s extrémní leukocytózou (Ulloa-Gutierrez R. et al., 2011, Chantreuil J. et al., 2015).

### **3.13.1 Postexpoziční profylaxe**

Vhodné a doporučené je přeléčení úzkých kontaktů pacienta s pertusí v rodině, případně kolektivu, tzv. postexpoziční profylaxe, která je zaměřena zejména na prevenci šíření onemocnění na nejmenší, vnímavé děti (Tiwari T. et al., 2005).

V prevenci sekundárních případů pertuse u dětí a dospělých domácích kontaktů byla postexpoziční profylaxe erytromycinem účinná v 67,5 % ve srovnání s placebem (Halperin SA., et al., 1994).

### **3.14 Epidemiologická situace ve světě**

V období před zavedením očkování byla pertuse nejčastějším dětským onemocněním. V průmyslových zemích dosahovala průměrná roční nemocnost 150 – 200/100 000 obyvatel. Podle dostupných dat onemocnělo pertusí v prevakcinační éře v průmyslových i rozvojových zemích průměrně 80 % jedinců do pěti let věku a méně než 3 % případů tvořily osoby starší 15 let (WHO position paper, 2015).

Po zavedení antibiotické terapie a plošné vakcinace proti pertusi mezi roky 1950 a 1960 došlo k rychlému a dramatickému poklesu nemocnosti a úmrtnosti; až o 90 %. Od konce 80. let bylo naočkováno proti pertusi 80 % všech dětí na světě (WHO position paper, 2005). WHO odhaduje, že se v roce 2008 podařilo odvrátit díky globálnímu očkování proti pertusi asi 687 000 úmrtí (WHO, 2000). Úmrtnost na pertusi byla a zůstává vysoká. Počet úmrtí na pertusi je odhadován celosvětově na 200 - 300 tisíc případů ročně; v roce 2008 zemřelo podle WHO v souvislosti s pertusí 89 000 osob. Až 85 % všech úmrtí na pertusi je hlášeno u dětí do 2 let věku. V rozvojových zemích dosahuje smrtnost nejmenších dětí až 4 %. Před léčbou antibiotiky byla smrtnost kojenců do půl roku života 80 – 85 % (WHO, 2016, Vysoká-Buriánová B., 1981, Raška K., 1954).

Podle odhadů WHO onemocní průměrně každý rok pertusí 20 - 40 miliónů lidí; 95 % z nich v rozvojových zemích; v roce 2014 bylo hlášeno podle WHO 139 786 případů onemocnění. Od 80. let minulého století je hlášen nárůst nemocnosti pertusí ve všech věkových skupinách zejména z rozvinutých států, a to i přes deklarovanou vysokou proočkovanost DTP. Nárůst nemocnosti v dospělé populaci zvyšuje pravděpodobnost onemocnění u nejmenších dětí.

Těžký průběh a hlavně úmrtí v souvislosti s pertusí jsou hlášeny právě u nejmladších neočkovaných kojenců. Až 86 % dětí zemřelých na pertusi v USA v letech 1990 - 2004 bylo mladších než čtyři měsíce (Donoso A. et al., 2005, Paddock CD. et al., 2008, Coudeville L. et al., 2008, Winter K. et al., 2012).



Analýza úmrtí kojenců na pertusi v Anglii z let 2001 - 2011 potvrzuje skutečnost, že ve vyspělých zemích, podobně jako v zemích rozvojových, dochází k úmrtí nejčastěji u příliš malých dětí, které ještě není možné očkovat.

Onemocnění pertusí u malých kojenců kopírují maximum nemocnosti v ostatních věkových skupinách, k přenosu nákazy dochází od jejich nejbližších kontaktů, rodinných příslušníků. Nelze vyloučit, že nepoznaná pertuse se může podílet i na syndromu náhlého úmrtí kojenců (*Van Hoek AJ. et al., 2013*).

Data z WHO potvrzují, že u nejmenších dětí je nemocnost nejvyšší do 2 měsíců věku, tedy ještě před zahájením očkování proti pertusi. Pokud je očkování u dětí zahájeno ve věku 2 měsíců, klesá počet hospitalizací a úmrtí v souvislosti s pertusí. Nemocnost rychle klesá po první nebo druhé dávce očkování. Počet hospitalizací a úmrtí je nejvyšší u nejmladších dětí (0 – 1 měsíc); u dětí, které obdržely dvě dávky vakcíny, jsou úmrtí v souvislosti s pertusí vzácná (*WHO SAGE, 2014*).

### **3.14.1 Příčiny návratu pertuse a zvýšení počtu hlášených případů**

Předpokládá se, že za nárůstem pertuse bude pravděpodobně více faktorů. Kromě adaptace *B. pertussis* na očkovací látku, genetických změn v populaci kolujících kmenů bordetel a antigenní odlišnosti vakcinálních kmenů od kmenů kolujících v dané populaci (kapitoly 3.4.1 a 3.14.2) se k dalším příčinám řadí vyvanutí imunity po očkování.

Rovněž spektrum antigenů obsažených v aP vakcínách není podle některých studií dostatečné pro navození adekvátní imunitní odpovědi (*Mills KH. et al. 2014*).

Za jeden z aspektů nárůstu onemocnění je považováno i nižší přirozené „boostrování“, tedy pokles přirozeného posilování imunity po kontaktu s divokými kmeny *B. pertussis* kolujícími v populaci, jak tomu bylo v období před zahájením očkování (*Guiso N., 2014*).

Zvýšené povědomí odborné a laické veřejnosti o stále častějším výskytu pertuse jak u dětí, tak u adolescentů a dospělých může vést k lepšímu zachytu onemocnění.

V dnešní proočkované populaci je klinický obraz pertuse pestrý a může činit diagnostické rozpaky. Zlepšení surveillance pertuse a dostupnější a citlivější laboratorní diagnostika umožňuje rychlejší a přesnější stanovení příčiny onemocnění a podílí se také na nárůstu případů, a to i těch, které by dříve zůstaly nediodnostikovány (*Cherry JD., 2014*).

V neposlední řadě je v některých oblastech za nárůstem případů pertuse i postupné snižování proočkovanosti. Studie koloradské dětské populace ukázala, že děti rodičů, které nenechávají své děti očkovat proti pertusi, jsou ve vysokém riziku laboratorně potvrzené pertuse (*Glanz JM. et al., 2009*).

### **3.14.2 Polymorfismus *B. pertussis***

O možném polymorfismu *B. pertussis* se zmiňoval již v roce 1907 Jules Bordet v souvislosti s opakovaným pasážováním a aglutinací (*Vysoká-Buriánová B., 1961*).

Za možné příčiny nárůstu pertuse v populaci považují některé studie zejména adaptaci *B. pertussis* na očkovací látku, genetické změny v populaci kolujících kmenů bordetel a antigenní odlišnost vakcinálních kmenů od kmenů kolujících v dané populaci. Klinické izoláty *B. pertussis* zachycené v současné době vykazují změny oproti kmenům z prevakcinačního období (*Weber AA. et al., 2001*). Polymorfismus u recentně kolujících izolátů byl popsán v genech *B. pertussis* kódujících zásadní faktory virulence; u podjednotky pertusového toxinu A, pertaktinu, tracheálního kolonizujícího faktoru A a u podjednotek pro fimbrie. Některé kmeny neexprimují faktory virulence, dříve považované za nezbytné, a přesto zůstávají infekční, **tab. č. 3**.

Nedávná epidemie pertuse v severských státech Evropy je spojována s klonální expanzí odlišných kmenů *B. pertussis* (*Elomaa A. et al., 2005, Kallonen T. a He Q., 2009*).

Významné změny byly nalezeny v Nizozemí mezi kmeny bordetel z období před zahájením očkování a kmeny zachycenými v průběhu očkování. Po zavedení očkování se původní vysoká genotypová diverzita bordetel v nizozemské populaci snížila, a to v roce 1960 a podruhé v roce 1980. Bylo zjištěno, že redukce genotypové diverzity byla způsobena antigenně odlišnými kmeny bordetel. Antigenní změny se objevily u povrchových proteinů bordetel. Kmeny obsahující nevakcinální typ pertaktinu

a podjednotky pro pertusový toxin byly nalezeny v 90 % u kmenů z období 1990 – 1996. Očkováním se tak vyselektovaly kmeny odlišné od kmenů vakcinačních. (*Mooi FR. et al., 2001*).

V Nizozemí byl potvrzen nárůst nemocnosti pertusí spojený s výskytem více virulentnějších kmenů *B. pertussis*, které nesou novou alelu pro promotor pertusového toxinu zodpovědnou za zvýšenou produkci pertusového toxinu (*Mooi FR. et al., 2009*).

Studium australských izolátů *B. pertussis* z epidemie v letech 2008 – 2012 prokázalo významnou diverzifikaci a mikroevoluci s výskytem pertaktin negativních kmenů (*Safarchi A. et al., 2016*). Studium kmenů *B. pertussis* z USA zachycených v období 1935 – 2012 potvrdilo dramatický nárůst pertaktin negativních izolátů od roku 2010 (*Pawloski LC. et al., 2014, Queenan AM. et al., 2013*). Nárůst izolátů *B. pertussis* i *B. parapertussis*, které neexprimují pertaktin je evidován také ve Francii a Finsku (*Hegerle N. et al., 2012, Barkoff AM. et al., 2012*). Studie ve Francii u dětí do 6 měsíců věku nepotvrdila rozdíl v klinických symptomech pertuse mezi dětmi infikovanými PRN pozitivními a PRN negativními izoláty. U kmenů *B. pertussis* neexprimujících pertaktin nebyla pozorována snížená virulence (*Bodilis H. a Guiso N., 2013*).

Na významnou souvislost mezi očkováním a produkcí pertaktinu ukazují výsledky studie z USA; pravděpodobnost, že bude hlášeno onemocnění způsobené pertaktin negativním kmenem je větší u očkovaných osob (*Martin SW. et al., 2015*).

Vakcíny s acelulární pertusovou složkou jsou vyrobeny z antigenů exprimovaných kmeny bordetel, které byly izolovány ještě před zahájením všeobecného očkování. Tyto antigeny se liší od antigenů exprimovaných současně kolujícími kmeny *B. pertussis*. Proto je velmi důležité v rámci surveillance izolovat a dále typizovat cirkulující kmeny pomocí metod molekulární epidemiologie (*Weber C. et al., 2001*).

**Tab. č. 3 Nejdůležitější změny v populaci *B. pertussis* za posledních 60 let spojené se změnami 4 genů**

<b>Geny kódující:</b>	<b>Vakcinální typy</b>	<b>Cirkulující typy</b>
<b>prn</b>	prn1	prn2 a prn3
<b>ptxP</b>	ptxP	ptxP3
<b>ptxA</b>	ptxa2/ptxA4	ptxA1
<b>Fim3</b>	fim3-1	fim3-2

### **3.15 Epidemiologická situace v ČR**

Dávivý kašel, kam patří obě dvě velmi podobná onemocnění, pertuse a parapertuse, podléhá v České republice povinnému hlášení a historicky patří k dlouhodobě sledovaným infekčním onemocněním. „Kašel zádušní“ patřil mezi povinně hlášená onemocnění již od dob Rakouska-Uherska.

Před zavedením očkování patřila pertuse spolu s diftérií a spalničkami k nejnebezpečnějším dětským infekcím. Podle historických záznamů, které sledují počet zemřelých v souvislosti s pertusí již od roku 1890 na území Čech, Moravy a Slezska, dosahovala v roce 1890 úmrtnost na „zajímavý“ kašel 65,7/100 000 v českých zemích a v zemích moravských 55,3/100 00, **obrázek č. 2** (Pelc H., 1929).

V ČR dosáhla hlášená nemocnost pertuse po 2. světové válce maxima v roce 1956, kdy byly evidovány 49 144 případy onemocnění; nemocnost 520,5/100 000 obyvatel. Po zavedení plošného očkování proti pertusi v roce 1958 rychle a výrazně klesala úmrtnost a nemocnost v dětské populaci. Z původních desetitisíců případů ročně se výskyt pertuse od druhé poloviny 70. let do roku 1992 pohyboval v rozmezí 5 – 48 případů ročně. Nejméně hlášených případů bylo zaznamenáno v roce 1989, celkem 5 onemocnění (nemocnost 0,05/100 000 obyvatel).

Analýza dlouhodobého trendu nemocnosti podle věku ukázala, že většina případů pertuse do roku 1989 byla evidována u dětí mladších 3 let (*Maixnerová M., 2003*).

Přes vysokou úroveň proočkovanosti české dětské populace, která dosahuje 99 % (*Dlhý J., 2012*), se v dlouhodobém trendu nemocnosti pravidelně opakují 2 – 5leté cykly nárůstu a poklesu onemocnění, podobně jako v jiných státech. Tyto epidemické cykly svědčí o trvalé přítomnosti bakterie *B. pertussis* - původce onemocnění - v populaci **graf č. 1.**

Z vývoje onemocnění od 90. let je patrné, že na zvyšujícím se trendu incidence se podílí také nízká imunogenicita již tehdy používaných dovážených očkovacích látek, což potvrzují výsledky sérologických přehledů provedených v roce 1996 a 2001 (*Maixnerová M., 2003*).

Od roku 1993 je v ČR registrován stoupající trend onemocnění ve všech věkových kategoriích. Došlo ke změně ve věkově specifické nemocnosti pertuse; nejvíce případů bylo pravidelně každý rok hlášeno ve věkové skupině 10 – 14letých dětí.

Většina hlášených případů onemocnění z celé české populace byla ve věkové skupině 0 – 19 let věku. Nemocnost však začala narůstat také ve věkových skupinách nad dvacet let.

V roce 2012 došlo k další výrazné změně ve věkově specifické nemocnosti pertuse; maximum nemocných se posunulo z věkové skupiny 10 – 14 let do věkové skupiny 15 – 19 let.

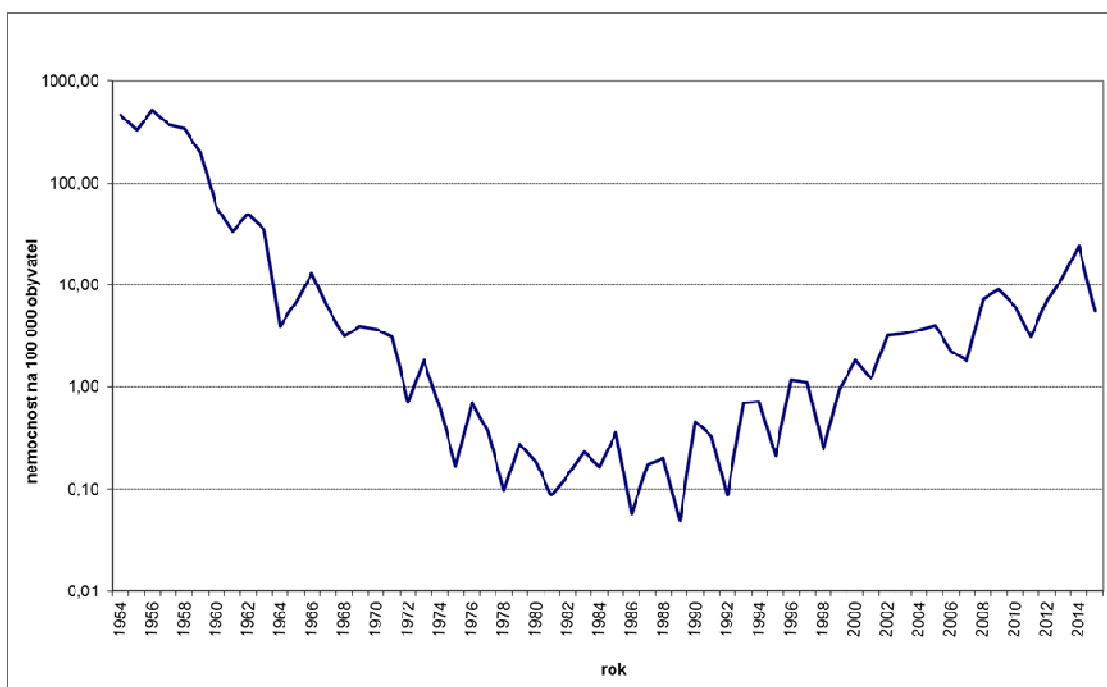
Rok 2014 byl v dlouhodobém sledování nemocnosti pertuse výjimečný; prostřednictvím systému EPIDAT byl nahlášen celkem 2521 případ onemocnění pertusí; nemocnost 24,0/100 000 obyvatel. V dlouhodobém trendu nemocnosti bylo více nemocných než v roce 2014 hlášeno naposledy v roce 1963; registrováno bylo tehdy 3399 případů onemocnění; nemocnost 35,1/100 000 obyvatel.

Většina z hlášených případů pertuse v ČR je každoročně diagnostikována nepřímou, tedy průkazem specifických protilátek, v roce 2015 téměř 94 %, v roce 2013 91 % případů (*Fabiánová K. et al., 2016, Fabiánová K. et al., 2015, Fabiánová K. et al., 2014,*

*Fabiánová K. et al., 2013, Fabiánová K. et al., 2012, Fabiánová et al., 2011, Fabiánová K. et al., 2009).*

Při rozboru záznamů o očkování za období 1998 - 2008 bylo zjištěno, že očkováno proti pertusi bylo celkem 90,1 % osob s pertusí. Úplné očkování pěti případně více dávkami bylo vykázáno u 75,3 % případů. Ve věkové skupině 10 - 14 let, která měla nejvyšší nemocnost ve sledovaném období, onemocnělo celkem 46,6 %. Všechny 5 dávek očkování proti pertusi podle platného schématu bylo aplikováno u 91,3 % případů z této věkové skupiny (*Fabiánová et al., 2009*).

**Graf č. 1: Pertuse, ČR, hlášená nemocnost (semilogar.) na 100 000 obyvatel, 1954 – 2015.** Převzato z: *Fabiánová K. et al., 2016.*



**Obr. č. 2: Úmrtnost na dávný kašel v Československé republice v letech 1890 – 1928.**

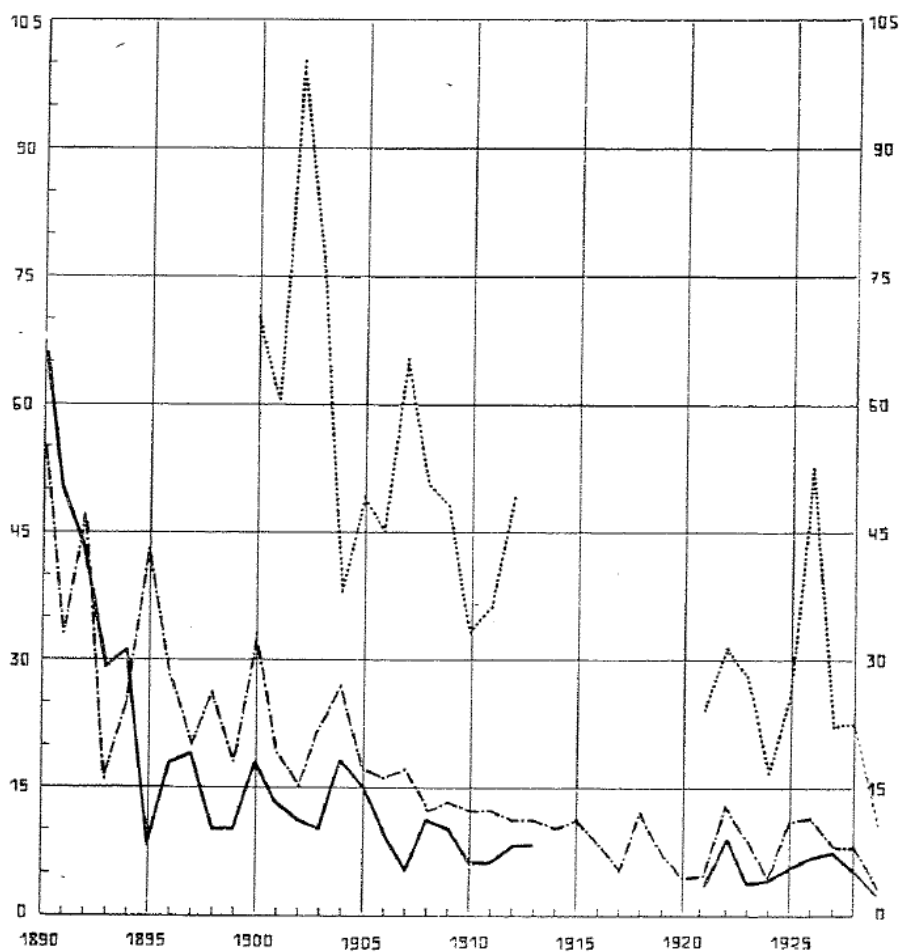
(Převzato z: Pelc H. Zdravotní stav obyvatelstva Československé republiky v jejím prvním desetiletí. Praha: 1929.)

**Diagram č. IX.**

Úmrtnost zájímavým kašlem v Československé republice v letech 1890—1928

(na 100.000 obyvatelů).

— Čechy - - - - - Morava a Slezsko<sup>1)</sup> ..... Slovensko a Podk. Rus.



<sup>1)</sup> V roce 1914—1920 pouze Morava.

## 3.16 Prevence onemocnění

### 3.16.1 Stručná historie očkování

Snahy o aktivní imunizaci a výrobu očkovací látky proti dávivému kašli se datují již od objevení původce onemocnění. Celobuněčné vakcíny proti pertusi byly například v USA registrovány již v roce 1914 (*Edwards KM. a Decker MD., 2013*).

V ČR byl první pertusový bakterin k dispozici v polovině 20. let minulého století. Jeho indikace byla jak léčebná, tak profylaktická. Ve druhé polovině 30. let bylo doporučeno očkovat děti v kolektivech smíšeným bakterinem Perbad; mimo *B. pertussis* vakcína obsahovala složku stafylokokovou, streptokokovou, pneumokokovou a mikrokokovou. V 50. letech byly k dispozici monovakcíny proti dávivému kašli (Perbaa, Perbac, Perbab) nebo kombinovaná vakcína se záškrťovým anatoxinem adsorbovaná na aluminium hydroxid (*Trmal J., 2009*). Vakcíny dovezené z Anglie, Švýcarska a Francie měly problematickou účinnost; různé šarže byly různé kvality a nebylo vždy dodrženo schéma, které uváděl příslušný výrobce. Navíc byly některé z těchto vakcín velmi reaktogenní (*Vysoká-Buriánová B., 1976*).

Hlavní příčiny neúspěchu prvních očkovacích látek jsou dnes již známé. Jednalo se zejména o způsob přípravy vakcín a to, že použité kmeny *B. pertussis* byly v S fázi a tedy ne plně antigenně vybavené (*Vysoká-Buriánová B., 1976*).

Vakcíny proti pertusi se dělí na celobuněčné (wP) obsahující oslabenou nebo usmrcenou bakterii *B. pertussis* a acelulární (aP), které obsahují obvykle 1 až 5 vybraných purifikovaných antigenů *B. pertussis* – pertusový toxin (PT), pertaktin (PRN), filamentózní hemaglutinin (FHA) a fimbrie 2 a 3 (FIM 2, FIM3). Čím více antigenů aP vakcína obsahuje, tím je účinnější (*Gustafsson L. et al., 1996*).

### 3.16.2 Celobuněčná vakcína proti pertusi (wP)

Již krátce po objevení *B. pertussis* na začátku minulého století začal vývoj očkovací látky pro terapii a prevenci dávivého kašle. Vysoká nemocnost a úmrtnost na pertusi urychlily vývoj celobuněčné pertusové vakcíny. První vakcíny obsahovaly celé



usmrcené bakterie *B. pertussis* a lišily se obsahem a způsobem přípravy. Velmi brzy byl u očkováných jedinců rozpoznán přímý vztah mezi produkcí protilátek, a tím navozenou imunitou, a počtem bakterií obsažených ve vakcíně. S počtem mikroorganismů však také přímo souvisela toxicita, projevující se různými komplikacemi po očkování (*Matoo S. a Cherry JD., 2005*).

V polovině 40. let začala rutinní imunizace dětí v USA monokomponentní celobuněčnou pertusovou vakcínou, aplikovanou od roku 1947 v kombinaci s difterickým a tetanickým toxoidem. Od 50. let jednotlivé státy postupně zaváděly očkování nejmenších dětí proti pertusi a onemocnění se podařilo významně redukovat. Překvapivě však pokračovaly 2 – 5leté cykly ve výskytu onemocnění v populaci. Předpokládalo se, že po zahájení očkování se bude cirkulace původce v populaci postupně snižovat a epidemické cykly se budou postupně prodlužovat, čehož nebylo dosaženo. Vakcinací se tedy podařilo výskyt onemocnění omezit u dětí, ale cirkulace *B. pertussis* v populaci nebyla přerušena (*Cherry JD., 1998, Matoo S. a Cherry JD., 2005*).

Způsob přípravy celobuněčné očkovací látky proti pertusi ovlivňuje její reaktogenitu, zejména způsob purifikace bakterinu, použité adjuvans a konzervační látky. Konvenční celobuněčné vakcíny jsou vyráběny v mnoha zemích. Jejich základní příprava je podobná: bakterie jsou usmrceny a částečně detoxikovány teplem nebo chemicky nebo kombinací těchto metod. Čištěné suspenze inaktivovaných kmenů *B. pertussis* jsou vyráběné buď ze standardních sbírkových kmenů nebo z kmenů izolovaných v populaci státu, kde se vakcína vyrábí. Očkovací látka by měla obsahovat hlavní povrchové antigeny typu 1, 2, 3, které se vyskytují v kmenech *B. pertussis* v kombinacích 1,2 nebo 1,3 nebo 1,2,3. Pertusová složka vakcíny je obvykle kombinována s difterickým a tetanickým toxoidem.

Účinnost wP vakcín proti onemocnění pertusí u dětí se pohybuje kolem 78 %, ale je velmi závislá na druhu vakcíny a počtu dávek (*WHO, 2010*). Studie z USA odhadla účinnost jedné dávky wP vakcíny proti paroxysmům kašle na 44 % a čtyř dávek kolem 80 % (*Onorato IM. et al., 1992*). V dánské studii byla odhadovaná účinnost jedné dávky v prevenci dětské hospitalizace 36 %, a účinek tří dávek 87 % (*Hviid A. et al., 2004*). Data ze surveillance pertuse v Polsku ukazují naopak snížení účinnosti wP vakcíny

během období 1996 – 2001. U dětí ve věku 2 – 5 let poklesla z 97 % na 73 % a u dětí ve věku 6 – 9 let se účinnost snížila z 84 % na 69 % (*Zieliński A. et al., 2004*).

Očkování celobuněčnou vakcínou proti pertusi není bez komplikací. Až u 22 % dětí docházelo po očkování k lokálním reakcím v místě aplikace, například zarudnutí, otok, bolestivost, které se zvyšují s počtem dávek. Vakcíny wP proto nebyly indikovány pro adolescenty a dospělou populaci. Syndrom neztišitelného pláče a febrilní křeče byly méně běžné; méně než 1 na 100 aplikací. Hypotonické epizody se objevovaly vzácně; méně než jedna na 1000 – 2000 aplikací. Celkové reakce jako teplota, ospalost, cyanóza, syndrom neztišitelného pláče, se však s počtem dávek snižují (*Matoo S. a Cherry JD., 2005*).

U velmi malého počtu dětí bylo po očkování zaregistrováno závažné až ireverzibilní poškození centrálního nervového systému (1976, the National Childhood Encephalopathy Study, 1991 the Institute of Medicine). Rozsah zvýšeného rizika akutní encefalopatie po DTwP očkování je odhadován na 0,0 až 10,5 případů na milión očkovaných. Následnými studiemi však nebyla prokázána souvislost mezi očkováním a akutní encefalopatií (*Scheifele DW., 1988, Miller DC. et al., 1989, Miller D. et al., 1993, Cowan LD. Et al., 1993, Ray P. et al., 2006*). Acelulární vakcíny sice přinesly snížení záchvatů po vakcinaci, ale nové důkazy po roce 2006 ukazují, že případy údajné „vakcinační encefalopatie“ jsou způsobeny mutací v genu pro sodíkové kanály (*Brown NJ. et al., 2007*).

Právě tyto komplikace měly velmi negativní dopad na veřejné mínění. V některých státech (Japonsko, Švédsko, Anglie a Wales) došlo dokonce v 70. letech minulého století k přerušení očkování proti pertusi (*Locht C. a Mielcarek N., 2012*).

Ve Švédsku, kde bylo plošné očkování zahájeno v roce 1950, byla vakcinace přerušena v roce 1979. Po tři roky se pertuse držela na nízké úrovni, ale pak se nemocnost onemocnění prudce zvýšila ve dvou epidemiích v roce 1983 a 1985. V letech 1980 - 1985 byla pertuse laboratorně potvrzena u 36 729 pacientů, z toho 11 % byly děti mladší 1 roku a 69 % byly děti ve věkové skupině 1 - 6 let. Nemocnost ve věkové skupině 0 - 6 let se vzrostla ze 700/100 000 v roce 1981 na 3200/100 000 v roce 1985 (*Romanus V. et al., 1987*).

Anglie a Wales zavedly očkování proti pertusi na přelomu 50. a 60. let minulého století. V období 1967 - 1974 dosáhla kompletní imunizace u dětí do dvou let věku 76 - 81 %. Reakce veřejnosti na agravované postvakcinační komplikace vedly k odklonu od zavedeného schématu a k následnému dramatickému poklesu proočkovanosti ze 77 % v roce 1974 na 30 % v roce 1978. Od roku 1977 nemocnost pertuse narůstala a kulminovala obrovskou epidemií v letech 1978 - 1979, největší od 50. let. Bylo hlášeno 102 500 případů, 5 000 dětí bylo hospitalizováno a desítky dětí zemřely. V následných studiích se prokázalo, že snížení proočkovanosti bylo hlavní příčinou zvýšené incidence pertuse (*Anonym, 1982, Anonym, 1981*).

### **3.16.3 Acelulární vakcína proti pertusi (aP)**

Ačkoli role dospělých v přenosu pertuse na děti byla známa či předpokládána již v předvakcinační éře (*Vysoká-Buriánová B., 1961, Vysoká-Buriánová B., 1963*), imunizace dospělých osob proti pertusi se neprováděla, protože závažné projevy a následky onemocnění dávivým kašlem byly u starší populace pozorovány velmi zřídka a také proto, že očkování adolescentů a dospělých celobuněčnou očkovací látkou nebylo doporučeno kvůli komplikacím po aplikaci – objevovaly se nejen časté závažné reakce v místě vpichu, ale i systémové reakce (*Cherry JD., 1998*).

Postvakcinační komplikace a skutečnost, že očkování ani prožité onemocnění neposkytují dlouhodobou imunitu; vedly k potřebě vyvinout „bezpečnější“ vakcínu nejen pro děti, ale i pro dospělou populaci (*Cherry JD., 1996*).

Výzkum *B. pertussis* umožnil odhalení a výběr jednotlivých antigenů, které vyvolávají u hostitele imunitní odpověď potřebnou k prevenci onemocnění. Do nové tzv. acelulární vakcíny byl zařazen inaktivovaný pertusový toxin, filamentózní hemaglutinin, aglutinogeny fimbrií a pertaktin. Pertusový toxin podporuje vazbu bordetel na řasinky epitelu v dýchacích cestách, navozuje lymfocytózu a zcitlivuje buňky na histaminový efekt. Protilátky proti němu mohou mít rozhodující význam v ochraně proti pertusi. Všechny současné pertusové vakcíny obsahují chemicky inaktivovaný, nebo molekulárními technikami oslabený bakteriální endotoxin. Filamentózní hemaglutinin je obsažen ve stěně bordetel a je nezbytný k jejich přilnutí na respirační sliznici. Aglutinogeny fimbrií jsou povrchové antigeny bordetel, podílející se na vazbě bordetel

na sliznici. Pertaktin je protein zevní stěny všech virulentních kmenů *B pertussis*. Protilátky proti němu chrání před opakovaným onemocněním dýchacích cest (*Conrad DA. a Jenson HB., 1999*).

První acelulární pertusové vakcíny vznikly v Japonsku v roce 1981 a jsou známy jako Takeda vakcíny. Původně obsahovaly FHA vedle malého množství inaktivovaného PT a v některých případech PRN a fimbriální proteiny. Další vakcíny obsahovaly stejné množství PT a FHA, tzv. Biken typ.

V současnosti se vyrábí mnoho druhů acelulárních očkovacích látek, které se svým obsahem značně liší. Obsahují podle druhu vakcíny odlišný počet a množství jednotlivých antigenních komponent, liší se také bakteriálním klonem použitým pro primární produkci antigenů, metodou purifikace a detoxifikace a použitých adjuvans a konzervačních látek.

Acelulární očkovací látky jsou aplikovány obvykle v kombinaci s difterickým a tetanickým toxoidem (DTaP), ale pro rutinní očkování v dětství mohou obsahovat ještě další složky – proti hepatitidě B, poliomyelitidě a proti *Haemophilus influenzae* typu b.

Stanovení optimálního složení acelulární vakcíny je obtížné, protože neexistuje spolehlivá metoda, kterou by se dal stanovit protektivní účinek vakcíny (*Crowcroft NS. a Pebody RG., 2006, Edwards KM. a Decker MD., 2004*). Navíc složení současně používaných aP vakcín nerespektuje genetické změny aktuálně kolujících kmenů *B. pertussis* (*Locht C., 2007*).

Rovněž stanovení účinnosti aP vakcín je velmi obtížné vzhledem k jejich rozmanitosti. To vyplývá i z výsledků přehledu, který porovnával účinnost a bezpečnost aP vakcín v celkem 58 studiích. Účinnost aP vakcíny s třemi a více antigeny se pohybovala mezi 84 – 85 % v prevenci typické pertuse a mezi 71 – 78 % v prevenci mírnějšího onemocnění. Účinnost aP vakcín s jedním nebo dvěma antigeny se pohybovala mezi 59 – 78 % v prevenci typické pertuse a mezi 41 – 58 % v prevenci mírnějšího onemocnění. Vakcíny s vyšším obsahem antigenů jsou méně efektivní než wP vakcíny s vysokou účinností. Acelulární vakcíny měly méně nežádoucích účinků než wP vakcíny jak v základním očkování, tak i v přeočkování (*Zhang L. et al. 2014*).

Přesto, že aP vakcíny prokázaly bezpečnost a účinnost v klinických pokusech, při rutinním očkování byl u některých prokázán nižší protektivní účinek, než se předpokládalo. Výskyt pertuse u dětí očkovaných jen acelulární vakcínou je dokonce vyšší než u dětí s minimálně jednou dávkou celobuněčné vakcíny (*Witt MA. et al., 2013, Kříž B. et al., 2007*).

Pro ochranu před onemocněním jsou požadovány minimálně dvě dávky aP vakcíny. Data ze surveillance systému pertuse ve Švédsku v období 2001 – 2004 ukázala, že nemocnost mezi neočkovanými dětmi ve věku 0 – 2 měsíce byla 225/100 000 osob, po jedné dávce DTaP ve věku 3 měsíců 212/100 000 obyvatel, po druhé dávce ve věku 5 měsíců se snížila na 31/100 000 obyvatel a po třetí dávce v 1. roce života byla jen 8/100 000 obyvatel (*Gustafsson L. et al., 2006*).

Redukce reaktogenity snížením koncentrace antigenů v aP vakcínách umožnila jejich indikaci pro adolescenty a pro dospělou populaci.

Ačkoli podle klinických studií jsou vedlejší účinky po očkování acelulární vakcínou mírnější a jejich výskyt je nižší než u celobuněčné vakcíny, u 1 – 2 % boosterovaných jedinců se objevují lokální reakce, jako je zarudnutí, otok, bolestivost, teplota. Pravděpodobnost reakce je vyšší u těch osob, které jsou očkovány jen acelulární vakcínou (*Edwards KM. a Decker MD., 2004, SÚKL, Nežádoucí účinky léčiv, 2012*). Reaktogenita acelulární očkovací látky se zvyšuje s počtem dávek. Vedlejší účinky jsou častější po čtvrté dávce stejné vakcíny (*Pichichero ME. et al., 1997*).

V současné době se ve světě používají oba typy vakcín, jak celobuněčné, tak acelulární vakcíny první a druhé generace. Vzhledem k vysoké ceně acelulárních vakcín je ve většině zemí světa stále používána celobuněčná pertusová vakcína. Očkování obecně snížilo výskyt pertuse, ale zcela pod kontrolu se onemocnění nikdy nepodařilo dostat. Ve skutečnosti zůstává pertuse jedním z nejhůře kontrolovaných infekčních onemocnění na světě, kterému lze předcházet očkováním. Pro dobrou prevenci onemocnění jsou nezbytné nové strategie a nové vakcíny (*Locht C. a Mielcarek N., 2012*).

Onemocnění způsobená jinými druhy bordetel než *B. pertussis* nejsou preventabilní současně používanými vakcínami.

### 3.16.4 Imunita navozená po vakcínách proti pertusi

Přítomnost protilátek proti pertaktinu, pertusovému toxinu a fimbriím je důležitá pro ochranu před onemocněním (*Cherry JD. et al., 1998*). Různé druhy celobuněčných a acelulárních pertusových vakcín dávají velmi odlišnou protilátkovou odpověď, která je ale důležitá pro odlišení, zda se jedná o reakci na očkování nebo na infekci. Některé pertusové vakcíny indukují nižší hladiny protilátek proti pertusovému toxinu než akutní onemocnění, jiné vyvolávají tak vysoké hladiny protilátek proti pertusovému toxinu, že je těžké je odlišit od probíhajícího onemocnění (*Crowcroft NS. a Pebody RG. 2006*). Jednotlivé acelulární vakcíny se navzájem liší nejenom počtem použitých antigenních komponent, ale i jejich množstvím, takže již z této skutečnosti vyplývají do určité míry odlišné imunologické odpovědi po očkování.

Imunita po acelulární očkovací látce není plně efektivní a ochranné titry specifických protilátek klesají rychleji než po celobuněčné očkovací látce (*Smits K. et al., 2013*). Celobuněčné vakcíny indukují podobnou, ale slabší odpověď, jakou vyvolá přirozená infekce *B. pertussis*, navozují imunitní odpověď zprostředkovanou Th1 a Th17 buňkami (*Higgs R. et al., 2012*). Současně používané acelulární vakcíny, které obsahují soli hliníku jako adjuvans, indukují Th2 a Th17 buněčnou odpověď, ale slabší Th1. Buňky Th17 sekretují cytokin interleukin IL-17, který hraje zásadní roli v hostitelské imunitě indukované po acelulárních vakcínách. Optimální ochrana proti *B. pertussis* je podobná odpovědi na přirozenou infekci a vyžaduje indukci Th1, nikoliv Th2 (*Ross PJ. et al., 2013, Warfel JM. a Merkel TJ., 2013*).

V roce 2010 byla v Kalifornii zaznamenána největší epidemie pertuse za posledních 60 let s nejvyšší specifickou nemocností u dětí ve věku 7 – 10 let i přesto, že v této věkové skupině byla vysoká proočkovanost DTaP vakcínou. Case-control studie potvrdila, že s každým rokem, který uplyne od poslední dávky aP vakcíny se snižuje účinnost vakcíny a zvyšuje pravděpodobnost onemocnění (*Misegades LK. et al., 2012*).

### 3.16.5 Experimentální zvířecí model

Pro pochopení mechanismu imunitní odpovědi po vakcínách nebyla dosud používaná laboratorní zvířata vhodná. Pro modelování přirozené infekce *B. pertussis* a imunitní odpovědi po infekci a po vakcínách byl použit jeden z primátů, pavián anubi (*Papio*

*anubis*) (Warfel JM. et al., 2012). Mláďata paviánů byla očkována v 2., 4. a 6. měsíci věku aP nebo wP vakcínou a v 7. měsíci byla vystavena infekci *B. pertussis*. Byla sledována imunitní odpověď měřením cytokinů v nazofaryngeální sliznici. Paviáni očkovaní aP vakcínou byli sice chráněni před závažným průběhem onemocnění, ale byli infekční a přenášeli infekci na vnímavé kontakty. Experimentální data ukazují, že současné acelulární vakcíny dokáží u očkovaných osob zabránit příznakům onemocnění, ale nezabrání kolonizaci sliznice respiračního traktu a přenosu infekce na další osoby (Warfel JM. a Merkel TJ., 2013, Warfel JM. et al., 2014).

Paviáni byli také použiti pro modelování infekce *B. pertussis* po očkování aP vakcínami v těhotenství a u novorozenců (neonatální očkování). Výsledky prokázaly, že očkování v těhotenství a u novorozenců v paviáním modelu poskytuje ochranu před onemocněním (Warfel JM. et al., 2014).

### **3.16.6 Současné strategie prevence onemocnění**

Nejúčinnější prevencí proti onemocnění pertusí je očkování – buď jako součást pravidelného očkování u dětí nebo jako doporučené očkování u adolescentů a dospělých.

WHO v dokumentech z roku 2014 věnovaných pertusi doporučuje udržet vysokou proočkovanost a zavést všechna preventivní opatření, která mohou snížit nemocnost a úmrtnost nejmenších dětí na pertusi. Kromě pravidelného očkování dětské populace doporučuje přeočkování adolescentů a dospělých. Do preventivních opatření, strategií řadí WHO také „cocoon“ strategie, očkování gravidních, očkování zdravotníků a očkování novorozenců (WHO, 2014, WHO SAGE 2014).

### **3.16.7 Postexpoziční profylaxe**

Do preventivních opatření se zahrnuje také postexpoziční profylaxe, které byla věnována pozornost v kapitole 3.13.1.

### **3.16.8 Očkování dětí**

Národní doporučení pro očkování dětí a očkovací schémata se v jednotlivých státech světa značně liší. V základním očkování jsou ve světě aplikovány 3 dávky vakcíny ve

více jak 80 různých schématech; požívají se zejména následující: 6., 10. a 14. týden, 2., 3. a 4. měsíc, 3., 4. a 5. měsíc nebo 2., 4. a 6. měsíc. Řada států používá schéma 3., 5. a 12. měsíc, kdy první dvě dávky jsou považovány za základní očkování a třetí dávka jako booster (*WHO, 2010*).

WHO doporučuje zahájit u dětí základní očkování proti pertusi od ukončeného šestého týdne věku dítěte ve schématu 6., 10. a 14. týden. Vakcína je obvykle aplikována v kombinaci jako DTwP nebo DTaP a často obsahuje další složky (*Haemophilus influenzae* typ b – Hib, hepatitis B – HepB a poliovirus – IPV). Stanovení očkovacího schématu a počtu dávek není jednotné, ale ve většině zemí jsou 3 základní dávky podány s minimálně měsíčním intervalem dětem od 2. do 6. měsíce věku (*WHO, 2005*).

WHO doporučuje očkování proti pertusi nejméně 3 dávkami všem dětem, včetně HIV pozitivních. Očkování by mělo být zahájeno v 6. týdnu života, ne později než v 8. týdnu. Proočkovanost by měla dosáhnout 90 a více procent. Tři dávky vakcíny proti pertusi během prvního roku života jsou nezbytné pro ochranu před onemocněním. Oddalování třetí dávky až po 9. měsíci života může narušit celé očkování a snížit ochranu před infekcí v prvním roce života (*WHO, 2015*).

Ochrana po základním očkování závisí na mnoha faktorech, včetně lokální epidemiologické situace, dalším očkovacím schématu a druhu očkovací látky. Posilovací „booster“ dávka je doporučena pro děti ve věku 1 – 6 let, nejlépe 6 měsíců po primárním očkování, během druhého roku života (*WHO, 2015*).

**Obrázek č. 3** ukazuje národní dětská očkovací schémata proti pertusi v jednotlivých evropských státech. Světle zelenou barvou jsou označeny tzv. catch-up dávky (vychytávací) nebo očkování u těch, kde předchozí dávky chybí. Upraveno podle ECDC. Z 31 uvedených států očkuje děti v základním očkování 5 dávkami vakcíny proti pertusi podobně jako ČR celkem 19 států.

### **3.16.9 Očkování adolescentů a dospělé populace**

Acelulární očkovací látky umožnily vzhledem k svému složení a nižší reaktogenitě očkování adolescentů a dospělých. Některé státy přistoupily vzhledem k epidemiologické situaci k očkování adolescentů jednou dávkou aP vakcíny. Věk, ve



kterém se adolescenti očkují, se značně liší v jednotlivých státech. Podle očkovacího schématu ECDC doporučuje očkování adolescentů proti pertusi 18 států.

Očkování proti pertusi v dospělé populaci je věnována velká pozornost vzhledem k narůstajícímu počtu nemocných mezi adolescenty a dospělými a vzhledem ke skutečnosti, že právě oni jsou hlavním zdrojem onemocnění pro kojence. Očkování proti pertusi je doporučováno pro osoby v úzkém kontaktu s nejmenšími dětmi, tzv. „cocoon strategy“, zejména pro budoucí rodiče, rodiče, starší sourozence, prarodiče, chůvy a zdravotníky. V mnoha zemích je doporučováno i očkování těhotných žen.

Analýza očkování dospělé populace ukázala, že rutinní očkování dospělých může kontrolovat onemocnění s relativně nízkým vakcinačním pokrytím; kolem 40% proočkovanosti všech dospělých každých deset let nebo 65% proočkovanosti pro blízké kontakty vnímavého dítěte (*Coudeville L. et al., 2008*).

Podle aktuálního očkovacího kalendáře uvedeného na webových stránkách ECDC je v devíti evropských státech doporučení očkovat dospělou populaci proti pertusi součástí očkovacích kalendářů buď v podobě pravidelného intervalu (jednou za deset let) nebo v rámci „cocoon“ strategie, případně jako očkování těhotných žen, **obrázek č. 4**. Například v Rakousku je doporučeno očkování pro osoby mezi 18. a 60. rokem života let každých deset let kombinovanou vakcínou dTaP-IPV

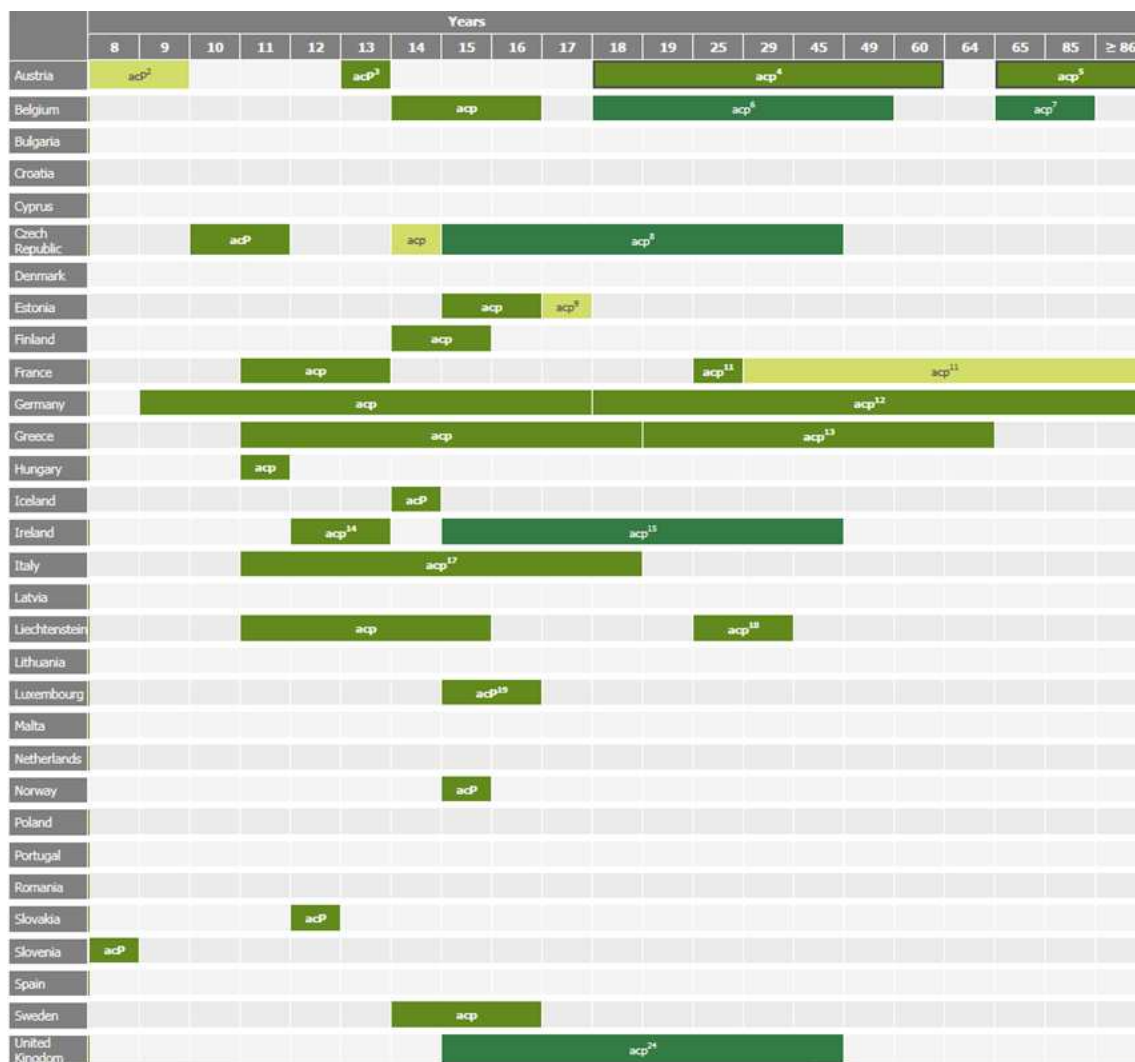
Obr. č. 3: Očkovací kalendář, očkování proti pertusi, dětí 0 – 9 let, v 31 evropských státech, duben 2016.

Převzato z ECDC: <http://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Pages/Scheduler.aspx>

	Months																							
	2	3	4	5	6	10	11	12	13	14	15	16	18	23	2	3	4	5	6	7	8	9		
Austria		acP		acP				acP <sup>1</sup>												acP	acP <sup>2</sup>			
Belgium	acP	acP	acP							acP								acP						
Bulgaria	acP	acP	acP								acP							acP						
Croatska	acP		acP		acP					acP						acP								
Cyprus	acP		acP		acP						acP							acP						
Czech Republic	acP	acP	acP			acP												acP						
Denmark		acP		acP				acP										acP						
Estonia		acP	acP	acP										acP					acP					
Finland		acP		acP				acP									acP							
France	acP <sup>18</sup>		acP				acP												acP					
Germany	acP	acP	acP					acP			acP				acP			acP						
Greece	acP		acP		acP					acP								acP						
Hungary	acP	acP	acP									acP							acP					
Iceland		acP		acP				acP									acP							
Ireland	acP		acP		acP													acP						
Italy		acP		acP				acP											acP <sup>16</sup>					
Latvia	acP		acP		acP				acP											acP				
Liechtenstein	acP		acP		acP						acP							acP						
Lithuania	acP		acP		acP							acP							acP					
Luxembourg	acP	acP	acP					acP										acP						
Malta	acP	acP	acP									acP												
Netherlands	acP	acP	acP				acP										acP							
Norway		acP		acP				acP												acP				
Poland	wcP <sup>20</sup>	wcP <sup>20</sup>	wcP								wcP <sup>20</sup>								acP					
Portugal	acP		acP		acP							acP							acP					
Romania	acP		acP				acP												acP <sup>21</sup>					
Slovakia		acP		acP			acP												acP					
Slovenia		acP	acP	acP						acP											acP			
Spain	acP <sup>22</sup>		acP <sup>22</sup>		acP <sup>22</sup>							acP <sup>22</sup>							acP <sup>22</sup>					
Sweden		acP		acP				acP											acP					
United Kingdom	acP	acP	acP																acP <sup>23</sup>					

Obr. č. 4: Doporučené očkování proti pertusi u populace nad 9 let v 31 evropských státech, duben 2016.

Převzato z ECDC: <http://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Pages/Scheduler.aspx>



### 3.16.10 Cocoon strategie

„Cocoon“ strategie vychází ze studií, které prokázaly, že až 75 % nejmenších dětí, které onemocní pertusí, se nakazí pertusí od nejbližších kontaktů v domácím prostředí. Z prací z USA, Brazílie, Kanady, Francie a Austrálie vyplývá, že důležitou roli v přenosu pertuse v domácnosti hrají dospělí mezi 19. a 39. rokem života a že nejčastějším zdrojem pro kojence byli právě rodiče, matka a otec. Starší sourozenci jsou také častým zdrojem vzhledem k vyvanutí imunity po očkování (*Wiley KE. et al., 2013, Baptista PN. et al., 2010, Wendelboe AM. et al., 2007, Bisgard KM. et al., 2004*).

Smyslem „cocoon“ strategie je ochránit nejmenší děti před onemocněním pertusí. „Cocoon“ strategie je systém očkování proti pertusi zaměřený na rodiče (matky před otěhotněním nebo po porodu) a na všechny další kontakty, které přijdou do styku s dětmi během prvního roku života. Očkování osob proti pertusi kolem novorozence je považováno za první krok plošné vakcinace dospělých. U studií hodnotících účinek očkování adolescentů a dospělých se prokázalo, že „cocoon“ strategie sice vede pouze k 9 - 17 % snížení typických případů pertuse u dospělých, ale má silný nepřímý efekt: bezchybně a komplexně zavedená „cocoon“ strategie může snížit počet případů pertuse u dětí do tří měsíců věku až o 70 %. (*Bisgard KM. et al., 2004, Kretsinger K. et al., 2006, Forsyth KD. et al., 2007, Wendelboe AM. et al., 2007, De Greef SC. et al., 2010*).

V ideálním případě by očkování v rámci „cocoon“ strategie mělo probíhat ještě před narozením dítěte nebo ihned po porodu ještě před propuštěním z porodnice, minimálně dva týdny před kontaktem s dítětem. Zkušenosti z několika programů zavádějících „cocoon“ strategii ukazují, že tyto programy vyžadují dokonalé naplánování celé akce včetně intenzivní rodičovské edukace.

„Cocoon“ strategie aplikovaná pouze na očkování žen po porodu se ukázala jako neúčinná; u dětí pod šest měsíců věku se nemocnost pertusí nesnížila (*Castagnini LA. et al., 2012*). Novější studie ukázala, že ani kombinace postpartum imunizace a „cocoon“ strategie neredukuje pertusi u dětí pod 6 měsíců věku (*Healy CM. et al., 2015*).

### 3.16.11 Očkování novorozenců

Během období, kdy se používala wP vakcína, bylo jen velmi málo dat o očkování novorozenců celobuněčnou vakcínou (*Provenzano RW. et al., 1965*).

Také pro očkování novorozenců acelulární pertusovou vakcínou je stále k dispozici jen omezené množství studií (*Halasa NB. et al., 2008, Knuf M. et al., 2008, Wood N. et al., 2010*). Například ve studii porovnávající děti očkované při narození (skupina 1) a pak podle obvyklého schématu (3., 5., 11. měsíc) s dětmi očkovanými od tří měsíců (skupina 2), měly děti z první skupiny ve věku 5. měsíců po dvou dávkách vakcíny geometrické titry protilátek anti-PT, anti-FHA a anti-PRN signifikantně vyšší než děti z druhé skupiny, očkované zatím pouze 1 dávkou. Ve věku 6 měsíců měly děti z první skupiny signifikantně vyšší titry protilátek anti-PRN a anti-FHA; u anti-PT nebyl pozorován významný rozdíl mezi oběma skupinami (*Belloni C. et al., 2003*).

Podle pracovní skupiny WHO pro pertusi z roku 2014 ukazují předběžná data, že očkování novorozenců proti pertusi je účinné. Zatím ale není doporučováno vzhledem k nedostatečným údajům o účinnosti, bezpečnosti a také dostupnosti aP monovakcíny. Nicméně studie ukazují, že jedna dávka aP vakcíny chrání novorozence před závažným onemocněním, a podporují tak další hodnocení a prověřování strategie očkování novorozenců (*WHO SAGE, 2014*).

### **3.16.12 Očkování zdravotníků proti pertusi**

Většina zdravotníků má i přes očkování v dětství v dospělém věku nízké hladiny protilátek proti pertusi (*Wright SW. et al., 1994*). Zdravotníci jsou ve zvýšeném riziku kontaktu s pertusí; až 1,7x vyšším riziku pertuse než ostatní dospělá populace (*De Serres G. et al., 2000*), a sami mohou být potencionálním zdrojem infekce pro své pacienty (*Gehano JF. et al., 1998, Gehano JF. et al., 1999, Nouvellon M. et al., 1999, Wright SW. et al., 1999*).

Ve studii, která sledovala výskyt nedagnostikovaných infekcí *B. pertussis* v dospělé populaci, bylo zjištěno, že v průběhu pěti let mělo signifikantní zvýšení hladin protilátek IgA nebo IgG 90 % zdravotníků, z toho 55 % zdravotníků mělo laboratorně potvrzené dvě infekce, 17 % mělo tři infekce a 4 % zdravotníků čtyři infekce (*Deville JG. et al., 1995*).

Cílem očkování proti pertusi v této skupině je zabránit onemocnění zdravotníků a ochránit před přenosem pertuse zejména dětské pacienty a imunosuprimované osoby (*WHO, 2010, Murphy TV. et al., 2008, Bryant KA. et al., 2006*).

### 3.16.13 Očkování těhotných proti pertusi

Jednou z možných strategií zaměřených na ochranu nejmenších dětí proti pertusi je také očkování těhotných. Hlavním cílem očkování v těhotenství je chránit nejmenší děti prostřednictvím posílení mateřských protilátek. Hladina mateřských protilátek je považována za nejdůležitější faktor ochrany kojenců před onemocněním. Nicméně po narození dochází u dětí velmi rychle k biologickému rozpadu mateřských protilátek a až 95 % dětí ve věku dvou měsíců již nemá mateřské protilátky detekovatelné (*Vysoká-Buriánová B., 1961, Van Savage J. et al., 1990, Tanaka M. et al., 2003, Healy CM. et al., 2004, Bisgard KM. et al., 2004, Gonik B. et al., 2005, Edwards KM. a Decker MD., 2013, Healy CM. et al., 2014, Swamy GK. a Garcia-Putnam R., 2014, Swamy GK. a Wheeler SM., 2014*).

Většina žen fertilního věku byla sice v dětství proti pertusi očkována, ale očkování jim neposkytuje celoživotní ochranu a nevede k trvalé přítomnosti ochranných titrů protilátek (*Čelko A. et al., 1984*).

Očkování v posledním trimestru těhotenství proti pertusi dočasně zvýší ochranné mateřské protilátky, které přechází od matky přes placentu jejímu nenarozenému dítěti. Mateřské protilátky chrání dítě v prvních dvou měsících života, než může být očkováno proti pertusi. Těhotné je doporučeno očkovat jednou dávkou kombinované vakcíny Tdap proti tetanu, difterii a pertusi (vakcína s tetanickým toxoidem, se sníženým množstvím difterického toxoidu a acelulární pertusovou složkou) během těhotenství, ideálně mezi 28. a 36. týdnem těhotenství.

Očkování proti pertusi kombinovanou Tdap vakcínou v graviditě je již oficiálně doporučováno v mnoha státech. Očkování těhotných žen provádí například USA, Kanada, Izrael, Nový Zéland, Velká Británie, Belgie, Austrálie.

Aplikace Tdap vakcíny těhotným mezi 28. a 36. týdnem vede k protilátkové odpovědi u matek a k optimálnímu přenosu pasivních mateřských protilátek proti pertusi do krevního oběhu plodu. Koncentrace protilátek v pupečnickové krvi je vyšší než v krvi mateřské, což svědčí o aktivním transplacentárním přenosu. Výše hladiny protilátek a tím míra protektivity pro novorozence je závislá na řadě faktorů, mimo jiné na době, která uplynula od očkování matky. Významně vyšší hladiny protilátek mají

novorozenci, jejichž matka byla proti pertusi očkována v graviditě (*Public Health England, 2014, Centers for Disease Control and Prevention, 2013, Bechini A. et al., 2012, Gal SA. et al., 2011*).

Hlavní důvody, které vedly k doporučení očkovat těhotné ženy proti pertusi:

- ✓ U kojenců nemůže být očkování proti pertusi zahájeno dříve než od dvou měsíců věku.
- ✓ 95 % dětí ve věku 2 měsíců již nemá mateřské protilátky.
- ✓ Nejvíce jsou pertusí ohroženy neočkované nebo neúplně očkované malé děti.
- ✓ Ochrana před závažným onemocněním pertusí u dětí nastupuje až cca 14 dní po 2. dávce pertusové vakcíny.
- ✓ Dosud neexistuje monovakcína proti pertusi.
- ✓ Dospělí, a právě zejména matka, jsou nejčastějším zdrojem pertuse pro nejmenší děti.
- ✓ „Cocoon“ strategie (očkování nejbližších kontaktů kolem kojence – očkování rodičů, sourozenců, prarodičů, zdravotníků, pečovatelů) snižuje pertusi u kojenců, ale má svá omezení.
- ✓ Očkování v těhotenství je účinnější než vakcinace postpartum – po porodu (*Vysoká-Buriánová B., 1961, Van Savage J. et al., 1990, Tanaka M. et al., 2003, Healy CM. et al., 2004, Bisgard KM. et al., 2004, Gonik B. et al., 2005, Edwards KM. a Decker MD., 2013, Healy CM. et al., 2015, Swamy GK. a Garcia-Putnam R., 2014, Swamy GK. et al., 2014*).

*Terranella et al. (Terranella A. et al., 2013)* srovnávali nemocnost, počet hospitalizovaných a počet úmrtí u kojenců a očkování žen proti pertusi v těhotenství vs. očkování matek po porodu. Z výsledků vyplývá, že vakcinace v těhotenství je preferována v prevenci kojenecké pertuse před vakcinací postpartum, **tab. č. 5**.

**Tab. č. 5: Srovnání poklesu nemocnosti, počtu hospitalizovaných dětí a počtu úmrtí kojenců u žen očkovaných proti pertusi v těhotenství a po porodu (upraveno podle Teranella et al.)**

	<b>Postpartum imunizace</b>	<b>Očkování v těhotenství</b>
<b>Pokles nemocnost pertuse u kojenců</b>	<b>o 20 %</b>	<b>o 33 %</b>
<b>Pokles hospitalizovaných kojenců</b>	<b>o 19 %</b>	<b>o 38 %</b>
<b>Pokles úmrtí kojenců</b>	<b>o 16 %</b>	<b>o 49 %</b>

Bezpečnost a účinnost vakcíny s tetanickým toxoidem pro těhotné a novorozence byly potvrzeny v dubnu 2014 komisí WHO „The Global Advisory Committee on Vaccine Safety, WHO“ v publikaci „Safety of Immunization during Pregnancy“ (WHO, 2014). V tomto přehledu WHO jsou zmíněny také výsledky analýzy databáze VAERS (Vaccine Adverse Event Reporting System, USA) z let 2005 – 2010. Nebyly potvrzeny obavy týkající se následků pro těhotné ženy, děti a plod po očkování vakcínou Tdap (Zheteyeva YA. et al, 2012)

Americký kongres porodníků a gynekologů (The American Congress of Obstetricians and Gynaecologists) na základě epidemiologické situace v USA v souladu s aktualizovaným doporučením Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) doporučil v roce 2012 očkování těhotných kombinovanou vakcínou proti tetanu, difterii a pertusi (Centers for Disease Control and Prevention. 2013, Committee on Obstetric Practice. 2012). Po zavedení očkování těhotných v USA vzrostla proočkovanost z počátečních 18,8 % v roce 2012 na 41,7 % v roce 2013 (Kharbanda EO. et al., 2016).

Nebylo prokázáno zvýšené riziko vedlejších reakcí po Tdap vakcinaci u těhotných žen ve třetím trimestru a ani u jejich dětí (Munoz FM. et al., 2014, Donegan K. et al., 2014, Sukumaran L. et al., 2015, Kharbanda EO. et al., 2016).

V Anglii a Walesu bylo doporučení pro očkování těhotných proti pertusi zavedeno na podzim roku 2012. Hlášená nemocnost pertusí v Anglii a Walesu v roce 2012 dosahovala 19,07/100 000 obyvatel. V roce 2012 bylo hlášeno 14 úmrtí na pertusi do jednoho roku – všechny děti zemřely ještě před zavedením nového vakcinačního



programu. V roce 2013 byla hlášena 3 úmrtí u dětí, jejichž matky nebyly v těhotenství očkované. Po zavedení programu očkování těhotných došlo k poklesu případů pertuse o 78 % a hospitalizace o 68 % u dětí do tří měsíců věku (*Amirthalingam G. et al., 2014*).

### 3.17 Očkování v ČR

Pravidelné plošné očkování trivakcinou s inaktivovanou celobuněčnou komponentou proti pertusi bylo v ČR zahájeno v roce 1958. Očkování se aplikovalo celkem pěti dávkami československé očkovací látky proti diftérii, tetanu a pertusi s celobuněčnou pertusovou složkou, jejíž složení bylo upravováno podle aktuálně kolujících kmenů *B. pertussis* v populaci.

Již v předcházejících letech bylo prováděno očkování vybraných dětských kolektivů zahraničními monovakcínami proti pertusi (z Anglie, Švýcarska, Francie), ale účinnost těchto očkovacích látek nebyla dostatečná, jednak proto, že šarže byly různé kvality a jednak proto, že nebylo vždy dodržováno schéma očkování uváděné výrobcem a také proto, že se očkovalo velmi nesystematicky (*Vysoká-Buriánová B., 1961*).

Až do roku 1994 se aktivní imunizace prováděla podle následujícího schématu: 1. dávka od 9. týdne života dítěte, 2. dávka za 6 - 8 týdnů po 1. dávce a 3. dávka za 6 - 8 měsíců po 2. dávce. Revakcinační dávky se podávaly ve věku 3 a 6 let.

V roce 1994 došlo ke změně očkovacího schématu s cílem posílit imunitní stav nejmladší dětské populace a bylo upraveno podle výsledků sérologických přehledů následovně: od 9. týdne života se dětem podávaly první tři dávky v 1 - 2 měsíčních intervalech tak, aby 3. dávka byla podána do konce 1. roku života, 4. dávka v 18. - 20. měsíci věku podle schématu, nejdříve však za půl roku po 3. dávce a 5. dávka ve věku 5 let.

V roce 2001 nahradila domácí wP vakcínu (ALDITEPERA) v pravidelném očkování zahraniční celobuněčná vakcína (TETRAct-HIB) proti diftérii, tetanu, pertusi a *Haemophilus influenzae* typ b.

Od roku 2002 byla na trhu k dispozici aP vakcína, ale pouze z indikace pediatra nebo za úhradu. V roce 2005 byla zavedena aP vakcína do pravidelného očkování jako 5. dávka. Od roku 2007 je aP vakcína součástí pravidelného očkování: podle vyhlášky

č. 537/2006 ze dne 29. listopadu 2006 o očkování proti infekčním nemocem se od začátku roku 2007 používala pro očkování dětí hexavakcína DaPT,Hib,VHB, Polio podle následující úpravy: „Základní očkování se provede v době od započatého třináctého týdne po narození dítěte, vždy však až po zhojení postvakcinační reakce po očkování proti tuberkulóze, a to třemi dávkami hexavalentní očkovací látky s acelulární pertusovou složkou a inaktivovanou očkovací látkou proti přenosné dětské obrně (dále jen "hexavalentní očkovací látka") v průběhu prvního roku života dítěte, podanými v intervalech nejméně jednoho měsíce mezi dávkami, a čtvrtou dávkou podanou nejméně 6 měsíců po podání třetí dávky. Čtvrtá dávka hexavalentní očkovací látky se podá nejpozději před dovršením osmnáctého měsíce věku dítěte. Přeočkování proti záškrtu, tetanu a dávivému kašli se provede očkovací látkou proti těmto infekcím v době od dovršení pátého do dovršení šestého roku věku dítěte.“

Vzhledem k příznivé epidemiologické situaci ve výskytu tuberkulózy na území ČR a z důvodů prodlouženého zahajování základního očkování kvůli nehojící se chrániče bylo zrušeno plošné očkování proti tbc. Zahájení základního očkování včetně očkování proti pertusi se posunulo. Podle vyhlášky MZ č. 273/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, v platném znění, probíhá od 9. týdne života třemi dávkami v průběhu prvního roku života, podanými v intervalech nejméně jednoho měsíce mezi dávkami, a čtvrtou dávkou podanou nejméně 6 měsíců po podání třetí dávky a nejpozději před dovršením osmnáctého měsíce věku dítěte. Přeočkování proti záškrtu, tetanu a pertusi se provede očkovací látkou proti těmto infekcím v době od dovršení pátého do dovršení šestého roku věku dítěte.

Od března roku 2009 podle vyhlášky MZ č. 65/2009 Sb., byla do povinného očkování zařazena šestá, posilovací (booster) dávka proti pertusi s acelulární pertusovou složkou od dovršení desátého do dovršení jedenáctého roku věku dítěte (spolu se záškrtem, tetanem a dětskou přenosnou obrnou) s ohledem na incidenci onemocnění v nejvíce postižené věkové skupině.

V polovině roku 2011 byla Národní imunizační komisí při Ministerstvu zdravotnictví vydána Národní strategie očkování proti pertusi pro dospělé populaci: [http://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/narodni-strategie-ockovani-proti-pertusi\\_5195\\_1985\\_5.html](http://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/narodni-strategie-ockovani-proti-pertusi_5195_1985_5.html)

8. prosince 2015 byla Národní strategie očkování proti pertusi doplněna o Doporučení pro očkování těhotných žen proti pertusi:  
[http://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/doporuceni-narodni-imunizacni-komisenikopro-ockovani-tehotnych-zen-proti-per\\_11107\\_1985\\_5.html](http://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/doporuceni-narodni-imunizacni-komisenikopro-ockovani-tehotnych-zen-proti-per_11107_1985_5.html)

V České republice jsou registrovány následující vakcíny proti pertusi: Adacel (Tdap), Adacel Polio (Tdap-IPV), Boostrix (Tdap), Boostrix-Polio (Tdap-IPV), Hexacima (DTaP-Hib-HBV-IPV), Infanrix (DTaP), Infanrix Hepb (DTaP+HBV), Infanrix Hexa (DTaP-Hib+HBV+IPV), Infanrix Hib (DTaP-Hib), Infanrix Polio (DTaP-IPV), Pediacel (DTaP-Hib-IPV).

**V tabulce č. 4** je uvedeno základní složení očkovacích látek používaných v ČR s acelulární pertusovou složkou. Upraveno podle SPC jednotlivých vakcín ke dni 4. 6. 2016, SÚKL.

Tab. č. 4: Složení očkovacích látek používaných v ČR s acelulární pertusovou složkou (upraveno podle SPC ke dni 4.6.2016, SÚKL, informace k Adacel Polio vzhledem k nedostupnosti jsou z roku 2015)

SLOŽENÍ	ADACEL	ADACEL POLIO	BOOSTRIX	BOOSTRIX POLIO	Infanrix Hexa	INFANRIX	PEDIACEL	HEXACIMA
PT	2,5 µg	2,5 µg	8 µg	8 µg	25 µg	25 µg	20 µg	25 µg
FHA	5 µg	5 µg	8 µg	8 µg	25 µg	25 µg	20 µg	25 µg
PRN	3 µg	3 µg	2,5 µg	2,5 µg	8 µg	8 µg	3 µg	0
FIM 2+3	5 µg	5 µg	0	0	0	0 µg	5 µg	0
Diphtheriae anatoxinum	2 IU (2 Lf)	2 IU (≥ 2Lf)	2 IU (2,5 Lf)	2 IU (2,5 Lf)	30 IU	≥ 30 IU	30 UI	20 IU
Tetani anatoxinum	20 IU (5 Lf)	20 IU (≥5 Lf)	20 IU (5 Lf)	20 IU (5 Lf)	40 IU	≥ 40 IU	40 UI	40 IU
Hep B	0	0	0	0	10 µg	0	0	10 µg
Inaktivovaný viru poliomyelitidy typ 1 (Mahoney)	0	40 D	0	40 D	40 D	0	40 D	40 D
Inaktivovaný viru poliomyelitidy typ 2 (MEF 1)	0	8 D	0	8 D	8 D	0	8 D	8 D
Inaktivovaný viru poliomyelitidy typ 3 (Saukett)	0	32 D	0	32 D	32 D	0	32 D	32 D
Polysacharid Haemophilus influenzae typu b (konjug. na tetan. anatoxin)	0	0	0	0	10 µg (20-40 µg)	0	10 µg (18-30 µg)	12 µg (22-36 µg)
Fosforečnan hlinitý AIPO <sub>4</sub>	1,5 mg (0,33 mg Al)	1,5 mg (0,33 mg Al)	0,2 mg Al	0,2 mg Al	0,32 Al	0	1,5 mg (0,33 mg Al)	0
Hydrat. hydroxid hlinitý Al(OH) <sub>3</sub>	0	0	0,3 mg Al	0,3 mg Al	0,5 mg Al	0,5 mg Al	0	0,6 mg Al

## **II. SPECIÁLNÍ ČÁST**

## 4 Popis použitých metod

---

### 4.1 Surveillance a data o výskytu pertuse

Byla použita epidemiologická a mikrobiologická data o výskytu pertuse ze surveillance programu pertuse, který je koordinován Centrem epidemiologie a mikrobiologie (CEM) Státního zdravotního ústavu (SZÚ).

Onemocnění pertusí podléhá v ČR povinnému hlášení. Surveillance dáivého kašle - pertuse a parapertuse - byla v roce 2008 legislativně zakotvena ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví ČR č. 473/2008 Sb., ve znění pozdějších předpisů.

Údaje o celkové nemocnosti pertusí v letech 1945 – 1964 jsou archivovány v Národním referenčním centru pro analýzu epidemiologických dat, SZÚ. Data z let 1965 – 1981 jsou použita z Ústavu zdravotnických informací v Praze, z let 1982 – 1992 z Informačního systému přenosných onemocnění. Data o jednotlivých případech jsou registrována od roku 1992 prostřednictvím informačního systému přenosných onemocnění EPIDAT, který spravuje Oddělení biostatistiky ve Státním zdravotním ústavu.

Epidemiologická surveillance pertuse v ČR spočívá v pravidelném týdenním hlášení jednotlivých případů pertuse zasílaných na základě údajů od osob poskytujících péči prostřednictvím Krajských hygienických stanic (KHS) do národního registru EPIDAT, jehož odborným garantem je SZÚ.

Případy pertuse jsou hlášeny podle surveillance onemocnění na základě klinických, laboratorních a epidemiologických kritérií podle platné legislativy. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce ve znění pozdějších předpisů, stanoví v klinických kritériích pertuse, že do klinického obrazu pertuse patří kašel trvající minimálně 2 týdny s jedním z následujících příznaků: záchvaty kašle, kokrhavý kašel nebo zvracení po záchvatu kašle bez jiných zjevných příčin nebo apnoická pauza u kojenců. V listu epidemiologického šetření každého případu pertuse je dokladován způsob laboratorního

vyšetření. Laboratorní diagnóza pertuse v ČR je prováděna kultivačním, sérologickým a PCR vyšetřením.

Pro hlášení případů v předchozím období byla použita definice případu z Věstníku Ministerstva zdravotnictví a podle direktivy Evropské Komise, dále byly použity platné směrnice příslušných informačních systémů a zásady surveillance pertuse zakotvené legislativními pokyny.

Do studovaného souboru byly zařazeny děti ve věku do jednoho roku života s laboratorně potvrzeným onemocněním pertusí, které byly v období 1997 - 2013 registrovány prostřednictvím systému přenosných onemocnění. Celkem bylo ve věku do jednoho roku života ve vybraném období nahlášeno 265 dětí. Věk dětí v měsících pro potřeby této práce byl stanoven podle ukončeného měsíce věku v době onemocnění.

## **4.2 Data o počtech zemřelých na pertusi**

Data o počtech zemřelých na pertusi v české populaci jsou získávána prostřednictvím hlášení lékařů ze dvou zdrojů. V archivu SZÚ jsou dostupná data o úmrtnosti (na kašel dávivý, zádušní, zajíkávký) na území historických českých zemí počínaje rokem 1890. (Pelc H., 1929). Data o počtech zemřelých od roku 1919 jsou dostupná na stránkách Českého statistického úřadu (ČSÚ) „Zemřelí podle podrobného seznamu příčin smrti a věku“.

Údaje o pěti zemřelých osobách v souvislosti s pertusí byly vyhledány v EPIDATu a ve spolupráci s KHS byly vyžádány zdravotní záznamy.

## **4.3 Laboratorní diagnostika**

Laboratorní část surveillance pertuse vede Národní referenční laboratoř (NRL) pro pertusi a difterii Centra epidemiologie a mikrobiologie SZÚ. Surveillance se skládá z identifikace kmenů *B. pertussis* a *B. parapertussis*, případně dalších kmenů rodu *Bordetella* doručených do NRL v rámci surveillance. Dále laboratoř provádí vyšetřování protilátek proti *B. pertussis* a *B. parapertussis* a zajišťuje přímo v SZÚ odběry na kultivační a PCR vyšetření.

### 4.3.1 Izoláty *Bordetella pertussis*

Při studiu a porovnávání kmenů *B. pertussis* molekulárně biologickými metodami byly použity sbírkové a recentní klinické izoláty *B. pertussis*, které byly v rámci národní surveillace pertuse doručeny do NRL pro pertusi a difterii Státního zdravotního ústavu. Při NRL existuje unikátní sbírka kmenů *B. pertussis* a *B. parapertussis*, které byly získány z laboratoří klinické mikrobiologie a z laboratoří hygienických stanic a zdravotních ústavů ČR od roku 1964.

Od svého založení tato unikátní sbírka čítá celkem 191 vzorků zaslaných do NRL od nemocných s pertusí v programu národní surveillace. Od roku 1964 do roku 2004 sbírka zahrnuje 99 kmenů uchovávaných v lyofilizovaném stavu, od roku 2007 do června roku 2015 sbírka obsahuje 92 kmenů, které se uchovávají v zamraženém stavu při teplotě -70 °C.

### 4.3.2 Molekulárně biologické metody

Izoláty *B. pertussis* získané v rámci surveillace pertuse byly vyšetřeny molekulárně biologickými metodami. Metodou multilokusové antigenní sekvenační typizace (MAST) byly detekovány a porovnány sekvence kódující nejdůležitější povrchové imunogenní struktury - gen pro S1 podjednotku pertusového toxinu (*ptxA*), oblast 1 a oblast 2 genu pro pertaktin (*prnA*), gen pro fimbrie typu 3 (*fim3*) – a oblast promotoru genu pro pertusový toxin (*ptxP*) odpovědného za řízení exprese pertusového toxinu a dalších významných faktorů virulence *B. pertussis*.

Pro metodu MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis) byla nejříve provedena PCR amplifikace úseků DNA obsahujících analyzované tandemové repetice a následně vyšetřena v genetickém analyzátoru. Zjišťoval se počet VNTR (Variable number of tandem repeat), variabilního počtu tandemových repetic u jednotlivých kmenů *B. pertussis*. Hodnoty délek VNTR repetic byly porovnány s hodnotami uvedenými pro jednotlivé VNTR v mezinárodní databázi na [ww.mlva.net]. Pro každý testovaný kmen bylo provedeno 5 VNTR reakcí a po následné analýze produktů a určení alel byl stanoven MLVA profil. MLVA profil je tvořen kombinací 6 přirozených čísel označujících počet repetic u jednotlivých VNTR alel. Každému



MLVA profilu bylo přiřazeno přirozené číslo, označující příslušný MLVA typ (MT). Známé MT byly přiřazeny porovnáním v databázi známých MT [www.mlva.net]. Kmeny, jejichž MLVA profily neodpovídaly žádnému z dosud známých MT, byly pro ověření počtu repetitivních testovány sekvenací a odeslány do RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Nizozemsko), k ověření a přiřazení MT.

Metodou multilokusové sekvenční typizace (MLST) byla zjišťována klonální diverzita 58 kmenů *B. pertussis*. Kmeny, izolované v ČR během období 1967 - 2010, byly voleny na základě lišících se charakteristik získaných metodami MAST a MLVA.

Metoda sleduje fragmenty sedmi genů: *adk*, *fumC*, *glyA*, *tyrB*, *icd*, *pepA* a *pgm*, které byly analyzovány v kapilárním sekvenátoru. Data byla následně vyhodnocena pomocí software Lasergene (DNASTAR, USA). Porovnáním získaných sekvenčních dat s celosvětovou MLST databází (<http://pubmlst.org/bordetella/>) byly určeny alelické varianty jednotlivých genových lokusů a jejich kombinací sekvenční typy (ST).

#### **4.4 Vyšetření citlivosti k antibiotikům volby a alternativám u kmenů *Bordetella pertussis***

Ke stanovení citlivosti kmenů *B. pertussis* izolovaných od pacientů s dávivým kašlem v letech 1967 – 2010 v rámci národní surveillancie pertuse v ČR byla použita antibiotika běžně používaná pro terapii pertuse: erytromycin, klaritromycin, azitromycin, ciprofloxacin a kotrimoxazol. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik byla vyšetřena referenční diluční agarovou metodou, na Bordet-Gengou agaru s 15 % defibrinované ovčí krve.

#### **4.5 Statistické metody**

K porovnávání dat byly použity běžné statistické ukazatele, jako je nemocnost v určité vybrané skupině populace, specifikované zejména věkem a pohlavím. Byl sledován počet hospitalizovaných osob a očkování proti pertusi. Epidemiologická data byla analyzována zejména podle specifické nemocnosti vzhledem k věku, s důrazem na pertusí nejvíce ohroženou skupinu dětí do jednoho roku života.

K stanovení celkové a specifické nemocnosti, případně úmrtnosti, byla použita demografická data pravidelně zveřejňovaná ČSÚ.

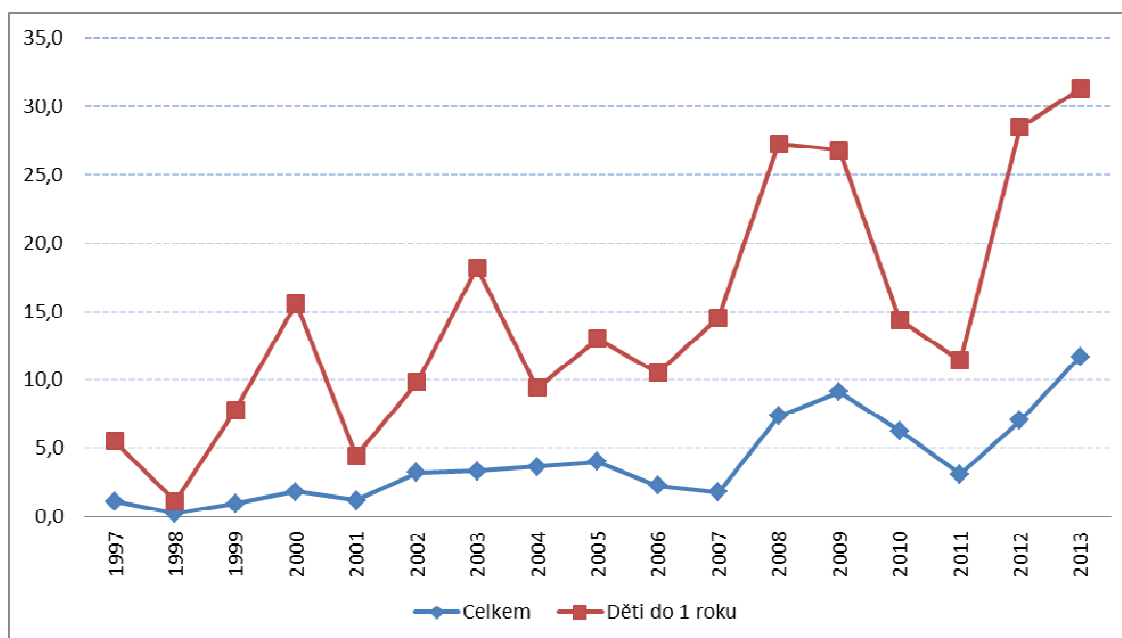
Laboratorní data získaná molekulárně biologickými metodami ze sekvenátoru byla následně vyhodnocena pomocí software Lasergene (DNASTAR, USA).

## 5 Přehled dosažených výsledků

### 5.1 Trend pertuse u dětí do jednoho roku života v České republice v letech 1997 - 2013

U dětí do jednoho roku života, podobně jako v celé české populaci, byl od devadesátých let minulého století zaznamenán trvalý nárůst hlášené incidence onemocnění pertusí. V dlouhodobém trendu hlášené incidence pertuse u dětí do jednoho roku jsou znatelné pravidelné 3 – 4leté cyklické výkyvy v závislosti na epidemickém a neepidemickém roku, **graf č. 2**

**Graf č. 2: Pertuse, celková incidence a incidence u dětí do 1 roku života na 100 000 obyvatel, ČR, 1997 - 2013**



Do studovaného souboru byly zařazeny děti ve věku do jednoho roku života s laboratorně potvrzeným onemocněním pertusí, které byly v období 1997 - 2013 registrovány prostřednictvím systému přenosných onemocnění EPIDAT. Nejnižší hlášená incidence pertuse u dětí do jednoho roku života byla zaznamenána v roce 1998: incidence 1,1/100 000 představovala pouze jeden případ; jednalo se o onemocnění měsíční holčičky. Nejvyšší hlášená incidence byla evidována v roce 2013, kdy bylo

hlášeno 34 případů pertuse u dětí do jednoho roku života, incidence 31,3/100 000 obyvatel.

Ve sledovaném období 1997 – 2013 bylo nahlášeno 265 případů pertuse u dětí do jednoho roku života.

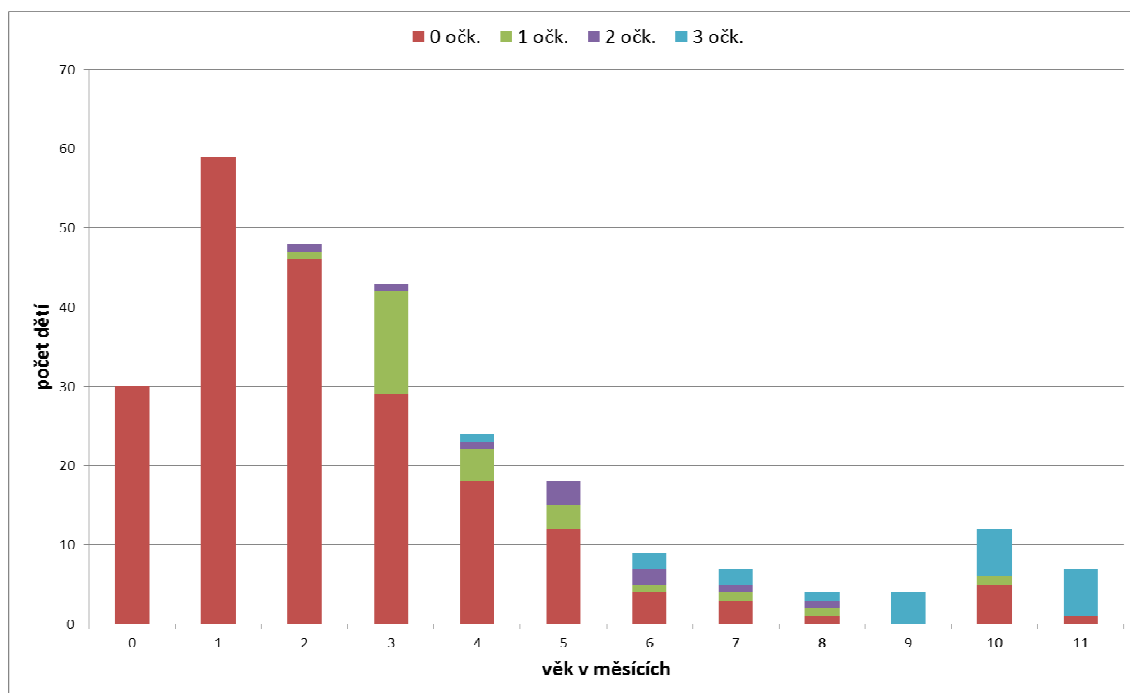
Většina dětí ve sledovaném období onemocněla během prvních čtyř měsíců života, téměř 77 % (204/265), respektive během šesti měsíců života - 87 % (231/265).

Ve skupině mírně převažoval počet chlapců nad dívkami; onemocnělo 137 (51,7 %) chlapců a 128 dívek (48,3 %).

### Pertuse, očkování

Ze sledovaného souboru 265 dětí nebylo před začátkem, prvními příznaky onemocnění očkováno proti pertusi 79 % dětí (209/265), **graf č. 3.**

**Graf č. 3: Pertuse, počet dávek očkování u dětí do jednoho roku života podle dosaženého měsíce věku před onemocněním, ČR, 1997 – 2013**



Nejvíce neočkovaných dětí ze sledované skupiny, 69 % (182/265) resp. 75 % (199/265), onemocnělo během prvních čtyř, respektive šesti měsíců.

Před vznikem onemocnění bylo jednou až třemi dávkami vakcíny proti pertusi očkováno 21 % dětí (56/265): jednou dávkou bylo očkováno 29 dětí, dvěma dávkami 9 dětí a třemi dávkami 18 dětí.

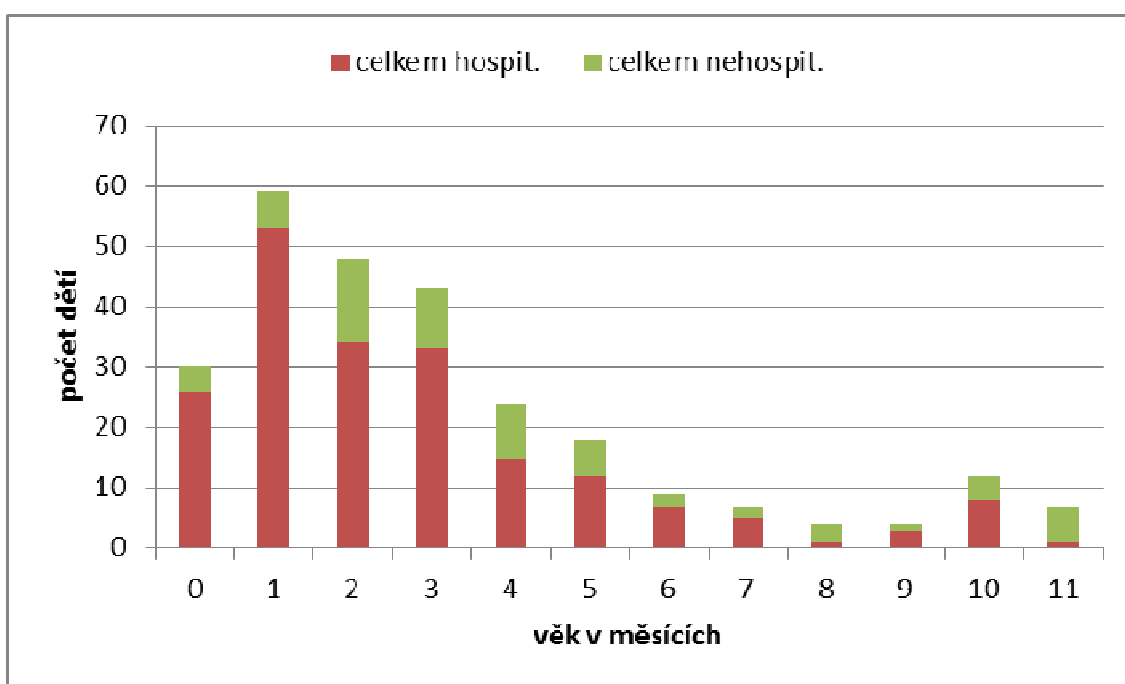
Kontraindikace očkování mělo 19 % dětí (50/265). Nejčastější kontraindikace k očkování byly neurologické, dále nízký věk nebo nedonošenost, nachlazení nebo nezhojená chránička po BCG vakcinaci.

Podrobnější rozbor počtu dávek očkování, které byly dětem aplikovány před onemocněním, ukazuje, že ukončené třídávkové očkování u dětí do jednoho roku života bylo dosaženo pouze u 6,8 % sledovaných dětí (18/265).

### **Pertuse, hospitalizace**

Ve sledované skupině bylo v souvislosti s pertusí v letech 1997 – 2013 celkem hospitalizováno téměř 75 % dětí (198/265). V jednotlivých letech kolísal počet hospitalizovaných dětí od 55 do 100 %. Většina dětí byla hospitalizována s onemocněním v prvních čtyřech měsících života - téměř 81 % (161 ze 198 hospitalizovaných), respektive v šesti měsících života 90 % (180/198). Nejvíce hospitalizovaných dětí podle jednotlivých měsíců věku bylo po ukončeném prvním měsíci života, téměř 27 % dětí (53/198), **graf č. 4**.

**Graf č. 4: Pertuse, hospitalizace u dětí do jednoho roku života podle dosaženého měsíce věku, ČR, 1997 – 2013**



## **Pertuse, úmrtí**

Ve sledovaném období 1997 – 2013 došlo v České republice ke čtyřem úmrtím dětí do jednoho roku života: v roce 2005 úmrtí měsíčního chlapce, v roce 2007 úmrtí čtyřměsíční dívky, v roce 2008 úmrtí čtyřtýdenní holčičky a v roce 2009 úmrtí dvoutměsíční dívky. Tři děti nebyly očkované proti pertusi z důvodů nízkého věku. U čtvrtého dítěte bylo zahájení očkování odloženo pro nachlazení, které však již patřilo k prvním příznakům fatálního onemocnění pertusí. Ve všech čtyřech případech byl zdrojem onemocnění člen blízké rodiny.

## **5.2 Vypracování podkladů k návrhu aktualizace vakcinační strategie**

Kontinuální nárůst pertuse v mnoha státech je velkým problémem zejména s ohledem na pertusí nejohroženější věkovou skupinu dětí do jednoho roku života. Se vzrůstající nemocností dospívajících a dospělých se zvyšuje riziko onemocnění nejmenších dětí. Onemocnění pertusí je nejrizikovější pro neočkované nebo neúplně očkované malé děti vzhledem k možnému rozvoji závažných komplikací i případnému úmrtí.

Na základě dlouhodobého vzestupného trendu nemocnosti pertusí u dětí do jednoho roku života v ČR jsme vypracovali doporučení pro očkování těhotných žen proti pertusi, které bylo předloženo Ministerstvu zdravotnictví ČR. Po projednání odbornými společnostmi bylo doporučení dne 8. 12. 2015 publikováno na stránkách Národní imunizační komise (NIKO) při Ministerstvu zdravotnictví ČR. <http://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/doporuzeni-narodni-imunizacni-komisenikopro-ockovani-tehotnych-zen-proti-per-11107-1985-5.html>

Hlavním cílem očkování v těhotenství je chránit nejmenší děti prostřednictvím posílení transplacentálního přenosu specifických mateřských protilátek na plod a do mateřského mléka. Dostatečná hladina mateřských protilátek je považována za nejdůležitější faktor ochrany před onemocněním u novorozenců a kojenců do doby, než u nich bude zahájeno očkování. Většina žen fertilního věku byla v dětství proti pertusi očkována, nicméně očkování v dětství ani prodělané onemocnění neposkytuje celoživotní ani dlouhodobou ochranu. Očkování v posledním trimestru těhotenství proti pertusi dočasně zvýší ochranné mateřské protilátky, které přechází od matky přes placentu jejímu

nenarozenému dítěti. K přestupu mateřských protilátek dochází po 30. týdnu těhotenství a při očkování v průběhu třetího trimestru těhotenství dochází k přenosu nejvyšších koncentrací mateřských protilátek. Přenesené mateřské protilátky pasivně chrání dítě v prvních 2 - 3 měsících života, než může být očkováno proti pertusi. Při očkování v průběhu těhotenství je dosahováno vyšších hladin specifických protilátek v mateřském mléce než při očkování žen po porodu. Dalším cílem očkování těhotných žen je navození ochrany u samotné ženy a snížení rizika přenosu nákazy na neočkovaného novorozence a kojence.

Těhotným ženám je doporučeno nechat se očkovat jednou dávkou kombinované vakcíny proti pertusi, difterii a tetanu (Tdap, vakcína s tetanickým toxoidem, se sníženým množstvím difterického toxoidu a acelulární pertusovou složkou) během těhotenství, ideálně mezi 28. a 36. týdnem těhotenství.

Ženám, které nebyly očkovány v těhotenství proti pertusi, je doporučeno podání jedné dávky Tdap vakcíny ihned po porodu, aby se minimalizovalo riziko přenosu onemocnění na novorozence.

### **5.3 Studium souboru izolátů *B. pertussis* molekulárními metodami**

Ve spolupráci s NRL pro pertusi a difterii se povedlo poprvé v ČR zavést molekulární metody studia izolátů *B. pertussis*: multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA), multilocus antigen sequence typing (MAST) pomocí sekvenace genů *prnA* oblast 1, *prnA* oblast 2, *ptxA*, *ptxP* a *fim3* na automatickém sekvenátoru, a metoda multilocus sequence typing (MLST).

Vyšetřovány byly izoláty ze sbírky kmenů *B. pertussis* Národní referenční laboratoře pro pertusi a difterii. Soubor izolátů pokrývá více jak padesátileté období používání celobuněčné a acelulární vakcíny. Z archivních lyofilizovaných kmenů se podařilo oživit pouze 44 izolátů z různých období. Při řešení projektu bylo tedy ze sbírky izolátů *B. pertussis* analyzováno celkem 136 archivních a recentních kmenů.

### 5.3.1 Výsledky sekvenace, MAST

Ve studii bylo analyzováno 136 kmenů *B. pertussis* z období 1967 – 2015 (červen), které bylo rozděleno na 3 časové úseky:

- 1: 1967 – 1980, období očkování celobuněčnou vakcínou československé výroby a klesajícího trendu výskytu pertuse,
- 2: 1990 – 2007, období souběžného používání zahraničních vakcín, celobuněčné i acelulární vakcíny a počátku vzestupného trendu výskytu pertuse,
- 3: 2008 – 2015, období očkování zahraniční acelulární vakcínou a pokračujícího vzestupného trendu výskytu pertuse.

Sekvenací oblasti *ptxP* bylo zjištěno, že u izolátů z roku 1980 a starších se vyskytovala převážně alelická varianta *ptxP(1)*. V roce 1970 se vyskytl kmen s netypickou variantou *ptxP* (tabulka 1). U izolátů z let 1990 až 2007 se současně s variantou *ptxP(1)* vyskytovala i varianta *ptxP(3)*, která od roku 2008 zcela převážila.

Pokud jde o sekvenci *ptxA*, u kmenů izolovaných do roku 1980 se vyskytovaly současně varianty *ptxA(1)* a *ptxA(2)*. U kmenů izolovaných od roku 1990 se již vyskytuje pouze varianta *ptxA(1)*.

V případě oblasti *prnA* se u kmenů izolovaných do roku 1980 vyskytovaly současně varianty *prnA(1)* a *prnA(3)*, v roce 1970 se vyskytl kmen s netypickou variantou *prnA* (tabulka 1). V období 1990 – 2007 se vyskytovaly varianty *prnA(1)*, *prnA(2)* a *prnA(3)*, od roku 2008 převažuje varianta *prnA(2)*. V roce 2010 se vyskytl netypický kmen, u něhož se sekvence oblasti *prnA* shodovala se sekvencí typickou pro kmen *Bordetella parapertussis*. V roce 2014 se vyskytl kmen s netypickou variantou *prnA(2)* a v roce 2015 se vyskytly 3 kmene s alelickou variantou *prnA(4)*.

Sekvence oblasti *fim3* ukázala, že kmene izolované do r. 1980 byly nositeli alelické varianty *fim3(1)*, v obdobích 1990 – 2007 a 2008 – 2010 se vyskytují varianty *fim3(1)* a *fim3(2)*.

Alelický profil (AP) izolátů ve třech srovnávaných obdobích se liší. V prvním období (1967 – 1980, wP vakcína) byly nejčastěji zjištěny profily: *ptxP(1)*, *ptxA(2)*, *prnA(1)*, *fim3(1)*; *ptxP(1)*, *ptxA(1)*, *prnA(3)*, *fim3(1)*. Ve druhém období (1990 – 2007, přechod



na aP vakcínu) byl nejčastěji zjištěn profil *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(2)*. Ve třetím období (2008 – 2015, aP vakcína) zcela převládaly dva alelické profily, které se v prvním období vůbec nevyskytovaly: *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(2)*; *ptxP(3)* *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(1)*.

U izolátů z období 1967 – 1980 a 1990 – 2007 se vyskytoval výhradně sérotyp Fim3, v období 2008 – 2015 se vyskytují sérotypy Fim3, Fim2, Fim2,3.

U izolátů z počátku sledovaného období (1967-1999), kdy v důsledku aplikace celobuněčné vakcíny poklesla nemocnost pertusí v ČR (70. a 80. léta), byla identifikována genová struktura, která odpovídá struktuře antigenních složek později vyvinutých acelulárních vakcín.

U izolátů z období po roce 2007 byly zjištěny strukturní změny u sledovaných markerů (*ptxA*, *prnA*, *fim3*) (**tabulka č. 7**). S tímto nálezem koreluje též strukturní změna *ptxP*, kde došlo k mutaci indukující u *B. pertussis* zvýšenou produkci toxinu.

Sekvenací oblastí genomu *ptxP*, *ptxA*, *prnA* a *fim3* u kmenů *B. pertussis* byly potvrzeny změny alelických variant těchto oblastí. Výskyt kmenů nesoucích nové alelické varianty narůstá po roce 1995 na úkor kmenů nesoucích varianty původní. Výsledky studie lze interpretovat jako částečný genetický únik patogenních kmenů *B. pertussis* mimo účinnost pertusových vakcín. (Zavadilová J. et al., 2015).

### 5.3.2 Výsledky metody MLVA

Analýza souboru 136 izolátů rozděleného na tři skupiny s ohledem na trend výskytu onemocnění pertusí na území ČR a na používanou očkovací látku, ukazuje, že:

- v období očkování celobuněčnou vakcínou československé výroby a klesajícího trendu výskytu pertuse byly u izolátů z let 1967 – 1980 zjištěny MLVA analýzou nejčastěji dva klonální komplexy MT12 a MT29, metodou MAST zjištěny nejčastěji dva profily
  - ✓ *ptxP(1)*, *ptxA(2)*, *prnA(1)*, *fim3(1)* a
  - ✓ *ptxP(1)*, *ptxA(1)*, *prnA(3)*, *fim3(1)*,
- v období souběžného používání zahraničních vakcín, celobuněčné i acelulární vakcíny a počátku vzestupného trendu výskytu pertuse, tedy v letech 1990–2007,

byl MLVA analýzou v úvodu zjištěn klonální komplex MT29 a od roku 1993 byl nahrazen komplexem MT27, metodou MAST byl nejčastěji zjištěn profil

✓ *ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(2)*.,

- v období očkování zahraniční acelulární vakcínou a pokračujícího vzestupného trendu výskytu pertuse, tedy od roku 2008 do června 2015, bylo při MLVA analýze zjištěno, že zcela převládal klonální komplex MT27, metodou MAST bylo zjištěno, že zcela převládaly dva příbuzné profily, které se v prvním období nevyskytovaly:

✓ *ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(2)* a

✓ *ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(1)*.

MLVA analýzou souboru kmenů *B. pertussis* izolovaných z klinického materiálu na území ČR v období 1967-2015 (červen) byl prokázán pokles genetické diverzity ve studované populaci a změny v zastoupení a četnosti jednotlivých MT. Tyto změny lze charakterizovat jako postupný nárůst výskytu celosvětově rozšířených MT v České republice na úkor MT regionálně unikátních. Převažujícím MT, stejně jako ve většině geografických oblastí s dlouhodobě proočkovanou populací, je MT27 (*Lžičářová D. et al., přijatý k tisku, 2016*).

**Tabulka č. 7: Přehled výsledků MAST analýzy**

Období	Počet izolátů	Počet AP	Alelický profil (AP)	Četnost AP	Četnost AP (%)
1967-1980	32	4	ptxP(1), ptxA(2), prnA(1), fim3(1)	14	43,75
			ptxP(1), ptxA(1), prnA(1), fim3(1)	5	15,63
			ptxP nová, ptxA(2), prnA(1) nová, fim3(1)	1	3,13
			ptxP(1), ptxA(1), prnA(3), fim3(1)	12	37,5
1990-2007	13	5	ptxP(1), ptxA(1), prnA(3), fim3(1)	3	23,08
			ptxP(1), ptxA(1), prnA(1), fim3(1)	1	7,69
			ptxP(1), ptxA(1), prnA(2), fim3(1)	1	7,69
			ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(1)	2	15,38
			ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(2)	6	46,15
2008-2015	91	5	ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(1)	49	56,04
			ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(2)	37	39,56
			ptxP(3), ptxA(1), prn-parapert., fim3(2)	1	1,09
			ptxP(3), ptxA(1), prnA(4), fim3(1)	3	3,3
			ptxP(3), ptxA(1), prnA(2) nová, fim3(1)	1	1,09

### 5.3.3 Výsledky MLST

Metodou multilokusové sekvenční typizace (MLST) byla zjišťována klonální diverzita 58 kmenů *B. pertussis*. Studované kmeny, izolované v ČR za období 1967 – 2015, byly voleny na základě lišících se charakteristik získaných metodami MAST a MLVA.

Izoláty vykazovaly jednotný sekvenční typ ST-2 během celého studovaného období. Závěrem této analýzy je zhodnocení metody MLST jako málo diskriminační a tudíž nevhodné pro detailnější studium kmenů *B. pertussis*.

V souladu s navrženými praktickými výstupy řešení projektu byly předloženy podrobné molekulární charakteristiky zjištěné u studovaného souboru izolátů *B. pertussis* ke kurátorskému posouzení. Údaje byly umístěny v celosvětové databázi, na <http://pubmlst.org/bordetella/> - **obrázek č. 5**. Centrální databázové prostředí zajišťuje odborníkům operativní dostupnost informací o molekulárních a epidemiologických charakteristikách kmenů patogenů, vyskytujících se či šířících se ve světových regionech. Do databáze byly poskytnuty podrobné údaje MAST analýzy českých izolátů *B. pertussis* – **obrázek č. 6**.

## 5.4 Srovnání českých izolátů *B. pertussis* v mezinárodní studii

Při spolupráci na projektu “Coordination of activities for laboratory surveillance of whooping cough in Member States and EEA countries“ bylo odesláno k analýze celkem 20 českých izolátů *B. pertussis* z let 2008 - 2012, které byly zpracovány metodou pulzní gelové elektroforézy (PFGE, pulsed field gel electrophoresis). Navíc byly tyto kmeny vyšetřeny metodou MLVA a MAST, genotypizací a sérotypizací. Kmeny *B. pertussis* k vyšetření metodou PFGE byly poslány do National Institute for Health and Welfare ve Finsku a kmeny k vyšetření metodou MLVA, genotypizaci a sérotypizaci byly odeslány do National Institute for Public Health and the Environment v Nizozemí.

Ve studii bylo vyšetřeno celkem 466 izolátů *B. pertussis* ze 13 evropských zemí z let 1998 – 2012. Metodou MAST byly sekvenovány oblasti pro promotor pertusového toxinu a další geny kódující proteiny používané v acelulárních vakcínách: pertusový toxin, pertaktin, fimbrie 2 a fimbrie 3. Výsledky molekulární analýzy ukazují na podobnost populace *B. pertussis* ve 12 zemích, kde se očkuje vakcínou s acelulární pertusovou složkou, a na značnou odlišnost izolátů z Polska, kde se dosud očkuje vakcínou s celobuněčnou pertusovou složkou.

V Evropě současně používané aP vakcíny obsahují *ptxA2* a *ptxA4*, polská wP vakcína obsahuje *ptxA2*. Soubor studovaných izolátů byl v alele *prxA* homogenní; ze 429 analyzovaných kmenů obsahovalo celkem 428 izolátů nevakcinální alelu *ptxA1*.

Současně používané aP vakcíny obsahují *prn1* a *prn7*, polská wP vakcína pouze *prn1*. Ve studii byly ve 12 zemích identifikovány *prn1*, *prn2*, *prn3* a *prn13*. Alela *prn2* dominovala v letech 1998 – 2001 s frekvencí 84 %, její frekvence se postupně navyšovala až na 99 % v letech 2007 – 2012.

Ve studii byly nalezeny 3 *ptxP* alely, *ptxP1*, *ptxP3* a *ptxP20* (alela *ptx20* byla nalezena v ČR v letech 2007 – 2012). Ve 12 zemí ve studii bylo registrováno zvýšení prevalence *ptxP3* izolátů, z 57 % v letech 1998 – 2001 na 97 % v letech 2007 – 2012. V Polsku dominovaly izoláty s *ptxP1*.

Závěry studie ukazují, že při srovnání izolátů *B. pertussis* mělo 12 států (Belgie, ČR, Dánsko, Finsko, Francie, Německo, Irsko, Nizozemí, Norsko, Španělsko, Švédsko a

Velká Británie) velmi podobnou populaci *B. pertussis*, zatímco polské izoláty byly významně odlišné. Izoláty, které cirkulovaly ve všech zemích, byly odlišné od kmenů vakcinálních v jednom nebo více sledovaných antigenech (Van Gent M. et al., 2015).

## **5.5 Vyšetření minimální inhibiční koncentrace antibiotik u kmenů *B. pertussis***

V rámci pertusové problematiky jsme se zabývali důležitou otázkou, zda kmeny *B. pertussis* kolující v české populaci jsou dostatečně citlivé na cílenou antibiotickou terapii. Studie citlivosti *B. pertussis* na antibiotika nebyla v ČR nikdy provedena.

Dohodli jsme se na spolupráci s Národní referenční laboratoří pro antibiotika při vyšetřování minimální inhibiční koncentrace antibiotik u sbírkových a recentních kmenů *B. pertussis*.

Cílem práce bylo vyšetření citlivosti k antibiotikům volby a alternativám při léčení pertuse u 70 kmenů *B. pertussis* izolovaných od pacientů s dávivým kašlem v letech 1967 – 2010 v rámci národní surveillace pertuse v ČR.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) erytromycinu, klaritromycinu, azitromycinu, ciprofloxacinu a kotrimoxazolu byla vyšetřena referenční diluční agarovou metodou, na Bordet-Gengou agaru s 15 % defibrinované ovčí krve.

Všech 70 kmenů vyšetřovaného souboru bylo inhibováno dvěma koncentracemi erytromycinu a azitromycinu (0,06 a 0,12 mg/l), klaritromycin inhiboval kmeny ve třech koncentracích (0,03; 0,06 a 0,12 mg/l), nejvyšší koncentrace v rozmezí MIC byla u těchto tří podobných antibiotik identicky 0,12 mg/l. Koncentrace erytromycinu inhibující 90 % kmenů byla o jeden stupeň ředění dvojnásobně geometrické řady nižší (0,06 mg/l) než byla MIC<sub>90</sub> u klaritromycinu a azitromycinu (0,12 mg/l). Všechny kmeny inhibovala jediná koncentrace 0,06 mg/l ciprofloxacinu a dvě koncentrace kotrimoxazolu (0,12 a 0,25 mg/l).

Studovaný soubor 70 českých kmenů *B. pertussis* se podle výsledků jeví jako homogenní co se týče minimální inhibiční koncentrace antibiotik, neboť všechny kmeny byly inhibovány dvěma až třemi nízkými koncentracemi.

Ve sbírce českých izolátů nebyl potvrzen žádný kmen *B. pertussis* inhibovaný vyšší koncentrací erytromycinu, klaritromycinu, azitromycinu, ciprofloxacinu ani kotrimoxazolu (*Jakubů V. et al. 2015*).

Obrázek č. 5: Ukázka registrace českých izolátů *Bordetella pertussis* v celosvětové MLST databázi

Search/browse database - Bordetella PubMLST - Internet Explorer

Query: Search | Profile/ST  
Breakdown: Isolate fields | Scheme/alleles | Publications  
Links: Contents | Home | Options | Profiles/sequences definitions

Search or browse Bordetella PubMLST database

Enter search criteria or leave blank to browse all records. Modify form parameters to filter or enter a list of values.

Isolate provenance/phenotype fields: country = Czech Republic

Display/sort options: Order by: id, descending; Display: 10 records per page

16 records returned (1 - 10 displayed). Click the hyperlinks for detailed information.

id	isolate	aliases	Isolate fields					MLST							Loci		
			species	site	disease	country	year	host	adk	fumC	glyA	tyrB	icd	pepA		pgm	ST
398	CR 121	CR 84837	B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	2008	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
397	CR 117		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	2008	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
396	CR 135		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	2008	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
395	CR 130		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	2008	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
394	CR 116		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	2008	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
393	CR 114		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	2008	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
392	CR 122		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	2008	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
391	CR 9		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	2004	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
390	CR 314		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	1993	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex
389	CR 1429		B. pertussis	nasopharynx	pertussis	Czech Republic	1967	human	1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex

Obrázek č. 6: Ukázka údajů v MLST databázi u vybraného českého izolátu

Isolate information: id-398 (CR 121) - Bordetella PubMLST - Internet Explorer

Query: Search | Profile/ST  
Breakdown: Isolate fields | Scheme/alleles | Publications  
Links: Contents | Home | Options | Profiles/sequences definitions

Full information on isolate CR 121

Provenance/meta data

id: 398  
isolate: CR 121  
alias: CR 84837  
species: B. pertussis  
site: nasopharynx  
disease: pertussis  
country: Czech Republic  
region: South Bohemia  
year: 2008  
host: human

comments: 13 yr-old female; pbxP(3)-pbxA(1)-prnA(2)-fim3(2); supported by IGA MZ CR NT/14058-3  
sender: Jana Zavadilova, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic  
curator: Karen Register, Respiratory Diseases of Livestock Research Unit, USDA/ARS/National Animal Disease Center, Ames, IA, USA (E-mail: karen.register@ars.usda.gov)  
update history: 1 update show details  
date entered: 2015-03-16  
timestamp: 2015-03-16

Schemes and loci

MLST							ST	clonal complex
adk	fumC	glyA	tyrB	icd	pepA	pgm		
1	1	1	3	1	1	1	2	ST-2 complex

## 6 Diskuze

---

### 6.1 Epidemiologická situace a vakcinace

Rozbor epidemiologických charakteristik u dětí do jednoho roku života v ČR v letech 1997 až 2013 prokázal stoupající trend onemocnění, který ve svém vývoji téměř kopíruje trend nemocnosti celé populace. Obdobná situace je rovněž popisována v mnoha dalších zemích, kde došlo k přechodu z celobuněčné vakcíny proti pertusi na vakcínu s acelulární pertusovou složkou. S nárůstem počtu nemocných u adolescentů a dospělých stoupá nemocnost a úmrtnost nejmenších dětí (*WHO, 2014*).

Hlášená onemocnění pertusí v různých zemích vykazují cyklický charakter stejně jako v předvakcinační éře, což znamená, že původce onemocnění, bakterie *Bordetella pertussis*, stále koluje v populaci (*Cherry JD., 2012, Mattoo S. a Chery JD., 2005*). U věkové skupiny dětí do jednoho roku života v ČR v letech 1997 až 2013 se v dlouhodobém trendu hlášené incidence vyskytují tři až čtyřleté epidemické cykly. Tyto cykly korespondují s dlouhodobým cyklickým trendem pertuse v celé české populaci.

Počty hlášených případů mohou být ovlivněny mnoha faktory. Obecně se ale odhaduje, že hlášené případy pertuse tvoří jen malou část skutečného stavu, kolem 1 – 36 % (*Miller E. et al., 2000, Strebel P. et al., 2001, Jenkinson D., 1995*). Nemocnost pertuse je značně podhlášená; studie z Nizozemí dokonce předpokládá, že na 1 hlášený případ připadá 685 případů nehlášených (*de Melker HE J Infect 2006*). V ČR je v počtu hlášených případů stále značný rozdíl, jak podle věku, tak v jednotlivých okresech. Rozdíl je dán mnoha faktory, zejména rozdílným přístupem v aplikaci surveillance pertuse, včetně dostupnosti diagnostikujících laboratoří, možnostmi lékařů cíleně pacienty vyšetřovat a v neposlední řadě spoluprací lékaře a pacienta a zodpovědností pacientů k sobě a ke svému okolí, ochotou lékaře hlásit infekční onemocnění atd. (*Fabiánová K. et al. 2013*).

Ve skupině dospělých jsme v hlášených případech dlouho registrovali dva zřetelné protichůdné směry: na jedné straně výrazný pokles hlášené incidence po devatenáctém roce věku, vzhledem k vysoké incidenci pertuse u teenagerů zdánlivě nelogický, a na



straně druhé zároveň postupně se zvyšující počet případů u adolescentů a dospělých. Nárůst diagnostikovaných případů ve skupině nad 19 let je dán pravděpodobně lepší informovaností o možném výskytu onemocnění u dospělých, a tím i snahou identifikovat původce onemocnění ze strany laické a odborné veřejnosti, než skutečným nárůstem pertuse. Již v roce 1952 zmiňuje profesor Raška možnost pertuse u dospělých a její průběh jako atypický, lehčí. Na tuto možnost se časem zapomnělo a onemocnění zůstávalo a mnohde stále zůstává doménou dětského lékařství a u dospělé populace je tudíž podceňované, nepoznané, podhlášené. Hlavním důvodem paradoxního dlouhodobě sledovaného prudkého poklesu nemocnosti kolem dvacátého roku života bude pravděpodobně - v důsledku změny praktického lékaře - i změna v přístupu k onemocnění, k případné pracovní neschopnosti apod., která vychází od lékařů a pacientů samotných (*Fabiánová K. et al. 2013*).

Hlavním přínosem očkování proti pertusi je snížení rizika závažných průběhů onemocnění u dětí. Prioritou WHO je dosáhnout u všech dětí 90% a vyšší proočkovanosti alespoň třemi dávkami pertusové vakcíny. První dávku WHO doporučuje v 6. týdnu života, následující dvě dávky by měly být v rozestupu 4 - 8 týdnů, přičemž poslední dávka základního očkování by měla být aplikována do 6. měsíce věku (*WHO, 2010*). Obecně platí, že pro ochranu před onemocněním případně před závažným průběhem onemocnění je třeba aplikovat minimálně dvě dávky vakcíny s acelulární pertusovou složkou. Podle švédské studie s počtem dávek klesá incidence onemocnění v populaci dětí do jednoho roku života (*Gustafsson L. et al., 2006*).

Od zahájení celoplošného očkování v ČR v roce 1958 bylo pětidávkové schéma očkování proti pertusi součástí očkovacího kalendáře dětí. Podle údajů poskytovaných WHO se u nás proočkovanost třemi dávkami proti pertusi minimálně v posledních deseti letech udržuje nad hranicí 97 % (*WHO vaccine-preventable diseases: monitoring systém, 2015*). Očkování však neposkytuje celoživotní ochranu. Při rozboru dat o očkování u hlášených případů pertuse v ČR za období 1998 - 2008 bylo zjištěno, že očkováno proti pertusi bylo celkem 90,1 % osob. Kompletní očkování pěti případně více dávkami bylo vykázáno u 75,3 % případů. Ve věkové skupině 10 - 14 let, která měla nejvyšší nemocnost ve sledovaném období, onemocnělo celkem 46,6 % osob.

Všech 5 dávek očkování proti pertusi podle platného schématu bylo aplikováno u 91,3 % případů z této věkové skupiny (*Fabiánová et al., 2009*).

Začátek očkování se v ČR postupně upravoval z původních tří až pěti měsíců dítěte v roce 1958, přes 9. a 13. týden až na 9. týden života v říjnu 2010. Poslední posun v očkování byl mimo jiné způsoben narůstajícím počtem případů pertuse v populaci a zvýšeným rizikem onemocnění pro nejmenší děti. V průběhu období 1997 – 2007 došlo postupně k nahrazování celobuněčné vakcíny očkovací látkou s acelulární pertusovou složkou. V roce 2007 aP vakcína zcela nahradila dosud používanou celobuněčnou očkovací látku proti pertusi.

V českém očkovacím kalendáři je stanoveno, aby první tři dávky vakcíny proti pertusi byly dětem aplikovány do jednoho roku života. Ze sledovaného souboru 265 dětí nebylo před začátkem onemocnění očkováno proti pertusi ani jednou dávkou vakcíny 209 dětí (79 %). Většina neočkovaných dětí však nedosáhla v době onemocnění věku nutného pro zahájení očkování. Kontraindikace očkování mělo 50 dětí. Nejvíce neočkovaných dětí ze sledované skupiny, celkem 75 % dětí (199), onemocnělo během rizikových prvních šesti měsíců života; podle doporučení WHO by ale tyto děti již měly být očkovány třemi dávkami. Podle platného znění očkovací vyhlášky by děti v našem souboru měly být poprvé očkovány mezi 9. až 13. týdnem života. Od ukončeného třetího měsíce do roku života však nebylo ani jednou dávkou očkováno 74 dětí. Z 265 hlášených případů pertuse bylo 56 dětí (21 %) očkováno jednou až třemi dávkami vakcíny proti pertusi: jednou dávkou bylo očkováno 29 dětí, dvěma dávkami 9 dětí a třemi dávkami pertusové vakcíny 18 dětí. V průběhu šesti týdnů onemocnělo po prvním očkování 27 dětí, po druhém očkování 6 dětí. Lze předpokládat, že většina z těchto dětí byla očkována již v inkubační době onemocnění nebo se s onemocněním setkala v krátké době po očkování, pravděpodobně od nejbližších členů rodiny, jak potvrzují recentní studie.

Onemocnění pertusí je pro nejmenší děti závažné svým průběhem a zejména možnými komplikacemi. Proto by děti měly být vždy hospitalizovány a léčeny na specializovaných pracovištích. V USA bylo hospitalizováno více jak 50 % dětí do jednoho roku života, které onemocněly pertusí. Většina z hospitalizovaných dětí byla ve věku do šesti měsíců (*CDC, 2014*). V našem sledovaném souboru bylo v souvislosti

s pertusí hospitalizováno v letech 1997 – 2013 průměrně 75 % dětí. V jednotlivých letech kolísal počet hospitalizovaných dětí od 55 do 100 %. V prvních čtyřech měsících života byla většina dětí hospitalizována s onemocněním, téměř 81 %.

Ve sledovaném období 1997 – 2013 bylo nahlášeno prostřednictvím systému přenosných onemocnění 265 případů pertuse u dětí do jednoho roku života. Většina dětí našeho souboru onemocněla během prvních čtyř měsíců života, téměř 77 % respektive během šesti měsíců života - 87 %, tedy v období, které je z hlediska onemocnění pertusí pro nejmenší děti nejvíce rizikové. Onemocnění nejmenších dětí může probíhat velmi závažně, zejména do 6 měsíců věku, a jejich léčba by vzhledem k možným život ohrožujícím komplikacím měla probíhat vždy ve zdravotnickém zařízení. Závažnost onemocnění pro malé děti potvrdila v roce 2010 největší kalifornská epidemie pertuse za posledních 63 let. Hlášená nemocnost dětí do 6 měsíců byla 441,7/100 000 obyvatel, což představovalo 1257 případů, a zemřelo 10 dětí ve věku  $\leq 2$  měsíce (*California Department of Public Health, 2011*).

V sledovaném souboru dětí v ČR ve věku do jednoho roku života bylo celkem hospitalizováno téměř 75 % dětí, nicméně v průběhu jednotlivých let docházelo k značným výkyvům v počtu hospitalizovaných dětí. U novorozenců a kojenců bývá diagnostika pertuse náročnější, protože u nich často průběh onemocnění neodpovídá typickému klinickému obrazu (*Swamy GK. a Wheeler SM., 2014*) a hrozí tak nebezpečí oddálení správné diagnózy. Časná diagnostika a terapie je v případě pertuse u malých dětí velmi důležitá. Je proto nezbytné použít k laboratornímu potvrzení pertuse u malých dětí všechny dostupné metody, zejména PCR a kultivaci. V případě kultivace *B. pertussis* je žádoucí posílat izoláty do NRL pro difterii a pertusi Státního zdravotního ústavu Praha k další charakterizaci. Při anamnéze a diagnostice u malých dětí je nutné pátrat i po zdravotním stavu, případně onemocnění blízkých kontaktů dítěte.

Podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví ČR č. 306/2012 Sb. by měl být každý případ akutní pertuse hospitalizován. Je to důležitý požadavek zejména z epidemiologického hlediska; včasná izolace nemocného a cílená antibiotická terapie zabrání šíření onemocnění na další osoby. Dlouhodobě je však v ČR průměrně ročně hospitalizováno ze všech hlášených osob s pertusí pouze 10 %. Malý počet hospitalizovaných osob s pertusí svědčí zejména o problematické a pozdní diagnóze onemocnění, na které se

podílí mnoho faktorů (*Fabiánová K., 2011*). Adolescenti a dospělí se tak stávají zdrojem onemocnění pro své okolí. Pro nejmenší děti jsou nejčastějším zdrojem pertuse právě rodinní příslušníci a příbuzní (*Bisgard KM. et al., 2004, Schellekens J. et al., 2005, Kretsinger K. et al., 2006, Wendelboe AM. et al., 2007, Wendelboe AM. et al., 2007*).

Od roku 1919 byly na území bývalého Československa hlášeny ročně desítky až stovky případů úmrtí v souvislosti s pertusí. Procházka a Kryl v časopise *Praktický lékař* z roku 1959 uvedli, že v letech 1949 – 1956 zemřelo v souvislosti s pertusí 2972 osob, z toho 96 % byly děti do tří měsíců věku (*Procházka J. a Kryl R., 1959*). Jejich data jsou poněkud odlišná od dat úmrtnosti v ČSÚ. V dostupných datech o úmrtích na pertusi docházelo a dochází k diskrepancím, které jsou způsobeny zejména historickými změnami ve způsobu hlášení a určování primární příčiny úmrtí, která ne vždy respektuje základní onemocnění. Příkladem je následující dohlášení úmrtí v roce 2012. Úmrtí v souvislosti s pertusí bylo dohlášeno u neočkovaného dítěte z roku 2008. Jednalo se o čtyřtýdenní dívku, narozenou ve 36. gestačním týdnu, která byla hospitalizována pro akutní bronchitidu s následným rozvojem fatální rozsáhlé bilaterální pneumonie. Úmrtí v souvislosti s pertusí bylo dohlášeno po epidemiologickém šetření na základě laboratorních výsledků dítěte a členů rodiny po čtyřech letech (*Fabiánová K. et al. 2013*).

Zavedením chloramfenikolu do léčby pertuse a celoplošného očkování v padesátých letech minulého století došlo rychle k výraznému poklesu incidence a dětské úmrtnosti. Od roku 1960 do roku 1983 bylo zaznamenáno celkem 21 úmrtí v souvislosti s pertusí. Od roku 1984 do roku 2004 nebylo hlášeno žádné úmrtí. U studovaného souboru dětí byla v průběhu 17 let registrována 4 úmrtí; v letech 2005, 2007, 2008 a 2009, kdy v souvislosti s pertusí zemřely čtyři dosud neočkované děti. Ve třech případech se jednalo o děti, které byly věkově příliš malé pro zahájení očkování, ve čtvrtém případě bylo zahájení očkování odloženo pro respirační infekci, který však byl již katarálním stadiem pertuse. Podle epidemiologického šetření byl ve všech případech zdroj onemocnění v rodině.

Sledování hladiny a dynamiky transplacentárně přenesených protilátek proti pertusi prokázalo, že ve 4. týdnu života má protilátky již pouze 21 % dětí a ve 2. měsíci života

je většina dětí naprosto bez obranných látek proti onemocnění způsobeném *B. pertussis*. Biologický poločas pasivně získaných mateřských protilátek je totiž relativně krátký (*Esposito S. et al., 2012, Castagnini LA. et al. 2012, Vysoká-Buriánová B., 1961*). Tato skutečnost byla jedním z důvodů posunu zahájení očkování v České republice v říjnu 2010 do 9. týdne života. Koncentrace protilátek v pupečnickové krvi je vyšší než v krvi mateřské, což svědčí o aktivním transplacentárním přenosu. Výše hladiny protilátek a tím míra protektivity pro miminko je závislá na řadě faktorů, mimo jiné na době, která uplynula od očkování matky (*Bechini A. et al., 2012*). Významně vyšší hladiny protilátek mají novorozenci, jejichž matka byla proti pertusi očkována v graviditě (*Gall SA. et al., 2011*). V řadě zemí, například v USA, Kanadě, Velké Británii, Izraeli, Islandu, bylo od roku 2010 postupně doporučeno a zahájeno očkování těhotných žen vakcínou s acelulární pertusovou složkou se snížením množstvím antigenů (Tdap). Podle recentních studií neredukuje očkování matek po porodu a „cocoon“ strategie onemocnění pertusí u dětí do 6 měsíců věku. Očkování těhotných Tdap vakcínou v kombinaci s „cocoon“ strategií se proto doporučuje v mnoha státech jako nejúčinnější metoda, která snižuje morbiditu a mortalitu nejmenších dětí.

Vzhledem k nárůstu pertuse v České republice je nutné a nezbytné pro ochranu nejmenších dětí udržet i nadále co nejvyšší proočkovanost a zavést taková opatření, která by minimalizovala přenos pertuse na neočkované děti. Znamená to co nejlépe využít současné dostupné vakcíny proti pertusi. Doporučení pro očkování těhotných žen je nadějně řešení, než budou k dispozici vakcíny nové generace.

## **6.2 Antigenní variabilita kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v České republice**

Sekvenací oblastí genomu *ptxP*, *ptxA*, *prnA* a *fim3* u kmenů *B. pertussis* izolovaných v ČR byly potvrzeny změny alelických variant těchto oblastí. Výskyt kmenů nesoucích nové alelické varianty narůstal po roce 1995 na úkor kmenů nesoucích varianty původní.

Změny ve struktuře antigenních determinant *B. pertussis*, které vedou ke zvýšení odolnosti kmenů cirkulujících v hostitelské populaci vůči selekčnímu tlaku

postvaccinačních protilátek, mohou být jednou z příčin narůstající incidence pertuse v populacích s vysokou proočkovaností (Mooi FR., 2010).

Nejčastější alelický profil *ptxA(1)*, *ptxP(3)*, *prnA(2)*, *fim3(2)* a *fim2(1)* současně cirkulujících kmenů ve světě je odlišný od profilu kmenů použitých k výrobě vakcíny (Litt DJ. *Et al.*, 2009, Van Loo IH. a Mooi FR., 2002). Navíc přibývají izoláty, které neexprimují PRN (Bouchez V. *et al.*, 2009, Lam C. *et al.*, 2014).

Alelická varianta *ptxP(3)* v současnosti ve světě dominuje (Kallonen T. a He Q., 2009) a některé studie indikují, že kmeny s přítomností varianty *ptxP(3)* mají zvýšenou virulenci ve srovnání s kmeny s variantou *ptxP(1)* (King AJ. *et al.*, 2013).

Nejnovější studie ve Velké Británii prokázala, že geny kódující antigeny aP vakcíny se mění více, než geny ostatních povrchových proteinů. Toto platilo již před zavedením očkování proti pertusi, ale po zavedení aP vakcíny jsou tyto změny více vyjádřeny (Sealy KL. *Et al.*, 2014).

V zemích s dlouhodobě vysoce proočkovanou populací se po nárůstu incidence pertuse začala sledovat genetická variabilita oblastí kódujících antigenní determinanty nebo faktory patogenity (Mooi FR. *et al.*, 1998, Mooi FR. *et al.*, 1999, Fry NK. *et al.*, 2001, Hallander HO. *et al.*, 2005, Gzyl A. *et al.*, 2001). Významná variabilita byla zjištěna v oblastech kódujících S1 podjednotku PT, promotor genu pro PT, oblast 1 genu pro PRN, velkou podjednotku fimbrií typu 2 a 3 (van Loo IH. *et al.*, 2002, Litt DJ *et al.*, 2009).

Nejrozšířenější aP vakcína, používaná k plošné vakcinaci také v ČR, obsahuje antigeny připravené z typového kmene Tohama I. Tento kmen je nositelem alelických variant *ptxP(1)*, *ptxA(2)* a *prnA(1)* (Bart MJ. *et al.*, 2014), tedy těch, které jsou v populaci *B. pertussis* na území ČR na ústupu, případně již vymizely. To může být příčinou snížené účinnosti aP vakcíny.

Výsledky naší studie odpovídají nálezům v dalších evropských i mimoevropských regionech s dlouhodobě vysokou proočkovaností populace. Růst hlášené nemoci pertuse v ČR, způsobené kromě dalších faktorů také antigenně změněnými kmeny, současné aP vakcíny dlouhodobě neovlivní.

### 6.3 Minimální inhibiční koncentrace u kmenů *B. pertussis*

K vyšetření minimální inhibiční koncentrace antibiotik bylo poskytnuto 70 klinických izolátů *B. pertussis*, které byly v programu národní surveillancce pertuse doručeny do Národní referenční laboratoře pro pertusi a difterii v letech 1967 až 2010. Soubor se podle našich výsledků jeví jako homogenní co se týče MIC antibiotik, neboť všechny kmeny byly inhibovány dvěma - třemi nízkými koncentracemi antibiotik. Nebyl tudíž potvrzen žádný kmen inhibovaný vyšší koncentrací erytromycinu ani žádného jiného ze čtyř dalších vyšetřovaných antibiotik.

K antibiotické terapii pertuse se používal chloramfenikol, později erytromycin. Přes převážně dobrou klinickou odpověď na léčbu infekcí způsobených *B. pertussis* byl erytromycin pro výskyt nežádoucích účinků posléze nahrazen lépe snášeným klaritromycinem nebo azitromycinem (Mandell GL. et al., 2009, John Hopkins POC-IT Guides, Hoppe JE., 1996, Mertsola J. a He Q.).

Selhání léčby u pertuse se vyskytuje zcela vyjíměčně. Nicméně od roku 1982 je zaznamenáván sporadický výskyt kmenů *B. pertussis* rezistentních k erytromycinu (Bannatyne RM. a Cheung R., 1982, Bannatyne RM. a Cheung R., 1984, Lewis K. et al., 1995, Korgenski K. a Daly JA., 1997, Hill BC. et al., 2000, Yao SM. et al., 2008). Podrobné analýzy většiny takových případů ukázaly jako pravděpodobnou příčinu selhání léčby nedostatečnou imunologickou kompetenci pacienta infikovaného kmenem *B. pertussis*, který byl *in vitro* inhibován nízkými koncentracemi příslušných antibiotik používanými k jeho léčbě (Hoppe JE., 1996, Halsey N. et al., 1980). Vzhledem k tomu, že tyto rezistentní kmeny vesměs vznikly mutací v genu 23S rRNA (Bartkus JM. et al., 2003), nehrozí jejich epidemické rozšíření, jak by tomu mohlo být u rezistence způsobené geny vázanými na plazmidu, nicméně pro heterogenní charakter rezistence mohou takové kmeny unikat pozornosti.

Pro dobrý klinický efekt antibiotik volby a předpokládanou citlivost původce k těmto a mnoha jiným antibiotikům se nedoporučuje provádět rutinní vyšetření antibiotické citlivosti, neboť standardní metoda doposud není k dispozici, získané výsledky jsou obvykle zatíženy inherentními chybami a v rutinní praxi mají nízkou reprodukovatelnost. Příčinou jsou nutriční nároky a nízká růstová rychlost *B. pertussis*.

Existuje nejednotnost v doporučených metodách pro vyšetření citlivosti *B. pertussis*, ve volbě půdy, druhu krve a její koncentrace v půdě, a v koncentraci inokula (*Mertsola J. a He Q., Hoppe JE. a Tschirner T., 1995, Hoppe JE. a Paulus T., 1998*).

Přes tyto nesnáze se doporučuje provádět surveillance antibiotické citlivosti kmenů *B. pertussis* izolovaných z geograficky definovaného území v laboratoři, která má potřebné zkušenosti s vyšetřením MIC náročných bakterií. Je nutno zvolit půdu, obsah a druh krve dodávané do půdy, která umožňuje dostatečný růst kmenů, neinterferuje však s účinností antibiotik. V tomto uspořádání lze získat výsledky, které informují o dynamice účinku antibiotik v definované populaci bakterií a zachytit výskyt kmenů, které jsou inhibovány vyššími koncentracemi antibiotik.



## 7 Závěr a zhodnocení cílů

---

Soubor izolátů *Bordetella pertussis* z ČR použitý v práci je jedinečný svým rozsahem a délkou období, které pokrývá. Studium sbírkových a recentních izolátů *B. pertussis* metodami molekulární biologie poskytlo řadu prioritních výsledků, které byly publikovány.

Byly potvrzeny změny alelických variant genomu *ptxP*, *ptxA*, *prnA* a *fim3* u kmenů *B. pertussis* izolovaných v ČR v období 1967 – 2015. Bylo zjištěno, že výskyt kmenů *B. pertussis* v ČR nesoucích nové alelické varianty narůstá po roce 1995, tedy v souladu s celkovou hlášenou nemocností pertuse.

Sekvenací oblastí genomu *ptxP*, *ptxA*, *prnA* a *fim3* u kmenů *B. pertussis* byly potvrzeny změny alelických variant těchto oblastí. Výskyt kmenů nesoucích nové alelické varianty narůstá po roce 1995 na úkor kmenů nesoucích varianty původní. Výsledky studie lze interpretovat jako částečný genetický únik patogenních kmenů *B. pertussis* mimo účinnost pertusových vakcín.

MLVA analýzou souboru kmenů *B. pertussis* izolovaných z klinického materiálu na území ČR v období 1967-2015 byl prokázán pokles genetické diverzity ve studované populaci a změny v zastoupení a četnosti jednotlivých MLVA typů. Tyto změny lze charakterizovat jako postupný nárůst výskytu celosvětově rozšířených MT v České republice na úkor MT regionálně unikátních. Převažujícím MLVA typem je MT27. Tento vývoj je možné pozorovat celosvětově v oblastech s dlouhodobě proočkovanou populací proti pertusi.

Bylo zjištěno, že vybrané izoláty *B. pertussis* nevykazovaly při studiu metodou MLST klonální diverzitu; podél celého studovaného období vykazovaly jednotný sekvenční typ ST-2. Bylo konstatováno, že metoda MLST jako málo diskriminační je nevhodná pro detailnější typizaci pertusových kmenů.

Metodami molekulární biologie jsme prokázali, že v ČR se vyskytují nové klony *B. pertussis* vzniklé selektivním tlakem vakcinace s vlastnostmi, které jim umožňují vyhnout se dostatečné účinnosti používaných vakcín.

Data získaná metodami molekulární biologie byla poskytnuta do mezinárodních databází (MLST, MLVA) k ověření a registraci.

Bylo zjištěno, že soubor izolátů *B. pertussis* z ČR je homogenní co se týče minimální inhibiční koncentrace antibiotik, neboť všechny kmeny byly inhibovány jednou až třemi nízkými koncentracemi antibiotika. Nebyl tudíž potvrzen žádný kmen inhibovaný vyšší koncentrací erytromycinu ani žádného jiného ze čtyř dalších vyšetřovaných antibiotik.

Rozborem epidemiologické situace bylo potvrzeno, že v ČR od 90. let minulého století stoupá nemocnost pertusí ve všech věkových kategoriích. Nárůst hlášených případů pertuse v české populaci je spojen se zvýšenou nemocností nejmenších dětí, včetně hospitalizace a komplikací spojených s onemocněním. Většina dětí do jednoho roku života v ČR onemocní pertusí během prvních tří měsíců života, tedy ještě před zahájením pravidelného očkování.

Ministerstvu zdravotnictví ČR byl v průběhu řešení projektu předložen návrh doporučení k upřesnění vakcinační strategie proti pertusi v ČR. Na základě dlouhodobého vzestupného trendu nemocnosti pertusí u dětí do jednoho roku života v ČR jsme vypracovali doporučení pro očkování těhotných žen proti pertusi a předložili Ministerstvu zdravotnictví ČR. Po projednání odbornými společnostmi bylo doporučení dne 8. 12. 2015 publikováno na stránkách Národní imunizační komise při Ministerstvu zdravotnictví ČR.

## 8 Souhrn

---

Cílem bylo zdokumentovat vývoj a výskyt onemocnění pertusí v ČR zejména s ohledem na pertusí nejohroženější skupinu dětí do jednoho roku života. Součástí práce bylo zodpovězení otázky, zda recentní vzestup nemocnosti v ČR není způsoben novými liniemi *B. pertussis*, proti nimž jsou současné vakcíny neúčinné, a zda jsou cirkulující kmeny *B. pertussis* citlivé na antibiotika volby.

Byla použita data o výskytu pertuse ze surveillance programu. Do studovaného souboru bylo zařazeno 265 dětí ve věku do jednoho roku života s laboratorně potvrzeným onemocněním pertusí z období 1997 – 2013.

Izoláty *B. pertussis* získané v rámci surveillance pertuse byly vyšetřeny molekulárně biologickými metodami – MAST, MLVA a MLST.

Bylo provedeno stanovení citlivosti kmenů *B. pertussis* izolovaných od pacientů v letech 1967 – 2010 k základním antibiotikům pro léčbu pertuse.

Rozborem epidemiologické situace bylo potvrzeno, že v ČR stoupá od 90. let minulého století nemocnost pertusí ve všech věkových kategoriích, včetně dětí do jednoho roku života. Téměř 77 % dětí onemocnělo pertusí během prvních čtyř měsíců života ještě před zahájením pravidelného očkování; 79 % dětí nebylo před začátkem onemocnění očkováno proti pertusi ani jednou dávkou vakcíny.

Metodami molekulární biologie bylo prokázáno, že v ČR se vyskytují nové klony *B. pertussis* vzniklé selektivním tlakem vakcinace s vlastnostmi, které jim umožňují vyhnout se dostatečné účinnosti používaných vakcín.

Ve sbírce českých izolátů nebyl potvrzen žádný kmen *B. pertussis* inhibovaný vyšší koncentrací erytromycinu, klaritromycinu, azitromycinu, ciprofloxacinu ani kotrimoxazolu.

K lepšímu monitorování situace byla u dětí s potvrzeným onemocněním pertusí do jednoho roku života od 1. 1. 2015 zavedena zvýšená surveillance ve spolupráci s Ministerstvem zdravotnictví a krajskými epidemiology. Ministerstvu zdravotnictví byl předložen návrh doporučení pro očkování těhotných žen proti pertusi v ČR.

## 9 Summary

---

The aim was to document the trend in pertussis in the Czech Republic (CR) with regard to the infant population under one year of age, which is at highest risk for pertussis. Another point was to answer two questions: 1) whether the recent rise in pertussis cases in the CR is caused by new lineages of *B. pertussis*, against which the available vaccines are not effective, and 2) whether the circulating strains of *B. pertussis* are susceptible to antibiotics of choice.

Data on pertussis cases were derived from the surveillance programme. Two hundred and sixty-five children under one year of age with laboratory confirmed pertussis, diagnosed between 1997 and 2013, were included in the study. *B. pertussis* isolates obtained within the surveillance of pertussis were examined by molecular biological methods – MAST (multiantigen sequence typing), MLVA (multilocus variable-number tandem-repeat analysis), and MLST (multilocus sequence typing). *B. pertussis* strains isolated from patients between 1967 and 2010 were tested for susceptibility to first-line antibiotics for the treatment of pertussis.

The analysis of the epidemiological situation confirmed an upward trend in pertussis in the CR since the 1990s in all age categories, including children under one year of age. Nearly 77 % of children acquired pertussis during the first four months of life before receiving the vaccine; 79 % of children with pertussis were not even recipients of a single dose of pertussis vaccine.

Molecular biological methods revealed new clones of *B. pertussis* in the CR, that emerged under vaccine selection pressure, with properties enabling vaccine escape.

No strain of *B. pertussis* from the collection of Czech isolates required a higher concentration of erythromycin, clarithromycin, azithromycin, ciprofloxacin, or cotrimoxazole for inhibition.

To improve the monitoring of the situation, enhanced surveillance of children under one year of age with confirmed pertussis has been implemented in cooperation with the Ministry of Health and regional epidemiologists since 1 January 2015. The proposal of the recommendation for pertussis vaccination in pregnancy was submitted to the Ministry of Health of CR.

## 10 Seznam obrázků, tabulek a grafů

---

Obr. č. 1: Fylogenetický dendrogram rodu *Bordetella*.

Obr. č. 2: Úmrtnost na dávivý kašel v Československé republice v letech 1890 – 1928.

Obr. č. 3: Očkovací kalendář, očkování proti pertusi, děti 0 – 9 let v 31 evropských státech, duben 2016, ECDC.

Obr. č. 4: Doporučené očkování proti pertusi u populace nad 9 let v 31 evropských státech, duben 2016, ECDC.

Obr. č. 5: Ukázka registrace českých izolátů *Bordetella pertussis* v celosvětové MLST databázi

Obr. č. 6: Ukázka údajů v MLST databázi u vybraného českého izolátu

Tab. č. 1: Hlavní biologicky aktivní látky *B. pertussis*.

Tab. č. 2: Doporučená laboratorní diagnostika pertuse v závislosti na délce trvání příznaků u očkovaných dětí a dospělých.

Tab. č. 3 Nejdůležitější změny v populaci *B. pertussis* za posledních 60 let spojené se změnami 4 genů

Tab. č. 4: Složení očkovacích látek používaných v ČR s acelulární pertusovou složkou

Tab. č. 5: Srovnání poklesu nemocnosti, počtu hospitalizovaných dětí a počtu úmrtí kojenců u žen očkovaných proti pertusi v těhotenství a po porodu.

Tab. č. 6: Složení očkovacích látek používaných v ČR s acelulární pertusovou složkou

Tab. č.7: Přehled výsledků MAST analýzy

Graf č. 1: Pertuse, ČR, hlášená nemocnost (semilogar.) na 100 000 obyvatel, 1954 - 2015

Graf č. 2: Pertuse, celková incidence a incidence u dětí do 1 roku života na 100 000 obyvatel, ČR, 1997 – 2013

Graf č. 3: Pertuse, počet dávek očkování u dětí do jednoho roku života podle dosaženého měsíce věku před onemocněním, ČR, 1997 – 2013

Graf č. 4: Pertuse, hospitalizace u dětí do jednoho roku života podle dosaženého měsíce věku, ČR, 1997 – 2013

## 11 Seznam použité literatury

---

1. Advani A, Gustafsson L, Ahrén C, Mooi FR, Hallander HO. Appearance of Fim3 and ptxP3-Bordetella pertussis strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine*. 2011;29(18):3438-42.
2. Advani A, Hallander HO, Dalby T, Krogfelt KA, Guiso N, Njamkepo E, von Könning CH, Riffelmann M, Mooi FR, Sandven P, Lutynska A, Fry NK, Mertsola J, He Q. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of Bordetella pertussis isolates circulating in Europe from 1998 to 2009. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):422-8.
3. Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Donegan K, Fry NK, Miller E, Ramsay M. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet*. 2014;384(9953):1521-8.
4. Anonym. Effect of a low pertussis vaccination uptake on a large community. Report from the Swansea Research Unit of The Royal College of General Practitioners. *Br Med J*. 1981;282(6257):23-6.
5. Anonym. International Notes Pertussis – England and Wales. *MMWR*. 1982;31(47):629-31.
6. Aricò B, Rappuoli R. Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol*. 1987;169(6):2847-53.
7. Bakoss P. *Epidemiológia*. Bratislava: Univerzita Komenského, 2005. 488 s. ISBN 80-223-1989-9.
8. Bannatyne RM, Cheung R. Antibiotic resistance of degraded strains of Bordetella pertussis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984;25(4):537-8.
9. Bannatyne RM, Cheung R. Antimicrobial susceptibility of Bordetella pertussis strains isolated from 1960 to 1981. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;21(4):666-7.
10. Baptista PN, Magalhaes VS, Rodrigues LC. The role of adults in household outbreaks of pertussis. *Int J Infect Dis*. 2010;14(2):e111-4.
11. Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, He Q. Appearance of Bordetella pertussis strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(10):1703-4.

12. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *Mbio*. 2014;5(2):e01074. [online]. [cit. 2014–12–20]. Dostupný na [www:http://mbio.asm.org/content/5/2/e01074-14.full.pdf+html](http://mbio.asm.org/content/5/2/e01074-14.full.pdf+html).
13. Bartkus JM, Juni BA, Ehresmann K, Miller CA, Sanden GN, Cassiday PK, Saubolle M, Lee B, Long J, Harrison AR Jr, Besser JM. Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):1167–72.
14. Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 2000;68(4):1934-41.
15. Bechini A, Tiscione E, Boccalini S, Levi M, Bonanni P. Acellular pertussis vaccine use in risk groups (adolescents, pregnant women, newborns and health care workers): a review of evidences and recommendations. *Vaccine*. 2012;30(35):5179-90.
16. Belloni C, De Silvestri A, Tinelli C, Avanzini MA, Marconi M, Strano F. et al. Immunogenicity of a three-component acellular pertussis vaccine administered at birth. *Pediatrics*. 2003;111(5 Pt 1):1042-5.
17. Bidet P, Liguori S, De Lauzanne A, Caro V, Lorrot M, Carol A, Faye A, Guiso N, Bingen E, Bonacorsi S. Real-Time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3636-8.
18. Bille E, Lesage F, Guiso N, Quesne G, Berche P, Le Monnier A. *Bordetella bronchiseptica*-associated acute chest syndrome in a child with sickle cell disease. *Archives de Pediatrie*. 2011;18(1):41-4.

19. Bisgard KM, Pascual FB, Ehresmann KR, Miller CA, Cianfrini C, Jennings CE, Rebmann CA, Gabel J, Schauer SL, Lett SM. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(11):985-9.
20. Bjørnstad ON, Harvill ET. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. *Trends Microbiol.* 2005;13(8):355-9.
21. Blechová Z. Opomíjená infekce – pertuse. *Pediatr. pro praxi.* 2008;9(4):223-6.
22. Bodilis H, Guiso N. Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(3):471-4.
23. Bonhoeffer J, Bär G, Riffelmann M, Solèr M, Heininger U. The role of *Bordetella* infections in patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Infection.* 2005;33(1):13-7.
24. Bortolussi R, Miller B, Ledwith M, Halperin S. Clinical course of pertussis in immunized children. *Ped Infect Dis J.* 1995;14(10):870-4.
25. Bos AC, Beemsterboer P, Wolfs TF, Versteegh FG, Arets HG. *Bordetella* species in children with cystic fibrosis: what do we know? The role in acute exacerbations and chronic course. *J Cyst Fibros.* 2011;10(5):307-12.
26. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. *Vaccine.* 2009;27(43):6034-41.
27. Broome CV, Fraser DW. Pertussis in the United States, 1979: a look at vaccine efficacy. *J Infect Dis.* 1981;144(2):187-90.
28. Brown NJ, Berkovic SF, Scheffer IE. Vaccination, seizures and 'vaccine damage'. *Curr Opin Neurol.* 2007;20(2):181-7.
29. Bryant KA, Humbaugh K, Brothers K, Wright J, Pascual FB, Moran J, Murphy TV. Measures to control an outbreak of pertussis in a neonatal intermediate care nursery after exposure to a healthcare worker. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006;27(6):541-5.
30. California Department of Public Health. Pertussis report, April 13, 2011. 2011. [cit. 2012-07-30] Dostupný na [www: http://www.cdph.ca.gov/programs/immunize/Documents/PertussisReport2011-04-13.pdf](http://www.cdph.ca.gov/programs/immunize/Documents/PertussisReport2011-04-13.pdf).



31. Carbonetti NH, Artamonova GV, Mays RM, Worthington ZE. Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 2003;71(11):6358-66.
32. Cassiday P, Sanden G, Heuvelman K, Mooi F, Bisgard KM, Popovic T. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis*. 2000;182(5):1402-8.
33. Castagnini LA, Healy CM, Rench MA, Wootton SH, Munoz FM, Baker CJ. Impact of maternal postpartum tetanus and diphtheria toxoids and acellular pertussis immunization on infant pertussis infection. *Clin Infect Dis*. 2012;54(1):78-84.
34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases, The Pink Book*. 12th edn. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention: April 2011. [online] [cit. 2015-10-08] Dostupný na [www: http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pert.pdf](http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pert.pdf).
35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2012 Final Pertussis Surveillance Report. [online] [cit. 2014-08-08] Dostupný na [www: http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html](http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html).
36. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013 Provisional Pertussis Surveillance Report. [online] [cit. 2014-08-08] Dostupný na [www: http://www.cdc.gov/pertussis/-surveillance-report.pdf](http://www.cdc.gov/pertussis/-surveillance-report.pdf).
37. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013;62(07):131-5.
38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis (Whooping cough). [online]. [cit. 2014-08-10] Dostupný na [www: http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/complications.html](http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/complications.html).
39. Clarke M, McIntyre PB, Blyth CC, Wood N, Octavia S, Sintchenko V, Giles L, Quinn H, Hill V, Hanly G, Lan R, Marshall HS. The relationship between *Bordetella pertussis* genotype and clinical severity in Australian children with pertussis. *J Infect*. 2016;72(2):171-8.

40. Committee on Obstetric Practice. ACOG Committee Opinion No. 521: Update on immunization and pregnancy: tetanus, diphtheria, and pertussis vaccination. *Obstet Gynecol.* 2012;119(3):690-1.
41. Conrad DA., Jenson HB. Using acellular pertussis vaccines for childhood immunization: Potential benefits far outweigh potential risks. *Postgrad Med.* 1999;105(7):165-78.
42. Cookson BT, Vandamme P, Carlson LC, Larson AM, Sheffield JVL, Kersters K, Spach DH. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, „*B. hinzii*“. *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2569-71.
43. Coudeville L, Van Rie A, Andre P. Adult pertussis vaccination strategies and their impact on pertussis in the United States: evaluation of routine and targeted (cocoon) strategies. *Epidemiol Infect.* 2008;136(5):604-20.
44. Cowan LD, Griffin MR, Howson CP, Katz M, Johnston RB Jr, Shaywitz BA, Fineberg HV. Acute encephalopathy and chronic neurological damage after pertussis vaccine. *Vaccine.* 1993;11(14):1371-9.
45. Crowcroft NS, Pebody RG. Recent developments in pertussis. *Lancet.* 2006;367(9526):1926-36.
46. Čáp P, Vondra V, a kolektiv. Akutní a chronický kašel. Teorie a praxe. 1. vyd. Praha: Mladá Fronta, 2013. 159 s. ISBN 978-80-204-2814-1.
47. Čelko A, Buriánová B, Maixnerová M, Stříbrný J, Zikmundová V, Zikmund V. Transplacental antibodies. Part I: Maternal antibodies against *B. pertussis* and *B. parapertussis*. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1984;28(4):465-9.
48. Da Silva FR, M. De Albuquerque Navarro BM, L.T. Pinto LA, De-Simone SG. An overview of pertussis reemergence and evidence of its resurgence in Brazil. *Rev Patol Trop.* 2014;43(2): 151-62.
49. Daxboeck F, Georzer E, Apfalter P, Nehr M, Krause R. Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. *Diabet Med.* 2004;21(11):1247-8.
50. De Greef SC, Mooi FR, Westerhof A. Pertussis disease burden in the household: how to protect young infants. *Clin Infect Dis.* 2010;50(10):1339-45.
51. de Melker HE, Versteegh FG, Schellekens JF, Teunis PF, Kretzschmar M. The incidence of *Bordetella pertussis* infections estimated in the population from a combination of serological surveys. *J Infect.* 2006;53(2):106-13.

52. De Serres G, Shadmani R, Duval B, Boulianne N, Déry P, Douville Fradet M, Rochette L, Halperin SA. Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *J Infect Dis.* 2000;182(1):174-9.
53. Deville JG, Cherry JD, Christenson PD, Pineda E, Leach CT, Kuhls TL, Viker S. Frequency of unrecognized *Bordetella pertussis* infections in adults. *Clin Infect Dis.* 1995;21(3):639-42.
54. Dlhý J. Administrativní kontrola proočkovanosti v České republice k datu 31.12.2010. Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha). 2012;21(3):92-7.
55. Donegan K, King B, Bryan P. Safety of pertussis vaccination in pregnant women in UK: observational study. *BMJ.* 2014;349:g4219.
56. Donoso A, León J, Ramírez M, Rojas G, Oberpaur B. Pertussis and fatal pulmonary hypertension: a discouraged entity. *Scand J Infect Dis.* 2005;37(2):145-8.
57. Edwards KM, Decker MD. Pertussis Vaccines. In Plotkin SA, Orenstein WA. Vaccines. 6th edn. Philadelphia: Saunders, 2013. p.447-92. ISBN-13: 9781455700905.
58. El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, Osicka R, Sebo P, Ladant D, Leclerc C. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38514-21.
59. Elomaa A, Advani A, Donnelly D, Antila M, Mertsola J, Hallander H, He Q. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):3681-7.
60. Esposito S, Bosis S, Morlacchi L, Baggi E, Sabatini C, Principi N. Can infants be protected by means of maternal vaccination? *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl 5:85-92.
61. Fabiánová K. Pertuse a současné možnosti očkování. *Vakcinologie.* 2011;5(3):116-26.
62. Fabiánová K, Beneš Č, Kříž B. A steady rise in incidence of pertussis since nineties in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2010;59(1):25-33

1. Fabiánová K, Zavadilová J, Šebestová H, Gašpárek M, Kříž B. Syndrom dávivého kašle. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2015 - epidemiologická situace. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2016;25(2):65-70.
63. Fabiánová K, Zavadilová J, Šebestová H, Beneš Č, Kříž B. Syndrom dávivého kašle. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2014 – rozbor epidemiologické situace. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2015;24(5):172-7.
64. Fabiánová K, Beneš Č, Šebestová H, Kříž B. Pertuse v České republice v roce 2013 – rozbor epidemiologické situace. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2014; 23(3):97–104.
65. Fabiánová K, Beneš Č, Šebestová H, Kynčl J, Částková J, Zavadilová J, Lžičarová D, Kříž B. Pertuse v ČR v roce 2012 – rozbor epidemiologické situace. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2013;22(2):55-61.
66. Fabiánová K, Zavadilová J, Beneš Č, Kříž B. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2011. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2012;21(3):97-102.
67. Fabiánová K, Zavadilová J, Beneš Č, Kříž B. Pertuse v České republice v roce 2010. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2011;20(1):27-32.
68. Fabiánová K, Kříž B, Beneš Č. Vývoj onemocnění pertusí v ČR v letech 1982-2009. Zprávy EM (SZÚ, Praha). 2009;18(12):368-70.
69. Fabiánová K, Beneš Č. Situace ve výskytu dávivého kašle (A37.0) v České republice v roce 2008. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2009;18(3):95-9.
70. Forsyth KD, Wirsing von Konig CH, Tan T, Caro J, Plotkin S. Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine*. 2007;25(14):2634-42.
71. Frumkin K. Pertussis and persistent cough: practical, clinical and epidemiologic issues. *J Emerg Med*. 2013;44(4):889-95.
72. Fry NK, Duncan J, Edwards MT, Tilley R, Chitnavis D, Harman R, Hammerton H, Dainton L. A UK clinical isolate of *Bordetella hinzii* from a patient with myelodysplastic syndrome. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 12):1700-3.
73. Fry NK, Neal S, Harrison TG, Miller E, Matthews R, George RC. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect Immun*. 2001;69(9):5520-8. Erratum in: *Infect Immun* 2001;69(10):6564.

74. Gall SA, Myers J, Pichichero M. Maternal immunization with tetanus-diphtheria-pertussis vaccine: effect on maternal and neonatal serum antibody levels. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204(4):334.
75. Gehanno JF, Pestel-Caron M, Marguet C, Nouvellon M, Gueit I. 1998. Pertussis outbreak in an outpatient hospital staff. *Arch Pediatr.* 1998;5(1):92-3.
76. Gehanno JF, Pestel-Caron M, Nouvellon M, Caillard JF. Nosocomial pertussis in healthcare workers from a pediatric emergency unit in France. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999;20(8):549-52.
77. Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect.* 2001;3(1):61-72.
78. Giammanco A, Chiarini A, Stroffolini T, De Mattia D, Chiaramonte M, Moschen ME, Mura I, Rigo G, Taormina S, Sarzana A, et al. Seroepidemiology of pertussis in Italy. *Rev Infect Dis.* 1991;13(6):1216-20.
79. Gilberg S, Njamkepo E, Du Châtelet IP, Partouche H, Gueirard P, Ghasarossian C, Schlumberger M, Guiso N. Evidence of *Bordetella pertussis* infection in adults presenting with persistent cough in a french area with very high whole-cell vaccine coverage. *J Infect Dis.* 2002;186(3):415-8.
80. Glanz JM, McClure DL, Magid DJ, Daley MF, France EK, Salmon DA, Hambidge SJ. Parental refusal of pertussis vaccination is associated with an increased risk of pertussis infection in children. *Pediatrics.* 2009;123(6):1446-51.
81. Gonik B, Puder KS, Gonik N, Kruger M. Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies in mothers and their newborn infants. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005;13(2):59-61.
82. Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev.* 1980;44(4):722-38.
83. Grimpel E, Begue P, Anjak I, Njamkepo E, Francois P, Guiso N. Long-term human serum antibody responses after immunization with whole-cell pertussis vaccine in France. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3(1):93-7.
84. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann, Von König CHW. 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.

85. Guiso N. Bordetella pertussis: why is it still circulating? *J Infect.* 2014;68(Suppl 1):S119-24.
86. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med.* 1996;334(6):349-55. Erratum in: *N Engl J Med.* 1996;334(18):1207.
87. 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.
88. Gzyl A, Augustynowicz E, Rabczenko D, Gniadek G, Slusarczyk J. Pertussis in Poland. *Int J Epidemiol.* 2004;33(2):358-65.
89. Gzyl A, Augustynowicz E, van Loo I, Slusarczyk J. Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in Bordetella pertussis strains isolated from clinical cases in Poland. *Vaccine.* 2001;20(3-4):299-303.
90. Haberling DL, Holman RC, Paddock CD, Murphy TV. Infant and maternal risk factors for pertussis-related infant mortality in the United States, 1999 to 2004. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(3):194-8.
91. Halasa NB, O'Shea A, Shi JR, LaFleur BJ, Edwards KM. Poor immune responses to a birth dose of diphtheria, tetanus, and acellular pertussis vaccine. *J Pediatr.* 2008;153(3):327-32.
92. Hallander HO, Advani A, Donnelly D, Gustafsson L, Carlsson RM. Shifts of Bordetella pertussis variants in Sweden from 1970 to 2003, during three periods marked by different vaccination programs. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2856-65.
93. Halperin SA, Bortolussi R, Langley JM, Eastwood BJ, De Serres G. A randomized, placebo-controlled trial of erythromycin estolate chemoprophylaxis for household contacts of children with culture-positive bordetella pertussis infection. *Pediatrics.* 1999;104(42). [online] [cit. 2015-10-08] Dostupný na [www: http://pediatrics.aappublications.org/content/104/4/e42.long](http://pediatrics.aappublications.org/content/104/4/e42.long).
94. Halsey N, Welling MA, Lehman RM. Nosocomial pertussis: a failure of erythromycin treatment and prophylaxis. *Am J Dis Child.* 1980;134(5):521-2.

95. Harrington AT, Castellanos JA, Ziedalski TM, Clarridge JE 3rd, Cookson BT. Isolation of *Bordetella avium* and novel *Bordetella* strain from patients with respiratory disease. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):72-4.
96. He Q, Mäkinen J, Berbers G, Mooi FR, Viljanen MK, Arvilommi H, Mertsola J. *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J Infect Dis.* 2003;187(8):1200-5.
97. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA.* 1998;280(7):635-7.
98. Healy CM, Munoz FM, Rench MA, Halasa NB, Edwards KM, Baker CJ. Prevalence of pertussis antibodies in maternal delivery, cord, and infant serum. *J Infect Dis.* 2004;190(2):335-40.
99. Healy CM, Rench MA, Wootton SH, Castagnini LA. Evaluation of the impact of a pertussis cocooning program on infant pertussis infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(1):22-6.
100. Hegerle N, Paris AS, Brun D, Dore G, Njamkepo E, Guillot S, Guiso N. Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetellae* not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(9):E340-6.
101. Heininger U. Recent progress in clinical and basic pertussis research. *Eur J Pediatr.* 2001;160(4):203-13.
102. Henry R, Dorman D, Skinner J, Mellis C. Limitations of erythromycin in whooping cough. *Med J Aust.* 1981;2(2):108-9.
103. Heymann DL, editor. *Control of communicable diseases manual.* 19th edn. Baltimore: United Book Press, 2008. p.746. ISBN-13: 978-0875531892.
104. Higgs R1, Higgins SC, Ross PJ, Mills KH. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* 2012;5(5):485-500.
105. Hijnen M, Mooi FR, van Gageldonk PG, Hoogerhout P, King AJ, Berbers GA. Epitope structure of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infect Immun.* 2004;72(7):3716-23.

106. Hill BC, Baker CN, Tenover FC. A simplified method for testing *Bordetella pertussis* for resistance to erythromycin and other antimicrobial agents. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1151-5.
107. Hoppe JE. State of art in antibacterial susceptibility of *Bordetella pertussis* and antibiotic treatment of pertussis. *Infection.* 1998;26(4):242-6.
108. Hoppe JE. Update of epidemiology, diagnosis, and treatment of pertussis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15(3):189-93.
109. Hoppe JE, Paulus T. Comparison of three media for agar dilution susceptibility testing of *Bordetella pertussis* using six antibiotics. *Eur J Microbiol Infect Dis.* 1998;17(6):391-3.
110. Hoppe JE, Tschirner T. Comparison of media for agar dilution susceptibility testing of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995;14(9):775–9.
111. Hviid A, Stellfeld M, Andersen PH, Wohlfahrt J, Melbye M. Impact of routine vaccination with a pertussis toxoid vaccine in Denmark. *Vaccine.* 2004;22(27-28):3530-4.
112. Chantreuil J, Fakhri N, Labarthe F, Saliba E, Favrais G. Coqueluche maligne et exsanguino-transfusion. *Arch Pediatr.* 2015;22(1):84-7.
113. Cherry JD. Resurgence of pertussis: Facts, fiction, myths and misconceptions. Přednáška na AV ČR. 7. 7. 2014.
114. Cherry JD. Epidemic pertussis in 2012 – the resurgence of a vaccine-preventable disease. *N Engl J Med.* 2012;367(9):785-7.
115. Cherry JD. Historical perspective on pertussis and use of vaccines to prevent it. *Microbe.* 2007;2(3): 139-44.
116. Cherry JD. The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics.* 2005;115(5):1422-7.
117. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine.* 1998;16(20):1901-6.
118. Cherry JD. Pertussis in adults. *Ann Intern Med.* 1998;128(1):64-6.
119. Cherry JD. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis.* 1996;174,Suppl 3:259-63.



120. Cherry JD, Paddock CD. Pathogenesis and histopathology of pertussis: implications for immunization. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(9):1115-23.
121. Christie CD, Baltimore RS. Pertussis in neonates. *Am J Dis Child*. 1989;143:1192-1202.
122. Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med*. 1994;180(4):1225-33.
123. Jakubů V, Zavadilová J, Fabiánová K, Urbášková P. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of Bordetella pertussis. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2015;64(1):12-15.
124. Jenkinson D. Natural course of 500 consecutive cases of whooping cough: a general practice population study. *BMJ*. 1995;310(6975):299-302.
125. Kallonen T, He Q. Bordetella pertussis strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(7):863-75.
126. Kattar MM, Chavez JF, Limaye AP, Rassouljian-Barrett SL, Yarfitz SL, Carlson LC, Houze Y, Swanzy S, Wood BL, Cookson BT. Application of 16s rRNA gene sequencing to identify Bordetella hinzii as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):789-94.
127. Kersters KH, Hinz KH, Hertle A, Segers P, Lievens A, Siegmann O. Bordetella avium spp. Nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Bacteriol*. 1984;34(1):56-70.
128. Kharbanda EO, Vazquez-Benitez G, Lipkind HS, Klein NP, Cheetham TC, Naleway AL, Lee GM, Hambidge S, Jackson ML, Omer SB, McCarthy N, Nordin JD. Maternal Tdap vaccination: Coverage and acute safety outcomes in the vaccine safety datalink, 2007-2013. *Vaccine*. 2016;34(7):968-73.
129. Khelef N, Guiso N. Induction of macrophage apoptosis by Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;134(1):27-32.
130. King AJ, van der Lee S, Mohangoo A, van Gent M, van der Ark A, van de Waterbeemd B. Genome-wide gene expression analysis of Bordetella pertussis isolates associated with a resurgence in pertussis: elucidation of factors involved in the increased fitness of epidemic strains. *PloS One*. 2013;8(6):e6615.0. [online]

[cit. 2013–06–11]. Dostupný na [www:  
http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066150](http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066150).

131. Knuf M, Schmitt HJ, Wolter J, Schuerman L, Jacquet JM, Kieninger D, Siegrist CA, Zepp F. Neonatal vaccination with an acellular pertussis vaccine accelerates the acquisition of pertussis antibodies in infants. *J Pediatr* 2008;152(5):655-60.
132. Ko KS, Peck KR, Oh WS, Lee NY, Lee JH, Song JH. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2516-19.
133. Korgenski K, Daly JA. Surveillance and detection of erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the Intermountain West Region of the United States. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2989-91.
134. Kretsinger K, Broder KR, Cortese MM, Joyce MP, Ortega-Sanchez I, Lee GM, Tiwari T, Cohn AC, Slade BA, Iskander JK, Mijalski CM, Brown KH, Murphy TV. Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adults: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP, supported by the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), for use of Tdap among health-care personnel. *MMWR. Recommend Rep.* 2006;55(RR-17):1-37.
135. Kříž B, Fabiánová K, Maixnerová M, Beneš Č, Malý M. Pertusse – navracející se infekce? *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2007;56(2):51-65.
136. Kwantes W, Joynson HM, Williams WO. *Bordetella pertussis* isolation in general practice: 1977-79 whooping cough epidemic in West Glamorgan. *J Hyg Camb.* 1983;90(2):149-58.
137. Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Guiso N, Keil AD, Lawrence A, Robson J, Hogg G, Lan R. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(4):626-33.
138. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun.* 2010;78(3):907-13.

- 139.Lavine JS, Bjørnstad ON, de Blasio BF, Storsaeter J. Short-lived immunity against pertussis, age-specific routes of transmission, and the utility of a teenage booster vaccine. *Vaccine*. 2012;30(3):544-51.
- 140.Le Custoumier A, Njamkepo E, Cattoir V, Guillot S, Guiso N. Bordetella petrii infection with long-lasting persistence in human. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(4):612-18.
- 141.Lee GM, Lett S, Schauer S, LeBaron C, Murphy TV, Rusinak D, Lieu TA; Massachusetts Pertussis Study Group. Societal costs and morbidity of pertussis in adolescents and adults. *Clin Infect Dis*. 2004;39(11):1572-80.
- 142.Leininger E, Roberts M, Kenimer JG, Charles IG, Fairweather N, Novotny P, Brennan MJ. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing Bordetella pertussis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(2):345-9.
- 143.Leschke TM, Blumin JH, Bock JM. Diagnosis and laryngeal complications of Bordetella pertussis infection in the ambulatory adult population. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;151(5):714-17.
- 144.Lewis K, Saubolle MA, Tenover FC, Rudinsky MF, Barbour SD, Cherry JD. Pertussis caused by an erythromycin resistant strain of Bordetella pertussis. *Pediatr Infect Dis J*. 1995;14(5):388-91.
- 145.Linnemann CC Jr, Bass JW, Smith MH. The carrier state in pertussis. *Am J Epidemiol*. 1968;88(3):422-7
- 146.Linnemann CC, Perry EB. Bordetella parapertussis. Recent experience and a review of the literature. *Am J Dis Child*. 1977;131(5):560-3.
- 147.Litt DJ, Neal SE, Fry NK. Changes in genetic diversity of the Bordetella pertussis population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):680-8.
- 148.Lobovská A. Infekční nemoci. 1. vyd. Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolinum, 2002. 263 s. ISBN 80-246-0116-8.
- 149.Loht C. Bordetella: Molecular microbiology. Wyomondham, Norfolk: Horizon Bioscience, 2007. p. 289. ISBN 978-1-904933-31-1.

150. Locht C, Mielcarek N. New pertussis vaccination approaches: en route to protect newborns? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;66(2):121-33.
151. Lžičářová D, Zavadilová J, Musílek M, Jandová Z, Křížová P, Fabiánová K. Multiple-locus variable number tandem repeat analýza souboru kmenů *Bordetella pertussis* v ČR z období 1967 - 2015: rozšíření varianty adaptované na proočkovanou populaci. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* Listopad 2015 [přijatý k publikování].
152. Maixnerová M. Sérologický přehled ČR v roce 2001 – Dávivý kašel (Pertussis) in Kříž B. et al. Víceúčelový sérologický přehled protilátek proti vybraným infekcím, u nichž se provádí očkování. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2003; 12(příloha 1):16-19.*
153. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 7th edn. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2009. p. 4320. ISBN 978-0-443-06839-3.
154. Marešová V. Pertuse a pertusoidní syndrom. *Vox pediatrice.* 2003;3(3):26-8.
155. Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, Qin X, Reynolds L, Kenyon C, Giambrone G, Kudish K, Miller L, Selvage D, Lee A, Skoff TH, Kamiya H, Cassidy PK, Tondella ML, Clark TA. Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis.* 2015;60(2):223-7.
156. Masuda M, Betancourt L, Matsuzawa T, Kashimoto T, Takao T, Shimonishi Y, Horiguchi Y. Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *EMBO J.* 2000;19(4):521-30.
157. Masure HR. Modulation of adenylate cyclase toxin production as *Bordetella pertussis* enters human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(14):6521-5.
158. Mattoo S, Chery JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Mikrobiol Rev.* 2005;18(2):326-82
159. Meade BD, Kind PD, Manclark CR. Lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* alters mononuclear phagocyte circulation and response to inflammation. *Infect Immun.* 1984;46(3):733-9.

160. Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(4):274-88.
161. Mertsola J. Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. *Eur J Clin Microbiol*. 1985;4(2):123-8.
162. Mertsola J, Ruuskanen O, Eerola E, Viljanen MK. Intrafamilial spread of pertussis. *J Pediatr*. 1983;103(3):359-63.
163. Mertsola J, He Q. *Bordetella pertussis* (whooping cough) and other species. [online]. [cit. 2016-04-02] Dostupný na www: <http://www.antimicrobe.org/b83.asp>.
164. Miller D, Madge N, Diamond J, Wadsworth J, Ross E. Pertussis immunisation and serious acute neurological illnesses in children. *BMJ*. 1993;307(6913):1171-6.
165. Miller DC, Wadsworth MJ, Ross EM. Pertussis vaccine and severe acute neurological illnesses. Response to a recent review by members of the NCES team. *Vaccine*. 1989;7(6):487-9.
166. Miller E, Fleming DM, Ashworth LA, Mabbett DA, Vurdien JE, Elliott TS. Serological evidence of pertussis in patients presenting with cough in general practice in Birmingham. *Commun Dis Public Health*. 2000;3(2):132-4. Erratum in: *Commun Dis Public Health*. 2000;3(3):221.
167. Mills KH, Ross PJ, Allen AC, Wilk MM. Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends Microbiol*. 2014;22(2):49-52.
168. Misegades LK, Winter K, Harriman K, Talarico J, Messonnier NE, Clark TA, Martin SW. 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.
169. Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol*. 2010;10(1):36-49.
170. Mooi FR, He Q, van Oirschot H, Mertsola J. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun*. 1999;67(6):3133-4.
171. Mooi FR, van Loo IH, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3 Suppl):526-8.
172. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N, Mertsola J. *Bordetella pertussis* strains

- with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1206-13.
173. 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.
174. Mosiej E, Augustynowicz E, Zawadka M, Dabrowski W, Lutyńska A. Strain Variation among *Bordetella pertussis* Isolates Circulating in Poland after 50 Years of Whole-Cell Pertussis Vaccine Use. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1452-7.
175. Munoz FM, Bond NH, Maccato M, Pinell P, Hammill HA, Swamy GK, Walter EB, Jackson LA, Englund JA, Edwards MS, Healy CM, Petrie CR, Ferreira J, Goll JB, Baker CJ. Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2014;311(17):1760-9.
176. Munoz JJ, Arai H, Bergman RK, Sadowski PL. Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1981;33(3):820-6.
177. Murphy TV, Slade BA, Broder KR, Kretsinger K, Tiwari T, Joyce PM, Iskander JK, Brown K, Moran JS. Prevention of pertussis, tetanus and diphtheria among pregnant and postpartum women and their infants. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2008;57(RR-4):1-51.
178. Musser JM, Hewlett EL, Peppler MS, Selander RK. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol.* 1986;166(1):230-7.
179. Infanrix a rozsáhlé lokální reakce - připomenutí pro očkující lékaře a rodiče očkovaných dětí. *Informační zpravodaj Nežádoucí účinky léčiv. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Praha.* 2012;5(4):3-4.
180. Nooitgedagt JE, De Greeff SC, Elvers BH, De Melker HE, Notermans DW, Van Huisseling H, Versteegh FG. Seroprevalence of *Bordetella pertussis* infection during pregnancy measured by IgG antibodies against pertussis toxin. *Clin Infect Dis.* 2009;49(7):1086-9.

181. Nouvellon M, Gehanno JF, Pestel-Caron M, Weber C, Lemeland JF, Guiso N. Usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in assessing nosocomial transmission of pertussis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999;20(11):758-60.
182. Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, Lawrence A, Keil AD, Hogg G, Lan R. Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying *prn2* and *ptxP3* alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. *J Infect Dis.* 2012;205(8):1220-4.
183. Onorato IM, Wassilak SG, Meade B. Efficacy of whole-cell pertussis vaccine in preschool children in the United States. *JAMA.* 1992;267(20):2745-9.
184. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, Goldsmith CS, Greer PW, Montague JL, Eliason MT, Holman RC, Guarner J, Shieh WJ, Zaki SR. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis.* 2008;47(3):328-38.
185. Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeño-Tárraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003;35(1):32-40.
186. Pawloski LC, Queenan AM, Cassidy PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, Williams MM, Bowden KE, Burgos-Rivera B, Qin X, Messonnier N, Tondellaa ML. Prevalence and Molecular Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(2):119-25.
187. Pelc H. Zdravotní stav obyvatelstva Československé republiky v jejím prvním desetiletí. Praha: 1929. 183 s.
188. Pesek R, Lockey R. Vaccination of adults with asthma and COPD. *Allergy.* 2011;66(1):25-31.

189. Pichichero ME, Deloria MA, Rennels MB, Anderson EL, Edwards KM, Decker MD, Englund JA, Steinhoff MC, Deforest A, Meade BD. A safety and immunogenicity comparison of 12 acellular pertussis vaccines and one whole-cell pertussis vaccine given as a fourth dose in 15- to 20-month-old children. *Pediatrics*. 1997;100(5):772-88.
190. Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. *Bordetella holmesii*: an under-recognised *Bordetella* species. *The Lancet. Infection Diseases*. 2014;14(6):510-19.
191. Pittet LF, Posfay-Barbe KM. *Bordetella holmesii* infection: current knowledge and a vision for future research. *Expert Review Anti-Infective Therapy*. 2015;13(8):965-71.
192. Pittman M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis*. 1984;3(5):467-86.
193. Pittman M. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev Infect Dis*. 1979;1(3):401-12.
194. Pittmann M. Neurotoxicity of *Bordetella pertussis*. *NeuroToxicology*. 1986;7(2):53-68.
195. Postels-Multani S, Schmitt HJ, Wirsing von König CH, Bock HL, Bogaerts H. Symptoms and complications of pertussis in adults. *Infection*. 1995;23(3):139-42.
196. Procházka J, Kryl R. Problematika pertuse. *Prakt Lek*. 1959;20(6):241-6.
197. Provenzano RW, Wetterlow LH, Sullivan CL. Immunization and antibody response in the newborn infant. I. Pertussis inoculation within twenty-four hours of birth. *N Engl J Med*. 1965;273(18):959-65.
198. Public Health England. Vaccination against pertussis (Whooping cough) for pregnant women – 2014. Information for healthcare professionals. [online]. [cit. 2015-02-10] Dostupný na [www: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/338567/PHE\\_pertussis\\_in\\_pregnancy\\_information\\_for\\_HP\\_2014\\_doc\\_V3.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/338567/PHE_pertussis_in_pregnancy_information_for_HP_2014_doc_V3.pdf)
199. Queenan AM, Cassiday PK, Evangelista A. Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in the United States. *N Engl J Med*. 2013;368(6):583-4.
200. Raška K. *Epidemiologie*. 2. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1954. 611 s.



201. Ray P, Hayward J, Michelson D, Lewis E, Schwalbe J, Black S, Shinefield H, Marcy M, Huff K, Ward J, Mullooly J, Chen R, Davis R; Vaccine Safety Datalink Group. Encephalopathy after whole-cell pertussis or measles vaccination: lack of evidence for a causal association in a retrospective case-control study. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(9):768-73.
202. Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1963-6.
203. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N; Pertussis PCR Consensus Group. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):4925-9.
204. Riitta H. The effect of early erythromycin treatment on the infectiousness of whooping cough patients. *Acta Paediatr Scand*. 1982;71(IS 298):10-12.
205. Rodman AC, Bradford WL, Berry GP. An epidemiological study of an outbreak of pertussis in a public school. *Am J Public Health Nations Health*. 1946;36(10):1156-62.
206. Romanus V, Jonsell R, Berquist SO. Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr Infect Dis J*. 1987;6(4):364-71.
207. Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, Misiak A, Lavelle EC, McLoughlin RM, Mills KH. 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.
208. Safarchi A, Octavia S, Wu SZ, Kaur S, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Keil AD, Lan R. Genomic dissection of Australian *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2012 epidemic. *J Infect*. 2016;72(4):468-77.
209. Sawal M, Cohen M, Irazuzta JE, Kumar R, Kirton C, Brundler MA, Evans CA, Wilson JA, Raffeeq P, Azaz A, Rotta AT, Vora A, Vohra A, Abboud P, Mirkin LD, Cooper M, Dishop MK, Graf JM, Petros A, Klonin H. Fulminant pertussis: a multi-center study with new insights into the clinico-pathological mechanisms. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(10):970-80.

210. Sealey KL, Harris SR, Fry NK, Hurst LD, Gorringer AR, Parkhill J, Preston A. Genomic analysis of isolates from the United Kingdom 2012 pertussis outbreak reveals that vaccine Antigen genes are unusually fast evolving. *J Infect Dis.* 2015;212(2):294-301.
211. Senzilet LD, Halperin SA, Spika JS, Alagaratnam M, Morris A, Smith B, Sentinel Health Unit Surveillance System Pertussis Working Group. Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. *Clin Infect Dis.* 2001;32(12):1691-7.
212. Scheifele DW. Pertussis vaccine and encephalopathy after the Loveday trial. *CMAJ.* 1988;139(11):1045-6.
213. Schellekens J, Von König CH, Gardner P. Pertussis source of infection and routes of transmission in the vaccination era. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(5 Suppl):S19-S24.
214. Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, Skoff TH, Tondella ML, Tatti KM. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1248-55.
215. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare settings. [online]. [cit. 2015-10-11] Dostupný na [www: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf).
216. Skoff TH, Kenyon C, Cocoros N, Liko J, Miller L, Kudish K, Baumbach J, Zansky S, Faulkner A, Martin SW. Sources of infant pertussis infection in the United States. *Pediatrics.* 2015;136(4):635-41.
217. Smits K, Pottier G, Smet J, Dirix V, Vermeulen F, De Schutter I, Carollo M, Loch C, Ausiello CM, Mascart F. Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination. *Vaccine.* 2013;32(1):111-8.
218. Spilker T, Liwiński AA, LiPuma JJ. Identification of *Bordetella* spp. in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(5):504-6.

219. Strebel P, Nordin J, Edwards K, Hunt J, Besser J, Burns S, Amundson G, Baughman A, Wattigney W. Population-based incidence of pertussis among adolescents and adults, Minnesota, 1995-1996. *J Infect Dis.* 2001;183(9):1353-9.
220. Sukumaran L, McCarthy NL, Kharbanda EO, Weintraub ES, Vazquez-Benitez G, McNeil MM, Li R, Klein NP, Hambidge SJ, Naleway AL, Lugg MM, Jackson ML, King JP, DeStefano F, Omer SB, Orenstein WA. Safety of Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid, and Acellular Pertussis and Influenza Vaccinations in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2015;126(5):1069-74.
221. Swamy GK, Garcia-Putnam R. Maternal immunization to benefit the mother, fetus, and infant. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2014;41(4):521-34.
222. Swamy GK, Wheeler SM. Neonatal pertussis, cocooning and maternal immunization. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(9):1107-14.
223. Tanaka M, Vitek CR, Pascual FB, Bisgard KM, Tate JE, Murphy TV. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. *JAMA.* 2003;290(22):2968-75.
224. Terranella A, Asay GR, Messonnier ML, Clark TA, Liang JL. Pregnancy dose Tdap and postpartum cocooning to prevent infant pertussis: a decision analysis. *Pediatrics.* 2013;131(6):e1748-56.
225. Thomas MG. Epidemiology of pertussis. *Rev Infect Dis.* 1989;11:255-62.
226. Tiwari T, Murphy TV, Moran J. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis. 2005 CDC guidelines. *MMWR Recommend Rep.* 2005;54 (RR14):1-16.
227. Todar K. Todar's online textbook of bacteriology. [online]. [cit. 2016-04-02] Dostupný na www: [http://textbookofbacteriology.net/pertussis\\_2.html](http://textbookofbacteriology.net/pertussis_2.html).
228. Trmal J. Historie výroby očkovacích látek a očkování v České republice. *Vakcinologie.* 2009;3(3):112-20.
229. Ulloa-Gutierrez R, Boza R, Carvajal-Riggioni D, Baltodano A. Pertussis: should we improve intensive care management or vaccination strategies? *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(1):49-53
230. Valdez H, Lamberti Y, Gorgono J, Hayes JA, Rodriguez ME. Survival of *B. pertussis* in human macrophages involves bacterial virulence modulation and the

- expression of genes implicated in iron stress response. Talk in 9th International Bordetella Symposium, Baltimore, USA, September 30 – October 3, 2010.
231. Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, Falsen E, Kersters K, Hinz KH. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* R ger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46(4):849-58.
232. Vandamme P, Hommez J, Vancanneyt M, Monsieurs M, Hoste B, Cookson B, Wirsing von König CH, Kersters K, Blackall PJ. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45(1):37-45
233. Van Hoek AJ, Campbell H, Amirthalingam G, Andrews N, Miller E. The number of deaths among infants under one year of age in England with pertussis: results of a capture/recapture analysis for the period 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(9). [online]. [cit. 2014-01-02] Dostupn y na www: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20414>.
234. Van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N, Wirsing von König CH, Vestrheim DF, Dalby T, Fry NK, Pierard D, Detemmerman L, Zavadilova J, Fabianova K, Logan C, Habington A, Byrne M, Lutyńska A, Mosiej E, Pelaz C, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff AM, Mertsola J, Economopoulou A, He Q, Mooi FR. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(4):821-30.
235. van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR. Multilocus Sequence Typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):1994-2001.
236. Van Loo IH, Mooi FR. Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. *Microbiology.* 2002;148(Pt 7):2011-8.
237. Van Savage J, Decker MD, Edwards KM, Sell SH, Karzon DT. Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on vaccine response. *J Infect Dis.* 1990;161(3):487-92.
238. Versteegh, FGA. Pertussis: new insights in diagnosis, incidence and clinical manifestations. Waddinxveen: Febodruk, 2005. 163 s. ISBN 90-9019500-9.

239. Vitek CR, Pascual FB, Baughman AL, Murphy TV. Increase in deaths from pertussis among young infants in the United States in the 1990s. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(7):628-34.
240. Von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui R, Rösick U, Göbel UB, Gross R. *Bordetella petrii* sp. nov. isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(4):1257-65.
241. Votava M. a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie speciální.* Dotisk. Brno: Neptun, 2006. 495 s. ISBN 80-902896-6-5
242. Vysoká-Buriánová, B. *Pertusse – Parapertusse.* Praha, 1961. 122 s. Disertační práce na Lékařské fakultě hygienické Univerzity Karlovy. Školitel prof. MUDr. Karel Raška.
243. Vysoká-Buriánová B. K současné problematice epidemiologie dáivého kašle. *Č Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 1963;XII(3): 2004-6.
244. Vysoká-Buriánová B. *Dáivý kašel.* Praha, 1976. Doktorská disertační práce na Lékařské fakultě hygienické Univerzity Karlovy.
245. Vysoká-Buriánová B. *Epidemiologie.* 1. vyd. Praha: Avicenum, 1981. 298 s.
246. Warfel JM, Beren J, Kelly VK, Lee G, Merkel TJ. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect Immun.* 2012;80(4):1530-6.
247. Warfel JM, Beren J, Merkel TJ. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 2012;206(6):902-6.
248. Warfel JM, Merkel TJ. *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* 2013;6(4):787-96.
249. Warfel JM, Papin JF, Wolf RF, Zimmerman LI, Merkel TJ. Maternal and neonatal vaccination protects newborn baboons from pertussis infection. *J Infect Dis.* 2014;210(4):604-10.
250. 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.
251. Watanabe M, Connelly B, Weiss AA. Characterization of serological responses to pertussis. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(3):341-8.

252. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4396-403.
253. Weiss AA, Hewlett EL, Myers GA, Falkow S. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 1984;150(2):219-22.
254. Wendelboe AM, Hudgens MG, Poole C, Van Rie A. Estimating the role of casual contact from the community in transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Emerg Themes Epidemiol.* 2007;4:15:1-7.
255. Wendelboe AM, Njamkepo E, Bourillon A, Floret DD, Gaudelus J, Gerber M, Grimprel E, Greenberg D, Halperin S, Liese J, Muñoz-Rivas F, Teyssou R, Guiso N, Van Rie A; Infant Pertussis Study Group. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(4):293-9.
256. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Whitney AM, Daneshvar MI, Moss CW, Brenner DJ. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol.* 1995;33(1):1-7.
257. WHO. Pertussis. [online]. [cit. 2016-01-25] Dostupný na [www: http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/passive/pertussis/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/).
258. WHO. Immunization coverage. Fact sheet. Reviewed March 2016. [online]. [cit. 2016-04-02] Dostupný na [www: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/en/).
259. WHO. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2015 global summary. [online] [cit. 2016-02-10] Dostupný na [www: http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/globalsummary/coverages?c=CZE](http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/coverages?c=CZE)
260. WHO. Pertussis vaccines. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90(35):433-60.
261. WHO. Revised guidance on the choice of pertussis vaccines: July 2014. *Wkly Epidemiol Rec.* 2014;89(30):337-44. [online]. [cit. 2014-07-30] Dostupný na [www: http://www.who.int/wer/2014/wer8930/en/](http://www.who.int/wer/2014/wer8930/en/). ISSN 0049-8114.

262. WHO. WHO SAGE pertussis working group. Background paper. Sage April 2014. [online]. [cit. 2015-01-10] Dostupný na [www](http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1_Pertussis_background_FINAL4_web.pdf): [http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1\\_Pertussis\\_background\\_FINAL4\\_web.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1_Pertussis_background_FINAL4_web.pdf).
263. WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010;85(40):385-400.
264. WHO. Pertussis vaccines. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2005;80(4):31-9.
265. WHO. Pertussis surveillance. A global meeting. Geneva, 16-10 October 2000.
266. WHO. Safety of Immunization during Pregnancy. [online]. [cit. 2015-02-10] Dostupný na [www](http://www.who.int/vaccine_safety/publications/safety_pregnancy_nov2014.pdf): [http://www.who.int/vaccine\\_safety/publications/safety\\_pregnancy\\_nov2014.pdf](http://www.who.int/vaccine_safety/publications/safety_pregnancy_nov2014.pdf)
267. 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.
268. Willems RJ, van der Heide HG, Mooi FR. Characterization of a Bordetella pertussis fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol.* 1992;6(18):2661-71.
269. Winter K, Harriman K, Zipprich J, Schechter R, Talarico J, Watt J, Chavez G. California pertussis epidemic, 2010. *J Pediatr.* 2012;161(6):1091-6.
270. Witt MA, Arias L, Katz PH, Truong ET, Witt DJ. Reduced risk of pertussis among persons ever vaccinated with whole cell pertussis vaccine compared to recipients of acellular pertussis vaccines in a large US cohort. *Clin Infect Dis.* 2013;56(9):1248-54.
271. Witt MA, Katz PH, Witt DJ. Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak. *Clin Infect Dis.* 2012;54(12):1730-5.
272. Wood N, McIntyre P, Marshall H, Robertson D. Acellular pertussis vaccine at birth and one month induces antibody responses by two months of age 4. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(3):209-15.
273. Woolfrey BF, Moody JA. Human infection associated with Bordetella bronchiseptica. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4(3):243-55.

274. Wright SW, Edwards KM, Decker MD, Lamberth MM. Pertussis seroprevalence in emergency department staff. *Ann Emerg Med.* 1994;24(3):413-7.
275. Wright SW, Edwards KM, Decker MD, Zeldin MH. Pertussis infection in adults with persistent cough. *JAMA.* 1995;273(13):1044-6.
276. Wright SW, Decker MD, Edwards KM. Incidence of pertussis infection in healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999;20(2):120-3.
277. Yao SM, Liaw GJ, Chen YY, Yen MH, Chen YH, Mu JJ, Chiang CS. Antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella pertussis* in Taiwan prompted by a case of pertussis in a paediatric patient. *J Med Microbiol.* 2008;57(12):1577-80.
278. Zavadilová J, Fabiánová K, Maixnerová M. Doporučení pro laboratorní diagnostiku dáivého kašle. *Zprávy EM (SZÚ Praha).* 2009;18(1):24-5.
279. Zavadilová J, Lžičařová D, Musílek M, Křížová P, Fabiánová K. Antigenní variabilita kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v letech 1967-2010 v České republice - možné vysvětlení vzestupu onemocnění pertusí? *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015;64(3):130-8.
280. Zhang L, Prietsch SO, Axelsson I, Halperin SA. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;9:CD001478.
281. Zheteyeva YA, Moro PL, Tepper NK, Rasmussen SA, Barash FE, Revzina NV, Kissin D, Lewis PW, Yue X, Haber P, Tokars JI, Vellozzi C, Broder KR. Adverse event reports after tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccines in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207(1):59.e1-7.
282. Zieliński A, Rosińska M, Czarkowski M, Rudowska J. The effectiveness of vaccination with whole-cell pertussis vaccine by age group in Poland 1996-2001. *Scand J Infect Dis.* 2004;36(2):114-8.



## 12 Přehled prací (články a abstrakta) autora v souvislosti s dizertací

---

*Poznámka: Publikace s IF jsou žlutě podbarveny.*

1. Fabiánová K, Zavadilová J, Šebestová H, Gašpárek M, Kříž B. Syndrom dávivého kašle. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2015 – epidemiologická situace. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2016;25(2):65-70.
2. Fabiánová K. Pertuse. Alergie. 2015;17(4):245-250.
3. Fabiánová K. Očkování těhotných proti pertusi. XI. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 1. - 3. 10. 2015. Sborník abstrakt. ISBN 978-80-260-8725-0.
4. Zavadilová J, Musílek M, Bečvářová Z, Lžičařová D, Křížová P, Fabiánová K. Porovnání kmenů Bordetella pertussis izolovaných v ČR v období 1967 - 2015 molekulárně biologickými metodami. XI. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 1. - 3. 10. 2015. Sborník abstrakt. ISBN 978-80-260-8725-0.
5. Zavadilová J, Musílek M, Bečvářová Z, Lžičařová D, Křížová P, Fabiánová K. Výsledek MAST analýzy u kmenů Bordetella pertussis izolovaných v období 1967-2015. Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie, KMINE 2015, 23. - 25. 9. 2015. Sborník abstrakt. ISBN 978-80-906155-3-3.
6. Lžičařová D, Zavadilová J, Musílek M, Jandová Z, Křížová P, Fabiánová K. Multiple-locus variable number tandem repeat analýza souboru kmenů Bordetella pertussis v ČR z období 1967 - 2015: rozšíření varianty adaptované na proočkovanou populaci. Epidemiol Mikrobiol Imunol. Listopad 2015 [přijatý k publikování]. ISSN 1210-7913. **IF 0,353**
7. Fabiánová K, Zavadilová J, Šebestová H, Beneš Č, Kříž B. Syndrom dávivého kašle. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2014 – rozbor epidemiologické situace. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2015;24(5):172-7.
8. Fabiánová K. Očkování těhotných proti pertusi, současná situace ve světě a v České republice Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2015;24(1):15-18.
9. Fabianova K, Zavadilova J, Lzicarova D, Musilek M, Benes C, Krizova P. Kriz B. 65 years since the introduction of universal vaccination against pertussis in the Czech Republic: Study and comparison of the Bordetella pertussis strains isolated

during the period 1964-2015 by molecular biological methods. International Meeting IMED, 31. 10. - 3. 11. 2014, Vídeň, Rakousko. Abstract Book.

10. Zavadilová J, Lžičařová D, Musílek M, Křížová P, Fabiánová K. Antigenní variabilita kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v letech 1967 - 2010 v České republice – možné vysvětlení vzestupu onemocnění pertusí? *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015;64(3):130-8. **IF 0,361**
11. Jakubů V, Zavadilová J, Fabiánová K, Urbášková P. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie.* 2015;64(1):12-5. **IF 0,361**
12. Fabiánová K. Očkování těhotných - neúčinnější strategie prevence vzestupu pertuse u dětí? Abstrakt v časopise. *Vakcinologie.* 2015;9(1):32.
13. Zavadilová J, Musílek M, Lžičařová D, Křížová P, Fabiánová K. Porovnání kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v období 1967 – 2010 MAST analýzou. X. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 2. - 4. 10. 2014. Sborník abstrakt. ISBN 978-80-260-6833-4.
14. Fabiánová K. Očkování těhotných – neúčinnější strategie prevence vzestupu pertuse u dětí? X. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 2. - 4. 10. 2014. Sborník abstrakt. ISBN 978-80-260-6833-4.
15. Fabiánová K, Zavadilová J, Lžičařová D, Musílek M, Křížová P, Kříž B. 55 let od zahájení plošného očkování v ČR. X. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 2. - 4. 10. 2014. Sborník abstrakt. ISBN 978-80-260-6833-4.
16. Zavadilová J, Musílek M, Lžičařová D, Křížová P, Fabiánová K. Porovnání kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v období 1967 – 2010 genovou sekvenací. 26. Pečenkovy epidemiologické dny, Luhačovice, 16. - 18. 9. 2014. Sborník abstrakt. ISBN 978-80-904667-2-2.
17. Fabiánová K. 55 let od zahájení plošného očkování proti pertusi. 26. Pečenkovy epidemiologické dny, Luhačovice, 16. - 18. 9. 2014. Sborník abstrakt. ISBN 978-80-904667-2-2.
18. van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N, Wirsing von König CH, Vestheim DF, Dalby T, Fry NK, Pierard D, Detemmerman L, Zavadilova J., Fabianova K, Logan C, Habington A, Byrne M, Lutyńska A, Mosiej E, Pelaz C, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff AM,

Mertsola J, Economopoulou A, He Q, Mooi FR. Analysis of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(12):821-30. **IF 2,544**

19. Fabiánová K, Šebestová H, Beneš Č, Zavadilová J, Křížová P, Kříž B. Trend pertuse u dětí do jednoho roku života v ČR v letech 1997 – 2013. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2014;63(4):270-7. **IF 0,361**
20. Zavadilová J, Fabiánová K. Doporučení pro laboratorní diagnostiku pertuse a parapertuse. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2014;23(9):318-20.
21. Zavadilová J, Lžičarová D, Fabiánová K, Kříž B. Zpráva o činnosti NRL pro pertusi a difterii za rok 2013. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2014;23(5):174-5.
22. Fabiánová K, Beneš Č, Šebestová H, Kříž B. Pertuse v České republice v roce 2013 – rozbor epidemiologické situace. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2014;23(3):97-104.
23. Kříž B, Částková J, Fabiánová K, Kynčl J. Několik komentářů k očkování. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2013;22(8):262-5.
24. Machač J, Chlíbaek R, Fabiánová K, Plíšek S. Hlášená a skutečná incidence pertuse – přístup k vakcinační strategii. Poster na 4. kongresu klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie (KMINE), 17. - 19. 10. 2013, Olomouc.
25. Fabiánová K, Chlíbaek R, Smetana J, Zavadilová J, Dítě P, Lžičarová D, Machač J. Séroprevalence protilátek Bordetella pertussis u dospělých v ČR. Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie, Olomouc, 17. - 19. 10. 2013. Sborník přednášek. ISBN 978-80-87753-08-4.
26. Chlíbaek R, Smetana J, Fabianova K, Zavadilova J, Dite P, Gal P, Lzicarova D, Bostik V, Splino M. The seroepidemiology of Bordetella pertussis in the Czech Republic. Poster in 8th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases (WSPID), 19. - 22. 11. 2013, Cape Town, South Africa.
27. Fabiánová K. Otazníky kolem černého kašle: Může postihnout každého z nás...?! Practicus. 2013;12(5):12-4.
28. Fabiánová K, Beneš Č, Zavadilová J, Kříž B. The cost of hospitalization of children under one year of age with pertussis and four deaths: importance of the introducing of cocoon strategy. Poster in 10th International Symposium on Bordetella, 8 – 11 September 2013, Dublin, Ireland.

29. Blechová Z, Fabiánová K. Pertuse jako přetrvávající epidemiologický problém. *Vakcinologie*. 2013;7(3):115-21.
30. Fabiánová K. Výskyt černého kašle dosáhl svého dlouholetého maxima. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2013;22(10):332-3.
31. Fabiánová K, Beneš Č, Šebestová H, Kynčl J, Částková J, Zavadilová J, Lžičařová D, Kříž B. Pertuse v ČR v roce 2012 – rozbor epidemiologické situace. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2013;22(2):55-61.
32. Fabiánová K. Pertuse – co je nového? Sborník abstrakt, 35. Pečenkovy epidemiologické dny, 18. – 20. 9. 2012, Harrachov. ISBN 978-80-904667-1-5.
33. Černá M, Fabiánová K, Straňák Z. Pilot project of total cocooning strategy in the delivery hospital to protect newborn from pertussis. *Acta Med Port* 2012;25(S2):198. **IF 0,151**
34. Fabiánová K. Podaří se zkvalitněním diagnostiky a očkováním adolescentů a dospělých snížit pertusi u dětí? Sborník abstrakt, VII. Hradecké vakcinologické dny, *Vakcinologie*. 2012;6(1):15-6.
35. Fabiánová K. Změny ve výskytu pertuse. Abstrakta. *Pediatric pro praxi*. 2012;13(Suppl. A):16. ISSN 1803-5892.
36. Černá M, Fabiánová K, Straňák Z. Pilot project of total cocooning strategy in the delivery hospital to protect newborn from pertussis. Poster in 3rd International Congress of UEPNS (Union of European Neonatal and Perinatal Societies), 14 - 17th Nov 2012, Porto.
37. Fabiánová K, Zavadilová J, Beneš Č, Kříž B. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2011. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2012;21(3):97-102.
38. Fabiánová K. Očkování proti pertusi. *Acta Medicinæ*. 2012;1:10-13.
39. Fabiánová K. Pertuse a malé dítě v rodině; postexpoziční profylaxe. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2012;21(2):50-1.
40. Fabiánová K. Pertuse a ochranná „cocoon“strategie. *Postgraduální medicína*. 2012;14(3):318-20.
41. Fabiánová K, Beneš Č, Kříž B. The cost of hospitalization of children under one year of age with pertussis: importance of the introducing of cocoon strategy. Poster in 7th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases, Melbourne, Australia, November 16 - 19, 2011.

42. Fabiánová K, Beneš Č, Kříž B. Vývoj pertuse v ČR u dětí do jednoho roku života. Sborník abstraktů přednášek, Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí, Plzeň, 21. - 23. 9. 2011, ISBN 978-80-7177-997-1, Plzeň 2011.
43. Fabiánová K. Podaří se zkvalitněním diagnostiky a očkování adolescentů a dospělých snížit pertusi u dětí? Sborník abstrakt, VII. Hradecké vakcinologické dny, 29. 9. - 1. 10. 2011, ISBN 978-80-260-0335-9, Praha 2, 2011.
44. Fabiánová K. Pertuse – diagnostické možnosti a očkování adolescentů a dospělých. *Causa subita*. 2011;14(3):112-5.
45. Fabiánová K. Pertuse a současné možnosti očkování. *Vakcinologie*. 2011;5(3):116-26.
46. Fabiánová K., Zavadilová J. Aktualizovaná doporučení pro laboratorní diagnostiku pertuse a parapertuse. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*. 2011; 20(4):142-4.
47. Fabiánová K, Zavadilová J, Beneš Č, Kříž B. Pertuse v České republice v roce 2010. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*. 2011;20(1):27-32.
48. Fabiánová K. Surveillance pertuse. *Infekční nemoci*. Nakladatelství Raabe.
49. Fabiánová K. Pertuse (černý kašel) v dnešním světě. *Lékařské listy*. Odborná příloha zdravotnických novin. 2010;11:8-10.
50. Fabiánová K. Černý kašel na vzestupu. *Tempus medicorum*. Časopis České lékařské komory. 2010;19(11):29-30.
51. Fabiánová K, Kynčl J, Maixnerová M, Kříž B, Beneš Č. Re-emergence of fatal pertussis cases in children: results from a long-term surveillance programme in the Czech Republic. Poster in 28th Annual ESPID (European Society for Paediatric Infectious Diseases) Meeting, 5. - 8. 5. 2010, Nice, Francie.
52. Fabiánová K, Kříž B, Beneš Č. Vývoj onemocnění pertusí v ČR v letech 1982-2009. *Zprávy EM (SZÚ Praha)*. 2009;18(12):368-70.
53. Fabiánová K, Beneš Č, Kříž B. A Steady Rise in the Incidence of Pertussis since the Nineties in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2010;59(1):25-33.
54. Fabiánová K, Kříž B, Beneš Č. Vývoj onemocnění pertusí v ČR v letech 1982-2009. *Zprávy EM (SZÚ Praha)*. 2009;18(12):368-70.
55. Fabiánová K, Maixnerová M, Kříž B, Beneš Č. Introduction booster vaccination against pertussis to the czech vaccination schedule. Poster in European Scientific

- Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), 26. - 28. 10. 2009 in Stockholm, Sweden.
56. Zavadilová J, Fabiánová K, Maixnerová M. Doporučení pro laboratorní diagnostiku dávivého kašle. *Zprávy EM (SZÚ Praha)*. 2009;18(1):24-5.
  57. Fabiánová K. Dávivý (černý) kašel. *Postgraduální medicína*. 2009;11(6):17-23.
  58. Fabiánová K, Maixnerová M, Kříž B, Beneš Č. The long-term highest pertussis incidence in age cohort 10-14 years: implications for introduction booster vaccination. Poster in 27th Annual ESPID (European Society for Paediatric Infectious Diseases) Meeting, 9. - 13. 6. 2009, Brusel, Belgie.
  59. Fabiánová, K, Beneš Č. Situace ve výskytu dávivého kašle (A37.0) v České republice v roce 2008. *Zprávy EM (SZÚ Praha)*. 2009;18(3):95-9.
  60. Fabiánová K, Maixnerová M, Kříž B, Beneš Č. Introduction booster vaccination against pertussis to the czech vaccination schedule. Poster in European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), Stockholm, Sweden, 26. - 28. 10. 2009.
  61. Fabiánová K, Zavadilová J, Maixnerová M, Kříž B. Epidemiologie pertuse v ČR a srovnání s ostatními evropskými státy. *Vakcinologie*. 2009;3(1):28.
  62. Fabiánová K. Pertuse (dávivý kašel, černý kašel) je stále aktuální onemocnění. *Vox paediatricae*, 2008;8(9)30-3.
  63. Fabiánová K, Zavadilová J, Maixnerová M, Kříž B. Epidemiologie pertuse v ČR a srovnání s ostatními evropskými státy. Sborník abstrakt, IV. Hradecké vakcinologické dny, 18. - 20. 9. 2008, ISBN 978-80-7231-331-0, Hradec Králové 2008.
  64. Fabiánová K, Maixnerová M, Kříž B. Changes in pertussis occurrence in the Czech Republic in past decades. Poster in 26th Annual ESPID (European Society for Paediatric Infectious Diseases) Meeting, Graz, Austria, 13. 5. - 16. 5. 2008.
  65. Boxall N., Fabianová K., Kubátová A., Příkazský V. Risk factors associated with a pertussis outbreak in a school of vaccinated children in Pacejov, October 2006 – February 2007. Poster in European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), 18. 10. - 20. 10. 2007 in Stockholm, Sweden.
  66. Fabiánová K, Maixnerová M, Kříž B. Příčina úmrtí: pertuse?! *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*. 2007;16(8):359-62.

67. Kříž B, Fabiánová K, Maixnerová M, Beneš Č, Malý M. Pertuse – navracející se infekce? *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2007;56(2):51-65.
68. Fabiánová K, Příkazský V, Maixnerová M, Beneš Č, Částková J. Epidemiologická situace ve výskytu pertuse a parapertusse v období 1996 - 2005 na území ČR a Jihomoravského kraje. *Zprávy CEM (SZÚ Praha).* 2007;16 (2):83-91.

## 13 Publikace autora bez vztahu k dizertaci

1. Mandřáková Z, Fabiánová K. Postpoliomyelitický syndrom. VII. Slovenský vakcinologický kongres, Štrbské Pleso, 14. – 16. 1. 2016. Zborník abstraktov. ISBN 978-80-89797-08-0.
2. Fabiánová K, Částková J. Proč je poliomyelitida (poliomyelitis anterior acuta) a post-poliomyelitický syndrom stále aktuální? Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2015;24(8):262-4.
3. Orlíková H, Kubátová G, Miklušák R, Lexová P, Fabiánová K. Vaccine preventable infectious diseases in Roma population and in other ethnic minorities in the Czech Republic. Poster in „Inform, protect, immunise: engaging underserved populations“, 4 - 6 September 2012, Dublin, Irsko.
4. Takla A, Wichmann O, Carrillo-Santistevan P, Cotter S, Levy-Bruhl D, Paradowska-Stankiewicz I, Valentiner-Branth P, D'Ancona F; VENICE III NITAG Survey Group. Characteristics and practices of National Immunisation Technical Advisory Groups in Europe and potential for collaboration, April 2014. Euro Surveill. 2015;20(9). pii: 21049. **IF 5,7**
5. Košťálová J, Fabiánová K, Špačková M. Mimořádná konference České lékařské komory Ebola. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2014;23(10-11):407-10.
6. Fabiánová K, Orlíková H. 5. kongres International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED). Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2014;23(10):362-4.
7. Částková J, Fabiánová K, Křížová P, Kynčl J, Petráš P. 26. Pečenkovy epidemiologické dny, Luhačovice, 16. - 18. září 2014. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2014;23(8):281-3.
8. Fabiánová K. Setkání zástupců národních imunizačních programů Evropského regionu WHO - zpráva ze služební cesty. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2014;23(5):176-8.
9. Kynčl J, Částková J, Fabiánová K, Lexová P. Epidemie spalniček v Ústeckém kraji – stručná informace. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2014;23(2):49-50.
10. Fabiánová K, Králová R, Beneš Č. Svrab a současná epidemiologická situace ve výskytu svrabu v ČR. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2014;23(1):16-20.



11. Fabiánová K, Krsek D, Rettich F. Epidemie žluté zimnice v Dárfúru (Súdán). Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2012;21(12):428-30.
12. Fabiánová K, Šebestová H, Beneš Č. Doplnění k článku o syndromu HFM (syndrom ruka-noha-ústa). Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2012;21(8):241-2.
13. Fabiánová K, Macková B. 25. Pečenkovy epidemiologické dny, Harrachov, 18.-20.9.2012. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2012;21(9):309-13.
14. Fabiánová K, Rainetová P. Onemocnění ruka-noha-ústa. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2012;21(6-7):241-2.
15. Fabiánová K, Petráš P. 3. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí, Plzeň, 21.-23. září 2011. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2011;20(10):364-7.
16. Fabiánová K. Akutní zánět zevního zvukovodu v souvislosti s vodními sporty. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2011;20(6):215.
17. Fabiánová K, Petráš P. 24. Pečenkovy epidemiologické dny, České Budějovice. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2010;19(8):230-3.
18. Fabiánová K, Beneš Č. Q horečka – epidemický výskyt v Nizozemí. Zprávy EM (SZÚ Praha). 2010;19(4):111-3.
19. Fabiánová K, Částková J, Beneš Č, Kynčl J, Kříž B. Increase in hepatitis A cases in the Czech Republic in 2008 – Preliminary report. Eurosurveillance. 2008; 40(13). Dostupné na [www:  
http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18997](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18997)
20. Fabiánová K, Melicherčíková V. Problematika infekčních onemocnění, která se mohou vyskytnout při vykonávání činností epidemiologicky závažných. Zprávy CEM (SZÚ Praha), 2007; 16 (9), 415-417.
21. Fabiánová K. Hodnocení závěrečných hlášení o mimořádných epidemiologických situacích ve výskytu přenosných nemocí za rok 2006 v ČR. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2007;16(8):363–5.
22. Příkazský V, Fabiánová K, Roubalová K. Varianta Chlamydia trachomatis s delecí (ztrátou části DNA) na kryptickém plasmidu: důsledky pro použití diagnostických PCR testů. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2006;5(12):515.
23. Kubinyiová M, Fabiánová K. 21. Pečenkovy epidemiologické dny. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. 2006;12(5):206-7.

24. Kubinyiová M, Fabiánová K. 21. Pečenkovy epidemiologické dny. Zprávy CEM (SZÚ Praha), 2006;15(9):396-7.
25. Melicherčíková V, Fabiánová K. Dekontaminace nákupních košíků. Dezinfekce dezinfekce deratizace. 2006;15(2):73-4.
26. Fabiánová K, Príkazský V. Epidemie fusáriových keratitid. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2006;15(7):308-9.
27. Fabiánová K, Melicherčíková V. Krátké sdělení týkající se bakteriální kontaminace rukojetí nákupních košíků. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2006;5(5):204-5.
28. Fabiánová K, Kynčl J, Částková J. Krátké sdělení o projektu ETHREAT. 21. Pečenkovy epidemiologické dny, Hrotovice na Moravě, 19. - 21. 9. 2006. Sborník abstrakt. ISBN 80-7302-114-5.
29. Fabiánová K. 2. pracovní schůzka účastníků mezinárodního projektu ETHREAT. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2006;15(3-4):155-6.
30. Fabiánová K, Matyášová I, Kříž B. Neobvyklé výskyty aseptických meningitid v ČR. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2005;14(4): 194-5.

## 14 Přednášky

---

1. Fabiánová K. Syndrom dávivého kašle v rodině. Mezikrajský seminář epidemiologů, Janov nad Nisou, 3. - 5. 6. 2008.
2. Fabiánová K. Epidemiologie pertuse v ČR a srovnání s ostatními evropskými státy, IV. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 18. - 20. 9. 2008.
3. Fabiánová K. Syndrom dávivého kašle. Seminář pro alergology, Praha, 2. 10. 2008, Praha.
4. Fabiánová K. Epidemie příušnic v ČR v letech 2005 - 2007 – epidemiologické aspekty. Konzultační den NRL pro herpetické viry a NRL pro spalničky, zarděnky, příušnice a parvovirus B19, SZÚ Praha, 22. 10. 2008.
5. Fabiánová K. Problematika laboratorní diagnostiky hepatitid – současná epidemiologická situace. Aktuální problematika práce vedoucího laboranta mikrobiologických laboratoří a imunologických pracovišť, NCO NZO, Brno 2. 12. 2008.
6. Fabiánová K. Současná situace ve výskytu dávivého kašle. Seminář pro pracovníky oboru epidemiologie KHS Středočeského kraje, Praha, 10. 12. 2008.
7. Fabiánová K. Pertuse. Seminář pro pracovníky oboru epidemiologie HS hl. m. Prahy, Praha, 20. 1. 2009.
8. Fabiánová K. Diferenciální diagnostika dávivého kašle. VIII. Setkání dětských alergologů a imunologů, Telč, Krahulčí, 19. - 21. 7. 2009.
9. Fabiánová K., Beneš Č. Současná situace ve výskytu dávivého kašle a související změny v očkovacím kalendáři. 23. Pečenkovy epidemiologické dny, Jihlava, 22. - 24. 9. 2009.
10. Fabiánová K. Pertuse a vakcinační strategie. Mezikrajový seminář epidemiologů, Pec pod Sněžkou, 1. - 3. 6. 2010.
11. Fabiánová K. Výskyt pertuse v ČR – epidemiologická situace. 24. Pečenkovy epidemiologické dny, České Budějovice, 15. – 17. 9. 2010.
12. Fabiánová K., Beneš Č. Epidemie Q horečky v Nizozemí a situace v ČR. 24. Pečenkovy epidemiologické dny, České Budějovice, 15. – 17. 9. 2010.
13. Fabiánová K. Infekční onemocnění přenášená z matky na dítě během těhotenství. Seminář konaný v rámci Národního programu zdraví – Projekty podpory zdraví,

- projekt Mysli na mne včas – dříve než se narodím. Ministerstvo školství, Praha, 20. 10. 2010.
14. Kříž B, Fabiánová K. Očkování proti pertusi. II. Slovenský vakcinologický kongres, Štrbské pleso, Slovensko, 13. - 15. 1. 2011.
  15. Fabiánová K. Epidemiologie pertuse. Odborná konference s mezinárodní účastí: Problematika pertuse, SZÚ, Praha, 15. 4. 2011.
  16. Fabiánová K. Očkování a cestovní medicína. Kalokagathie Forum výchovy ke zdraví, Benešov, 17. 4. 2011.
  17. Fabiánová K. Problematika pertuse v ČR. Mezikrajová konference epidemiologů, Jetřichovice, 10. - 12. 5. 2011
  18. Fabiánová K, Beneš Č, Kříž B. Vývoj pertuse v ČR u dětí do jednoho roku života. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí, Plzeň, 21. - 23. 9. 2011.
  19. Fabiánová K. Podaří se zkvalitněním diagnostiky a očkování adolescentů a dospělých snížit pertusi u dětí? VII. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 29. 9. - 1. 10. 2011.
  20. Fabiánová K. Epidemiologie pertuse. Očkování proti pertusi. Seminář Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii a Společnosti infekčního lékařství J.E.Purkyně Pertuse, Lékařský dům, Praha, 4. 10. 2011.
  21. Fabiánová K. Pertuse. 4x edukační přednáška v rámci očkování zdravotníků proti pertusi, prosinec 2011 – leden 2012, Ústav pro péči o matku a dítě, Praha Podolí
  22. Fabiánová K. Epidemiologie pertuse. Tisková konference „Projekt ochrany novorozenců a malých kojenců v ÚPMD před černým kašlem“, 27. 2. 2012, Ústav pro péči o matku a dítě, Praha Podolí
  23. Fabiánová K. Postexpoziční profylaxe pertuse Mezikrajová konference epidemiologů, Přelouč, 15. 5. -17. 5. 2012
  24. Fabiánová K. Změny ve výskytu pertuse. XXX. dny praktické a nemocniční pediatrie, Kongres pediatriů a dětských sester, Olomouc, 25. - 26. května 2012.
  25. Fabiánová K. Pertuse – co je nového? 25. Pečenkovy epidemiologické dny, Harrachov, 18. - 20. 9. 2012.
  26. Změny ve výskytu pertuse. Pneumologický seminář, Motol, 21. 2. 2013

27. Fabiánová K. Možnosti očkování pro zdravotníky aneb Chráním sebe, chráním Tebe. IV. Celostátní odborná konference Nozokomiální nákazy. Bezpečnost zdravotnického personálu na pracovišti. Palác Charitas, Praha, 22. 2. 2013.
28. Fabiánová K. Změny ve výskytu pertuse. Alergologický seminář, FNKV, 8. 3. 2013.
29. Fabiánová K. Změny ve výskytu pertuse. Pneumologický seminář, Slaný, 20. 3. 2013
30. Fabiánová K. Změny ve výskytu pertuse. Seminář, plicní oddělení Thomayerova nemocnice, 6. 5. 2013.
31. Fabiánová K. Možnosti očkování pro zdravotníky 20. mezinárodní konference Nemocniční epidemiologie a hygiena, Fakultní nemocnice Brno – Bohunice, 25. 9. 2013.
32. Fabiánová K. Rizikový pacient a pertuse. Diagnostika a očkování. IX. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 3. - 5. 10. 2013.
33. Fabiánová K. Má smysl očkovat dospělé proti černému kašli? Mezinárodní kongres medicíny pro praxi, IFDA, Praha, 5. 10. 2013.
34. Fabiánová K, Chlíbek R, Smetana J, Zavadilová J, Dítě, Gál, Lžičařová D, Machač. Séroprevalence protilátek proti Bordetella pertussis u dospělých v ČR. 4. kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie (KMINE), Olomouc, 17. - 19. 10. 2013.
35. Fabiánová K. Současná epidemiologická situace pertuse aneb co je v pertusi nového? Konference Hygiena a preventivní medicína v teorii a praxi, Praha, 3. LF UK, 21. 11. 2013.
36. Havlíčková, Fabiánová, Kynčl, Jiřincová, Nagy, Křížová. Proč očkovat zdravotníky proti chřipce? – edukační přednášky pro zdravotnické pracovníky, 3x (FN Hradec Králové, ÚPMD Podolí, VFN Praha), 2013.
37. Fabiánová K. Co je v pertusi nového? ÚPMD Podolí, Praha, 2013.
38. Fabiánová K. Co je v pertusi nového? Gyn-porod. klinika VFN Apolinář, Praha, 24. 10. 2013
39. Fabiánová K, Současná epidemiologická situace pertuse. Novinky v očkování. Pneumologický seminář, Nemocnice na Bulovce, 13. 1. 2014.
40. Chlíbek R, Fabianova K, Prymula R: Update on Pertussis in the Czech Republic. 4<sup>th</sup> CEEPAG Meeting, Krakow, Poland, 20 - 21. 2. 2014.

41. Fabiánová K, Beneš Č, Šebestová H, Kříž B. Pertuse v České republice. Mezikrajová konference epidemiologů, Praha, 14. 5. 2014.
42. Fabiánová K. Současný stav pertuse v ČR- epidemiologie, prevence a klinický význam. Odborný seminář Aktuality v diagnostice virových a bakteriálních infekcí, Vidia, SZÚ, Praha, 26. 5. 2014.
43. Fabiánová K. Pertuse. Atypické pneumonie. Pneumologický seminář, Praha, 27. 5. 2014.
44. Fabiánová K, Zavadilová J, Lžičařová D, Musílek M, Křížová P, Kříž B. 55 let od zahájení plošného očkování proti pertusi. 26. Pečenkovy epidemiologické dny, Luhačovice, 16. - 18. 9. 2014.
45. Fabiánová K. Očkování těhotných – neúčinnější strategie prevence vzestupu pertuse u dětí? X. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 2. - 4. 10. 2014.
46. Fabiánová K, Zavadilová J, Lžičařová, D, Musílek, M., Křížová P, Kříž B. 55 let od zahájení plošného očkování v ČR. X. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 2. - 4. 10. 2014.
47. Fabiánová K. Nové a znovu se objevující infekční onemocnění. Kurz Nové a znovu se objevující infekční onemocnění, Česká lékařská komora, koordinátor a přednášející, Praha, 14. 1. 2015.
48. Fabiánová K. Pertuse. Seminář kliniky infekčních nemocí Fakultní nemocnice Ostrava, 17. 2. 2015.
49. Fabiánová K. Aktuální problematika pertuse. Seminář NCO NZO Aktuální problematika ochrany a podpory veřejného zdraví – epidemiologie, Brno, 11. 3. 2015.
50. Fabiánová K. Co na nás chystá pertuse a jak se na ni připravit? Světový den astmatu 2015, Praha 5. 5. 2015.
51. Fabiánová K. Hepatitidy – epidemiologická situace. Seminář Diagnostika virových hepatitid, Praha, 26. 5. 2015.
52. Fabiánová K. Beneš Č. Pertuse. Novinky a aktuální epidemiologická situace. Mezikrajový seminář epidemiologů, Černý Důl, 20. - 22. 5. 2015.
53. Fabiánová K. Očkování proti pertusi, diftérii, tetanu. Aktuální problematika. Kurz Očkování v praxi praktického lékaře, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha, 5. 6. 2015.

54. Fabiánová K. *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, pertuse. Kurz Infekce na vzestupu, koordinátor a přednášející, Česká lékařská komora, Praha, 19. 9. 2015.
55. Fabiánová K. Očkování těhotných proti pertusi. XI. Hradecké vakcinologické dny, Hradec Králové, 1. - 3. 10. 2015.
56. Fabiánová K. Proč je infekční poliomyelitida a postpoliomyelitický syndrom stále aktuální? Konzultační den Postpoliomyelitický syndrom. Přenosná dětská obrna. 55 let od zavedení plošného očkování v ČR. SZÚ Praha, 22. 10. 2015.
57. Fabiánová K. Pertuse - Epidemiologická situace a novinky. Konzultační den Problematika pertuse. SZÚ Praha, 10. 12. 2015.
58. Fabiánová K. Očkování proti pertusi, difterii a tetanu. Aktuální problematika. Souvislosti s migrační vlnou. Kurz Očkování, současnost a budoucí potřeby v prevenci infekcí, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha, 29. 1. 2016.
59. Fabiánová K. Difterie – epidemiologie, klinika, diagnostika, terapie a prevence. Seminář kliniky infekčních nemocí Fakultní nemocnice Ostrava, 15. 3. 2016.
60. Fabiánová K. Pertuse – co je nového? Seminář, AKI, Brno, 27. 4. 2016.

## 15 Výzkumná činnost

---

1. 2005 – 2008 - ETHREAT (European Training for Health Professionals on Rapid Response to Health Threats), mezinárodní projekt podporovaný Evropskou komisí. Řešitel projektu v ČR: MUDr. Jan Kynčl, PhD., MUDr. Jitka Částková, MUDr. Kateřina Fabiánová
2. 2011 - 2012 - Projekt 115790 (EPI-Pertussis-CZ) „Sero-prevalence of Bordetella pertussis in adults in the Czech Republic. Epidemiological observational prospective cohort study to evaluate the sero-prevalence of Bordetella pertussis in adults in the Czech Republic.“ Řešitel projektu: doc. MUDr. Roman Chlábek, PhD., odborní spolupracovníci: MUDr. Jan Smetana, MUDr. Petr Gal, MUDr. Petr Dítě, MUDr. Kateřina Fabiánová, Mgr. Jana Zavadilová.
3. 2013 - 2015 - Programový projekt podpořený Interní grantovou agenturou ministerstva zdravotnictví České republiky, registrační číslo NT/14058 – 3: „Studium a porovnání kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v období 1964 – 2015 molekulárně biologickými metodami a aplikace získaných výsledků jako podkladů pro návrh aktualizace vakcinační strategie v ČR“ Řešitel projektu: MUDr. Kateřina Fabiánová, odborní spolupracovníci: MUDr. Pavla Křížová, CSc., RNDr. Martin Musílek, PhD., Mgr. Jana Zavadilová
4. 2013 - Projekt institucionální podpory, grant MZ ČR – koncepční rozvoj výzkumné organizace: Zvýšení proočkovanosti proti sezónní chřipce u zdravotníků s cílem omezit výskyt chřipky jako nozokomiální infekce. MUDr. Martina Havlíčková, CSc., RNDr. Helena Jiřinocá, MUDr. Jan Kynčl, PhD., Mudr. Kateřina Fabiánová
5. 2014 - Projekt institucionální podpory, grant MZ ČR – koncepční rozvoj výzkumné organizace 75010330: „Vyšetření minimální inhibiční koncentrace antibiotik u kmenů *Bordetella pertussis*“. Řešitel projektu: MUDr. Kateřina Fabiánová. Spoluřešitelé: Mgr. V. Jakubů, RNDr. P. Urbášková, CSc., Mgr. J. Zavadilová.



6. 2015 – dosud - Projekt institucionální podpory, grant MZ ČR – koncepční rozvoj výzkumné organizace: „Studium rezistence na běžně používané dezinfekční přípravky ve zdravotnictví a v domácnostech u kmenů *B. pertussis* a *B. parapertussis* ze souboru sbírkových izolátů“. Řešitel projektu: MUDr. Kateřina Fabiánová. Spoluřešitelé: Mgr. Jana Zavadilová, Mgr. Petra Sklenářová, MUDr. Věra Melicherčíková, CSc.
7. 2015 – dosud – Mezinárodní projekt ECDC, číslo /2015/017: „PERTINENT - Sentinelový systém nemocniční surveillance pertuse u dětí  $\leq 12$  měsíců věku v České republice“. Řešitel projektu v ČR: MUDr. Kateřina Fabiánová, MUDr. Pavla Křížová, CSc., Mgr. Jana Zavadilová.
8. 2016 - 2020- Projekt GAČR MZ ČR 16-30782A „Využití omics technologií pro lepší poznání patogenity *Bordetella pertussis*“. Hlavní řešitel: RNDr. Branislav Večerek PhD. Spoluřešitel: Mgr. Jana Zavadilová. Odborní spolupracovníci: Ana Semčilo, Jakub Držmíšek, Kateřina Fabiánová.

## 16 Seznam příloh

- Fabiánová K, Šebestová H, Beneš Č, Zavadilová J, Křížová P, Kříž B. Trend pertuse u dětí do jednoho roku života v ČR v letech 1997 - 2013. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2014;63(4):270-7. ISSN 1210-7913. **IF 0,361**
- Van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N, Wirsing von König CH, Vestrheim DF, Dalby T, Fry NK, Pierard D, Detemmerman L, Zavadilova J, Fabianova K, Logan C, Habington A, Byrne M, Lutyńska A, Mosiej E, Pelaz C, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff AM, Mertsola J, Economopoulou A, He Q, Mooi FR. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2015;34(4):821-30. ISSN 0934-9723. **IF 2,544**
- Jakubů V, Zavadilová J, Fabiánová K, Urbášková P. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015;64(1):12-15. ISSN 1210-7913. **IF 0,361**
- Zavadilová J, Lžičarová D, Musílek M, Křížová P, Fabiánová K. Antigenní variabilita kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v letech 1967-2010 v České republice - možné vysvětlení vzestupu onemocnění pertusí? *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015;64(3):130-8. ISSN 1210-7913. **IF 0,361**
-

## **16.1 Článek 1: Fabiánová K. et al., 2014**

Fabiánová K, Šebestová H, Beneš Č, Zavadilová J, Křížová P, Kříž B. Trend pertuse u dětí do jednoho roku života v ČR v letech 1997 - 2013. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2014;63(4):270-7. ISSN 1210-7913. **IF 0,306**

# Trend pertuse u dětí do jednoho roku života v České republice v letech 1997–2013

Fabiánová K.<sup>1,3</sup>, Šebestová H.<sup>2</sup>, Beneš Č.<sup>2</sup>, Zavadilová J.<sup>1</sup>, Krížová P.<sup>1</sup>, Kríž B.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha

<sup>2</sup>Oddělení biostatistiky a informatiky, Státní zdravotní ústav, Praha

<sup>3</sup>Ústav epidemiologie, 3. LF UK, Praha

## SOUHRN

**Cíl práce:** Popis epidemiologické situace u dětí ve věku do jednoho roku života, které onemocněly pertusí v letech 1997–2013 v České republice.

**Materiál a metodiky:** Do souboru byly zařazeny děti ve věku do jednoho roku života s laboratorně potvrzeným onemocněním pertusí, které byly v období 1997–2013 registrovány prostřednictvím systému přenosných onemocnění. Celkem bylo ve vybraném období nahlášeno 265 dětí ve věku do jednoho roku života. U dětí v sledovaném souboru byla hodnocena vybraná demografická data, počet hospitalizovaných dětí a očkovací anamnéza.

**Výsledky:** U dětí do jednoho roku života byl od devadesátých let minulého století zaznamenán trvale stoupající trend hlášené incidence onemocnění. Nejnižší hlášená incidence pertuse u dětí do jednoho roku života byla zaznamenána v roce 1998 (1,1/100 000 obyvatel), nejvyšší v roce 2013 (31,3/100 000). V období 1997–2013 bylo v ČR prostřednictvím systému přenosných onemocnění hlášeno celkem 265 dětí ve věku do jednoho roku života s onemocněním pertusí, 128 dívek a 137 chlapců. Většina dětí ve sledovaném období

onemocněla během prvních čtyř měsíců života, téměř 77 %. Z 265 dětí nebylo před začátkem onemocněním očkováno 79 %, minimálně jednou dávkou vakcíny proti pertusí bylo v době onemocnění očkováno 21 %. Hospitalizováno v souvislosti s pertusí bylo 75 % dětí. Většina dětí, téměř 81 %, byla hospitalizována s onemocněním v prvních čtyřech měsících života, respektive v šesti měsících života – 90 %.

**Závěry:** Během období 1997–2013 byl v České republice zaznamenán stoupající počet případů onemocnění pertusí u dětí do jednoho roku života. Většina z dětí onemocněla v prvních čtyřech měsících života a nebyla v době onemocnění očkována proti pertusí. Tato skutečnost jednoznačně podporuje důraznější doporučení „cocoon“ strategie; tedy očkování proti pertusí u nejbližších kontaktů kojenice, dále posilovací „booster“ dávku pro osoby ve věku 25 let a zároveň otevírá otázku zavedení očkování těhotných.

## KLÍČOVÁ SLOVA:

pertuse u dětí do jednoho roku života – incidence – mortalita – hospitalizace – očkování

## ABSTRACT

Fabiánová K., Šebestová H., Beneš Č., Zavadilová J., Krížová P., Kríž B.: Pertussis trend in children under one year of age in the Czech Republic in 1997–2013

**Study objective:** To characterize the epidemiological situation of pertussis in children under one year of age in the Czech Republic in 1997–2013.

**Material and methods:** The study cohort consisted of children under one year of age with laboratory confirmed pertussis reported to the communicable disease system from 1997 to 2013. A total of 265 pertussis cases were reported in children under one year of age over the study period. Selected demographic data, need for hospitalization, and vaccination history were evaluated in the study cohort.

**Results:** Children under one year of age have shown a steady upward trend in reported cases of pertussis since the 1990s. The reported incidence of pertussis in this age group was the lowest in 1998 (1.1/100 000 population) and the highest in 2013 (31.3/100 000). In 1997–2013, 265 pertussis cases were reported in children under one year of age, 128 females and 137 males, to the communicable disease system in the Czech

Republic. Most of these children, nearly 77 %, developed pertussis within the first four months of life. Of the 265 children, 79 % were not vaccinated before the onset of the disease and 21 % were immunized with at least one dose of pertussis vaccine before developing the disease. As many as 75 % of the children with pertussis needed hospitalization. Most of them, nearly 81 %, were hospitalized with pertussis in the first four months of life and 90 % of them in the first six months of life.

**Conclusions:** In 1997–2013, an upward trend was observed in pertussis cases in children under one year of age. Most children developed the disease within the first four months of life while not vaccinated against pertussis. This fact unambiguously supports the „cocoon“ strategy, i.e. vaccination of the closest contacts of the child, and a booster dose at 25 years of age. At the same time, a question arises whether to provide vaccination to pregnant women.

## KEY WORDS:

pertussis in children under one year of age – incidence – mortality – hospitalization – vaccination

*Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 63, 2014, č. 4, s. 270–277

## ÚVOD

Před třiceti lety byl ve světě zaznamenán návrat pertuse ve většině vyspělých států. Dramatický nárůst případů je registrován zejména v posledních deseti letech. Hlášená onemocnění pertuse vykazují v současnosti pravidelný cyklický charakter podobně jako v předvakcinační éře, což znamená, že *Bordetella pertussis* stále koluje v populaci [1, 2]. Onemocnění

pertusí se vyskytuje ve všech věkových skupinách; u dětí, adolescentů a dospělých. Zejména u adolescentů a dospělých má onemocnění často atypický průběh a zůstává proto nepoznáno. Právě dospělí a dospívající, zejména nejbližší příbuzní, jsou nejčastějším zdrojem onemocnění pro vnímavé kojenice [3, 4]. Zvýšený výskyt osob s pertusí v populaci může vést ke zvýšení nemocnosti a úmrtnosti u dětí [5]. Děti,

kteří mají nízký věk pro očkování nebo nejsou plně očkované třemi dávkami vakcíny proti pertusi, jsou ve vysokém riziku onemocnění a případných komplikací [6, 7]. K většině úmrtí spojených s pertusí dochází u kojenců, kteří mají nízký věk pro očkování, tedy mladších tří měsíců věku. Zvýšení nemocnosti a úmrtnosti u dětí do jednoho roku života hlášené z většiny vyspělých zemí, např. z USA, Kanady, Austrálie, Velké Británie, je alarmující [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Také v České republice je od 90. let minulého století u dětí do jednoho roku života, podobně jako u celé populace, zaznamenán trvale stoupající trend hlášené incidence onemocnění pertusí. Po dlouhé době byla evidována i 4 úmrtí kojenců (v letech 2005–2009).

V předkládané práci jsou popsány vybrané epidemiologické charakteristiky 256 dětí do jednoho roku života, které onemocněly pertusí v letech 1997–2013.

**MATERIÁL A METODIKA**

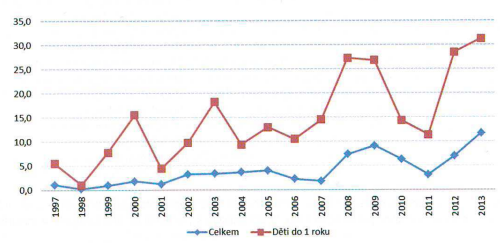
V České republice patří pertuse k povinně hlášeným infekčním onemocněním prostřednictvím osob poskytujících péči a krajských hygienických stanic. Data o jednotlivých nemocných jsou hlášena od osob poskytujících péči územním pracovištím krajských hygienických stanic (KHS). Z KHS jsou přes informační systém přenosných nemocí EPIDAT shromažďována v Národním referenčním centru pro analýzu epidemiologických dat ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ). Případy pertuse byly hlášeny podle surveillance onemocnění na základě klinických, laboratorních a epidemiologických kritérií. Do souboru byly zařazeny děti ve věku do jednoho roku života s laboratorně potvrzeným onemocněním pertusí, které byly v období 1997–2013 registrovány prostřednictvím systému přenosných onemocnění. Celkem bylo ve věku do jednoho roku života ve vybraném období nahlášeno 265 dětí. Věk dětí v měsících pro potřeby této práce byl stanoven podle ukončeného měsíce věku v době onemocnění.

Data o počtech zemřelých na pertusí byla převzata ze stránek Českého statistického úřadu (ČSÚ).

**VÝSLEDKY**

**Pertuse, incidence a počet případů, pohlaví**

U dětí do jednoho roku života, podobně jako u celé české populace, byl od devadesátých let minulého století zaznamenán trvale stoupající trend hlášené incidence onemocnění pertusí. V dlouhodobém trendu hlášené incidence pertuse u dětí do jednoho roku jsou zřejmé pravidelné 3–4leté cyklické výkyvy v závislosti na epidemickém a neepidemickém roku.



**Graf 1.** Pertuse, celková incidence a incidence u dětí do 1 roku života na 100 000 obyvatel, ČR, 1997–2013

**Fig. 1.** Pertussis, overall incidence and incidence in children under one year of age per 100,000 population, Czech Republic, 1997–2013

Nejnižší hlášená incidence pertuse u dětí do jednoho roku života byla zaznamenána v roce 1998: incidence 1,1/100 000 představovala pouze jeden případ; jednalo se o onemocnění měsíční holčičky. Nejvyšší hlášená incidence byla evidována v roce 2013, kdy bylo hlášeno 34 případů pertuse u dětí do jednoho roku života, incidence 31,3/100 000 obyvatel.

Ve sledovaném období 1997–2013 bylo nahlášeno prostřednictvím systému přenosných onemocnění 265 případů pertuse u dětí do jednoho roku života – tabulka 1.

Většina dětí ve sledovaném období onemocněla během prvních čtyř měsíců života, téměř 77 % (204/265), respektive během šesti měsíců života – 87 % (231/265) – tabulka 2.

Ve skupině mírně převažoval počet chlapců nad dívkami; onemocnělo 137 (51,7 %) chlapců a 128 dívek (48,3 %) – tabulka 3.

**Pertuse, očkování**

Ze sledovaného souboru 265 dětí nebylo před začátkem – prvními příznaky – onemocnění očkováno proti pertusi 79 % dětí (209/265) – tabulka 4. Kontraindikace očkování mělo 19 % dětí (50/265). Nejčastější kontraindikace k očkování byly neurologické, dále nízký věk nebo nedonošenost, nachlazení nebo nezhojená chránička po BCG vakcinaci.

Nejvíce neočkovaných dětí ze sledované skupiny, 69 % (182/265), respektive 75 % (199/265), onemocnělo během prvních čtyř, respektive šesti měsíců.

Jednou až třemi dávkami vakcíny proti pertusi bylo před onemocněním očkováno 21 % dětí (56/265); jednou dávkou bylo očkováno 29 dětí, dvěma dávkami 9 dětí a třemi dávkami 18 dětí.

Podrobnější rozbor počtu dávek očkování, které byly dětem aplikovány před onemocněním, ukazuje, že ukončené třídávkové očkování u dětí do jednoho roku života bylo dosaženo jen u 18 z 265 sledovaných dětí – tabulka 5.

V průběhu 1.–26. týdne po očkování první dávkou postupně onemocnělo 29 dětí, z toho 6 dětí v prvním týdnu po očková-

**Tabulka 1.** Pertuse, počet případů a incidence na 100 000 obyvatel, děti do 1 roku života, ČR, 1997–2013

**Table 1.** Pertussis, cases and incidence per 100,000 population, children under one year of age, Czech Republic, 1997–2013

Rok	Počet	Incidence
1997	5	5,6
1998	1	1,1
1999	7	7,8
2000	14	15,6
2001	4	4,5
2002	9	9,8
2003	17	18,2
2004	9	9,4
2005	13	13,0
2006	11	10,6
2007	16	14,5
2008	32	27,3
2009	32	26,8
2010	17	14,4
2011	13	11,4
2012	31	28,5
2013	34	31,3

**Tabulka 2.** Pertuse, počet případů do jednoho roku života, ČR, 1997–2013

**Table 2.** Pertussis, cases in children under one year of age, Czech Republic, 1997–2013

Věk [měsíce]	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Celkem	%
0	0	0	1	2	0	1	1	1	1	0	3	5	3	3	0	4	5	30	11,3
1	0	1	2	2	0	1	1	2	3	1	3	10	10	3	3	6	11	59	22,3
2	1	0	0	2	1	2	5	2	2	3	5	2	3	3	0	8	9	48	18,1
3	0	0	1	1	1	1	6	0	5	1	1	8	3	4	2	6	3	43	16,2
4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	4	5	2	4	2	1	24	9,1
5	0	0	1	2	0	1	0	2	0	2	0	2	2	2	1	1	2	18	6,8
6	0	0	1	1	0	3	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	9	3,4
7	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	7	2,6
8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	4	1,5
9	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	4	1,5
10	2	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	4	0	1	0	0	12	4,5
11	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	7	2,6
Celkem	5	1	7	14	4	9	17	9	13	11	16	32	32	17	13	31	34	265	100,0

ní, 4 děti ve druhém týdnu, 7 dětí ve třetím týdnu, 3 děti ve čtvrtém týdnu, 5 dětí v pátém týdnu, 2 děti v šestém týdnu a po jednom dítěti ve dvacátém pátém a dvacátém šestém týdnu po očkování. Po očkování druhou dávkou vakcíny proti pertusi onemocnělo celkem 9 dětí; vždy dvě děti v prvním a třetím týdnu a pak po jednom dítěti ve čtvrtém, šestém, dvanáctém, čtrnáctém a třicátém sedmém týdnu. Po očkování třetí dávkou vakcíny proti pertusi onemocnělo v rozmezí od šestého do třicátého čtvrtého týdne 18 dětí – tabulka 6. V tabulce byly vynechány týdny s nulovým hlášením.

**Pertuse, hospitalizace**

Ve sledované skupině bylo v souvislosti s pertusí v letech 1997–2013 celkem hospitalizováno téměř 75 % dětí (198/265). V jednotlivých letech kolísal počet hospitalizovaných dětí od 55 do 100 %.

**Tabulka 3.** Pertuse, počet dívek a chlapců do jednoho roku života, ČR, 1997–2013

**Table 3.** Pertussis, cases in females and males under one year of age, Czech Republic, 1997–2013

Věk v měsících	M	Ž	Celkem
0	15	15	30
1	30	29	59
2	23	25	48
3	24	19	43
4	14	10	24
5	10	8	18
6	5	4	9
7	3	4	7
8	2	2	4
9	4	0	4
10	4	8	12
11	3	4	7
Celkem	137	128	265

**Tabulka 4.** Pertuse, počet očkovaných a neočkovaných dětí do jednoho roku života v letech, ČR, 1997–2013

**Table 4.** Pertussis, cases in vaccinated and unvaccinated children under one year of age, Czech Republic, 1997–2013

Věk v měsících	Očkován	Neočkován	Celkem
0	0	30	30
1	0	59	59
2	2	46	48
3	14	29	43
4	6	18	24
5	5	13	18
6	5	4	9
7	4	3	7
8	3	1	4
9	4	0	4
10	7	5	12
11	6	1	7
Celkem	56	209	265

Většina dětí byla hospitalizována s onemocněním v prvních čtyřech měsících života – téměř 81 % (161 ze 198 hospitalizovaných), respektive v šesti měsících života 90 % (180/198).

Nejvíce hospitalizovaných dětí podle jednotlivých měsíců věku bylo po ukončení prvním měsíc života, téměř 27 % dětí (53/198) – tabulka 7.

**Pertuse, úmrtí**

Ve sledovaném období 1997–2013 došlo v České republice ke čtyřem úmrtím dětí do jednoho roku života: v roce 2005 úmrtí měsíčního chlapce, v roce 2007 úmrtí čtyřměsíční dívky, v roce 2008 úmrtí čtyřtýdenní holčičky a v roce 2009 úmrtí dvouměsíční dívky. Tři děti nebyly očkovány proti pertusi z důvodů nízkého věku. U čtvrtého dítěte bylo zahájení očkování odloženo pro nachlazení, které však již patřilo k prvním

**Tabulka 5.** Pertuse, počet dávek očkování u dětí do jednoho roku života před onemocněním, ČR, 1997–2013

**Table 5.** Pertussis, number of vaccine doses in children under one year of age administered before disease, Czech Republic, 1997–2013

Věk v měsících	0 očkování	1 očkování	2 očkování	3 očkování	Celkem
0	30	0	0	0	30
1	59	0	0	0	59
2	46	2	0	0	48
3	29	13	1	0	43
4	18	5	1	0	24
5	13	3	2	0	18
6	4	2	2	1	9
7	3	1	1	2	7
8	1	1	1	1	4
9	0	0	0	4	4
10	5	1	1	5	12
11	1	1	0	5	7
<b>Celkem</b>	<b>209</b>	<b>29</b>	<b>9</b>	<b>18</b>	<b>265</b>

příznakům fatálního onemocnění pertusi. Ve všech čtyřech případech byl zdrojem onemocnění člen blízké rodiny.

**DISKUSE**

Rozbor epidemiologických charakteristik u dětí do jednoho roku života v ČR v letech 1997–2013 prokázal stoupající trend onemocnění, který ve svém vývoji téměř kopíruje trend nemocnosti celé populace. Obdobná situace je rovněž popisována v mnoha dalších zemích, kde došlo k přechodu z celobuněčné vakcíny proti pertusi na vakcínu s acelulární pertusovou složkou. S nárůstem počtu nemocných u adolescentů a dospělých stoupá nemocnost a úmrtnost nejmenších dětí [5].

Hlášená onemocnění pertuse v různých zemích vykazují cyklický charakter, stejně jako v předvakcinační éře, což znamená, že původce onemocnění, bakterie *Bordetella pertussis*, stále koluje v populaci [1, 2]. U věkových skupin dětí do jednoho roku života v ČR v letech 1997–2013 se v dlouhodobém trendu hlášené incidence vyskytují tři až čtyřleté epidemické cykly. Tyto cykly korespondují s dlouhodobým cyklickým trendem pertuse v celé české populaci.

Hlavním přínosem očkování proti pertusi je snížení rizika závažných průběhů onemocnění u dětí. Prioritou WHO (World Health Organization) je dosáhnout u všech dětí 90% a vyšší proočkovanosti alespoň třemi dávkami pertusové vakcíny. První dávku WHO doporučuje v 6. týdnu života, následující dvě dávky by měly být v rozestupu 4–8 týdnů, přičemž poslední dávka základního očkování by měla být aplikována do 6. měsíce věku [16]. Obecně platí, že pro ochranu před onemocněním případně před závažným průběhem onemocnění je třeba aplikovat minimálně dvě dávky vakcíny s acelulární pertusovou složkou (aP). Podle švédské studie s počtem dávek klesá incidence onemocnění v populaci dětí do jednoho roku života [17].

Od zahájení celoplošného očkování v ČR v roce 1958 bylo pětidávkové schéma očkování proti pertusi součástí očkovacího kalendáře dětí. Podle údajů poskytovaných WHO se u nás proočkovanost třemi dávkami proti pertusi minimálně v posledních deseti letech udržuje nad hranici 97% [18]. Začátek očkování se postupně upravoval z původních tří až pěti měsíců dítěte v roce 1958, přes 9. a 13. týden až na 9. týden života

v říjnu 2010. Poslední posun v očkování byl mimo jiné vyvolán narůstajícím počtem případů pertuse v populaci a zvýšeným rizikem onemocnění pro nejmenší děti. V průběhu období 1997–2007 došlo postupně k nahrazování celobuněčné vakcíny očkovací látkou s acelulární pertusovou složkou. V roce 2007 aP vakcína zcela nahradila dosud používanou celobuněčnou očkovací látku proti pertusi.

V českém očkovacím kalendáři je stanoveno, aby první tři dávky vakcíny proti pertusi byly dětem aplikovány do jednoho roku života. Ze sledovaného souboru 265 dětí nebylo před začátkem onemocnění očkováno proti pertusi ani jednou dávkou vakcíny 209 dětí (79%). Většina neočkovaných dětí však nedosáhla v době onemocnění věku nutného pro zahájení očkování. Kontraindikace očkování mělo 50 dětí. Nejvíce neočkovaných dětí ze sledované skupiny, celkem 75% dětí (199), onemocnělo během rizikových prvních šesti měsíců života; podle doporučení WHO by již tyto děti měly být očkovány třemi dávkami. Podle platného znění očkovací vyhlášky by děti v našem souboru měly být poprvé očkovány mezi 9–13. týdnem života. Od ukončení třetího měsíce do roku života však nebylo ani jednou dávkou očkováno 74 dětí. Z 265 hlášených případů pertuse bylo 56 dětí (21%) očkováno jednou až třemi dávkami vakcíny proti pertusi: jednou dávkou bylo očkováno 29 dětí, dvěma dávkami 9 dětí a třemi dávkami

**Tabulka 6.** Pertuse, počet týdnů, které uplynuly od poslední dávky očkování do onemocnění, ČR, 1997–2013

**Table 6.** Pertussis, number of weeks from the last vaccine dose to disease, Czech Republic, 1997–2013

Týden onemocnění po očkování	Počet případů po 1. očkování	Počet případů po 2. očkování	Počet případů po 3. očkování	Celkem případů
1	6	2	0	8
2	4	0	0	4
3	7	2	0	9
4	3	1	0	4
5	5	0	0	5
6	2	1	1	4
10	0	0	1	1
12	0	1	0	1
13	0	0	1	1
14	0	1	0	1
16	0	0	1	1
19	0	0	2	2
20	0	0	1	1
21	0	0	3	3
22	0	0	1	1
23	0	0	2	2
24	0	0	1	1
25	1	0	1	2
28	0	0	1	1
29	0	0	1	1
34	0	0	1	1
36	1	0	0	1
37	0	1	0	1
<b>Celkem</b>	<b>29</b>	<b>9</b>	<b>18</b>	<b>56</b>

pertusové vakcíny 18 dětí. V průběhu šesti týdnů onemocnělo po prvním očkování 27 dětí, po druhém očkování 6 dětí. Lze předpokládat, že většina z těchto dětí byla očkována již v inkubační době onemocnění nebo se s onemocněním setkala v krátké době po očkování.

Onemocnění pertusí je pro nejmenší děti závažné svým průběhem a zejména možnými komplikacemi. Proto by děti měly být vždy hospitalizovány a léčeny na specializovaných pracovištích. V USA bylo hospitalizováno více než 50 % dětí do jednoho roku života, které onemocněly pertusí. Většina z hospitalizovaných dětí byla ve věku do šesti měsíců [19].

Podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví ČR č. 306/2012 Sb. by měl být každý případ akutní pertuse hospitalizován. Je to důležitý požadavek také z epidemiologického hlediska; včasná izolace nemocného a cílená antibiotická terapie zabrání šíření onemocnění na další osoby. Dlouhodobě je však v ČR průměrně ročně hospitalizováno s pertusí pouze 10 % osob. Malý počet hospitalizovaných osob s pertusí svědčí zejména o problematické a pozdní diagnóze onemocnění [20]. Adolescenti a dospělí se tak stávají zdrojem onemocnění pro své okolí. Onemocnění nejmenších dětí může probíhat velmi závažně, zejména do 6 měsíců věku, a jejich léčba by vzhledem k možným život ohrožujícím komplikacím měla probíhat vždy ve zdravotnickém zařízení. Závažnost onemocnění pro malé děti potvrdila v roce 2010 největší kalifornská epidemie pertuse za posledních 63 let. Hlášená nemocnost dětí do 6 měsíců byla 441,7/100 000 obyvatel, což představovalo 1257 případů, a zemřelo 10 dětí ve věku ≤ 2 měsíce [21].

V sledovaném souboru dětí v ČR ve věku do jednoho roku života bylo celkem hospitalizováno téměř 75 % dětí, nicméně v průběhu jednotlivých let docházelo k značným výkyvům v počtu hospitalizovaných dětí. U novorozenců a kojenců bývá diagnostika pertuse náročnější, protože u nich často průběh onemocnění neodpovídá typickému klinickému obrazu [22], a hrozí tak nebezpečí oddálení správné diagnózy. Časná diagnostika a terapie je v případech pertuse u malých dětí velmi důležitá. Je proto nezbytné použít k laboratornímu potvrzení pertuse u malých dětí všechny dostupné metody, zejména PCR, kultivaci, případně průkazem protilátek. V případě kultivace *B. pertussis* je žádoucí posílat izoláty do Národní referenční laboratoře pro difterii a pertusí Státního zdravotního ústavu Praha k další charakterizaci. Při anamnéze a diagnostice u malých dětí je nutné pátrat i po zdravotním stavu, případně onemocnění blízkých kontaktů dítěte.

Od roku 1919 byly na území bývalého Československa hlášeny ročně desítky až stovky případů úmrtí v souvislosti s pertusí. Zavedením chloramfenikolu do léčby pertuse a celoplošného očkování v padesátých letech minulého století došlo rychle k výraznému poklesu incidence a dětské úmrtnosti. Od roku 1960 do roku 1983 bylo zaznamenáno celkem 21 úmrtí v souvislosti s pertusí. Od roku 1984 do roku 2004 nebylo hlášeno žádné úmrtí. U studovaného souboru byla v průběhu 17 let registrována 4 úmrtí; v letech 2005, 2007, 2008 a 2009, kdy v souvislosti s pertusí zemřely čtyři dosud neočkované děti. Podle epidemiologického šetření byl ve všech případech zdroj onemocnění v rodině.

Sledování hladiny a dynamiky transplacentárně přenesených protilátek proti pertusí prokázalo, že ve 4. týdnu života má protilátky již pouze 21 % dětí a ve 2. měsíci života je většina dětí naprosto bez obranných látek proti onemocnění způsobeném *B. pertussis*. Biologický poločas pasivně získaných mateřských protilátek je totiž relativně krátký. Tato skutečnost byla jedním z důvodů posunu zahájení očkování v České republice v říjnu 2010 do 9. týdne života [23, 24, 25]. Koncentrace protilátek v pupečnickové krvi je vyšší než v krvi mateřské, což svědčí o aktivním transplacentárním přenosu. Výše hladiny protilátek a tím míra protektivnosti pro miminko je závislá na

**Tabulka 7.** Pertuse, hospitalizované děti do 1 roku života podle měsíců, ČR, 1997–2013

**Table 7.** Pertussis, number of hospitalized children under one year of age by month, Czech Republic, 1997–2013

Věk v měsících	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Celkem hospitalizací
0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	3	4	3	3	0	4	5	26
1	0	1	2	2	0	1	1	2	3	1	3	10	9	2	3	2	11	53
2	1	0	0	2	1	1	3	1	0	3	5	1	2	1	0	7	6	34
3	0	0	1	1	1	0	5	0	5	1	1	6	1	3	2	4	2	33
4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	3	2	1	2	2	1	15
5	0	0	1	2	0	1	0	2	0	2	0	1	0	0	0	1	2	12
6	0	0	1	1	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	7
7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	5
8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
10	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2	0	1	0	0	7
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Počet hospitalizovaných dětí/ počet dětí celkem	3/5	1/1	6/7	12/14	3/4	5/9	13/17	7/9	8/13	9/11	16/16	25/52	19/32	10/17	9/13	24/31	28/34	198/265
% hospitalizovaných dětí do 1 roku života	60,0	100,0	85,7	85,7	75,0	55,6	76,5	77,8	61,5	81,8	100,0	78,1	59,4	58,8	69,2	77,4	82,4	74,7



řadě faktorů, mimo jiné na době, která uplynula od očkování matky [26].

Významně vyšší hladiny protilátek mají novorozenci, jejichž matka byla proti pertusi očkována v graviditě [27]. V řadě zemí, například v USA, Kanadě, Velké Británii, Izraeli, Islandu, bylo od roku 2010 postupně doporučeno a zahájeno očkování těhotných žen vakcínou s acelulární pertusovou složkou se snížením množstvím antigenů (Tdap). Podle recentních studií neredukuje očkování matek po porodu a „cocoon“ strategie onemocnění pertusí u dětí do 6 měsíců věku. Očkování těhotných Tdap vakcínou v kombinaci s „cocoon“ strategií se proto doporučuje v mnoha státech jako nejúčinnější metoda, která snižuje morbiditu a mortalitu nejmenších dětí.

Vzhledem k nárůstu pertuse v České republice je nutné a nezbytné pro ochranu nejmenších dětí udržet i nadále co nejvyšší proočkovanosť a zavést taková opatření, která by minimalizovala přenos pertuse na neočkované děti. Znamená to co nejlépe využít současně dostupné vakcíny proti pertusi, a tedy zahájit další preventivní opatření, ať již formou posilovací „booster“ dávky vakcíny proti pertusi pro osoby ve věku 25 let, nebo účinnou medializací „cocoon“ strategie pro blízké kontakty u okolí budoucího miminka a zároveň doporučení pro očkování těhotných jako nadějnějšího řešení, než budou k dispozici vakcíny nové generace.

### ZÁVĚR

Hlášená incidence pertuse v České republice narůstá od devadesátých let minulého století. Případy jsou evidovány ve všech věkových kategoriích. V letech 1997–2013 byl pozorován jednoznačný nárůst hlášené incidence u dětí do jednoho roku života. Většina z těchto dětí onemocněla během prvních čtyř měsíců života, proto ještě nemohlo být zahájeno očkování podle platného očkovacího kalendáře. Většina dětí byla v souvislosti s pertusí hospitalizována. V souvislosti s pertusí došlo ke čtyřem úmrtím nejmenších dětí.

Je proto nezbytné zvýšit povědomí laické a odborné veřejnosti o onemocnění a jeho závažnosti a minimalizovat všemi dostupnými prostředky přenos onemocnění na nejmenší děti.

**Poděkování:** Práce byla podpořena výzkumným grantem NT/14058-3 Interní grantové agentury (IGA) MZ ČR. Poděkování všem, kteří se podíleli na surveillance pertuse v České republice.

### Literatura

- Cherry JD. Epidemic pertussis in 2012 – the resurgence of a vaccine-preventable disease. *N Engl J Med*, 2012;367(9):785–787.
- Mattoo S, Chery JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Mikrobiol Rev*, 2005;18(2):326–382.
- Bisgard KM, Pascual FB, Ehresmann KR, Miller CA, et al. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J*, 2004;23(11):985–89.
- Wendelboe AM, Njamkepo E, Bourillon A, Floret DD, et al. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr Infect Dis J*, 2007;26(4):293–299.
- WHO. Revised guidance on the choice of pertussis vaccines: July 2014. *Wkly Epidemiol Rec*, 2014; 89(30):337–344 [online]. [cit. 2014-07-30] Dostupný na [www.who.int/wer/2014/wer8930/en/](http://www.who.int/wer/2014/wer8930/en/). ISSN 0049-8114.
- Baptista PN, Magalhaes VS, Rodrigues LC. The role of adults in household outbreaks of pertussis. *Int J Infect Dis*, 2010;14(2):e111–114.
- Frumkin K. Pertussis and persistent cough: practical, clinical and epidemiologic issues. *The Journal of emergency medicine*, 2013;44(4):889–895.
- CDC. 2012 Final Pertussis Surveillance Report. [online] [cit. 2014-08-08] Dostupný na [www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html](http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html)

- CDC. 2013 Provisional Pertussis Surveillance Report. [online] [cit. 2014-08-08] Dostupný na [www.cdc.gov/pertussis/-surveillance-report.pdf](http://www.cdc.gov/pertussis/-surveillance-report.pdf).
- Haberling DL, Holman RC, Paddock CD, Murphy TV. Infant and maternal risk factors for pertussis-related infant mortality in the United States, 1999 to 2004. *Pediatr Infect Dis J*, 2009;28:194–198.
- Vitek CR, Pascual FB, Baughman AL, Murphy TV. Increase in deaths from pertussis among young infants in the United States in the 1990s. *Pediatr Infect Dis J*, 2003;22:628–634.
- Winter K, Harriman K, Zipprich J, Schechter R, et al. California pertussis epidemic, 2010. *J Pediatr*, 2012;161:1091–1096.
- Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, et al. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis*, 2008;47(3):328–338.
- Van Hoek AJ, Campbell H, Amirthalingam G, Andrews N, et al. The number of deaths among infants under one year of age in England with pertussis: results of a capture/recapture analysis for the period 2001 to 2011. *Eurosurveillance*, 2013;18(9).
- Swamy GK, Wheeler SM. Neonatal pertussis, cocooning and maternal immunization. *Expert Rev Vaccines*, 2014;1–8.
- WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*, 2010;85(40):385–400.
- 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;118:978–984.
- WHO [online] [cit. 2014-08-08] Dostupný na [http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/globalsummary/coverages?c=CZE](http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/coverages?c=CZE)
- Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta. Pertussis (Whooping cough). [online]. [cit. 2014-08-10] Dostupný na [www.cdc.gov/pertussis/clinical/complications.html](http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/complications.html)
- Fabiánová K. Pertuse a současné možnosti očkování. *Vakcinologie*, 2011;5(3):116–126.
- Pertussis report 2011-04-13. California Department of Public Health, 2011 [cit. 2012-07-30] Dostupný na [www.cdph.ca.gov/programs/immunize/Documents/PertussisReport2011-04-13.pdf](http://www.cdph.ca.gov/programs/immunize/Documents/PertussisReport2011-04-13.pdf)
- Swamy GK, Wheeler SM. Neonatal pertussis, cocooning and maternal immunization. *Expert Rev Vaccines*, 2014;1–8.
- Esposito S, Bosis S, Morlacchi L, Baggi E, et al. Can infants be protected by means of maternal vaccination? *Clin Microbiol Infect*, 2012;18(Suppl 5):85–92.
- Castagnini LA, Healy CM, Rench MA, Wootton SH, et al. Impact of maternal postpartum tetanus and diphtheria toxoids and acellular pertussis immunization on infant pertussis infection. *CID*, 2012;54(1):78–84.
- Vysoká-Buriánová B. Pertuse – Parapertuse. Disertační práce. 1961, Praha.
- Bechini A, Tiscione E, Boccalini S, Levi M, et al. Acellular pertussis vaccine use in risk groups (adolescents, pregnant women, newborns and health care workers): A review of evidences and recommendations. *Vaccine*, 2012;30(35):5179–190.
- Gall SA, Myers J, Pichichero M. Maternal immunization with tetanus-diphtheria-pertussis vaccine: effect on maternal and neonatal serum antibody levels. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2011;204:334.e1–5.

Do redakce došlo dne 14. 8. 2014.

Adresa pro korespondenci:  
**MUDr. Kateřina Fabiánová**  
 Centrum epidemiologie a mikrobiologie  
 Státní zdravotní ústav  
 Šrobárova 48  
 100 42 Praha 10  
 e-mail: [kfabianova@szu.cz](mailto:kfabianova@szu.cz)

## **16.2 Článek 2: Van Gent M. et al., 2015**

Van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N, Wirsing von König CH, Vestrheim DF, Dalby T, Fry NK, Pierard D, Detemmerman L, Zavadilova J, Fabianova K, Logan C, Habington A, Byrne M, Lutyńska A, Mosiej E, Pelaz C, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff AM, Mertsola J, Economopoulou A, He Q, Mooi FR. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34(4):821-30. ISSN 0934-9723. **IF 2,544**

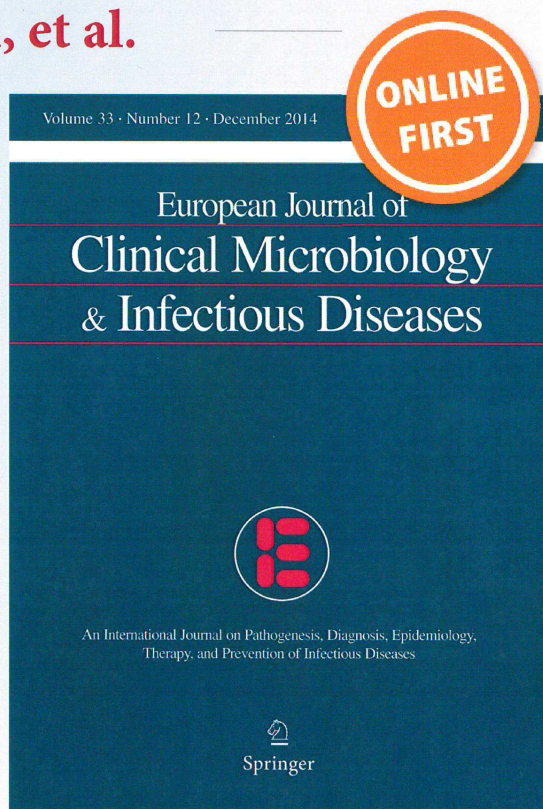
*Analysis of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012*

**M. van Gent, C. J. Heuvelman, H. G. van der Heide, H. O. Hallander, A. Advani, N. Guiso, C. H. Wirsing von König, D. F. Vestrheim, et al.**

**European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**

ISSN 0934-9723

Eur J Clin Microbiol Infect Dis  
DOI 10.1007/s10096-014-2297-2



 Springer

## Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012

M. van Gent · C. J. Heuvelman · H. G. van der Heide · H. O. Hallander · A. Advani · N. Guiso · C. H. Wirsing von König · D. F. Vestrheim · T. Dalby · N. K. Fry · D. Pierard · L. Detemmerman · J. Zavadilova · K. Fabianova · C. Logan · A. Habington · M. Byrne · A. Lutyńska · E. Mosiej · C. Pelaz · K. Gröndahl-Yli-Hannuksela · A.M. Barkoff · J. Mertsola · A. Economopoulou · Q. He · F. R. Mooi

Received: 8 October 2014 / Accepted: 7 December 2014  
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Despite more than 50 years of vaccination, pertussis is still an endemic disease, with regular epidemic outbreaks. With the exception of Poland, European countries have replaced whole-cell vaccines (WCVs) by acellular vaccines (ACVs) in the 1990s. Worldwide, antigenic divergence

in vaccine antigens has been found between vaccine strains and circulating strains. In this work, 466 *Bordetella pertussis* isolates collected in the period 1998–2012 from 13 European countries were characterised by multi-locus antigen sequence typing (MAST) of the pertussis toxin promoter (*ptxP*) and of

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10096-014-2297-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. van Gent (✉) · C. J. Heuvelman · H. G. van der Heide · F. R. Mooi  
Centre for Infectious Disease Control (CIb), National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven, The Netherlands  
e-mail: marjolein.van.gent@rivm.nl

H. O. Hallander · A. Advani  
The Swedish National Institute of Public Health, Solna, Sweden

N. Guiso  
Molecular Prevention and Therapy of Human Diseases, Institut Pasteur, Paris, France

C. H. Wirsing von König  
Labor: Medizin Krefeld MVZ, Helios Klinikum, Krefeld, Germany

D. F. Vestrheim  
Department of Bacteriology and Immunology, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway

T. Dalby  
Department of Microbiology and Infection Control, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

N. K. Fry  
Respiratory and Vaccine Preventable Bacteria Reference Unit, Public Health England—Microbiology References Services, Colindale, United Kingdom

D. Pierard · L. Detemmerman  
National Reference Center for Pertussis, Department of Microbiology and Infection Control, Universitair Ziekenhuis Brussel, Brussels, Belgium

J. Zavadilova  
National Reference Laboratory for Pertussis and Diphtheria, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

K. Fabianova  
Department of Infectious Diseases Epidemiology, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

C. Logan · A. Habington · M. Byrne  
Microbiology Department, Our Lady's Children's Hospital, Dublin, Ireland

A. Lutyńska · E. Mosiej  
Department of Sera and Vaccines Evaluation, National Institute of Public Health, National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland

C. Pelaz · Q. He  
Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

K. Gröndahl-Yli-Hannuksela · A. Barkoff  
Department of Infectious Disease Surveillance and Control, National Institute for Health and Welfare, Turku, Finland

the genes coding for proteins used in the ACVs: pertussis toxin (Ptx), pertactin (Prn), type 2 fimbriae (Fim2) and type 3 fimbriae (Fim3). Isolates were further characterised by fimbrial serotyping, multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The results showed a very similar *B. pertussis* population for 12 countries using ACVs, while Poland, which uses a WCV, was quite distinct, suggesting that ACVs and WCVs select for different *B. pertussis* populations. This study forms a baseline for future studies on the effect of vaccination programmes on *B. pertussis* populations.

## Introduction

Pertussis, or whooping cough, is a highly contagious human infection of the upper respiratory tract caused by the Gram-negative bacterium *Bordetella pertussis* [1]. Despite the introduction of vaccination against pertussis more than 50 years ago, the disease is still a public health problem worldwide, with epidemic outbreaks occurring every 3–5 years. In the last 10 years, a resurgence of pertussis was observed in countries with highly vaccinated populations, including Australia [2], Norway [3], Poland [4], the Netherlands [5], the United Kingdom [6] and the United States [7]. One of the hallmarks of the pertussis resurgence is the shift in prevalence from young infants to older persons with waning vaccine-induced immunity [8, 9]. Several causes have been proposed for the resurgence of pertussis, including improved diagnosis, increased awareness [10, 11], decreased vaccine efficacy, waning immunity and pathogen adaptation [12, 13]. The contribution of these factors to the resurgence of pertussis may differ between countries.

European countries use different vaccines and vaccination schedules for pertussis (Table 1 and <http://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Pages/Scheduler.aspx>). Partly due to the side effects of the whole-cell vaccines (WCVs), all European countries, except Poland, have replaced WCVs by acellular vaccines (ACVs) since the 1990s [14]. WCVs are composed of killed *B. pertussis* bacteria, while ACVs consist of 1–5 purified *B. pertussis* proteins: pertussis toxin (Ptx), pertactin (Prn), filamentous haemagglutinin (FHA), type 2 fimbriae (Fim2) and type 3 fimbriae (Fim3). Worldwide, variation in these vaccine antigens have been found between strains used for the production of the vaccines and isolates that are circulating in those countries where these vaccines have been used extensively [2, 15–25].

J. Mertsola  
Department of Pediatrics, Turku University Hospital, Turku, Finland

A. Economopoulou  
European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC),  
Stockholm, Sweden

 Springer

**Table 1** Pertussis vaccines currently used in European countries\*

Country	Vaccine
Belgium	ACV3
Czech Republic	ACV3 or ACV5
Denmark	ACV1
Finland	ACV2 or ACV3
France	ACV2, ACV3 or ACV5
Germany	ACV2 or ACV3
Ireland	ACV3
Norway	ACV3
Poland	WCV
Spain	ACV3
Sweden	ACV2 or ACV3
The Netherlands	ACV3
United Kingdom	ACV3 or ACV5

\*Vaccine compositions: ACV1: Ptx; ACV2: Ptx and FHA; ACV3: Ptx, FHA and Prn; ACV5: Ptx, FHA, Prn, Fim2 and Fim3

Besides antigenic variation, recently, *B. pertussis* isolates have emerged which produce higher levels of a number of virulence factors in vitro, including Ptx [5, 26]. These isolates carry a new allele for the Ptx promoter, *ptxP3*, and have replaced the resident *ptxP1* isolates in many countries. The emergence of *ptxP3* isolates is associated with the increase in pertussis notifications in the Netherlands since 1996 [5]. Nowadays, *ptxP3* isolates are found worldwide [20–22, 25, 27–30]. Moreover, recently, *B. pertussis* isolates have been observed that do not express one or more vaccine components, in particular, Prn [7, 31–39].

Monitoring changes in the European *B. pertussis* populations and studying the impact of these changes on the disease burden are important in order to establish the most effective pertussis vaccines and vaccination strategies. To study these changes, a European network, designated EUpertstrain, was created in 2001, with the main aim of collecting and typing of European *B. pertussis* isolates. The number of participating countries increased from five in 2001 to nine in 2013 [40–43]. Members of the EUpertstrain group collected and typed isolates on a regular basis between 2001 and 2013. Typing involved multi-locus antigen sequence typing (MAST), fimbrial serotyping, multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). However, direct comparison of these isolates collected during the study period was only performed by PFGE analyses [41–43].

This present study is part of a European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC)-funded network, EUpertlabnet, which focuses on the laboratory surveillance of whooping cough in EU Member States and European Economic Area (EEA) countries. In this study, we present the typing results of isolates collected from 13 countries

(Belgium, the Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Ireland, Norway, Poland, Spain, Sweden, the Netherlands and the United Kingdom) between 2000 and 2012. Further, the typing of previous collections was extended and the results were combined to give an overview of *B. pertussis* isolates circulating in European countries between 1998 and 2012.

## Materials and methods

### *B. pertussis* isolates

*B. pertussis* isolates were grown on Bordet–Gengou (BG) agar with 15 % sheep blood and incubated for 3 to 4 days at 35 °C. In total, 466 *B. pertussis* isolates were included in this study (Supplementary Table S1). Isolates collected between 1998 and 2009 were previously analysed by PFGE [41–43]. Here, we extended these analyses by typing more isolates from this period. Further, we present novel data from five EU countries; Belgium ( $n=20$ , isolated in 2000–2012), the Czech Republic ( $n=20$ , isolated in 2008–2012), Ireland ( $n=20$ , isolated in 2003–2012), Poland ( $n=20$ , isolated in 2000–2012) and Spain ( $n=12$ , isolated in 2004–2012).

### Multi-locus antigen sequence typing (MAST)

Polymorphisms in the genes for proteins used in the ACVs (PtxA, Prn, Fim2 and Fim3) were analysed as described previously [5, 15, 44, 45]. The pertussis toxin promoter, *ptxP*, was also included, as previous studies have shown that the *ptxP3* allele is an important characteristic of successful isolates [5, 20–22, 25, 27–30]. For DNA isolation, bacterial cells were lysed in Tris-EDTA buffer (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, the Netherlands, 1.0 M Tris-HCl, containing 0.1 M EDTA, 100× concentrated) at 95 °C for 5 min, centrifuged briefly and used in a polymerase chain reaction (PCR) assay.

### Serotyping

A bacterial suspension was mixed on a glass slide with monoclonal or polyclonal antibodies against Fim2 or Fim3 (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), South Mimms, UK). Agglutination was determined after a maximum of 30 s to avoid false-positive agglutination [44]. Bacterial suspensions were mixed with a physiological salt solution to determine auto-agglutination.

### Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)

For MLVA, the variable number of tandem repeats in six loci (VNTR1, VNTR3a, VNTR3b, VNTR4, VNTR5 and VNTR6) was determined as described previously [23, 46].

### Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

All EUpertstrain isolates were previously analysed by PFGE at the Swedish Institute for Communicable Disease Control (SMI) [43]. PFGE of isolates from Belgium, Ireland and Poland was performed by the respective countries, whereas PFGE of isolates from the Czech Republic and Spain was performed at the Finnish National Institute for Health and Welfare (THL). Gel images of all isolates from the five countries were also analysed at the Finnish THL. The PFGE protocol, reference strains used and profile analysis were the same as those previously described [43]. The profiles were analysed by using BioNumerics software version 4.61 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The Swedish nomenclature was used and based on cluster analysis with the group method with 1 % band tolerance and 1 % optimisation settings. The resulting profiles were designated BpSR1, BpSR2, BpSR3 etc. for those isolates with profiles first detected in Sweden. Isolates first identified in a country other than Sweden, such as Finland, were designated BpFINR1, BpFINR2 etc.

## Results

### The EUpertstrain and EUpert-labnet collections

One of the aims of the EUpertstrain network is to collect isolates from different European countries in order to assess the emergence and spread of new variants of *B. pertussis*. A secondary aim is to determine the effect, if any, of different vaccination strategies on the pertussis burden and the emergence of new variants. Analyses of the three EUpertstrain collections isolated between 1998 and 2009 by PFGE and analysis of the EUpert I collection isolated between 1998 and 2001 by MLVA have already been published [40–43].

Here, we extend this work to the EUpert-labnet collection by including five more EU countries: Belgium, the Czech Republic, Ireland, Poland and Spain (Table 2). Further, additional typing was performed on previously collected isolates. The old and new data were integrated to give an overview of (country-specific) changes of the *B. pertussis* populations in the participating European countries. Isolates collected between 1998 and 2012 were aggregated in three periods to obtain a comparable number of isolates per year; 1998–2001 ( $n=106$ ), 2002–2006 ( $n=165$ ) and 2007–2012 ( $n=195$ ). As PCR is replacing culture for pertussis diagnosis, obtaining sufficient strains for population studies has become difficult. The number of participating countries for the three periods was 7, 11 and 12, respectively (Table 2). For Finland, France, the Netherlands and Sweden, 17 to 23 isolates were available for each period. In contrast, for Norway and the Czech

**Table 2** Number of *Bordetella pertussis* clinical isolates used in this study

Country	1998–2001	2002–2006	2007–2012	Total
Belgium	2	8	10	20
Czech Republic	0	0	20	20
Denmark	0	20	23	43
Finland	20	20	17	57
France	20	20	20	60
Germany	17	18	0	35
Ireland	0	5	15	20
Norway	0	0	20	20
Poland	11	7	2	20
Spain	0	2	10	12
Sweden	17	20	20	57
The Netherlands	19	23	20	62
United Kingdom	0	22	18	40
Total	106	165	195	466

Republic, isolates were only available for period 2007–2012. Table 1 shows the pertussis vaccines currently used in European countries.

#### Changes in allele frequencies

We investigated changes in frequencies of the alleles for four proteins used in ACVs: *ptxA*, *prn*, *fim2* and *fim3*. The pertussis toxin promoter, *ptxP*, was also included, as several previous studies have shown that the *ptxP3* allele is an important characteristic of recent clinical isolates [5, 20, 28]. Isolates were also serotyped to assess expression of the *fim2* and *fim3* genes. All allelic variants discussed here are associated with changes in protein structure. An overview of allelic and protein variants is provided in previously published reviews [12, 47].

For our analysis, we included data only if at least five isolates were available in a particular period. In general, Poland was found to be distinct, while the remaining 12 countries showed minor differences in their *B. pertussis* populations. Therefore, except for the *ptxA* alleles and serotypes, we limited the comparisons to Poland and pooled the remaining 12 countries. All data are represented in Supplementary Table S1.

#### *ptxA* alleles

The ACVs currently used in the European countries contain *ptxA2* and *ptxA4* [12] and the Polish WCV contains only *ptxA2* [48]. Essentially, no differences were found between the 13 countries with respect to *ptxA* alleles. The non-vaccine type allele *ptxA1* was identified in 428 out of the 429 isolates

analysed. One isolate, isolated in Sweden in 1998, harboured the *ptxA2* allele.

#### *prn* alleles

The ACVs currently used in the European countries contain *prn1* and *prn7* [12] and the Polish WCV contains only *prn1* [48]. In the group of 12 countries, four *prn* alleles were observed in this study, *prn1*, *prn2*, *prn3* and *prn13*. The *prn13* allele was detected once in Sweden during the period 1998–2001. The *prn3* allele was found in all three periods but decreased in frequency from 10 % in 1998–2001 to 4 % in 2002–2006 and to 1 % in 2007–2012. The two minor *prn* alleles *prn13* and *prn3* were combined into one group in Fig. 1a. In the 12 countries, *prn2* predominated in 1998–2001 with a frequency of 84 %, increasing to 91 % in 2002–2006 and to 99 % 2007–2012 (Fig. 1a). In Poland, the frequencies of *prn1* in the periods 1998–2001 and 2002–2006 were, respectively, 55 and 43 % (Fig. 1b). Two Polish isolates were available in 2007–2012, both containing *prn1*.

#### *ptxP* alleles

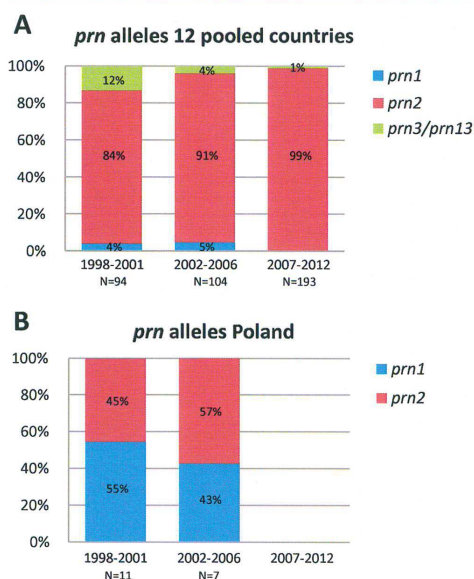
Three *ptxP* alleles were found in this study, *ptxP1*, *ptxP3* and *ptxP20*. *ptxP20* was found once in the Czech Republic in 2007–2012 and not included in Fig. 2. An increasing prevalence of *ptxP3* isolates was observed in the group of 12 countries from 57 % in 1998–2001 to 87 % in 2002–2006 and to 97 % in 2007–2012 (Fig. 2a). In Poland, a distinct trend was found. *ptxP1* predominated in both periods 1998–2001 and 2002–2006, with frequencies of 82 and 100 %, respectively (Fig. 2b). Only two Polish isolates were available in 2007–2012, both containing *ptxP1*.

#### *fim2* alleles

Two *fim2* alleles have been found worldwide, *fim2-1* and *fim2-2* [47]. Only *fim2-1* is present in the currently used ACVs [12] and the Polish WCV [48]. In this collection, *fim2-2* isolates were only detected in Poland and Belgium, while the remaining isolates harboured the *fim2-1* allele. In Belgium, one *fim2-2* isolate was observed in the period 2002–2006. In Poland, the *fim2-2* frequencies were 55 % in 1998–2001 and 43 % in 2002–2006 (Fig. 3). Only two Polish isolates were available for the period 2007–2012: one isolate harboured the *fim2-1* allele and one harboured the *fim2-2* allele; therefore, the prevalences for the period 2007–2012 were not included in the figure.

#### *fim3* alleles

Five *fim3* alleles were found in this study, *fim3-1* (found in ACVs [12]) and the Polish WCV [48]), *fim3-2*, *fim3-3*, *fim3-4*

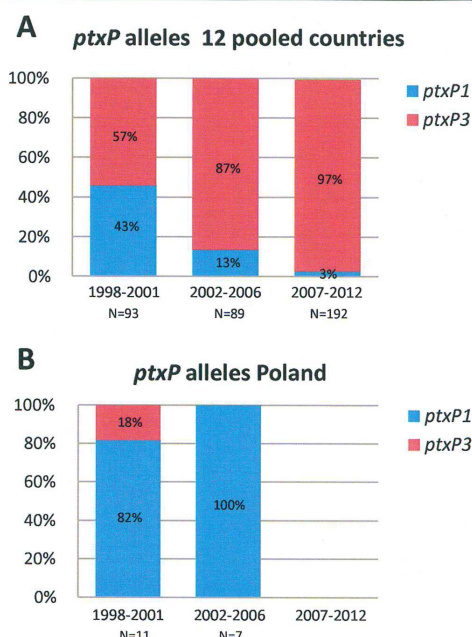


**Fig. 1** Frequencies of the *prn* alleles in the period 1998–2012. Isolates were aggregated in three periods, 1998–2001, 2002–2006 and 2007–2012. **a** Allele frequencies in the 12 pooled countries: Belgium, the Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Ireland, Norway, Spain, Sweden, the Netherlands and the United Kingdom. **b** Allele frequencies in Poland. Due to the limited availability of Polish isolates in the period 2007–2012 ( $n=2$ ), no data are included for this period. The percentages and number of strains analysed in the different periods are indicated

and *fim3-6*. Two *fim3-3* isolates were found, one in the Netherlands (in the period 2007–2012) and one in Denmark (in the period 2007–2012). A *fim3-4* isolate was found in France (in the period 2007–2012) and a *fim3-6* isolate was found in Belgium (in the period 2007–2012). The three minor *fim3* alleles, *fim3-3*, *fim3-4* and *fim3-6*, were combined into one group in Fig. 4a. In the group of 12 countries, *fim3-1* was found with frequencies of 50, 41 and 56 % in the periods 1998–2001, 2002–2006 and 2007–2012, respectively (Fig. 4). In Poland, *fim3-1* predominated in the period 1998–2001 (frequency 82 %) and increased in frequency to 100 % in the period 2002–2006 (Fig. 4b). Only two Polish isolates were available for the period 2007–2012, both containing *fim3-1*.

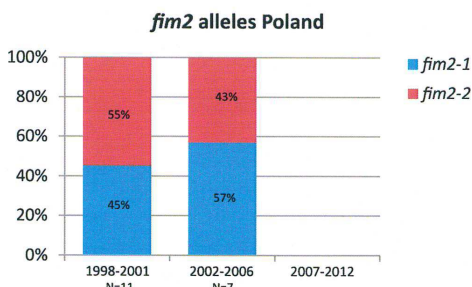
**Fimbrial serotyping**

*B. pertussis* produces two serologically distinct fimbriae, designated serotype 2 (Fim2) and serotype 3 fimbriae (Fim3). A *B. pertussis* isolate may produce a single serotype or both serotypes. Therefore, three combinations are possible: Fim2, Fim3 and Fim2,3. Ireland and Poland were distinct with



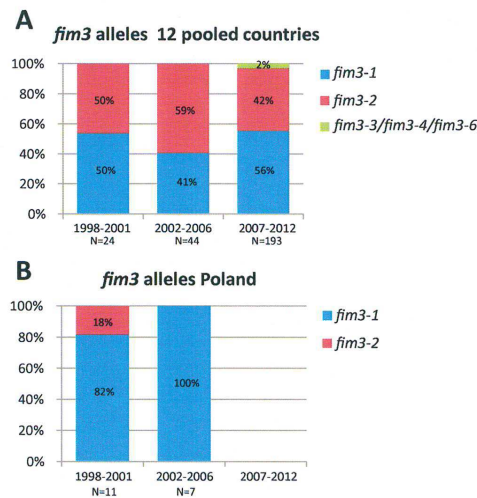
**Fig. 2** Frequencies of the *ptxP* alleles in the period 1998–2012. See caption of Fig. 1 for further details

respect to fimbrial serotypes, whereas minor differences were found between the remaining 11 countries. Therefore, Ireland and Poland were treated separately, while the data of the remaining 11 countries were pooled. Fim3 predominated in the group of 11 countries with frequencies of 69 % in 1998–2001, 93 % in 2002–2006 and 86 % in 2007–2012 (Fig. 5a). In Ireland, lower frequencies of Fim3 were found: 60 % in



**Fig. 3** Frequencies of the *fim2* alleles in the period 1998–2006 in Poland. Two periods are indicated, 1998–2001 and 2002–2006. Due to the limited availability of Polish isolates in 2007–2012 ( $n=2$ ), no data are included for this period. In the remaining 12 countries, only *fim2-1* was observed, with the exception of Belgium, where one *fim2-2* isolate was identified



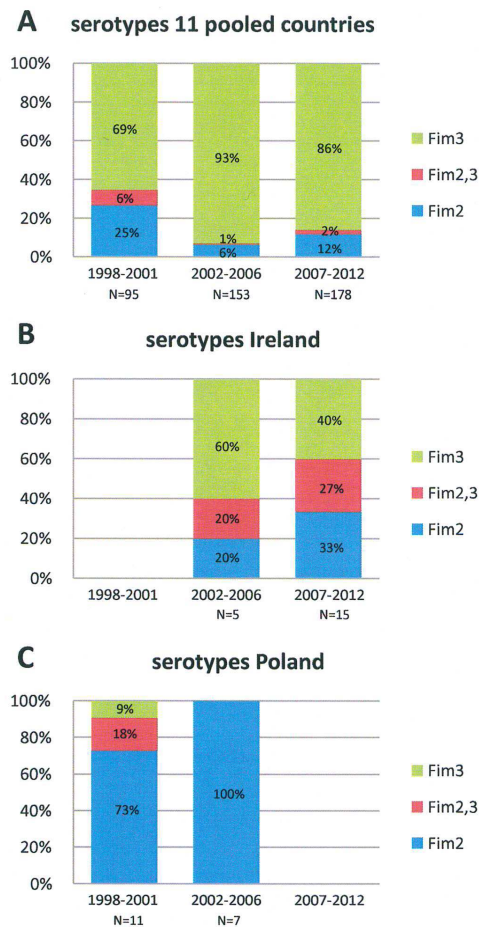


**Fig. 4** Frequencies of the *fim3* alleles in the period 1998–2012. See caption of Fig. 1 for further details

2002–2006 and 40 % in 2007–2012. No Irish isolates were available for the period 1998–2001 (Fig. 5b). In Poland, Fim2 predominated in 1998–2001 and 2006–2006 (frequencies of 73 and 100 %, respectively) (Fig. 5c). Only two Polish isolates were available in 2007–2012, both of which were Fim2. The Polish WCV is derived from strains which produce both Fim2 and Fim3 [49]. One strain, isolated in Spain in 2010, was found to be auto-agglutinable (data not shown).

#### Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)

Thirty-four MLVA types (MTs) were found in the 13 countries. MTs that were found less than five times in the group of 12 countries or in Poland were combined and designated as group R in Fig. 6a, b. MT27 predominated in the group of 12 countries (frequencies from 54 to 100 % per country) but was found once in Poland (in 1994–2001). MT27 predominated in 1998–2001, with a frequency of 49 %, which increased to 86 % in 2002–2006 and decreased to 74 % in 2007–2012 (Fig. 6a). MT29 predominated only in 1998–2001, with a frequency of 22 %, which decreased to 0 % in 2002–2006 and increased slightly to 1 % in 2007–2012. MT78 predominated in Finland in 2007–2012 (data not shown) (frequency 53 %). MT78 was found once in Norway (in the period 2007–2012) and once in Germany (in the period 1998–2001). In Poland, MT70 predominated, with frequencies of 55 % in 1998–2001 and 14 % in 2002–2006 (Fig. 6b). Besides Poland, MT70 has been found once in Belgium in the period 2002–2006. During the period 2002–2006, MT29 predominated in Poland, with a frequency of 57 %.

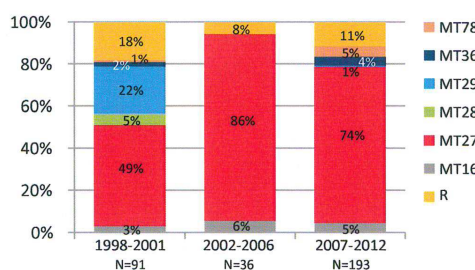


**Fig. 5** Frequencies of the serotypes in the period 1998–2012. a Serotype frequencies of the 11 pooled countries; Belgium, the Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Norway, Spain, Sweden, the Netherlands and the United Kingdom. b Serotype frequencies in Ireland. c Serotype frequencies in Poland. See caption of Fig. 1 for details

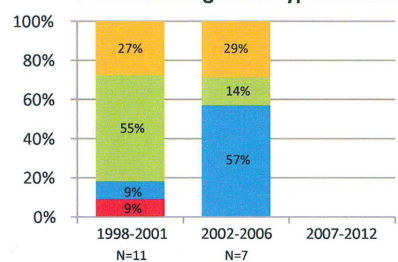
#### Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Eighty-seven PFGE types were found in the 13 countries. PFGE types that were found less than five times in the group of 12 countries were combined and designated as group R in Fig. 7a. In the group of 12 countries, increasing frequencies were observed for BpSR3 (0 % in 1998–2001 to 23 % in 2007–2012) and BpSR10 (10 % in 1998–2001 to 19 % in 2007–2012). Decreasing trends have been found for BpSR11 (29 % in 1998–2001 to 13 % in 2007–2012). No differences

**A** Predominating MLVA types 12 pooled countries



**B** Predominating MLVA types Poland



**Fig. 6** Frequencies of the predominant multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) types in the period 1998–2012. See caption of Fig. 1 for further details

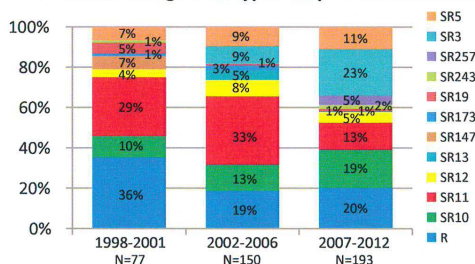
were found for the frequencies of BpSR5 (7 % in 1998–2001, 9 % in 2002–2006 and 11 % in 2007–2012) and BpSR12 (4 % in 1998–2001, 8 % in 2002–2006 and 5 % in 2007–2012) (Fig. 7a). In Poland, BpSR23 predominated in the period 1998–2001 (frequency 46 %). The predominant PFGE type in Europe, BpSR11, was found once in Poland, in the period 1998–2001 (Fig. 7b).

**Discussion**

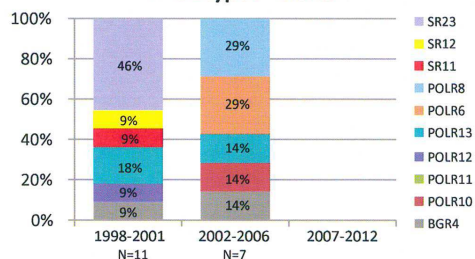
In this study, we analysed *B. pertussis* isolates from 13 European countries during the period 1998–2012. In general, our comparison showed that 12 countries had very similar *B. pertussis* populations (Belgium, the Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Ireland, the Netherlands, Norway, Spain, Sweden and the United Kingdom), while Poland was quite distinct. As noted previously, in all countries, circulating isolates were distinct from vaccine strains with respect to one or more of the investigated antigens [2, 15–25].

The *ptxA* gene was found to be highly monomorphic and, with one exception, all circulating isolates carried the non-

**A** Predominating PFGE types 12 pooled countries



**B** PFGE types Poland



**Fig. 7** Frequencies of the predominant pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) types in the period 1998–2012. See caption of Fig. 1 for further details

vaccine type allele *ptxA1*. Three *ptxP* alleles were observed in this collection of isolates, *ptxP1*, *ptxP3* and *ptxP20*. A notable observation was the low percentage of *ptxP3* isolates in Poland (10 %, *n*=20) compared to the other countries (average 72 %, range 37–100 %). Interestingly, the two Polish *ptxP3* isolates were found in the first period, 1998–2001, but not in the later periods. Possibly, *ptxP3* isolates do not have a fitness advantage in Poland, in contrast to the other 12 countries. Further, although the non-vaccine type allele *pm2* was found at frequencies of 45 and 57 % in the periods 1998–2001 and 2002–2006 in Poland, respectively, these percentages were lower than those observed in the remaining 12 countries (average 83 %, range 37–100 %). Comparing the clinical outcome between *ptxP1*- and *ptxP3*-infected individuals, especially in Poland, would be useful.

In Poland, two *fim2* alleles circulated in approximately equal frequencies, *fim2-1* (the vaccine type in Poland) and *fim2-2*. In contrast, in the remaining countries, only *fim2-1* was observed, with the exception of Belgium, where a single *fim2-2* isolate was identified. The Belgian *fim2-2* isolate was linked to the same MLVA and PFGE type (MT70 and BpBGR4, respectively) as 30 % of the Polish *fim2-2* isolates, suggesting that the *fim2-2* isolate was introduced in Belgium from Poland. The *fim2-2* allele was also observed in the pre-

vaccination era in the Netherlands (57 %,  $n=7$ ), while all isolates from 1965 or later harboured *fim2-1* [45]. More recently, *fim2-2* isolates were observed in Moscow (89 % in the period 1990–2004) and Australia (36 % in the period 1998–2008) [50, 51]. In both Poland and Australia, a significant percentage of the *fim2-2* isolates were linked to MT70 (80 and 88 %, respectively), possibly suggesting a common origin. However, independent genesis and fixation of the *fim2-2* single nucleotide polymorphism (SNP) by different *B. pertussis* lineages may also be possible. The latter would suggest that the mutation has a significant effect on fitness.

The limited distribution of *fim2-2* isolates in Europe compared to Moscow and Poland could be due to geographic isolation, as travelling to Poland and/or Moscow from Western Europe was restricted until the late 1980s. However, in the Czech Republic, which was also located in the former Eastern Europe, no *fim2-2* isolates have been observed. Another cause for the observation that the distribution of *fim2-2* isolates was limited to Poland and Russia could be the use of the pertussis vaccines, as in Poland and Moscow, a WCV is still used, while an ACV has already been introduced in the Czech Republic in 2007.

The Polish and Irish populations showed higher Fim2 frequencies compared to the other 11 countries (80 and 30 %, respectively). An association between Fim2 and the prevalence of *fim2-2* isolates has been found previously in the United Kingdom, where isolates collected between 1920 and 2002 were studied [52]. All isolates with the *fim2-2* allele ( $n=20$ ) were Fim2. This was also observed in Poland, where 90 % of the *fim2-2* isolates were Fim2. However, no *fim2-2* alleles have been found in Ireland in this study.

MT27 is the predominating MT in Europe. Previous European studies showed a linkage between *ptxP3* and MT27 [17, 18, 46]. Indeed, 97 % of MT27 isolates in this study harboured the *ptxP3* allele. MT27 was also the predominating MT in countries outside Europe, including Australia [2], Japan [25] and the United States [22]. One of the two Polish *ptxP3* isolates was also typed as MT27.

The Fim and Prn types of Danish isolates were similar to the isolates found in other countries, except Poland. Since the Danish vaccine contains only Ptx, the changes to the Fim and Prn types in Danish isolates may be the result of overflow from neighbouring countries, rather than selective pressure from the Ptx vaccine.

Five predominant PFGE types have been found in Europe, BpSR3, BpSR5, BpSR10, BpSR11 and BpSR12 [43]. These PFGE types were also predominant in at least one Canadian province, where 317 out of 434 (73 %) isolates collected between 1998 and 2006 belonged to the PFGE types BpSR5, BpSR11 and BpSR12 [24]. However, no isolate with PFGE types BpSR3 and BpSR10 have been found in Canada so far, suggesting some geographic differences in isolates.

The present study showed minor differences in European countries which used ACVs based on MAST, fimbrial

serotyping, MLVA and PFGE. However, Poland, the only country included in this study where a WCV is still used, showed a distinct population.

A distinct population compared to Europe has also been found in Serbia, where a WCV has been continued to be used since 1957 [53]. Both countries, Poland and Serbia, have a vaccination history including several changes of strain compositions since the 1960s, which could explain the distinct *B. pertussis* populations compared to the European countries where an ACV is used. The Polish and Serbian *B. pertussis* populations both show high *prn1* frequencies, 43 % in 2002–2006 and 47 % in 1985–2000, respectively [43], compared to high *prn2* frequencies (>90 %) in European countries, where ACVs have been used for many years.

The immune response induced by the two vaccines is different. WCVs induce a broad immune response, but with relatively low titres, whereas ACVs induce high titres against only a few antigens. Theoretical studies suggest that a change from a broad to a narrow immune response will favour the emergence of escape variants [54]. Indeed, several studies have shown the emergence of Prn-deficient strains in populations where ACVs are used [7, 31–39]. This is in contrast with Poland and Serbia, where a WCV has been used for many years. No Prn-deficient strains have been detected in both countries [48, 53].

This study has some limitations. Isolates were not sampled randomly and the sample size from some countries was small. However, as culture is being replaced by PCR, less and less isolates are available for typing and most members of this study sent all isolates available. Further, it was not possible to establish relationships between strain type and vaccination status, as very limited vaccination data were available. Further, FHA, also a component in some ACVs, was not included, as the large size of the gene precluded analyses. Interestingly, FHA-deficient isolates have been described [32]. In the future, targeted sequencing of genes for vaccine antigens may be replaced by whole genome sequencing, which may reveal other relevant loci to be included in MAST [51, 55]. This study was not set up to identify isolates not producing Prn in Europe, as a recent study has already addressed this issue [38]. Overall, low prevalences (<4 %) of Prn-deficient strains were found, except in Norway and France (25 % in 2007–2009 and 15 % in 2013, respectively [56]).

**Acknowledgements** This present study is part of an ECDC-funded network EUper-labnet with a focus on the laboratory surveillance of whooping cough in Member States/EEA countries (ECDC/2011/013). The EUperstrain I project was supported by the European Commission Quality of Life Program (QLK2-CT-2001-01819), and the EUperstrain II and III studies were supported by GlaxoSmithKline (Rixensart, Belgium) and Sanofi Pasteur MSD (Lyon, France). The processing of Czech isolates and the provision of data were supported by research grant NT/14058-3 of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic. The processing of Belgian isolates and the provision of data were performed in the frame of the Belgian National Reference

Centre for pertussis supported by the Belgian Ministry of Social Affairs through a fund within the Health Insurance System.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## References

- de Gouw D, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, Hermans PW, Mooi FR (2011) Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev* 35:441–474
- Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, Lawrence A, Keil AD, Hogg G, Lan R (2012) Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying *ptx2* and *ptxP3* alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008–2010. *J Infect Dis* 205:1220–1224
- Dudman SG, Trøseid M, Jonassen TØ, Steinbakk M (2006) Whooping cough—an increasing problem in Norway. *Tidsskr Nor Lægeforen* 126:305–308
- Stefanoff P, Paradowska-Stankiewicz IA, Lipke M, Karasek E, Rastawicki W, Zasada A, Samuels S, Czajka H, Pebody RG (2014) Incidence of pertussis in patients of general practitioners in Poland. *Epidemiol Infect* 142:714–723
- Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N, Mertsola J (2009) *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* 15:1206–1213
- Amirthalingam G, Gupta S, Campbell H (2013) Pertussis immunisation and control in England and Wales, 1957 to 2012: a historical review. *Euro Surveill* 18(38). pii: 20587
- Queenan AM, Cassidy PK, Evangelista A (2013) Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in the United States. *N Engl J Med* 368:583–584
- Halperin SA (2007) The control of pertussis—2007 and beyond. *N Engl J Med* 356:110–113
- van der Maas NA, Mooi FR, de Greeff SC, Berbers GA, Spaendonck MA, de Melker HE (2013) Pertussis in the Netherlands, is the current vaccination strategy sufficient to reduce disease burden in young infants? *Vaccine* 31:4541–4547
- Cherry JD (2005) The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics* 115:1422–1427
- Zepp F, Heining U, Mertsola J, Bernatowska E, Guiso N, Roord J, Tozzi AE, Van Damme P (2011) Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe. *Lancet Infect Dis* 11:557–570
- Mooi FR, van der Maas NA, de Melker HE (2014) Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation—two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* 142:685–694
- Hegerle N, Guiso N (2013) Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. *Future Microbiol* 8:1391–1403
- Berbers GA, de Greeff SC, Mooi FR (2009) Improving pertussis vaccination. *Hum Vaccin* 5:497–503
- Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ (1998) 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* 66:670–675
- Caro V, Bouchez V, Guiso N, Gatti B, Agosti MR, Ayala SE (2007) Pertussis in Argentina and France. *Vaccine* 25:4335–4339
- Litt DJ, Neal SE, Fry NK (2009) Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J Clin Microbiol* 47:680–688
- Advani A, Van der Heide HG, Hallander HO, Mooi FR (2009) Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage. *J Microbiol Methods* 78:297–301
- Mosiej E, Augustynowicz E, Zawadka M, Dabrowski W, Lutyńska A (2011) Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use. *J Clin Microbiol* 49:1452–1457
- Kallonen T, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Elomaa A, Lutyńska A, Fry NK, Mertsola J, He Q (2011) Differences in the genomic content of *Bordetella pertussis* isolates before and after introduction of pertussis vaccines in four European countries. *Infect Genet Evol* 11:2034–2042
- Petersen RF, Dalby T, Dragsted DM, Mooi F, Lambertsen L (2012) Temporal trends in *Bordetella pertussis* populations, Denmark, 1949–2010. *Emerg Infect Dis* 18:767–774
- Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, Skoff TH, Tondella ML, Tatti KM (2012) Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935–2009. *Emerg Infect Dis* 18:1248–1255
- van Gent M, Bart MJ, van der Heide HG, Heuvelman KJ, Mooi FR (2012) Small mutations in *Bordetella pertussis* are associated with selective sweeps. *PLoS One* 7:e46407
- Shuel M, Jamieson FB, Tang P, Brown S, Farrell D, Martin I, Stoltz J, Tsang RS (2013) Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *Int J Infect Dis* 17:e413–e417
- Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K (2013) Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008–2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One* 8:e77165
- de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR (2014) Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One* 9:e84523
- Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassidy PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR (2014) Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *MBio* 5:e01074
- Advani A, Gustafsson L, Åhrén C, Mooi FR, Hallander HO (2011) Appearance of Fim3 and ptxP3-*Bordetella pertussis* strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine* 29:3438–3442
- van Gent M, Bart MJ, van der Heide HG, Heuvelman KJ, Kallonen T, He Q, Mertsola J, Advani A, Hallander HO, Janssens K, Hermans PW, Mooi FR (2011) SNP-based typing: a useful tool to study *Bordetella pertussis* populations. *PLoS One* 6:e20340
- Lam C, Octavia S, Bahrame Z, Sintchenko V, Gilbert GL, Lan R (2012) Selection and emergence of pertussis toxin promoter ptxP3 allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infect Genet Evol* 12:492–495
- Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N (2009) First report and detailed characterization of *B. Pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. *Vaccine* 27:6034–6041

32. Hegerle N, Paris AS, Brun D, Dore G, Njamkepo E, Guillot S, Guiso N (2012) Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetella* not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect* 18:E340–E346
33. Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, He Q (2012) Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol* 19:1703–1704
34. Pawloski LC, Queenan AM, Cassidy PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, Williams MM, Bowden KE, Burgos-Rivera B, Qin X, Messonnier N, Tondella ML (2013) Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 2:119–125
35. Quinlan T, Musser KA, Currenti SA, Zansky SM, Halse TA (2013) Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in New York State: a retrospective analysis, 2004–2013. *Mol Cell Probes* 28:138–140
36. Dinu S, Guillot S, Dragomirescu CC, Brun D, Lazăr S, Vancea G, Ionescu BM, Gherman MF, Bjerkestrand AF, Ungureanu V, Guiso N, Damian M (2014) Whooping cough in South-East Romania: a 1-year study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 78:302–306
37. Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Guiso N, Keil AD, Lawrence A, Robson J, Hogg G, Lan R (2014) Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis* 20:626–633
38. Zeddemann A, van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Bart MJ, Advani A, Hallander HO, Wirsing von König CH, Riffelmann M, Storsaeter J, Vestheim DF, Dalby T, Krogfelt KA, Fry NK, Barkoff AM, Mertsola J, He Q, Mooi F (2014) Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill* 19(33). pii: 20881
39. Tsang RS, Shuel M, Jamieson FB, Drews S, Hoang L, Horsman G, Lefebvre B, Desai S, St-Laurent M (2014) Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains in Canada: characterization of a dozen isolates based on a survey of 224 samples collected in different parts of the country over the last 20 years. *Int J Infect Dis* 28: 65–69
40. van Amersfoort SC, Schouls LM, van der Heide HG, Advani A, Hallander HO, Bondeson K, von König CH, Riffelmann M, Vahrenholz C, Guiso N, Caro V, Njamkepo E, He Q, Mertsola J, Mooi FR (2005) Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J Clin Microbiol* 43:2837–2843
41. Caro V, Njamkepo E, Van Amersfoort SC, Mooi FR, Advani A, Hallander HO, He Q, Mertsola J, Riffelmann M, Vahrenholz C, Von König CH, Guiso N (2005) Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* populations in various European countries with different vaccine policies. *Microbes Infect* 7:976–982
42. Hallander H, Advani A, Riffelmann M, von König CH, Caro V, Guiso N, Mooi FR, Gzyl A, Kaltoft MS, Fry NK, Mertsola J, He Q (2007) *Bordetella pertussis* strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 45:3257–3262
43. Advani A, Hallander HO, Dalby T, Krogfelt KA, Guiso N, Njamkepo E, von König CH, Riffelmann M, Mooi FR, Sandven P, Lutynska A, Fry NK, Mertsola J, He Q (2013) Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Europe from 1998 to 2009. *J Clin Microbiol* 51:422–428
44. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, Hoet B, Guiso N (2000) Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol* 19: 174–181
45. van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR (2002) Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol* 40:1994–2001
46. Schouls LM, van der Heide HG, Vauterin L, Vauterin P, Mooi FR (2004) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J Bacteriol* 186: 5496–5505
47. Mooi FR (2010) *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 10:36–49
48. Mosiej E, Zawadka M, Krysztopa-Grzybowska K, Polak M, Augustynowicz E, Piekarska K, Lutyńska A (2014) Sequence variation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from Poland in the period 1959–2013. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Epub ahead of print]
49. Zawadka M, Mosiej E, Polak M, Krysztopa-Grzybowska K, Moskala B, Rokosz-Chudziak N, Rabczenko D, Augustynowicz E, Lutyńska A (2014) Consistency of *Bordetella pertussis* vaccine seed strains and potency of whole-cell pertussis vaccine still in use in Poland. *Biologicals* 42:123–127
50. Borisova O, Kombarova SY, Zakharova NS, van Gent M, Aleshkin VA, Mazurova I, Mooi FR (2007) Antigenic divergence between *Bordetella pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains. *Clin Vaccine Immunol* 14:234–238
51. Octavia S, Maharjan RP, Sintchenko V, Stevenson G, Reeves PR, Gilbert GL, Lan R (2011) Insight into evolution of *Bordetella pertussis* from comparative genomic analysis: evidence of vaccine-driven selection. *Mol Biol Evol* 28:707–715
52. Packard ER, Parton R, Coote JG, Fry NK (2004) Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *J Med Microbiol* 53:355–365
53. Dakic G, Kallonen T, Elomaa A, Pljesa T, Vignjevic-Krastavcic M, He Q (2010) *Bordetella pertussis* vaccine strains and circulating isolates in Serbia. *Vaccine* 28:1188–1192
54. Lipsitch M, O'Hagan JJ (2007) Patterns of antigenic diversity and the mechanisms that maintain them. *J R Soc Interface* 4: 787–802
55. Bart MJ, van Gent M, van der Heide HG, Boekhorst J, Hermans P, Parkhill J, Mooi FR (2010) Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics* 11:627
56. Hegerle N, Guiso N (2014) *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13:1135–1146

### **16.3 Článek 3: Jakubů V. et al., 2015**

Jakubů V, Zavadilová J, Fabiánová K, Urbášková P. Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2015;64(1):12-15. ISSN 1210-7913. **IF 0,361**

# EPIDEMIOLOGIE MIKROBIOLOGIE IMUNOLOGIE

VYDÁVÁ ČESKÁ LÉKAŘSKÁ  
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

ČASOPIS SPOLEČNOSTI  
PRO EPIDEMIOLOGII A MIKROBIOLOGII  
ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI J. E. PURKYNĚ

březen 2015

1/64



## Z OBSAHU:

- Rezistence původce syfilis, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, k makrolidovým antibiotikům v České republice a ve světě
- Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*
- Přínos stanovení protilátek IgA pro laboratorní diagnostiku průušnic ve vysoce proočkované populaci
- Případ tuberkulózní meningitidy provázené perzistujícím snížením CD4+ T lymfocytů
- Vliv klimatických změn na výskyt onemocnění klíšťovou encefalitidou v letech 1982–2011 v České republice
- Multifaktorová epidemiologická analýza rizikových faktorů karcinomu pankreatu u žen
- Přístup populace ke screeningu kolorektálního karcinomu v České republice
- Prevalence vybraných vrozených vad v České republice: vývojové vady centrální nervové soustavy a zažívacího traktu

**IMPAKT  
FAKTOR  
0,361**

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica  
Excerptováno v Bibliographia medica Českoslovac  
EBSCO – Academic Search Complete  
MEDLINE/INDEX MEDICUS, BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS  
INIS Atomindex, SCOPUS  
IMPAKT FAKTOR 0,361  
Časopis je indexován v Seznamu periodik Rady pro výzkum, vývoj a inovace Úřadu vlády ČR.

ISSN 1210-7913  
ISSN (On-line) 1805-451X  
MK ČR E 4652

# Minimum inhibitory concentrations of erythromycin and other antibiotics for Czech strains of *Bordetella pertussis*

Jakubů V.<sup>1</sup>, Zavadilová J.<sup>2</sup>, Fabiánová K.<sup>3,4</sup>, Urbášková P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Reference Laboratory for Antibiotics, Centre for Epidemiology and Microbiology, The National Institute of Public Health, Prague

<sup>2</sup>National Reference Laboratory for Pertussis and Diphtheria, Centre for Epidemiology and Microbiology, The National Institute of Public Health, Prague

<sup>3</sup>Department of Infectious Disease Epidemiology, Centre for Epidemiology and Microbiology, The National Institute of Public Health, Prague

<sup>4</sup>Department of Epidemiology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague

## ABSTRACT

**Aim of the study:** To test the susceptibility to first-line and alternative antibiotics of 70 *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) strains recovered from patients with whooping cough through national pertussis surveillance in the Czech Republic (CR) in 1967–2010.

**Material and methods:** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of erythromycin, clarithromycin, azithromycin, ciprofloxacin, and co-trimoxazole were tested by the reference agar dilution method on Bordet-Gengou agar with 15 % defibrinated sheep blood.

**Results:** Each of the 70 study strains was inhibited by two concentrations of erythromycin and azithromycin (0.06 and 0.12 mg/l) and by three concentrations of clarithromycin (0.03, 0.06, and 0.12 mg/l), with the highest concentration of the MIC range being 0.12 mg/l for all these similar antibiotics.

Tested in a 2-fold geometric dilution series, the concentration of erythromycin required to inhibit 90 % of the study strains ( $MIC_{90}$ ) was one dilution step lower (0.06 mg/l) than those of clarithromycin and azithromycin (0.12 mg/l). All study strains were inhibited by a single concentration of ciprofloxacin (0.06 mg/l) and two concentrations of co-trimoxazole (0.12 and 0.25 mg/l).

**Conclusion:** The panel of 70 Czech strains of *B. pertussis* appears to be homogeneous in terms of the MICs of the antibiotics tested, with two to three low concentrations being effective against all strains. To be inhibited, no strain required a higher concentration of erythromycin, clarithromycin, azithromycin, ciprofloxacin, or co-trimoxazole.

## KEYWORDS:

*Bordetella pertussis* – minimum inhibitory concentration (MIC) – antibiotics

## SOUHRN

**Jakubů V., Zavadilová J., Fabiánová K., Urbášková P.: Minimální inhibiční koncentrace erytromycinu a dalších antibiotik u českých kmenů *Bordetella pertussis***

**Cíl práce:** Vyšetření citlivosti k antibiotikům volby a alternativám u 70 kmenů *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) izolovaných od pacientů s dávivým kašlem v letech 1967 až 2010 v rámci národní surveillancie pertuse v České republice (ČR).

**Materiál a metodika:** Minimální inhibiční koncentrace (MIC) erytromycinu, klaritromycinu, azitromycinu, ciprofloxacinu a kotrimoxazolu byla vyšetřena referenční diluční agarovou metodou, na Bordet-Gengou agaru s 15 % defibrinované ovčí krve.

**Výsledky:** Všechny 70 kmenů vyšetřovaného souboru bylo inhibováno dvěma koncentracemi erytromycinu a azitromycinu (0,06 a 0,12 mg/l), klaritromycin inhiboval kmeny ve třech koncentracích (0,03; 0,06 a 0,12 mg/l), nejvyšší koncentraci

trance v rozmezí MIC byla u těchto tří podobných antibiotik identicky 0,12 mg/l. Koncentrace erytromycinu inhibující 90 % kmenů byla o jeden stupeň ředění dvojnásobně geometrické řady nižší (0,06 mg/l) než byla  $MIC_{90}$  u klaritromycinu a azitromycinu (0,12 mg/l). Všechny kmeny inhibovala jediná koncentrace 0,06 mg/l ciprofloxacinu a dvě koncentrace kotrimoxazolu (0,12 a 0,25 mg/l).

**Závěr:** Soubor 70 českých kmenů *B. pertussis* se podle výsledků jeví jako homogenní co se týče MIC antibiotik, neboť všechny kmeny byly inhibovány dvěma/třemi nízkými koncentracemi. Nebyl tudíž potvrzen žádný kmen inhibovaný vyšší koncentrací erytromycinu, klaritromycinu, azitromycinu, ciprofloxacinu ani kotrimoxazolu.

## KLÍČOVÁ SLOVA:

*Bordetella pertussis* – minimální inhibiční koncentrace (MIC) – antibiotika

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 64, 2015, č. 1, s. 12–15



## INTRODUCTION

Erythromycin, a newer macrolide clarithromycin, or the azalide azithromycin are standard first-line therapies in patients with infection caused by *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) [1, 2, 3]. Co-trimoxazole [1, 3, 4] or one of the fluoroquinolones [2, 3] are alternatives in intolerant patients. Given the global rise in laboratory confirmed cases of *B. pertussis* infection and so far sporadic reports of erythromycin resistant strains appearing since the 1990s [5, 6, 7, 8], it is vital to pay attention to the epidemiology and biological properties of this species and its resistance to the first-line antibiotics and their alternatives at the national level.

## MATERIAL AND METHODS

### Bacteria

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the relevant antibiotics were determined for 70 clinical isolates of *B. pertussis* referred to the National Reference Laboratory for Pertussis and Diphtheria within the national pertussis surveillance programme in 1967–2010. These strains were recovered from patients with clinical pertussis in Prague (22 strains) and the following administrative regions: South Bohemian (27 strains), South Moravian (4 strains), Central Bohemian (1 strain), Liberec (1 strain), North Moravian (1 strain), and East Bohemian (1 strain). The geographical origin of 13 strains could not be identified. The age of the patients ranged from one month to 47 years but remained unknown for 10 samples. *B. pertussis* isolates from 1967 to 2004 were stored lyophilised while those recovered since 2007 were kept frozen at -70 °C. The strains of *B. pertussis* were cultured on Charcoal agar (OXOID CZ s. r. o.) plates and incubated under normal air conditions at 35 ± 1 °C for 96 hours. To confirm the species identification, the diagnostic serum for *Bordetella pertussis* (Remel Ltd, USA) was used in accordance with the manufacturer's instructions.

### Minimum inhibitory concentration (MIC) determination

The MIC was determined using the agar dilution method [9, 10]. The substances of erythromycin, clarithromycin, azithromycin, ciprofloxacin as a representative of the fluoroquinolones, trimethoprim, and sulfamethoxazole with known activity were purchased from the Sigma – Aldrich company (Czech Republic). Using the respective diluents and solvents [10] (for clarithromycin, in accordance with the manufacturer's instructions), the stock concentrations of 19000 mg/l and 1000 mg/l were obtained from the substances of sulfamethoxazole and the other five antibiotics, respectively. The 1000 mg/l stock concentration of co-trimoxazole containing trimethoprim and sulfamethoxazole at a ratio of 1:19 was obtained by mixing 1.5 ml of the 1000 mg/l concentration of trimethoprim and 1.5 ml of the 19000 mg/l concentration of sulfamethoxazole.

### Medium

Bordet-Gengou Agar (BGA) (Difco) was prepared in accordance with the manufacturer's instructions on the day of MIC determination. BGA was cooled to ca 52 °C and added with defibrinated sheep blood (LabMediaServis, Ltd) to a final concentration of 15%. To remain liquefied, the

medium was maintained on a water bath at 52 °C before the plates with antibiotics were prepared.

### Preparation of plates with antibiotics

On the day when the plates with antibiotics were prepared, 12 working concentrations were obtained from the stock concentrations in a geometric dilution series involving two-fold dilution steps for each antibiotic in a range of 0.02 to 40 mg/l, i.e. 10 times higher than the final concentrations required. The final plate concentrations in a range from 0.002 to 4 mg/l for each antibiotic were obtained by mixing 2 ml of the working concentration with 18 ml of BGA with 15% of sheep blood. The plates were shortly pre-dried before seeding.

### Inoculum

Strains of *B. pertussis* were seeded onto Charcoal agar plates and incubated under normal air conditions at 35 ± 1 °C for 72 hours. The inocula for susceptibility testing were prepared by suspending the colonies in Mueller-Hinton (MH) broth thermostated to 35 °C. The turbidity of the inoculum was adjusted to that of a 0.5 McFarland standard, which corresponds to a bacterial concentration of about 5 × 10<sup>8</sup> cells/ml.

### Seeding and incubation of plates

The surface of each of 12 plates with antibiotics arranged from the lowest to highest concentration was seeded with the inocula of multiple strains using a 36-pin inoculator. Two plates containing BGA with 15% of sheep blood without antibiotics were added to each series as growth controls (one was seeded before and the other after seeding the plates with antibiotics). The final concentration of the inoculum at the pin print on the test medium was about 5 × 10<sup>5</sup> cells/ml. Thirty-five test strains and one control strain were used in each series. The seeded plates were incubated upside down under normal air conditions at 35 °C ± 1 °C for 72 hours.

### Quality kontrol

For the purpose of antibiotic dilution quality control, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) ATCC 49619 with the known MICs of the antibiotics tested was used [11]. The MIC of this control strain was determined using the same protocol as was used for the test strains, except for the preparation of the inoculum from the Columbia agar plate.

### Evaluation

After incubation, the antibiotic concentration which clearly inhibited the growth of the strain tested was read. This concentration was considered as the MIC.

## RESULTS

All 70 strains tested for antibiotic susceptibility showed good growth on the control medium BGA with 15% of sheep blood. The MICs of four antibiotics tested for the control strain *S. pneumoniae* ATCC 49619 were in the required range reported for this strain [11]: erythromycin 0.06 mg/l, azithromycin 0.06 mg/l, clarithromycin 0.03 mg/l, and co-trimoxazole 0.5 mg/l. The MIC of ciprofloxacin, which has not been indicated for this control strain, was 0.5 mg/l. It means that the concentrations of antibiotics in the test media were in accordance with those stated.

**Table 1.** MIC ranges and MIC<sub>90</sub> for 70 strains of *Bordetella pertussis***Tabulka 1.** Rozmezí minimálních inhibičních koncentrací (MIC) a MIC<sub>90</sub> u 70 kmenů *Bordetella pertussis*

Antibiotic	MIC <sub>90</sub> * (mg/l)	MIC range (mg/l)
Erythromycin	0.06	0.06–0.12
Clarithromycin	0.12	0.03–0.12
Azithromycin	0.12	0.06–0.12
Ciprofloxacin	0.06	0.06–0.06***
Co-trimoxazole**	0.25	0.12–0.25

\*MIC<sub>90</sub>: concentration inhibiting 90 % of the strains  
 \*\*trimethoprim and sulfamethoxazole at a ratio of 1:19  
 \*\*\*all strains were inhibited by a single concentration

\*MIC<sub>90</sub> koncentrace, která inhibuje 90 % kmenů  
 \*\*trimetoprim a sulfamethoxazol v poměru 1 : 19  
 \*\*\*všechny kmeny inhibovala jediná koncentrace

On the test medium, BGA with 15% of defibrinated sheep blood, the strains investigated were clearly inhibited by the respective concentrations of the antibiotics and therefore, the MICs were easily read.

The MIC ranges and MIC<sub>90</sub> of erythromycin, clarithromycin, azithromycin, ciprofloxacin, and co-trimoxazole for 70 strains of *B. pertussis* are given in Table 1. All strains of the panel investigated were inhibited by two concentrations of erythromycin and azithromycin (0.06 and 0.12 mg/l) and by three concentrations of clarithromycin (0.03, 0.06, and 0.12 mg/l), with the highest MICs of these three similar antibiotics reaching equally 0.12 mg/l. The concentration of erythromycin inhibiting 90 % of the strains was one dilution step of the two-fold geometric series lower (0.06 mg/l) than the MIC<sub>90</sub> of clarithromycin and azithromycin (0.12 mg/l). All strains were inhibited by a single concentration of ciprofloxacin (0.06 mg/l) and two concentrations of co-trimoxazole (0.12 and 0.25 mg/l).

## DISCUSSION

Despite a generally good response of patients with *B. pertussis* infection to erythromycin therapy, which was later replaced, due to side effects, by better tolerated clarithromycin or azithromycin therapy [2, 3, 4, 12], sporadic cases of treatment failure have been reported. A detailed analysis showed that the most probable cause of treatment failure was mostly low immunocompetence of the patients infected by a *B. pertussis* strain that was inhibited in vitro by low concentrations of the clinically relevant antibiotics used in the treatment of this infection [4, 13]. Nevertheless, since 1982, sporadic strains of *B. pertussis* resistant to erythromycin have been reported [6, 7, 8, 14, 15, 16]. As such resistant strains result from mutation in the 23S rRNA gene [5], their epidemic spread is unlikely, in contrast to when the resistance is conferred by plasmid-bound genes. Nevertheless, given the heterogeneous nature of their resistance, such strains may escape attention.

Considering the good clinical effect of the first-line antibiotics and expected susceptibility of the causative agent to these and many other antibiotics, it is not recommended to perform routine antibiotic susceptibility testing, since a standard method has not yet been available and the results are subject to inherent errors and suffer from

low reproducibility. The reason lies in low nutritional requirements and slow growth of *B. pertussis*. No general guidelines are available concerning the method to be used for *B. pertussis* susceptibility testing, culture medium suitable for this purpose, type and concentration of blood to be added to the medium, and concentration of the inoculum [12, 17, 18]. Despite the discordances, it is recommended that the surveillance of antibiotic susceptibility of *B. pertussis* strains recovered from a geographically defined area be performed by a laboratory, which is experienced and skilled in MIC determination of fastidious bacteria. The culture medium and blood type and its quantity to be added to the medium should be selected to allow for adequate growth of strains and, at the same time, not to interfere with the efficacy of the antimicrobial tested. Such approach makes it possible to obtain results indicative of the dynamics of antimicrobial activity in a defined bacterial population and to detect the strains that are inhibited by higher concentrations of antibiotics.

Of the three culture media most often used for *B. pertussis* susceptibility testing, the most suitable appears to be MH agar with 5% of blood [1, 18, 19, 20] whose composition does not affect the activity of antimicrobials, thus being the medium of choice for fastidious bacteria in accordance with both the European [21] and US authorities for [10] standardization of laboratory methods. Nevertheless, despite meeting all conditions required, only half of our panel of 70 strains yielded adequate and reliable growth when seeded onto this culture medium. The failure to grow on MH agar with blood may have been related to the age of strains recovered between 1967 and 2010. Therefore, BGA with 15% of sheep blood was used for *B. pertussis* susceptibility testing where all panel strains showed good growth. The MICs of antimicrobials were determined by the agar dilution method in compliance with the standard ČSN [9] using the globally recognized standard protocol [10]. This is the reference method for MIC determination which provides the basis for all other susceptibility testing methods. Our results of MIC ranges and MIC<sub>90</sub> of erythromycin, clarithromycin, azithromycin, ciprofloxacin, and co-trimoxazole are identical to those reported by others on the same culture medium [5, 8, 17, 18, 22] and are also in accordance with those obtained on MH agar [17, 18, 19, 20]. Based on our results, the panel of 70 Czech strains of *B. pertussis* appears to be homogeneous in terms of MICs, as all strains were inhibited by one to three low concentrations of antibiotics. None of the panel strains was inhibited by a higher concentration of erythromycin or any of the other four antibiotics tested.

## REFERENCES

- Hoppe JE. State of art in antibacterial susceptibility of *Bordetella pertussis* and antibiotic treatment of pertussis. *Infection*, 1998;26(4):242-246.
- Mandell, Douglas, and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Churchill Livingstone, Elsevier 2010.
- John Hopkins Poc-it Guides. [online] [cit. 2014-11-11] Dostupné na: [http://www.hopkinsguides.com/hopkins/ub/index/Johns\\_Hopkins\\_ABX\\_Guide/](http://www.hopkinsguides.com/hopkins/ub/index/Johns_Hopkins_ABX_Guide/).
- Hoppe JE. Update of epidemiology, diagnosis, and treatment of pertussis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1996;15(3):189-193.

5. Bartkus JM, Juni BA, Ehresmann K et al. Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance. *J Clin Microbiol*, 2003;41(3):1167-72.
6. Lewis K, Saubolle MA, Tenover FC et al. Pertussis caused by an erythromycin resistant strain of *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J*, 1995;14(5):388-91.
7. Korgenski K, Dály JA. Surveillance and detection of erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the Intermountain West Region of the United States. *J Clin Microbiol*, 1997;35(11):2989-2991.
8. Yao SM, Liaw GJ, Chen YY et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella pertussis* in Taiwan prompted by a case of pertussis in a paediatric patient. *J Med Microbiol*, 2008;57(12):1577-1580.
9. Česká technická norma ČSN EN ISO 20776-1. Klinické a laboratorní zkoušky a zkušební systémy pro diagnostiku in vitro-Zkoušení citlivosti původců infekcí a hodnocení účinnosti prostředků pro stanovení antimikrobiální citlivosti-Část 1: referenční metody pro zkoušení aktivity antimikrobiálních činidel in vitro proti rychle rostoucím aerobním bakteriím způsobujícím infekční nemoci. Český normalizační institut 2007. (Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Reference methods for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Czech Standardization Institute 2007.)
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard-ninth edition (2012). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Quality Control. EUCAST routine QC tables v 4.0, valid from 2014-09-05. [online] [cit. 2014-10-25] Dostupné na www: [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/qc\\_tables/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/qc_tables/)
12. Mertsola J, He Q. *Bordetella pertussis* (Whooping Cough) and other species. Infec Dis Antimicrobial Agents. [online] [cit. 2014-11-07] Dostupné na www: <http://www.antimicrobe.org/b83.asp>
13. Halsey N, Welling MA, Lehman RM. Nosocomial pertussis: a failure of erythromycin treatment and prophylaxis. *Am J Dis Child*, 1980;134(5):521-522.
14. Bannatyne RM, Cheung R. Antibiotic resistance of degraded strains of *Bordetella pertussis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984;25(4):537-8.
15. Bannatyne RM, Cheung R. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella pertussis* strains isolated from 1960 to 1981. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982;21(4):666-667.
16. Hill BC, Baker CN, Tenover FC. A simplified method for testing *Bordetella pertussis* for resistance to erythromycin and other antimicrobial agents. *J Clin Microbiol*, 2000;38(3):1151-1155.
17. Hoppe JE, Tschirner T. Comparison of media for agar dilution susceptibility testing of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1995;14(9):775-779.
18. Hoppe JE, Paulus T. Comparison of three media for agar dilution susceptibility testing of *Bordetella pertussis* using six antibiotics. *Eur J Microbiol Infect Dis*, 1998;17(6):391-393.
19. Bourgeois N, Ghnassia JC, Doucet-Populaire F. In vitro activity of fluoroquinolones against erythromycin-susceptible and -resistant *Bordetella pertussis*. *J Antimicrob Chemother*, 2003;51(3):742-743.
20. Fry NK, Duncan J, Vaghji L et al. Antimicrobial susceptibility testing of historical and recent clinical isolates of *Bordetella pertussis* in the United Kingdom using the Etest method. *Eur J Microbiol Infect Dis*, 2010;29(9):1183-1185.
21. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, valid from 2014-01-01. [online] [cit. 2014-10-15] Available at [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/breakpoints/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/breakpoints/).
22. Kurzynski TA, Boehm DM, Rott-Petri JA et al. Antimicrobial susceptibilities of *Bordetella* species isolated in a Multicenter Pertussis Surveillance Project. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988;32(1):137-40.

#### Acknowledgement

The work was supported by research grant NT/14058-3 of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and by grant of the Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization („The National Institute of Public Health – NIPH, 75010330“). The authors wish to express their thanks to Iveta Vrbová and Michaela Horáková from the National Reference Laboratory for Antibiotics, NIPH for their outstanding technical assistance.

Do redakce došlo dne 17. 12. 2014.

Corresponding author:

**Vladislav Jakubů, MS**

National Reference Laboratory for Antibiotics  
Centre for Epidemiology and Microbiology  
The National Institute of Public Health  
100 42, Prague 10, Šrobárova 48  
Czech Republic  
E-mail: [vjakubu@szu.cz](mailto:vjakubu@szu.cz)

#### **16.4 Článek č. 4: Zavadilová J. et al., 2015**

Zavadilová J, Lžičarová D, Musílek M, Křížová P, Fabiánová K. Antigenní variabilita kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v letech 1967-2010 v České republice - možné vysvětlení vzestupu onemocnění pertusí? *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015;64(3):130-8. ISSN 1210-7913. **IF 0,361**

# EPIDEMIOLOGIE MIKROBIOLOGIE IMUNOLOGIE

VYDÁVÁ ČESKÁ LÉKAŘSKÁ  
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

ČASOPIS SPOLEČNOSTI  
PRO EPIDEMIOLOGII A MIKROBIOLOGII  
ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI J. E. PURKYNĚ

září 2015

3/64



## Z OBSAHU:

Lidská prionová onemocnění v České republice

Genetický a molekulový podklad vývoje autoimunitního diabetes mellitus

Antigenní variabilita kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v letech 1967–2010 v České republice – možné vysvětlení vzestupu nemoci pertusis?

Vyhodnocení epidemie spalniček v Ústeckém kraji

Klonální analýza populace meningokoků z invazivního onemocnění a od zdravých nosičů izolovaných v České republice v období 1971–2014 (květen)

Kampylobakteriózy na Klinice infekčních chorob Fakultní nemocnice Brno v letech 2011–2013: retrospektivní studie

Klinická rezistence lidského cytomegaloviru při léčbě gancyklovirem u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických buněk – zkušenosti jednoho centra

Hodnocení tvorby biofilmu vybraných patogenů vyskytujících se v potravinářském průmyslu

**IMPAKT  
FAKTOR  
0,353**

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica  
Excerptováno v Bibliographia medica Českoslovac  
EBSCO – Academic Search Complete  
MEDLINE/INDEX MEDICUS, BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS  
INIS Atomindex, SCOPUS  
IMPAKT FAKTOR 0,361  
Časopis je indexován v Seznamu periodik Rady pro výzkum, vývoj a inovace Úřadu vlády ČR.

ISSN 1210-7913  
ISSN (On-line) 1805-451X  
MK ČR E 4652

# Antigenní variabilita kmenů *Bordetella pertussis* izolovaných v letech 1967–2010 v České republice – možné vysvětlení vzestupu nemocnosti pertusí?

Zavadilová J.<sup>1</sup>, Lžičařová D.<sup>1</sup>, Musílek M.<sup>1</sup>, Křížová P.<sup>1</sup>, Fabiánová K.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha

<sup>2</sup>Ústav epidemiologie, 3. LF UK, Praha

## SOUHRN

**Cíl práce:** Porovnání antigenních struktur kmenů *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) z let 1967–2010 v České republice.

**Materiál a metodiky:** Do studie bylo zařazeno 70 kmenů *B. pertussis*, které byly v rámci surveillance pertuse doručeny do Národní referenční laboratoře (NRL) pro pertusis a difterii v letech 1967–2010 z celé České republiky (ČR). Kmeny byly studovány analýzou genomových sekvencí kódujících povrchové imunogenní struktury – gen pro S1 podjednotku pertusového toxinu (*ptxA*), oblast 1 genu pro pertaktin (*prnA*), gen pro fimbrie typu 3 (*fim3*) – a promotor genu pro pertusový toxin (*ptxP*) odpovědný za řízení produkce pertusového toxinu.

**Výsledky:** Ve studovaném souboru kmenů *B. pertussis* byly sekvenční analýzou prokázány změny ve všech sledovaných oblastech genomu. Alelický profil izolátů ve třech srovnávaných obdobích se liší. V prvním období (1967–1978, používání celobuněčné pertusové vakcíny (wP)) byly nejčastěji zjištěny dva profily: *ptxP(1)*, *ptxA(2)*, *prnA(1)*,

*fim3(1)*; *ptxP(1)*, *ptxA(1)*, *prnA(3)*, *fim3(1)*. Ve druhém období (1990–2007, přechod na acelulární pertusovou vakcínu (aP)) byl nejčastěji zjištěn profil *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(2)*. Ve třetím období (2008–2010, používání aP) zcela převládaly dva alelické profily, které se v prvním období vůbec nevykytovaly: *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(2)*; *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(1)*.

**Závěry:** Sekvenční oblastí genomu *ptxP*, *ptxA*, *prnA* a *fim3* u kmenů *B. pertussis* izolovaných v ČR v období 1967–2010 byly potvrzeny změny alelických variant těchto oblastí. Výskyt kmenů nesoucích nové alelické varianty narůstá po roce 1995 na úkor kmenů nesoucích varianty původní. Výsledky studie lze interpretovat jako částečný genetický únik patogenních kmenů *B. pertussis* mimo účinnost pertusových vakcín.

## KLÍČOVÁ SLOVA:

kmen *Bordetella pertussis* – izolát – sekvenace – epidemiologie – vakcína

## ABSTRACT

Zavadilová J., Lžičařová D., Musílek M., Křížová P., Fabiánová K.: Antigenic variability of *Bordetella pertussis* strains isolated in 1967–2010 in the Czech Republic – possible explanation for the rise in cases of pertussis?

**Objective:** Comparison of antigenic structures of *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) strains isolated from 1967 to 2010 in the Czech Republic.

**Material and methods:** Seventy strains of *B. pertussis* were referred to the National Reference Laboratory (NRL) for Pertussis and Diphtheria within the surveillance of pertussis from all over the Czech Republic (CR) between 1967 and 2010. To study the strains, the analysis was performed of the genome sequences encoding the surface immunogenic structures – the pertussis toxin S1 subunit gene (*ptxA*), pertactin gene region 1 (*prnA*), type 3 fimbriae gene (*fim3*) – and pertussis toxin promoter (*ptxP*) responsible for the regulation of the production of pertussis toxin.

**Results:** For the study set of *B. pertussis* strains, the sequencing analysis revealed changes in all genomic regions studied. The isolates from three periods differ in the allelic profile. In period 1 (1967–1978) with the use of whole cell pertussis

vaccine (wP), the following two profiles were the most common: *ptxP(1)*, *ptxA(2)*, *prnA(1)*, *fim3(1)* and *ptxP(1)*, *ptxA(1)*, *prnA(3)*, *fim3(1)*. In period 2 (1990–2007) with the switch to acellular pertussis vaccine (aP), the most common profile was: *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(2)*. Period 3 (2008–2010) with the use of aP was characterized by the predominance of the following two profiles which had never been found in period 1: *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(2)* and *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(1)*.

**Conclusions:** Sequencing of the genomic regions *ptxP*, *ptxA*, *prnA*, and *fim3* of *B. pertussis* strains isolated in the CR between 1967 and 2010 confirmed changes in the allelic variants of these regions. The incidence of strains carrying the new allelic variants was increasing after 1995 at the expense of those carrying the original variants. The study results can be interpreted as a partial genetic escape of pathogenic strains of *B. pertussis* beyond the reach of the pertussis vaccines.

## KEYWORDS:

*Bordetella pertussis* strain – isolate – sequencing – epidemiology – vaccine

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 64, 2015, č. 3, s. 130–138

## ÚVOD

Před zavedením očkování patřilo onemocnění pertusí mezi hlavní příčiny nemocnosti a úmrtnosti dětí. Plošná vakcinace proti pertusí (dávivému, černému kašli) byla ve většině států zavedena v polovině 20. století, což přispělo k významnému snížení nemocnosti a úmrtnosti dětí na pertusí. V sedmdesátých letech se pak v zemích s dobrou dostupností vakcín a vysokou proočkovaností dětské populace snížily počty nemocných na minimum.

V posledních dvou desetiletích 20. století a poté až do současné doby je však ze států se stabilní dobrou proočkovaností proti pertusí hlášen nárůst incidence onemocnění, a to nejen v dětské populaci, ale také u dospívajících a dospělých. Zvýšená incidence pertuse je zaznamenávána v mnoha oblastech a státech USA, Kanady, Austrálie a Evropy [1-9].

V ČR bylo zahájeno pravidelné očkování proti pertusí v roce 1958. K vakcinaci byla použita wP vyrobená v Ústavu sér a očkovacích látek z „domácích“ aktuálně kolujících kmenů *B. pertussis* v kombinaci s difterickým a tetanickým toxoidem (ALDITEPERA). Očkování dětí probíhalo v pětidávkovém schématu. Od roku 2001 byla pro pravidelné očkování používána wP zahraničního výrobce. Od roku 2002 byla již na českém trhu k dispozici i vakcína aP aplikovaná z indikace pediatra nebo za úhradu. Od roku 2005 aP nahradila pátou dávku očkování proti pertusí a v roce 2007 se aP stala součástí pravidelného očkování. Od roku 2009 bylo zavedeno přeočkování 6. dávkou aP. Očkovací látka aP používaná v rámci pravidelného očkování obsahuje tři komponenty: pertusový toxin (PT), pertaktin (PRN) a filamentózní hemaglutinin (FHA). Od roku 2010 je k dispozici na trhu alternativní aP proti pertusí, která obsahuje PT, PRN,

**Tabulka 1.** Souhrnná charakteristika kmenů *B. pertussis*, Česká republika, 1967-2010

**Table 1.** Summary characteristics of *B. pertussis* strains, Czech Republic, 1967-2010

	h	Rok izolace	Alelické varianty				Sérotyp Fim
			<i>ptxP</i>	<i>ptxA</i>	<i>prnA</i>	<i>fim3</i>	
1967-1978 období wP	1526	1967	1	2	1	1	3
	1385	1967	1	2	1	1	3
	1430	1967	1	2	1	1	3
	1429	1967	1	1	3	1	3
	58N	1969	1	2	1	1	3
	239	1969	1	1	3	1	3
	917	1969	1	1	3	1	3
	866	1969	1	1	3	1	3
	1221	1970	1	1	3	1	3
	1554	1970	1	1	3	1	3
	3305	1971	1	2	1	1	3
	411	1971	1	2	1	1	3
	345	1971	1	2	1	1	3
	541	1971	1	2	1	1	3
	1800	1971	1	1	1	1	3
	338	1971	1	1	3	1	3
	1707	1977	1	1	1	1	3
	17	1978	1	1	1	1	3
	932	1978	1	1	1	1	3
	426	1978	1	1	3	1	3
1990-2007 přechod z wP na aP	161/90	1990	3	1	2	2	3
	314	1993	1	1	3	1	3
	762/95	1995	1	1	2	1	3
	638/95	1995	3	1	2	1	3
	602	1995	3	1	2	2	3
	624/95	1995	3	1	2	2	3
	39/99	1999	3	1	2	2	3
	9	2004	3	1	2	2	3
	24(8/2007)	2007	3	1	2	2	3

## PŮVODNÍ PRÁCE

h	Rok izolace	Alelické varianty				Sérotyp Fim
		<i>ptxP</i>	<i>ptxA</i>	<i>prnA</i>	<i>fim3</i>	
114	2008	3	1	2	1	3
122	2008	3	1	2	1	3
130	2008	3	1	2	1	3
343	2008	3	1	2	1	3
344	2008	3	1	2	1	3
296/08	2008	3	1	2	1	3
20	2008	3	1	2	2	3
230	2008	3	1	2	2	3
231	2008	3	1	2	2	3
232	2008	3	1	2	2	3
233	2008	3	1	2	2	3
234	2008	3	1	2	2	3
288	2008	3	1	2	2	3
75(12329)	2008	3	1	2	2	2
155(7782)	2008	3	1	2	2	3
116	2008	3	1	2	2	3
135	2008	3	1	2	2	3
85(15030)	2008	3	1	2	2	3
117	2008	3	1	2	2	3
72 (215)	2008	3	1	2	2	3
121	2008	3	1	2	2	3
312	2008	3	1	2	2	3
342	2008	3	1	2	2	3
25	2008	3	1	2	2	3
303/08	2008	3	1	2	2	3
341/08	2008	3	1	2	2	3
55/09	2009	3	1	2	1	2,3
110/09	2009	3	1	2	1	3
139/09	2009	3	1	2	1	3
140/09	2009	3	1	2	1	2,3
144/09	2009	3	1	2	1	2,3
3/2010	2010	3	1	2	1	3
04/10	2010	3	1	2	1	3
01/10	2010	3	1	2	1	3
09/10	2010	3	1	2	1	3
12/10	2010	3	1	2	1	3
02/10	2010	3	1	2	2	3
03/10	2010	3	1	2	2	3
05/10	2010	3	1	2	2	3
06/10	2010	3	1	parapert	2	3
08/10	2010	3	1	2	2	3

2008-2010  
období aP

wP - celobuněčná pertusová vakcína, aP - acelulární pertusová vakcína, *ptxP* - promotor genu pro pertusový toxin, *ptxA* - gen pro S1 podjednotku pertusového toxinu, *prnA* - oblast 1 genu pro pertaktin, *fim3* - gen pro fimbrii typu 3, Fim - fimbrie, parapert - *B. parapertussis*

wP - whole cell pertussis vaccine, aP - acellular pertussis vaccine, *ptxP* - pertussis toxin promotor, *ptxA* - pertussis toxin S1 subunit gene, *prnA* - pertactin gene region 1, *fim3* - type 3 fimbriae gene, Fim - fimbriae, parapert - *B. parapertussis*



**Tabulka 2.** Alelický profil izolátů *B. pertussis*, Česká republika, 1967-2010**Table 2.** Allelic profiles of *B. pertussis* isolates, Czech Republic, 1967-2010

Alelický profil	1967-1978 wP (n=20)	1990-2007 wP + aP (n=9)	2008-2010 aP (n=41)	celkem (n=70)
ptxP(1), ptxA(2), prnA(1), fim3(1)	8	0	0	8
ptxP(1), ptxA(1), prnA(3), fim3(1)	8	1	0	9
ptxP(1), ptxA(1), prnA(1), fim3(1)	4	0	0	4
ptxP(1), ptxA(1), prnA(2), fim3(1)	0	1	0	1
ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(1)	0	1	16	17
ptxP(3), ptxA(1), prnA(2), fim3(2)	0	6	24	30
ptxP(3), ptxA(1), prn-parapert., fim3(2)	0	0	1	1

wP - celobuněčná pertusová vakcína, aP - acelulární pertusová vakcína, ptxP - promotor genu pro pertusový toxin, ptxA - gen pro S1 podjednotku pertusového toxinu, prnA - oblast 1 genu pro pertaktin, fim3 - gen pro fimbrii typu 3, parapert - *B. parapertussis*

wP - whole cell pertussis vaccine, aP - acellular pertussis vaccine, ptxP - pertussis toxin promotor, ptxA - pertussis toxin S1 subunit gene, prnA - pertactin gene region 1, fim3 - type 3 fimbriae gene, parapert - *B. parapertussis*

FHA a antigeny fimbrií Fim2 a Fim3. Tato vakcína je však určena pouze pro přeočkování.

Incidence a úmrtnost pertuse po zavedení pravidelného očkování v ČR rychle klesala z původních desetitisíců případů ročně na 5-48 případů od druhé poloviny 70. let do roku 1992; většina případů byla u dětí mladších tří let. Od roku 1993 má hlášená incidence pertuse v ČR trvale vzestupný trend. V ČR se proočkovanosť udržuje na velmi dobré úrovni, která umožňuje nastolení kolektivní imunity. Například u dětí do dvou let věku dosahuje 99 % [10]. Návrat pertuse do populace s vysokou proočkovanosťí může být způsoben mnoha faktory. Mezi nejčastěji uváděné patří zkvalitnění surveillance a laboratorní diagnostiky onemocnění, lepší povědomí odborné a laické veřejnosti o pertusi, druh používaných vakcín a vyvanutí („waning“) imunity po očkování [7, 11].

K významným faktorům nárůstu onemocnění patří také adaptace původce onemocnění, bakterie *B. pertussis*, na imunitu zprostředkovanou očkováním; tedy šíření kmenů *B. pertussis* antigenně odlišných od kmenů použitých ve vakcínách. Nové klony *B. pertussis* vzniklé selektivním tlakem vakcinace mají vlastnosti, které jim umožňují vyhnout se dostatečné účinnosti používaných vakcín [12]. Pro sekvenční analýzy byly zvoleny oblasti genomu ptxP, ptxA, prnA a fim3. Jde o genomové sekvence kódující struktury významně se uplatňující v patogenezi pertuse a dostatečně polymorfni pro účely typizace. Tyto struktury jsou zároveň složkami aP dostupných v ČR.

Oblast genomu ptxP je součástí promotoru ptx-ptl operonu kódujícího PT a jeho transportní systém, odpovědný za řízení produkce PT. Expresí genů tohoto operonu je regulována BvgA systémem, který řídí expresi stovek genů v závislosti na změnách vnějších podmínek [13-15]. Polymorfismus ptxP byl zjištěn v oblasti vazebných míst pro RNA polymerázu a pro transkripční faktor BvgA [16]. V současné době je známo 18 alelických variant sekvence ptxP [17].

Oblast genomu ptxA *B. pertussis* kóduje S1 podjednotku PT. PT je tvořen celkem 6 podjednotkami, S1-S5, S1 je podjednotkou katalytickou. Toxin působí mechanismem ADP ribosylace G-proteinů eukaryotních buněk. Polymorfni oblast podjednotky S1 má zásadní význam pro vazbu na receptor T lymfocytů (TCR) [18]. Ostatní podjednotky mají transportní funkci, tvoří transportní systém typu IV [13]. V oblastech kódujících ostatní podjednotky PT nebyl pozorován významnější polymorfismus [19]. PT je jediným známým faktorem patogenity odpovědným za klinickou manifestaci pertuse - u imunologicky naivních jedinců (v našich podmínkách vesměs dosud neočkované děti, především kojenci) způsobuje výraznou leukocytózu s absolutní lymfocytózou a syndrom plicní hypertenze, který může být příčinou respiračního a oběhového selhání a smrti [20, 21].

Další významnou funkcí PT je inhibice časné zánětlivé odpovědi, především produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů a migrace neutrofilních leukocytů do místa infekce, což usnadňuje kolonizaci sliznic hostitele v iničiální fázi infekce [13, 14]. V současné době je známo 8 alelických variant sekvence ptxA [17]. Inaktivovaný PT je součástí všech aP dostupných v ČR.

PrnA je variabilní oblast 1 genu kódujícího PRN, autotransportní sekreční protein s funkcí adhezinu [13, 22]. Vazebným místem pro adhezi je u PRN triplet aminokyselin Arg-Gly-Asp (RGD), známý jako místo vazby (protein-protein) s eukaryotní buňkou. Variabilní oblast 1 se nachází v blízkosti tohoto RGD motivu [22]. Variabilní oblast 1 PRN obsahuje epitop významný pro tvorbu protektivních protilátek. Polymorfismus v této oblasti ovlivňuje strukturu a tím i protektivitu těchto specifických protilátek [23, 24]. Jednotlivé alelické varianty prnA se liší počtem repetitivních aminokyselin GCXXP (Gly-Gly-X-X-Pro) ve variabilní oblasti 1, celkem je známo 13 variant [22]. V genu pro PRN se nachází i druhá poly-

## PŮVODNÍ PRÁCE

morfní oblast *prnB*, její sekvenace je však doporučována pouze v případě zjištění nové alelické varianty *prnA* [22]. PRN je obsažen ve většině aP používaných v ČR. Oblasti *fim2* a *fim3* kódují velkou (major) podjednotku fimbrií, vláknitých povrchových struktur bílkovinné povahy, jejichž předpokládanou funkcí je zprostředkování adherence k respiračnímu řasinkovému epitelu [14]. Fimbrie hrají roli i v imunomodulaci časné (T-independentní) IgM odpovědi, indukují Th2-dependentní odpověď [13]. Dosud jsou známy 4 alelické varianty *fim3* [17]. Oblast *fim2* nebyla v předkládané studii sekvenována a je uvedena jen pro úplnost. V laboratorní charakteristice kmenů *B. pertussis* je velká podjednotka fimbrií strukturou určující sérotyp Fim2/3/2,3 [25]. Fimbrie typu 2 a 3 obsahuje jedna z aP používaných v ČR pro přeočkování (5 let, 10–11 let, dospělí).

### MATERIÁL A METODIKA

#### Kmeny *Bordetella pertussis*

Do studie bylo zařazeno 70 kmenů *B. pertussis*, které byly v rámci surveillance pertuse doručeny do NRL pro pertusi a difterii v letech 1967–2010 z celé ČR. Z let 1972–1976, 1991–1992, 1996–1998, 2000–2003 a 2005–2006 se kmeny nedochovaly. Studované období více než 40 let bylo rozděleno na 3 časové úseky:

- 1967–1978 (20 izolátů) – období wP + klesající nemocnost pertuse.
- 1990–2007 (9 izolátů) – období přechodu z wP na aP + počátek vzestupu nemocnosti pertuse.
- 2008–2010 (41 izolátů) – období aP + pokračující vzestup nemocnosti pertuse.

Do roku 2004 byly kmeny uchovávány v lyofilizovaném stavu, od roku 2007 jsou uchovávány zmrazením při  $-70^{\circ}\text{C}$ . Kmeny *B. pertussis* byly kultivovány na Bordet-Gengou a Charcoal agaru a inkubovány při teplotě  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  po dobu 96 hodin v normální atmosféře. Potvrzení druhové identifikace bylo provedeno skličkovou aglutinací s diagnostickým sérem *Bordetella pertussis* (Remel Ltd, USA). Sérotypizace pro určení typu fimbrií byla provedena rovněž skličkovou aglutinací s použitím monoklonálních protilátek *Monoclonal Antibody for Serotyping Bordetella pertussis Fimbrial Antigen 2*, 1 st WHO IS (NIBSC, UK) a *Monoclonal Antibody for Serotyping Bordetella pertussis Fimbrial Antigen 3*, 1 st WHO IS (NIBSC, UK) podle [25].

#### Sekvenace DNA

Izolace DNA byla provedena soupravou QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, SRN).

Kmeny byly studovány analýzou genomových sekvencí kódujících povrchové imunogenní struktury – gen pro S1 podjednotku pertusového toxinu (*ptxA*), oblast 1 genu pro pertaktin (*prnA*), gen pro fimbrie typu 3 (*fim3*) – a promotor genu pro pertusový toxin (*ptxP*) odpovědný za řízení produkce pertusového toxinu. Amplifikace genových oblastí byly provedeny podle publikovaných postupů [19, 16, 22] při užití HotStarTaq Master Mix kitu (Qiagen, SRN) a termocykléru Labcycler (SensoQuest, SRN). Pro přečištění ampliconů byl použit kit Wizard SV 96 DNA Purification System (Promega, USA) podle návodu výrobce. Sekvenční produkty byly získány při užití BigDye Terminator v3.1 kitu (Applied Biosystems, USA) a termocykléru Veriti (Applied Biosystems, USA), přečištěny srážením 70% etanolem a centrifugací. Sekvence genových úseků byly získány analyzátozem 3130xL (Applied

Biosystems, USA) pomocí software Lasergene (DNASTAR, USA).

### VÝSLEDKY

Ve studii bylo analyzováno 70 kmenů *B. pertussis* z období 1967–2010, které bylo rozděleno na 3 časové úseky:

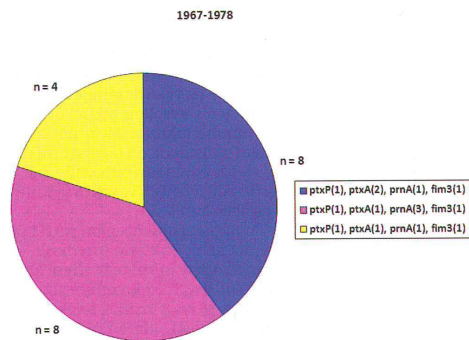
1. období (1967–1978), 2. období (1990–2002), 3. období (2008–2010).

Přehled zjištěných alelických variant je uveden v tabulce 1. Sekvenací oblasti *ptxP* bylo zjištěno, že u izolátů z roku 1978 a starších se vyskytovala výhradně alelická varianta *ptxP(1)*. U izolátů z let 1990 až 2007 se současně s variantou *ptxP(1)* vyskytovala i varianta *ptxP(3)*, která od roku 2008 zcela převládla.

Pokud jde o sekvenaci *ptxA*, u kmenů izolovaných do roku 1978 se vyskytovaly současně varianty *ptxA(1)* a *ptxA(2)*. U kmenů izolovaných od roku 1990 se již vyskytuje pouze varianta *ptxA(1)*.

V případě oblasti *prnA* se u kmenů izolovaných do roku 1978 vyskytovaly současně varianty *prnA(1)* a *prnA(3)*, v období 1990–2007 varianty *prnA(2)* a *prnA(3)*, od roku 2008 se vyskytuje pouze varianta *prnA(1)*. V roce 2010 se vyskytl netypický kmen, u něhož se sekvenace oblasti *prnA* shodovala se sekvenací typickou pro kmen *Bordetella parapertussis*. Sekvenace oblasti *fim3* ukázala, že kmeny izolované do r. 1978 byly nositeli alelické varianty *fim3(1)*, v obdobích 1990–2007 a 2008–2010 se vyskytují varianty *fim3(1)* a *fim3(2)*.

Alelický profil izolátů ve třech srovnávaných obdobích se liší – tabulka 2 a grafy 1–3. V prvním období (1967–1978, wP vakcína) byly nejčastěji zjištěny dva profily: *ptxP(1)*, *ptxA(2)*, *prnA(1)*, *fim3(1)*; *ptxP(1)*, *ptxA(1)*, *prnA(3)*, *fim3(1)*. Ve



Graf 1. Alelický profil izolátů *B. pertussis*, Česká republika, 1967–1978

Fig. 1. Allelic profiles of *B. pertussis* isolates, Czech Republic, 1967–1978

*ptxP* – promotor genu pro pertusový toxin, *ptxA* – gen pro S1 podjednotku pertusového toxinu, *prnA* – oblast 1 genu pro pertaktin, *fim3* – gen pro fimbrie typu 3

*ptxP* – pertussis toxin promoter gene, *ptxA* – pertussis toxin S1 subunit gene, *prnA* – pertactin gene region 1, *fim3* – type 3 fimbriae gene

druhém období (1990–2007, přechod na aP vakcínu) byl nejčastěji zjištěn profil *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(2)*. Ve třetím období (2008–2010, aP vakcína) zcela převládaly dva alelické profily, které se v prvním období vůbec nevyskytovaly: *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(2)*; *ptxP(3)* *ptxA(1)*, *prnA(2)*, *fim3(1)*.

Sérotyp izolovaných kmenů je uveden v tabulce 1. U izolátů z období 1967–1978 a 1990–2007 se vyskytoval výhradně sérotyp Fim3, v období 2008–2010 se vyskytují sérotypy Fim3, Fim2, Fim3,3.

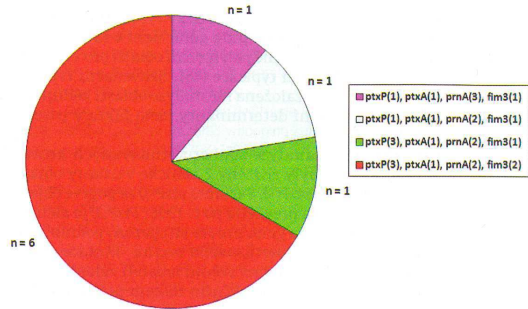
## DISKUSE

Změny ve struktuře antigenních determinantů *B. pertussis* vedoucí k zvýšení odolnosti kmenů cirkulujících v hostitelské populaci vůči selekčnímu tlaku postvakcinačních protilátek mohou být jednou z příčin narůstající incidence pertuse v populacích s vysokou proočkovaností [15]. Nejčastější alelický profil (*ptxA(1)*, *ptxP(3)*, *prnA(2)*, *fim3(2)*) a *fim2(1)* současně cirkulujících kmenů ve světě je odlišný od profilu kmenů použitých k výrobě vakcíny [26, 27] a izoláty, které neexprimují PRN přibývají [28–30]. Alelická varianta *ptxP(3)* v současnosti ve světě dominuje [31] a některé studie indikují, že kmeny s přítomností varianty *ptxP(3)* mají zvýšenou virulenci ve srovnání s kmeny s variantou *ptxP(1)* [32]. Nejnovější studie ve Velké Británii prokázala, že geny kódující antigeny aP vakcíny se mění více, než geny ostatních povrchových proteinů. Toto platilo již před zavedením očkování proti pertusi, ale po zavedení aP vakcíny jsou tyto změny více vyjádřeny [33].

Dalšími příčinami nárůstu incidence pertuse, o kterých se uvažuje, jsou vyvanutí (waning) postvakcinační i postinfekční imunity a změny v diagnostice a fungování systému surveillance. V podmínkách ČR jde také o zlepšení povědomí lékařské veřejnosti o problematice pertuse, především u starších dětí, dospívajících a dospělých, a uplatnění citlivých a efektivních diagnostických postupů. Nejedná se tedy přímo o změny, ale spíše o zefektivnění postupů v rámci stávajícího programu surveillance. Pro poslední uvedený důvod hovoří významné rozdíly v relativním počtu hlášených případů mezi některými zeměmi s vysoce proočkovanou populací, proti pak údaje ze zemí, kde se v rámci surveillance sleduje počet hospitalizací v souvislosti s diagnózou pertuse (důvody pro hospitalizaci jsou v čase stabilnější, protože vycházejí ze závažnosti stavu pacienta) a kde je pozorován nárůst hospitalizací svědčící pro skutečný, nikoli arteficiální nárůst incidence pertuse [34].

Genetická variabilita oblastí kódujících antigenní determinanty nebo faktory patogenity se začala sledovat v zemích s dlouhodobě vysoce proočkovanou populací po nárůstu incidence pertuse [35, 36–40]. Byla prováděna sekvenční analýza oblastí genomu kódujících různé faktory patogenity s cílem nalézt oblasti genomu s optimální mírou polymorfismu a sledovat jejich změny v čase. Polymorfismus byl prokázán v genech *bipA*, *flaB*, *fim2*, *fim3*, *ompQ*, *ptxS3*, *tcfA*, a *vag8* [41, 42]. Významná variabilita byla zjištěna v oblastech kódujících S1 podjednotku PT, promotor genu pro PT, oblast 1 genu pro PRN, velkou podjednotku fimbrií typu 2 a 3 [19, 26]. Bottero et al. [39] prokázali projevy variability vybraných oblastí ve struktuře proteinů.

Studie v Nizozemí a ve Finsku prokázaly polymorfismus v genech, které kódují dva důležité faktory virulence

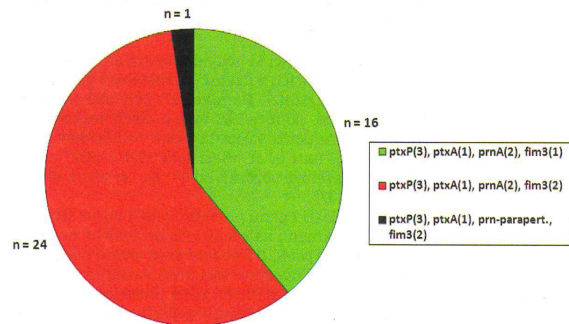


Graf 2. Alelický profil izolátů *B. pertussis*, Česká republika, 1990–2007

Fig. 2. Allelic profiles of *B. pertussis* isolates, Czech Republic, 1990–2007

*ptxP* – promotor genu pro pertusový toxin, *ptxA* – gen pro S1 podjednotku pertusového toxinu, *prnA* – oblast 1 genu pro pertaktin, *fim3* – gen pro fimbrii typu 3

*ptxP* – pertussis toxin promoter gene, *ptxA* – pertussis toxin S1 subunit gene, *prnA* – pertactin gene region 1, *fim3* – type 3 fimbriae gene



Graf 3. Alelický profil izolátů *B. pertussis*, Česká republika, 2008–2010

Fig. 3. Allelic profiles of *B. pertussis* isolates, Czech Republic, 2008–2010

*ptxP* – promotor genu pro pertusový toxin, *ptxA* – gen pro S1 podjednotku pertusového toxinu, *prnA* – oblast 1 genu pro pertaktin, *fim3* – gen pro fimbrii typu 3, *parapert* – *B. parapertussis*

*ptxP* – pertussis toxin promoter gene, *ptxA* – pertussis toxin S1 subunit gene, *prnA* – pertactin gene region 1, *fim3* – type 3 fimbriae gene, *parapert* – *B. parapertussis*

*B. pertussis*: PRN a PT. [35]. Právě protilátky proti PRN a PT byly pro ochranu před infekcí považovány za velmi významné a důležité [43–44].

K sekvenční typizaci *B. pertussis* není možné použít tzv. housekeeping geny, jako je tomu u jiných bakteriálních

druhů. Druh *B. pertussis* je geneticky vysoce monomorfní [45] a v oblasti housekeeping genů není v rámci druhu možné nalézt dostatečné polymorfní oblasti pro vytvoření systému sekvenční typizace [46]. Sekvenční typizace *B. pertussis* je proto založena na analýze oblastí kódujících vybrané antigenní determinanty nebo faktory patogenity [19].

Při sekvenční analýze souboru studovaných kmenů *B. pertussis* v ČR byly zjištěny 2 alelické varianty oblasti *ptxP*, a to *ptxP(1)* a *ptxP(3)*. Varianta *ptxP(3)* se poprvé objevila v r. 1990 a zcela převážila po r. 1995. *PtxP(3)* je alelická varianta promotoru genu pro *ptx-ptl* operon, podmiňující zvýšenou produkci pertusového toxinu. Mutace *ptxP(3)* poskytuje pravděpodobně svému nositeli výhodu související jen nepřímo se selekčním tlakem protilátek [15]. PT usnadňuje mechanismem imunosuprese kolonizaci sliznic dýchacích cest hostitele [13, 14]. K potlačení kolonizace může při jeho zvýšené produkci být zapotřebí vyšší koncentrace sérových protilátek proti PT [15]. Bart et al. [47] datují v práci, zabývající se charakteristikou celosvětové populace *B. pertussis* a jejich genetických změn ve vztahu k očkování, vznik alelické varianty *ptxP(3)* do rozmezí let 1974–1977, její predominanci pak po roce 1995. Tomu odpovídají výsledky předkládané studie. V Nizozemsku zaznamenali Mooi et al. [16] časovou koincidence nárůstu počtu hlášených případů pertuse s nárůstem výskytu kmenů nesoucích alelickou variantu *ptxP(3)*. Porovnání četnosti hospitalizací a úmrtnosti v obdobích s různou mírou výskytu varianty *ptxP(3)* v této práci nepřímo ukazuje na vyšší míru virulence kmenů nesoucích tuto variantu.

V oblasti *ptxA* kódující S1 podjednotku PT byly sekvenací kmenů pocházejících z území ČR zjištěny 2 alelické varianty, *ptxA(1)* a *ptxA(2)*. Do roku 1971 byly obě zastoupeny rovnoměrně, po roce 1971 byla u všech studovaných kmenů zjištěna pouze varianta *ptxA(1)*. Vznik alely *ptxA(1)* předpokládají Bart et al. mezi roky 1921 a 1932, nárůst výskytu celosvětově pozorují od 60. let, výskyt nad 90 % po roce 1995 [47].

Sekvenací oblasti 1 genu pro PRN (*prnA*) byly ve studovaném souboru kmenů nalezeny 3 různé alelické varianty, *prnA(1)*, *prnA(3)* a *prnA(2)*. V období před rokem 1995 převažovaly první dvě uvedené varianty, varianta *prnA(2)* se poprvé objevila v roce 1990 a zcela převažovala od roku 1995. Od roku 1995 nebyly již v souboru zjištěny alelické varianty *prnA(1)* ani *prnA(3)*. Z evropských zemí s vysokou proočkovností vykazuje podobný trend Finsko [27], ve Francii a Nizozemsku naopak výskyt variant *prnA(1)* a *prnA(3)* přetrvává [35, 48]. Postupný nárůst výskytu kmenů nesoucích *prnA(2)* je patrný i v celosvětovém trendu [47]. Protilátky proti PRN jsou specifické pro varianty PRN kódované různými alelickými variantami. Varianta *prnA(1)* je obsažena v genomu vakcinačních kmenů [49] a izolátů z období před zahájením plošné vakcinace a krátce po něm. Navozuje srovnatelně účinnou imunitní odpověď proti variantě *prnA(3)*, ale nikoli proti *prnA(2)* [23]. U varianty *prnA(3)* se předpokládá jiná selekční výhoda, např. lepší schopnost adheze [15, 50]. V oblasti *fim3* byly nalezeny alelické varianty *fim3(1)* a *fim3(2)*. *Fim3(2)* se poprvé objevila v roce 1990, od té doby se vyskytují obě varianty. Tyto dvě varianty dominují také celosvětově, výskyt *fim3(2)* narůstá významněji po roce 2000 [47]. Vznik alelické varianty *fim3(2)* je datován do období 1986–1989 [47]. Odlišnost alelických variant

*fim3(2)* a *fim3(1)* se projevuje i ve fenotypu jako záměna aminokyseliny na pozici 87 [51].

Samotná sekvenční analýza zmíněných oblastí genu *B. pertussis* nedává odpověď na otázku, zda kmeny nesoucí nové alelické varianty patří k mnoha vzájemně nepříbuzným klonům, u kterých došlo ke shodným změnám mechanismem genetického transferu a které se šíří v různých populačních celcích vlivem selekčního tlaku postvakcinačních protilátek, nebo zda jde o celosvětovou expanzi kmenů náležejících k témuž klonu. Pro porozumění tomu, zda a jak se populace *B. pertussis* přizpůsobuje selekčnímu tlaku postvakcinačních protilátek a do jaké míry jsou kmeny nesoucí totožné alelické varianty polymorfních oblastí genu kódujících faktory patogenity evolučně příbuzné, je klíčová znalost struktury a evoluční historie populace *B. pertussis* na celosvětové úrovni [50]. Výsledky sekvenční analýzy v kombinaci s metodou PFGE (pulzní gelová elektroforéza) [45], microarray hybridizační techniky v kombinaci se sekvenací vybraných oblastí genu [52, 53] a analýzy SNP (Single Nucleotide Polymorphism) mutací pro určení vzájemné genetické příbuznosti izolátů *B. pertussis* z různých geografických lokalit [17, 50] hovoří pro druhou možnost. Celosvětově se šířící klon je nositelem alelických variant *ptxP(3)*, *ptxA(1)*, *prnA(2)* [50]. Pro vliv selekčního tlaku vakcinačních protilátek na vznik a šíření tohoto klonu svědčí vyšší podíl SNP mutací v oblastech kódujících antigenní determinanty oproti oblastem tzv. „backbone“ genů (geny, jejichž produkty odpovídají za udržování základních životních funkcí organismu) [50].

Nejrozšířenější aP vakcína, používaná k plošné vakcinaci také v ČR, obsahuje antigeny připravené z typového kmene Tohama I. Tento kmen je nositelem alelických variant *ptxP(1)*, *ptxA(2)* a *prnA(1)* [47], tedy těch, které jsou v populaci *B. pertussis* na území ČR na ústupu, případně již vymizely. To může být příčinou snížené účinnosti aP vakcíny.

Výsledky studie odpovídají nálezům v dalších evropských i mimoevropských regionech s dlouhodobě vysokou proočkovností populace. Narůstající hlášenou incidencí pertuse v ČR, způsobenou kromě dalších faktorů také antigenně změněnými kmeny, se současným očkovacím schématem nedají potlačit.

## ZÁVĚRY

Sekvenací oblastí genu *ptxP*, *ptxA*, *prnA* a *fim3* u kmenů *B. pertussis* izolovaných v České republice v období 1967–2010 byly potvrzeny změny alelických variant těchto oblastí. Výskyt kmenů nesoucích nové alelické varianty narůstá po roce 1995 na úkor kmenů nesoucích varianty původní. Výsledky studie lze interpretovat jako částečný genetický únik patogenních kmenů *B. pertussis* mimo účinnost vakcín.

## LITERATURA

1. Resurgence of pertussis – United States, 1993. *Morb Mortal Wkly Rep*, 1993;42(49):952–953.
2. Milord F. Resurgence of pertussis in Montérégie, Québec – 1990–1994. *Can Commun Dis Rep*, 1995;21(5):40–44.
3. Poynten M, McIntyre PB, Mooi FR, et al. Temporal trends in circulating *Bordetella pertussis* strains in Australia. *Epidemiol Infect*, 2004;132(2):185–193.

4. Celentano LP, Massari M, Paramatti D, et al. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J*, 2005;24(9):761-765.
5. Gonçalves G, Machado E, Gouveia E, et al. Resurgence of pertussis in northern Portugal: two severe cases in very young children. *Euro Surveill*, 2005;10(25):pii=2731 [online]. [cit. 2014-11-14]. Dostupný na [www: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2731](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2731).
6. Grilc E, Pirnat N. Pertussis outbreak in recently vaccinated children in a kindergarten in Ljubljana during a resurgence in pertussis incidence. *Euro Surveill*, 2005;10(33):pii=2779 [online]. [cit. 2010-08-05]. Dostupný na [www: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2779](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2779).
7. de Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA, Rümke HC, et al. Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis*, 1997;3(2):175-178.
8. Gzyl A, Augustynowicz E, Rabaczenko D, et al. Pertussis in Poland. *Int J Epidemiol*, 2004;33(2):358-365.
9. Gustafsson L, Hessel L, Storsaeter J, et al. 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):978-984.
10. Dlhý J. Administrativní kontrola proočkovanosti v České republice k datu 31. 12. 2010. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie, SZÚ, Praha*, 2012;2(3):92-97.
11. Bass JW, Stephenson SR. The return of pertussis. *Pediatr Infect Dis J*, 1987;6(2):141-44.
12. Lam C, Octavia S, Bahrame Z, et al. Selection and emergence of pertussis toxin promoter *ptxP3* allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infect Genet Evol*, 2012;12(2):492-495.
13. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*, 2005;18(2):326-382.
14. Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, et al. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*, 2014;12(4):274-288.
15. Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol*, 2010;10(1):36-49.
16. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis*, 2009;15(8):1206-1213.
17. van Gent M, Bart MJ, van der Heide HG, et al. Small mutations in *Bordetella pertussis* are associated with selective sweeps. *PLoS One*, 2012;7(9):e46407 [online]. [cit. 2014-09-21]. Dostupný na [www: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046407](http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046407).
18. De Magistris MT, Di Tommaso A, Domenighini M et al. Interaction of the pertussis toxin peptide containing residues 30 - 42 with DRI and the T-cell receptors of 12 human T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89(7):2990-2994.
19. van Loo IHM, Heuvelman KJ, King AJ, et al. Multilocus Sequence Typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol*, 2002;40(6):1994-2001.
20. Cherry JD, Paddock CD. Pathogenesis and histopathology of pertussis: Implications for vaccination. *Expert Rev Vaccines*, 2014;13(9):1115-1123.
21. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, et al. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis*, 2008;47(3):328-338.
22. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, et al. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000;19(3):174-181.
23. He Q, Mäkinen J, Berbers G, et al. *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J Infect Dis*, 2003;187(8):1200-1205.
24. King AJ, Berbers G, van Oirschot, et al. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology*, 2001;147(11):2885-2895.
25. van Gent M, de Greef SC, van der Heide HG, et al. An investigation into the cause of the 1983 whooping cough epidemic in the Netherlands. *Vaccine*, 2009;27(13):1898-1903.
26. Litt DJ, Neal SE, Fry NK. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J Clin Microbiol*, 2009;47(3):680-688.
27. Van Loo IH, Mooi FR. Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. *Microbiology*, 2002;148(7):2011-218.
28. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, et al. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine*, 2009;27(43):6034-6041.
29. Lam C, Octavia S, Rifacort L, et al. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis*, 2014;20(4):626-633.
30. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, et al. Prevalence and genetic characterization of pertactin - deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One*, 2012;7(2):e31985 [online]. [cit. 2012-02-14]. Dostupný na [www: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031985](http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031985).
31. Kallonen T, He Q. *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev Vaccines*, 2009;8(7):863-875.
32. King AJ, van der Lee S, Mohangoo A, et al. Genome-wide gene expression analysis of *Bordetella pertussis* isolates associated with a resurgence in pertussis: elucidation of factors involved in the increased fitness of epidemic strains. *PLoS One*, 2013;8(6):e66150 [online]. [cit. 2013-06-11]. Dostupný na [www: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066150](http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066150).
33. Sealey KL, Harris SR, Fry NK, et al. Genomic analysis of isolates from the United Kingdom 2012 pertussis outbreak reveals that vaccine antigen genes are unusually fast evolving. *J Infect Dis*, 2014; pii: jiu665 [online]. [cit. 2014-12-08]. Dostupný na [www: http://jid.oxfordjournals.org/content/early/2015/01/06/infdis.jiu665.long](http://jid.oxfordjournals.org/content/early/2015/01/06/infdis.jiu665.long).
34. Berbers GA, de Greeff S, Mooi FR. Improving pertussis vaccination. *Hum Vaccin*, 2009;5(7):497-503.
35. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, et al. 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):670-675.
36. Mooi FR, He Q, van Oirschot H, et al. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun*, 1999;67(6):3133-3134.
37. Fry NK, Neal S, Harrison TG, et al. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect Immun*, 2001;69(9):5520-5528.
38. Hallander HO, Advani A, Donnelly D, et al. Shifts of *Bordetella pertussis* variants in Sweden from 1970 to 2003, during three periods marked by different vaccination programs. *J Clin Microbiol*, 2005;43(6):2856-2865.
39. Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, et al. Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin Vaccine Immunol*, 2007;14(11):1490-1498.
40. Gzyl A, Augustynowicz E, van Loo I, et al. Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in *Bordetella pertussis* strains isolated from clinical cases in Poland. *Vaccine*, 2001;20(3-4):299-303.

## PŮVODNÍ PRÁCE

41. Packard ER, Parton R, Coote JG, et al. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *J Med Microbiol*, 2004;53(5):355–365.
42. Borisova O, Kombarova SY, Zakharova NS, et al. Antigenic divergence between *Bordetella pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains. *Clin Vaccine Immunol*, 2007;14(3):234–238.
43. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, et al. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*, 1998;16(20):1901–1906.
44. Taranger J, Trollfors B, Lagergård T, et al. Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis. *J Infect Dis*, 2000;181(3):1010–1013.
45. Advani A, Van der Heide HG, Hallander HO, et al. Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage. *J Microbiol Methods*, 2009;78(3):297–301.
46. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM et al. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog*, 2005;1(4):e45 [online]. [cit. 2014–10–02]. Dostupný na [www: http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0010045](http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0010045).
47. Bart MJ, Harris SR, Advani A, et al. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *Mbio*, 2014;5(2):e01074 [online]. [cit. 2014–12–20]. Dostupný na [www: http://mbio.asm.org/content/5/2/e01074-14.full.pdf+html](http://mbio.asm.org/content/5/2/e01074-14.full.pdf+html).
48. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, et al. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol*, 2001;39(12):4396–4403.
49. van Amersfoort SC, Schouls LM, van der Heide HG et al. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J Clin Microbiol*, 2005;43(6):2837–2843.
50. Octavia S, Maharjan RP, Sintchenko V, et al. Insight into evolution of *Bordetella pertussis* from comparative genomic analysis: evidence of vaccine-driven selection. *Mol Biol Evol*, 2011;28(1):707–715.
51. Tsang RS, Lau AK, Sill ML, et al. Polymorphisms of the fimbria *fim3* gene of *Bordetella pertussis* strains isolated in Canada. *J Clin Microbiol*, 2004;42(11):5364–5367.
52. King AJ, van Gorkom T, Pennings JL, et al. Comparative genomic profiling of Dutch clinical *Bordetella pertussis* isolates using DNA microarrays: identification of genes absent from epidemic strains. *BMC Genomics*, 2008;9:311 [online]. [cit. 2012–03–25]. Dostupný na [www: http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/311](http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/311).
53. King AJ, van Gorkom T, van der Heide HG, et al. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genomics*, 2010;11:64 [online]. [cit. 2012–03–25]. Dostupný na [www: http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/64](http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/64).

### Poděkování

Práce byla podpořena výzkumným grantem NT/14058-3 Interní grantové agentury (IGA) MZ ČR.

Poděkování všem, kteří se podílejí na surveillance pertuse v České republice a posílají izoláty *B. pertussis* do NRL pro pertusi a difterii.

Do redakce došlo dne 4. 3. 2015.

Adresa pro korespondenci:

**Mgr. Jana Zavadilová**

Centrum epidemiologie a mikrobiologie  
Státní zdravotní ústav  
Šrobárova 48  
100 42 Praha 10  
e-mail: [jzavadilova@szu.cz](mailto:jzavadilova@szu.cz)