

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU
BILTHOVEN

Rapport nr. 128507003

**Serodiagnostiek van kinkhoest: interpretatie van hoge
IgG/IgA concentraties in acute fase serum: (Her)evaluatie
van eenpuntsserologie**

H.E. de Melker¹, H.G.L. Boshuis², M.P.T.M. Mommers²,
L.C. Sundermann³, J. Labadie³, H.C. Rümke³,
F.G.A. Versteegh⁴, M.A.E. Conyn-van Spaendonck¹,
J.F.P. Schellekens²

september 1996

¹ Centrum voor Infectieziekten Epidemiologie (CIE), RIVM, Bilthoven

² Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en Screening (LIS), RIVM, Bilthoven

³ Laboratorium voor Veldonderzoek vaccins (LVO), RIVM, Bilthoven

⁴ Kindergeneeskunde, Groene Hart Ziekenhuis, Gouda

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van de Inspectie voor de Gezondheidszorg in het kader van project nr 128507.

This investigation has been performed in order and for the account of the Medical Inspectorate of Health within the framework of project 128507.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven,
tel. 030 - 2749111, fax 030 - 2742971

VERZENDLIJST

1	Hoofdinspecteur voor de Gezondheidszorg, J. Verhoeff, psychiater
2-3	Bestuursraad Ministerie van VWS, de Directeur-Generaal ir. T. van der Putte
4-5	Inspecteur Infectieziekten van de Inspectie Gezondheidszorg, J. van Wijngaarden, arts
6	Hoofdinspectie voor de preventieve en curatieve gezondheidszorg
7	Gezondheidsraad
8-9	Landelijke Vereniging voor GGD'en
10	Landelijk Coördinatiestructuur Infectieziektenbestrijding
11-27	Streeklaboratoria
28-29	Nederlands Instituut Voor onderzoek van de Gezondheidszorg
30-47	Leden IGZ-infectieziekten overleg RIVM
48-115	Artsen infectieziektenbestrijding GGD'en (incl. LOI)
116	Nationale Vereniging Thuiszorg
117	Nederlandse Vereniging voor Kindergeneeskunde
118	Prof.dr.J.van der Meer, Nederlandse Vereniging voor Infectieziekten
119	Prof. dr. H. Verbrugh, Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie
120	Dr. van Loock, Instituut voor Hygiëne en Epidemiologie, Brussel
121	Prof. dr. J. Huisman
122	Prof. dr. J. van der Noordaa
123	Dr. H. Bijkerk
124	Dr. R. de Groot
125	Dr. J. Nagel
126	Depot Nederlandse Publicaties en Nederlandse bibliografie
127	Directie RIVM
128	Dr. M.M. Krasselt
129	Prof. dr. ir. D. Kromhout
130	Dr. M.J.W. Sprenger
131	Dr. A.D. Plantinga
132	Dr. J.G. Loeber
133	Dr. ir. J. Seidell
134	Dr. J.D.A. van Embden
135	Dr. F.R. Mooi
136	Dr. A. van der Zee
137-145	Medewerkers LIS
146-176	Medewerkers CIE
177-186	Auteurs
187	Hoofd Voorlichting en Public Relations RIVM
188-189	Bibliotheek RIVM
190	Bureau Rapportenregistratie
191-260	Bureau Rapportenbeheer

INHOUDSOPGAVE

VERZENDLIJST	2
SUMMARY	4
SAMENVATTING	5
1. INLEIDING	6
2. MATERIAAL EN METHODEN	9
2.1 Gegevensbronnen	9
2.2 Kwantitatieve IgG en IgA immuno-assays	10
2.3 Analyse	11
3. RESULTATEN	13
3.1 IgG en IgA titers	13
3.2 IgG/IgA-hoogtecategorieën (labcodes)	14
3.3 Vaststelling van de cut-off waarden voor eenpuntsserologie	14
3.4 Validatie van de cut-off door vergelijking met longitudinaal patroon van IgG/IgA-concentraties na natuurlijke infectie	14
3.5 De epidemiologische validatie van de vastgestelde cut-off waarden (labcodes) voor positiviteit van eenpuntsserologie	15
3.6 Het effect van de nieuwe interpretatie van eenpuntsserologie op de surveillance van kinkhoest, 1989-1994	15
4. DISCUSSIE	16
4.1 Cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie	16
4.2 Epidemiologische validatie	17
4.3 Incidentie kinkhoest op basis van eenpuntsserologie	18
4.4 Consequenties van toepassing van eenpuntsserologie	19
5. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	21
LITERATUUR	23
TABELLEN EN FIGUREN	25

SUMMARY

Introduction. In 1988 the serological criteria for notification of pertussis were changed. Only a significant increase of titers in paired sera was accepted as confirmation of the clinical diagnosis. As a consequence, the case-definition for notification of pertussis is highly specific, however the sensitivity is low. In more than 50% of suspected cases no serological diagnosis of pertussis can be accomplished because only one serum sample is available or high titers are found in paired sera with no increase. With the aim to facilitate serodiagnosis of pertussis, we set out to investigate in this study whether, and at which level, high titers in a first serum sample are indicative for actual or recent pertussis.

Methods. IgA- and IgG-concentrations of pertussis antibodies were measured 1. in sera of 799 participants (0-79 years) in the pilot of the PIENTER-project (cross-sectional study in the general populations: "normal sera"), 2. in sera from 503 children obtained at the age of 3, 6, 11 and 13 months, i.e. before vaccination, two to six weeks after the primary series of three DKTP-Hib immunisations (3, 4 and 5 months of age), before the (re)-immunisation at 11 months and two to six weeks thereafter ("DKTP-Hib-study-sera"), 3. in second sera of serumpairs from patients suspected for whooping cough with a significant increase of titers in paired sera ('Immune sera', n=1590). Low to high categories of combinations of IgG/IgA-concentrations were defined (labcodes 1-10). Age-specific cut-off values for positive one point serology were defined according to the following criteria (1) the IgA/IgG concentration category was higher than the 97.5 percentile in the "normal sera" and "DKTP-Hib-study-sera"; (2) The IgA/IgG category was higher than or equal to the 10 percentile of values in the "immune sera". To validate the cut-off values for positive one-point serology, the longitudinal course of IgA/IgG titers were studied in ten patients until maximally three years after acute infection. Besides, the patterns of incidences per month, per age group and per year according to notifications and classic criteria for serodiagnosis (positive two point serology) were compared with such patterns resulting from retrospective analysis of cut-off values for positive one point serology in the period 1989-94.

Results. Age specific cut-off values for IgA/IgG categories amounted ≥ 5 for 0-4 years old, ≥ 7 for persons aged 5-14 years and ≥ 8 for those aged ≥ 15 years. The cut-off value for the fourth of the DKTP-Hib-study-sera was not included in the evaluation for cut-off values for positive one-point serology because a seroconversion rate of 9% occurred in this cohort of vaccinated children. It could be calculated that for patients aged about 13 months the cut-off value for positive one point serology may yield a false-positive rate of $< 5\%$ (for other ages $< 2.5\%$). Patients in the acute phase of infection had IgA/IgG categories of ≥ 8 . Six months after infection the IgA/IgG category amounted five or less for eight out of the ten patients. The yearly peak for positive two point serology, notifications and positive one point serology were similar (August). Based on one- point serology the estimated incidence was 4,5 times higher than the incidences based on positive two point serology and notifications. The increment in incidence increased with age.

Conclusions. High IgA/IgG-titers in the first serum sample of a patient with cough support the diagnosis of "infection with B. pertussis" strongly. The application of one point serology makes it possible to take preventive measures for a larger proportion of patients with pertussis. However application of one point serology will have influence on the incidence based on notifications and thereby on the interpretation of surveillance data over time. The cut-off values for positive one-point serology found in this study need to be validated further in a representative set from the general population that are collected in 1995/1996 in the so-called PIENTER-project. In near future we will study if a cut-off value for positive one-point serology based on separately IgA-titer and IgG-titer can be formulated.

SAMENVATTING

Probleemstelling. Voor aangifte van kinkhoest geldt sinds 1988 dat serodiagnostiek alleen positief genoemd mag worden indien een significante titerstijging in gepaarde sera is aangetoond. Vaak blijft het serologisch onderzoek echter inconclusief; doordat geen tweede serummonster was ingestuurd of de patiënten al verhoogde titers in het eerste serummonster hadden die niet verder meer stegen. De casus-definitie voor aangifte heeft hierdoor een hoge specificiteit, maar lage gevoeligheid. Door herwaardering van de diagnostische waarde van eenpuntsserologie kan de diagnostiek van kinkhoest verbeteren.

Methoden. IgA-antistoffen tegen sonicaat van *Bordetella pertussis* bacteriën en IgG-antistoffen tegen gezuiverd pertussis toxine werden gemeten 1. bij personen uit de algemene bevolking in de leeftijd van 0-79 jaar ("*normaal-sera*" van 799 deelnemers aan de pilot voor het Pienter-project), 2. bij 503 kinderen op de leeftijden van ± 3 maanden, ± 6 maanden, ± 11 maanden en ± 13 maanden d.w.z. resp. vóór vaccinatie, 2-6 weken na de primaire serie van drie entingen tegen DKTP-Hib, vóór de vierde (re)vaccinatie en 2-6 weken na de revaccinatie ("*DKTP-Hib-studie-sera*") en 3. in het tweede serummonster van patiënten bij wie een significante titerstijging in gepaarde sera is aangetoond ($n=1590$; "*immuun-sera*"). Hoogtecategorieën van combinaties van IgG/IgA concentraties werden gedefinieerd (labcodes 1-10). Leeftijdsspecifieke cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie werden geformuleerd volgens de volgende criteria: (1) De hoogte-categorie IgA/IgG (labcode) is groter dan 97,5 percentiel in "*normaal-sera*" en "*DKTP-Hib-studie-sera*" van de betreffende leeftijdscategorie, (2) De labcode is groter dan of gelijk aan het 10^e percentiel in "*immuun-sera*" van de betreffende leeftijdscategorie. De gevonden cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie werden gevalideerd door het longitudinale verloop van labcodes in tien kinkhoest-patiënten tot drie jaar na acute infectie te bestuderen ("*longitudinale sera*"). Tevens werden de incidentie-patronen per maand, per jaar en naar leeftijd in 1989-1994 op grond van aangiften en klassieke serodiagnostiekcriteria (tweepuntsserologie) vergeleken met deze patronen retrospectief berekend aan de hand van cut-off waarden voor positieve eenpuntsserologie.

Resultaten. Leeftijdsspecifieke cut-off waarde voor hoogtecategorie IgA/IgG bedroeg ≥ 5 voor 0-4 jarigen, ≥ 7 voor 5-14 jarigen, ≥ 8 voor personen ≥ 15 jaar. De cut-off waarde voortkomend uit de 4e van de "*DKTP-Hib-studie-sera*" werd niet meegewogen; 9% had een significante immuunrespons. Hierdoor is het percentage mogelijk fout-positieve uitslagen voor kinderen van ± 13 maanden $<5\%$ i.p.v. $<2,5\%$ voor de overige leeftijdsgroepen. Patiënten in de acute fase van infectie ("*longitudinale sera*") hadden IgA/IgG waarden van hoogtecategorie ≥ 8 . Zes maanden na acute infectie bedroeg de hoogtecategorie voor 8 van de 10 patiënten ≤ 5 . De jaarlijkse seizoenspiek van "klassiek positieve" serologie en aangifte (augustus) viel samen met de seizoenspiek van positieve eenpuntsserologie. De negatieve serologie kende telkens een latere piek. Positieve eenpuntsserologie op grond van hierboven geformuleerde cut-off waarden leverde gemiddeld 4,5 keer meer gevallen op dan positieve tweepuntsserologie en aangiften. De toename van de geschatte incidentie was leeftijdsafhankelijk.

Conclusie. Meting van immuunwaarden in een eerste serum van een patiënt met hoestklachten ondersteunen de diagnose "infectie met *B. pertussis*" of "kinkhoest" in sterke mate. Door toepassing van eenpuntsserologie is het voor een groter deel van de kinkhoest patiënten en in een vroeger stadium van ziekte mogelijk preventieve maatregelen voor bescherming van kwetsbaren te nemen. Echter, de incidentie gebaseerd op aangiften zal dan veranderen en daarmee de interpretatie van trends in incidentie. Verdere validatie van de gevonden cut-off waarden in een voor de algemene bevolking representatieve steekproef (PIENTER-project) is noodzakelijk. Tevens zal in de nabije toekomst geanalyseerd worden of cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie geformuleerd kunnen worden op basis van separaat de IgA-titer en de IgG-titer.

1. INLEIDING

Onze kennis over het vóórkomen van kinkhoest in Nederland is gebaseerd op aangifte-cijfers. De casus-definitie voor aangifte omvat het verplichte criterium "laboratorium-bevestigd" (1), met als gevolg dat de aangifte van kinkhoest afhankelijk is van de beschikbaarheid en de gevoeligheid van laboratorium diagnostiek. De gevoeligheid van kweek of PCR van nasopharyngeaal materiaal voor detectie van *Bordetella pertussis* wordt minder naarmate de ziekte langer duurt. Het is zelfs zo dat bij een groot deel van de patiënten de bacterie reeds niet meer aantoonbaar is op het moment dat de mogelijkheid van kinkhoest overwogen wordt en laboratorium diagnostiek geïnitieerd (2). Een negatieve kweek of PCR ontkent de diagnose niet. In die gevallen is serologie de enig overblijvende methode om de diagnose te stellen.

Sinds januari 1988 geldt ten aanzien van het criterium "laboratorium-bevestigd" dat kinkhoest-serologie alleen dan positief genoemd mag worden wanneer onderzoek van twee serum-monsters, afgenomen met een tussenpauze van minstens twee weken, een significante stijging van antistof-titers laat zien (1). Echter, in veel gevallen is de immuunrespons op het moment van eerste serum afname reeds op haar hoogtepunt (2). Een titerstijging in een tweede serum wordt dan niet gevonden en de diagnose kinkhoest kan niet in het laboratorium worden bevestigd. In die gevallen mag niet tot aangifte worden overgegaan. De huidige casus-definitie van kinkhoest is daardoor zeer specifiek - "fout-positieve" aangifte is vrijwel uitgesloten-, maar weinig gevoelig.

Ondanks de geringe gevoeligheid van de casus-definitie kan inzicht worden gekregen in (veranderingen in) het voorkomen van kinkhoest over de jaren. In de aangifte worden die gevallen geregistreerd die zich zodanig ernstig c.q. vroeg in het beloop presenteren, dat de bacterie (nog) detecteerbaar is en/of de immuun-response zich (nog) in de vroeg-dynamische fase bevindt, zodat een titerstijging in een tweede serum gevonden wordt. Echter, de werkelijke incidentie wordt onderschat en te veel gevallen van klinisch zekere kinkhoest blijven buiten de aangifte waardoor preventieve maatregelen voor bescherming van kwetsbare nauwe kontakten niet worden genomen (3).

Verbetering en vereenvoudiging van de diagnostiek is daarom gewenst. Een herwaardering van eenpuntsserologie behoort tot de mogelijkheden. Hiertoe dienen gegevens over het beloop in de tijd van IgA en IgG-titers na een recente immuunrespons en over de gemiddelde hoogte en spreiding van deze titers in de algemene bevolking bestudeerd te worden.

Korte historie: van eenpunts- naar tweepuntsserologie

Sinds het beschikbaar komen van de specifieke immuno-assays (IgA tegen *B.pertussis* in 1981 (4) en IgG tegen pertussis toxine in 1984 (5)) is serologie in ons land in korte tijd de meest frequent toegepaste methode voor laboratorium-bevestiging van kinkhoest geworden. De immuunrespons die met de IgG en IgA immunoassays werd gemeten, bleek specifiek te zijn voor natuurlijke infectie met *B.pertussis*; vaccinatie met kinkhoest-vaccin leidde niet tot inductie van IgA antistoffen tegen *B.pertussis* en de IgG respons tegen pertussis toxine na vaccinatie was slechts gering en bovendien

tijdelijk (6,7,8). Vóór 1988 werd op basis van meting van specifiek IgG/IgA in acuut serum door het laboratorium (RIVM) een gedifferentieerde interpretatie gegeven (tabel 1). Bij ontbreken van antistoffen in acuut serum, of bij relatief lage concentraties ("mogelijk kinkhoest" in tabel 1), werd een tweede serum gevraagd om een eventuele titerstijging vast te stellen.

In diezelfde jaren deed het fenomeen zich voor dat steeds meer patiënten met kinkhoest werden aangegeven bij GGD/IGZ. De incidentie geschat op basis van aangiften steeg progressief van 0.15/100.000 in 1980 naar 17.5/100.000 in 1987, i.e. bijna 120-voudig. In ons omringende landen werd zo'n dynamiek niet waargenomen. Tegelijkertijd werd vastgesteld dat gezonde individuen met stijgen van de leeftijd steeds vaker aantoonbare IgG/IgA antistoffen hadden (figuur 1, uit ref 7) (6,7). Dit zou een reflectie zijn van het voorkomen bij volledig gevaccineerden van natuurlijke boosting van vaccin-geïnduceerde immuniteit door tussentijdse mild-symptomatische of zelfs asymptomatische natuurlijke infecties met *B.pertussis*. Het patroon in figuur 1 suggereert dat die natuurlijke infecties ongeveer 3 jaar na vaccinatie gaan optreden. De bescherming van het vaccin tegen infectie is dus maar tijdelijk. De hoogte van de IgA/IgG concentraties bij de individuen die kennelijk zo'n tussentijdse natuurlijke infectie hadden doorgemaakt, was overigens meestal bescheiden (figuur 2 uit ref 7)).

De mogelijkheid werd overwogen of de sterk toegenomen aangifte van kinkhoest wellicht voor een belangrijk deel werd veroorzaakt door de hoge prevalentie van "rest-titers" na natuurlijke boosting van vaccin geïnduceerde immuniteit. Immers, wanneer gemeten in het kader van een op pertussis gelijkend maar door een ander agens veroorzaakt ziektebeeld, zouden die rest-titers door de arts ten onrechte als laboratorium-bevestiging van kinkhoest kunnen worden geïnterpreteerd, leidend tot fout-positieve aangifte. Omdat de prevalentie van rest-titers in de gezonde bevolking toenam met de leeftijd zou fout-positieve aangifte vooral oudere kinderen en volwassenen moeten betreffen. En inderdaad, bij nadere analyse werd vastgesteld dat de toename van de aangifte-incidentie in de jaren tot 1987 proportioneel het sterkst was bij die oudere leeftijdscategoriën (9).

Eind 1987 heeft de toenmalige Geneeskundige Hoofdingspectie (thans IGZ), na overleg met een commissie van de beraadsgroep Infectie en Immuniteit van de Gezondheidsraad en met het serologisch laboratorium van het RIVM, gesteld dat laboratorium-bevestiging van kinkhoest middels serologie alleen dan met zekerheid positief was als een significante IgG en/of IgA titerstijging in gepaarde sera (i.e. twee sera afgenomen met een tussenpauze van twee weken) was aangetoond. De casus-definitie voor aangifte werd aan dit inzicht aangepast en de beroepsgroep werd eind 1987 geïnformeerd (1). Het serologische laboratorium (RIVM) verzocht voortaan inzending van gepaard serum, en gaf geen interpretatie meer van metingen in één serum. Het effect was dat het aantal inzendingen voor kinkhoest-serologie afnam en dat een belangrijk deel van de serologische onderzoeken van serumparen als non-conclusief ten aanzien van het actuele ziektebeeld werd afgegeven. Immers, vaak werden hoge, maar niet (verder) stijgende titers gevonden: "geen bewijs voor recente kinkhoest, wel aanwijzing voor *B. pertussis* infectie in het verleden". De aangifte van kinkhoest daalde van 17.5/100.000 in 1987 naar 1.0/100.000 in 1988. Bij ongewijzigde casus-definitie in de daarop volgende periode, werden aangifte-incidenties bereikt in 1989 t/m 1994 van respectievelijk 3.5, 2.7, 1.0, 1.1, 2.3 en 3.4 per 100.000 (10,11,12). Een

belangrijk deel van die gevallen was met een antistoftiter-stijging in tweepunts-serologie bevestigd, een kleiner deel met kweek.

Doel van dit onderzoek is om een herevaluatie van de direct diagnostische waarde van eenpuntsserologie uit te voeren en om hiermee de serodiagnostiek van kinkhoest te verbeteren. Hiertoe zijn gegevens over de hoogte van IgA en IgG-titers in de algemene bevolking gebruikt om inzicht te krijgen in de "normaal-waarden" van deze titers. Het longitudinale verloop van IgA- en IgG-titers bij personen na een acute infectie werd bestudeerd, evenals het verloop van deze titers na vaccinatie tegen kinkhoest op de leeftijd van 3, 4, 5 en 11 maanden. Op grond van deze gegevens is onderzocht of leeftijdsspecifieke cut-off waarden voor IgA en IgG titers konden worden geformuleerd die een onderscheid maken tussen titers die normaal voorkomen in de algemene bevolking en tussen titers die bij patiënten met een recente infectie voorkomen (bewezen kinkhoest op grond van de huidige aangiftecriteria).

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Gegevensbronnen

Pilot voor het Pienter-project

In 1994 is als voorloper op een landelijk onderzoek een pilot-onderzoek voor het Pienter-project (Peiling Immunisatie Effect Nederland ter Evaluatie van het Rijksvaccinatieprogramma) uitgevoerd. Met dit project wordt beoogd een serumbank op te richten van een representatieve steekproef van de Nederlandse bevolking. De serumbank zal hoofdzakelijk worden benut voor onderzoek naar de immuunstatus van de algemene bevolking tegen ziekten waartegen in het kader van het Rijksvaccinatieprogramma wordt gevaccineerd. Voor het pilot-onderzoek werd uit de provincie Utrecht een steekproef van vier gemeenten getrokken gewogen naar inwonerstal. Uit elk van deze gemeenten (Utrecht, Zeist, Amerongen en Woudenberg) werd een naar leeftijd gestratificeerde steekproef van 510 personen getrokken. De leeftijdsklassen waren 0, 1-4, 5-9 en verder vijfjaarsklassen tot en met 75-79 jaar. De beoogde deelnemers werd gevraagd een vragenlijst in te vullen en een spreekuur voor bloedafname te bezoeken. Van de 2040 uitgenodigde personen hebben 827 personen het spreekuur voor bloedafname bezocht. Van 799 personen was serum beschikbaar ten behoeve van kinkhoest serologie. Bij analyse is rekening gehouden met de methode van steekproeftrekking. Aangezien een naar leeftijd gestratificeerde steekproef is getrokken, komt de werkelijke leeftijdsverdeling van de deelnemers aan de pilot voor het Pienter-project niet overeen met de werkelijke leeftijdsverdeling in de provincie Utrecht; dat wil zeggen dat bepaalde leeftijdsgroepen zijn onder- dan wel oververtegenwoordigd. Voor uitgebreide beschrijving van de toegepaste methoden en resultaten van het pilot-onderzoek wordt verwezen naar referentie 13.

In de sera van de deelnemers aan de pilot voor het Pienter-project zijn IgA en IgG-titers bepaald. Deze sera zijn verder aangeduid als "*normaal-sera*".

DKTP-Hib onderzoek

Door het Laboratorium voor Veldonderzoek Vaccins (LVO) is in 1993/1994 een onderzoek uitgevoerd naar de invloed van simultane, gemengde of separate toediening van *Haemophilus influenzae* type b vaccin en DKTP-vaccins op de immuunrespons tegen difterie, kinkhoest, tetanus, polio en *Haemophilus influenzae* type b (14). In deze studie waren van 503 kinderen vier sera beschikbaar. Deze sera zijn afgenomen op leeftijden van circa 3 mnd (t=1), circa 6 mnd (t=2), circa 11 mnd (t=3) en ca 13 mnd (t=4) dit wil zeggen respectievelijk vóór vaccinatie, 2 tot 6 weken na de primaire serie van drie entingen met DKTP en Hib, vóór de vierde (re) vaccinatie met DKTP en Hib en 2 tot 6 weken na de re-vaccinatie. In deze sera werd de IgA/IgG-titer bepaald. Deze sera zijn aangeduid met "*DKTP-Hib-studie-sera*".

Longitudinale sera

In de periode 1992-1995 werden drie of vier sera verzameld van 10 personen die een acute *B. pertussis* infectie hadden doorgemaakt. In deze sera werd de IgA/IgG titer bepaald. De follow-up na infectie bedroeg minimaal 6 maanden en maximaal drie jaar (bron: Drs.F.Versteegh, kinderarts, Gouda). Deze sera worden verder aangeduid met "*longitudinale sera*".

Diagnostisch onderzoek bij het Laboratorium voor Bacteriologie en Antimicrobiële Middelen(LBA), thans Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en Screening (LIS)

Het LIS verricht als enig laboratorium kinkhoest-serologie voor geheel Nederland.

- *Tweede serummonsters van patiënten met een significante titerstijging in gepaarde sera*

Van alle patiënten die klinisch verdacht waren van kinkhoest met een significante IgA/IgG titerstijging in gepaarde sera (n=1590) waarbij de eerste ziektedag lag in de periode januari 1989 tot en met juni 1994 werd de distributie van de IgA/IgG-titers in het tweede serummonster geanalyseerd. Deze sera zijn verder aangeduid als "*immuunsera*".

- *Serodiagnostiekbestand kinkhoest*

Voor validiteit van de gevonden cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie (zie paragraaf 2.3) werd een retrospectieve analyse uitgevoerd bij patiënten die klinisch verdacht waren van kinkhoest waarvan de eerste ziektedag viel in de periode 1989-1994. Hiervoor werden de gegevens gebruikt van de door LIS in die periode verrichte kinkhoest-serologische bepalingen.

Aangiften bij Inspectie voor de Gezondheidszorg

Gegevens over aangiften van typische en atypische kinkhoest in de periode 1989-1994 zijn verkregen bij de Inspectie voor de Gezondheidszorg.

2.2 Kwantitatieve IgG en IgA immuno-assays

In de "normaal sera", '*DKTP-Hib-studie-sera*', "*immuunsera*" en overige sera in het serodiagnostiek bestand van LIS waren concentraties van IgG antistoffen tegen gezuiverd pertussis toxine en IgA antistoffen tegen een sonicaat van *Bordetella pertussis* bacteriën gemeten met eerder beschreven ELISA's (4,5), en kwantitatief uitgedrukt in units per milliliter i.e. van ≤ 5 (niet detecteerbaar) tot ≥ 500 (hoger dan de hoogste kwantificeerbare waarde) met daartussen exact kwantitatief uitgedrukte waarden van 5 tot 499 U/ml. Voorts waren aan combinaties van IgG en IgA concentraties in individuele sera hoogtecategoriën toebedeeld (tabel 1: labcodes 1 t/m 10).

Sinds het begin van de toepassing van deze immuno-assays in de serodiagnostiek van kinkhoest is steeds hetzelfde positieve referentie-preparaat gebruikt. Dit immunoglobuline preparaat werd

gewonnen uit reconvalescentie-sera van kweek-positieve kinkhoest-patiënten. Dit preparaat bevat per definitie 100 U/ml IgA en 100 U/ml IgG-antistoffen. De kwaliteit van dit preparaat is in de loop der jaren niet achteruitgegaan: bij ongewijzigde procedure van coating van antigeen aan de microtiter-platen werd met standaard verdunningen van het referentie-preparaat steeds een identieke dose-respons curve verkregen. Kwantitatieve resultaten zijn derhalve van jaar tot jaar vergelijkbaar.

2.3 Analyse

Definiëren van cut-off waarden voor eenpuntsserologie

Voor de leeftijdsgroepen 0, 1-4, 5-9, 10-14, 15-24 en 25-79 jaar voor de "*normaal-sera*" en voor de leeftijdsgroepen 0, 1-4, 5-9, 10-14, 15-24 en ≥ 25 jaar voor de "*immuun-sera*" werd het 2,5, 10, 25, 50 (mediaan), 75, 90 en 97,5 percentiel berekend ten aanzien van de IgG-titer, IgA-titer en IgG/IgA-hoogtecategorieën (labcodes). Voor de "*DKTP-Hib-studie-sera*" werden deze percentielen voor de titerverdeling op de vier tijdstippen van monsternamen berekend. Vervolgens werden leeftijdsspecifieke cut-off waarden van IgG/IgA-hoogtecategorieën (labcodes) geformuleerd volgens de volgende criteria:

- De labcode was groter dan 97,5 percentiel in "*normaal-sera*" en "*DKTP-Hib-studie-sera*" van de betreffende leeftijdscategorie: dat wil zeggen dat bij minder dan 2,5% van de algemene bevolking deze of hogere waarden werden waargenomen.
- De labcode was groter dan of gelijk aan het 10^e percentiel in "*immuun-sera*" van de betreffende leeftijdscategorie; dat wil zeggen bij 90% van de patiënten met een significante titerstijging in gepaarde sera [i.e. met bewezen recente kinkhoest] zijn deze of hogere waarden in het tweede serum waargenomen.

Validatie van cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie

Validatie van de gevonden cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie werd gedaan door:

- Vergelijking met het longitudinale patroon van labcodes in sera van kinkhoest-patiënten tot drie jaar na acute infectie ("*longitudinale sera*"),
- Herevaluatie van de serodiagnostiek gegevens van LIS, 1989-1994, en vergelijking van de patronen (epidemiologische curves) van incidenties per maand van:
 - a. patiënten met positieve eenpuntsserologie (op basis van de gevonden leeftijdsspecifieke cut-off waarden)
 - b. patiënten met positieve tweepuntsserologie (op basis van de klassieke criteria)
 - c. patiënten met negatieve tweepuntsserologie (op basis van de klassieke criteria: lage waarden in beide sera, zonder dynamiek)
 - d. patiënten met kinkhoest, aangegeven bij de Inspectie voor de Gezondheidszorg.

Effect van herinvoering van eenpuntsserologie op de surveillance van kinkhoest.

Herevaluatie van de serodiagnostische gegevens van LBA, 1989-1994, werd uitgevoerd op basis van de gevonden en gevalideerde leeftijdsspecifieke cut-off waarden voor positieve eenpuntsserologie door:

- Vergelijking van het patroon van jaarlijkse incidenties van positieve eenpuntsserologie (1989-1994), met het patroon van aangifte en van positieve tweepuntsserologie.
- Vergelijking van de leeftijdsverdeling van kinkhoest-patiënten volgens aangifte, positieve tweepuntsserologie en positieve eenpuntsserologie (1989-1994).

3. RESULTATEN

3.1 IgG en IgA titers

Het patroon van voorkomen, per leeftijdscategorie, van IgG en IgA antistof-concentraties in "normaal-sera", "DKTP-Hib-studie-sera" en "immuun-sera" zijn weergegeven in de figuren 3 en 4. Figuur 3 laat zien dat de kinderen <1 jaar die deelnamen aan de pilot van het PIENTER-project zelden of nooit detecteerbare IgG en/of IgA antistoffen hadden. De proportie met detecteerbare IgG en/of IgA antistoffen nam wel toe met de leeftijd. Die toename ging, voor IgG, van 3% met detecteerbare antistoffen in de leeftijd <1 jaar, naar 4% (1-4 jaar), naar 21% (5-9 jaar), naar 29% (10-14 jaar), waarna die proportie stabiliseerde. Voor IgA ging de stijging van die proportie van 0% (<1 jaar), naar 12% (1-4 jaar), naar 20% (5-9 jaar), naar 23% (10-14 jaar), naar 44% (15-24 jaar), naar 64% (≥ 25 jaar).

In de "normaal-sera" waren in de proportie met detecteerbare antistoffen de IgG en IgA antistoftiters over het algemeen gering tot matig van hoogte in vergelijking met waarden in "immuun-sera" van patiënten van gelijke leeftijd, welke waarden eveneens in figuur 3 zijn weergegeven.

Ten aanzien van IgG (figuur 3A) was er bij <1 jarigen en 1-4 jarigen geen overlap tussen normaal- en immuunwaarden; bij ≥ 5 jarigen was er wel enige overlap, zij het in geringe mate. In de 'immuun-sera' was de mediaan van de IgG-titers voor alle leeftijden van een vergelijkbaar niveau.

Ten aanzien van IgA in 'normaal sera' en 'immuun sera' laat figuur 3B zien dat de waarden in beide toenamen met de leeftijd en dat er voor elke leeftijdscategorie een geringe tot matige overlap bestond.

In het cohort van 503 jonge kinderen ("DKTP-Hib-studie-sera") bleek 29% van de sera afgenomen op de leeftijd van 3 maanden detecteerbare (>5 U/ml), zij het zeer lage, IgG-antistof niveau's te hebben (figuur 4A). Deze proportie was stabiel tot en met de leeftijd van 11 maanden, i.e. na drie tussentijdse immunisaties met DKTP-Hib of DKTP, maar nam toe, na de re-immunisatie op de leeftijd van 11 maanden, tot 49% op ruim 1-jarige leeftijd. Detecteerbare IgA-antistoffen (>5 U/ml) namen toe van circa 6% op de leeftijd van 3, 6 en 11 mnd, naar 23% op ruim 1-jarige leeftijd.

Bij de deelnemers aan de DKTP-Hib-studie was, zowel ten aanzien van IgG als IgA de spreiding naar hogere waarden op de leeftijd van 13-14 maanden aanzienlijk toegenomen. Van de individuen in dit cohort had 9,1% tijdens de immunisatie periode een, volgens de criteria voor serodiagnostiek van natuurlijke infectie, significante IgG/IgA immuunrespons doorgemaakt (labcode-stijging met 3 of meer punten; 46/503). Bij 8 kinderen (1,6%) was een significante immuunrespons opgetreden tussen afname van het eerste en tweede serum, bij 5 kinderen (1,0%) tussen afname van het tweede en derde serum en bij 33 kinderen (6,5%) tussen afname van het derde en vierde serum. Bij de 457 kinderen zonder tussentijdse immuunrespons was op ieder van de vier tijdstippen de mediaan van IgA en IgG-titers ≤ 5 U/ml.

Vier van de 33 kinderen met immuunrespons na de revaccinatie waren afkomstig uit Apeldoorn, de overige uit de regio Rotterdam (4/103, 3,9% versus 29/400, 7.3%; $P>0.1$). De derde en vierde sera

van de 33 kinderen met late immuunrespons waren vrijwel alle in de periode januari-maart 1994 afgenomen, respectievelijk vlak voor en enkele weken na de vierde DKTP-vaccinatie, met meestal korte tussenpauze van 3 tot 5 weken.

3.2 IgG/IgA-hoogtecategorieën (labcodes)

In tabel 2 en 3 is de leeftijdsspecifieke spreiding van IgG/IgA-hoogtecategorieën (labcodes) weergegeven, in "normaal-sera" versus "immuun-sera" (tabel 2) en in "DKTP-Hib-studie-sera" versus "immuun-sera" (tabel 3). Onder de deelnemers aan de pilot van het PIENTER-project was bij geen van de 22 kinderen <1 jaar de labcode >2, bij 2,2% van de 1-4 jarigen >3, bij 1,5% van de 5-9 jarigen >6, bij 1,3% van de 10-14 jarigen >5, bij 2,2% van de 15-24 jarigen >6, en bij 2,5% van de 25-79 jarigen >6. Onder de 503 deelnemers aan de DKTP-Hib studie was bij circa 2,0% de labcode >3 in de 3 seriële sera t/m de 11e levensmaand. Echter, in het 4e serum van dit cohort was bij 9,8% de labcode >3, bij 5,0% >4, bij 3,0% >5 en bij 2,0% >6.

3.3 Vaststelling van de cut-off waarden voor eenpuntsserologie

In tabel 4 zijn de gegevens samengevat op basis waarvan vastgesteld kan worden welke de leeftijdsspecifieke cut-off waarden zijn voor positiviteit van eenpuntsserologie. Voor de leeftijdsgroep 0-4 jaar zijn de gegevens van het vierde serum van het DKTP-Hib cohort (afgenomen op de leeftijd van 13 maanden) niet meegewogen. Volgens de definitie gegeven in paragraaf 2.3 zou de cut-off waarden voor kinderen van circa 13 maanden die recent zijn gevaccineerd ≥ 7 bedragen. Indien een cut-off van labcode ≥ 5 wordt gebruikt betekent dit dat het percentage fout-positieve uitslagen niet < 2,5% maar < 5% is. In de discussie zijn de consequenties en de overwegingen om voor deze leeftijdsgroep (circa 13 maanden) dezelfde cut-off waarde te gebruiken als voor de overige 0-4 jarigen, beschreven.

De zo berekende leeftijdsspecifieke cut-off waarden voor de leeftijdscategorieën 0-4 jaar (labcodes ≥ 5), 5-14 jaar (labcodes ≥ 7) en ≥ 15 jaar (labcodes ≥ 8) zijn eveneens weergegeven in tabel 4.

3.4 Validatie van de cut-off door vergelijking met longitudinaal patroon van IgG/IgA-concentraties na natuurlijke infectie

Het beloop van IgG en IgA waarden en van IgG/IgA-hoogtecategorieën in de maanden en jaren na natuurlijke infectie met *B.pertussis* ("longitudinale sera") is weergegeven in de figuren 5A (IgG), 5B (IgA) en figuur 6 (IgG/IgA hoogtecategorieën). Op het hoogtepunt van de immuunrespons waren alle IgG waarden > 128 U/ml, terwijl meer dan een half jaar later alle waarden significant gedaald waren (i.e. ≥ 4 -voudig) tot < 128 U/ml, en, in de twee individuen van wie zeer late sera beschikbaar waren, tot <32 U/ml na 2 à 3 jaar. De dynamiek van daling was voor de IgA parameter eveneens aanwezig doch duidelijk minder uitgesproken. In slechts 3 van de 10 patiënten was de daling na meer dan een half jaar significant (> 4 -voudig).

Zoals getoond in figuur 6 hadden alle patiënten in de acute fase van infectie IgG/IgA-waarden van labcode 8 of hoger. In de periode daarna was er in alle gevallen sprake van een aanzienlijke daling van de labcode; in 9 van de 10 gevallen was de labcode-daling ≥ 3 punten. Zes maanden of langer na acute infectie was de labcode in 8 van de 10 gevallen ≤ 5 (5 is de laagste leeftijdsspecifieke cut-off waarde, i.e. voor 0-4-jarigen; zie tabel 4). Twaalf maanden of langer na acute infectie was de labcode in 4 van de 5 gevallen ≤ 5 , en 2 jaar en langer na natuurlijke infectie was de labcode in 2 van 2 gevallen ≤ 4 .

3.5 De epidemiologische validatie van de vastgestelde cut-off waarden (labcodes) voor positiviteit van eenpuntsserologie

In figuur 7 is de incidentie per maand (1989-1994) weergegeven van aangifte van kinkhoest (gecorrigeerd naar eerste ziektedag), van positieve tweepuntsserologie volgens klassieke criteria, van positieve eenpunts-serologie (exclusief positieve tweepuntsserologie) op basis van bovenstaande cut-off waarden voor labcodes, en van negatieve (tweepunts)serologie volgens klassieke criteria. De jaarlijkse seizoenspiek van "klassiek positieve" serologie en aangifte (augustus) valt precies samen met de seizoenspiek van positieve eenpuntsserologie, terwijl de negatieve serologie steeds een iets latere en veel minder uitgesproken piek kent.

3.6 Het effect van de nieuwe interpretatie van eenpuntsserologie op de surveillance van kinkhoest, 1989-1994

In figuur 8 is de incidentie per jaar weergegeven van aangiften voor kinkhoest, van positieve tweepuntsserologie en van positieve eenpuntsserologie. Men moet zich hier realiseren dat (zoals aangegeven in de figuur) er enige overlap is tussen patiënten met positieve tweepuntsserologie en positieve eenpuntsserologie, omdat een deel van de patiënten met significante titerstijging in gepaarde sera in hun eerste serum reeds IgG/IgA-waarden hadden boven de leeftijdsspecifieke cut-off: in 1989 38 van 350 patiënten (11%), in 1990 24/278 (9%), in 1991 17/110 (15%), in 1992 26/238 (11%), in 1993 62/482 (13%) en in 1994 82/498 (16%). De incidenties van positieve eenpuntsserologie zijn aanzienlijk hoger dan die van positieve tweepuntsserologie en aangifte, maar het "waning-waxing" patroon in de periode 1989-1994 is voor ieder der parameters identiek.

Figuur 9 laat zien dat de leeftijdverdeling van patiënten met positieve eenpuntsserologie duidelijk verschillend is van die met positieve tweepuntsserologie of die van aangegeven patiënten. Het proportionele verschil neemt toe met de leeftijd: voor < 1 -jarigen is de gemiddelde jaarlijkse incidentie van positieve eenpuntsserologie vrijwel gelijk aan (1,04-maal) die van positieve tweepuntsserologie; voor 1-4 jarigen is de incidentie van positieve eenpuntsserologie 3,7-maal hoger, voor 5-9 jarigen 4,7- voor 10-14 jarigen 6,5-, voor 15-19 jarigen 11,8- en voor > 20 -jarigen 15,8-maal.

4. DISCUSSIE

4.1 Cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie

De analyse van IgG antistoffen tegen pertussis toxine en IgA antistoffen tegen *B.pertussis* in sera van gezonde individuen, in kinder-sera afgenomen vóór, tijdens, en na vaccinatie met DKTP-Hib, en in sera van kinkhoest-patiënten laat zien dat, ondanks enige overlap, normaalwaarden over het algemeen lager zijn dan immuunwaarden. "Rest-titers" worden met het toenemen van de leeftijd frequenter in de populatie gevonden, maar zijn lager dan immuunwaarden direct na een natuurlijke infectie. Dit werd bevestigd in analyse van seriële sera van tien patiënten, afgenomen tot drie jaar na natuurlijke infectie. Immuunwaarden persisteren slechts enkele maanden tot circa één jaar. Meting van immuunwaarden in een eerste serum van een patiënt met hoestklachten ondersteunt derhalve de diagnose actuele of recente "infectie met *B.pertussis*" of "kinkhoest" in sterke mate.

Echter, onverminderd blijft van kracht dat alleen het aantonen van een titerstijging de meeste zekerheid biedt over het aktueel of zeer recent zijn van de infectie. Theoretisch is het immers mogelijk dat immuunwaarden reeds vóór het ontstaan van het aktuele pertussis-achtige ziektebeeld aanwezig waren door een in de maanden daarvoor opgetreden natuurlijke infectie met *B.pertussis* en dat het aktuele ziektebeeld door een ander pathogeen is veroorzaakt. De arts die zich bij de diagnose kinkhoest op eenpuntsserologie baseert moet daarmee rekening houden.

Bovendien is het opmerkelijk dat bij 9,1% van de in deze studie geëvalueerde deelnemers aan de DKTP-Hib studie in de loop van het eerste levensjaar een significante IgA/IgG immuunrespons werd gevonden. Deze immuunrespons trad in 33 van de 46 gevallen op tussen het tijdstip van de vierde DKTP-Hib immunisatie op de leeftijd van 11 maanden en de laatste serumafname op de leeftijd van circa 13 maanden. Deze sera waren vrijwel alle in de periode januari-maart 1994 afgenomen, vlak voor en enkele weken na de revaccinatie, met meestal korte tussenpauze van 3 tot 5 weken. Deze tijdsrelatie suggereert dat de re-vaccinatie die titerstijgingen heeft veroorzaakt.

Echter, bij de grote meerderheid ontbrak zo'n reactie. In de pilot voor het Pienter-project werden bij de 22 nuljarigen geen verhoogde titers gevonden (vergelijk met figuur 3A/B). Het kleine aantal nuljarigen in de pilot voor het Pienter-project in vergelijking met het aantal (503) in de DKTP-Hib studie maakt het waarschijnlijk dat dergelijke hoge titers per toeval niet gevonden zijn in de nuljarigen uit de pilot voor het Pienter-project. Het is mogelijk dat de kinderen met een significante immuunrespons na de vierde re-immunisatie wellicht geprimed waren voor zo'n reactie (bijvoorbeeld door een te voren doorgemaakte natuurlijke infectie). Het is niet bekend of de betreffende individuen in de periode van IgG/IgA responsen ook kinkhoestachtige klachten hebben gehad; dit lijkt gezien de aard van andere ziekteverschijnselen die spontaan door ouders van deelnemers werden gemeld echter niet waarschijnlijk. De DKTP-Hib-sera werden verzameld in mei 1993 t/m april 1994, in welke jaren de incidentie van kinkhoest relatief hoog was (epidemische jaren) (10). Deze periode viel echter niet samen met de seizoenspiek die elk jaar in juli-sep optreedt.

Een hoge seroconversie-frequentie t.a.v. *B. pertussis* in het eerste levensjaar is in ongevacceerde populaties normaal. In Italië had 30% van de niet-gevaccineerde kinderen op de leeftijd van 1 jaar verhoogde (c.q. aantoonbare) IgG antistof-titers tegen pertussis toxine en in 90% van die gevallen herinnerden de ouders zich dat hun kind in het eerste levensjaar een periode van typisch (!) hoesten had doorgemaakt (12). De ouders van IgG-negatieve 1-jarigen hadden zo'n herinnering niet. In recente trials met acellulaire vaccins in Italië werd in de niet tegen kinkhoest gevaccineerde controle groep een frequentie van laboratorium-bevestigde klinisch typische kinkhoest (WHO-criterium: >30 dagen paroxysmaal hoesten, bevestigd met positieve kweek en/of positieve tweepuntsserologie) van 5,2% gevonden (15).

In ieder geval verdient het aanbeveling om bij toekomstige post-marketing studies van het effect van acellulaire kinkhoest-vaccins bij de deelnemende kinderen (ook) na te gaan welk type ziekte-episodes zij tussentijds doormaken. Alleen op die manier kan een meer zekere interpretatie van de betekenis van significante seroconversies bereikt worden. In de DKTP-Hib studie was het niet de bedoeling dergelijke gegevens betrouwbaar te verzamelen.

Men kan er van uitgaan dat de kort na de revaccinatie gevonden hoge waarden slechts korte tijd hebben gepersisteerd. Daarom: indien bij patiënten met hoestklachten die op de leeftijd van 11 maanden de 4e immunisatie hebben gehad en die ten tijde van diagnostiek 12 tot 16 maanden oud zijn, een IgG/IgA-waarde (labcode) van ≥ 5 wordt gevonden, is de kans op fout-positiviteit < 5%. In alle andere gevallen van eenpuntsserologie met waarden boven de berekende cut-off waarden is die kans < 2.5%. Derhalve is er voor gekozen voor deze leeftijdsgroep geen aparte cut-off waarde te gebruiken. Wel wordt gezien de bevinding in de DKTP-Hib studie aanbevolen voor kinderen van 0-2 jaar met kinkhoest-achtige klachten bij een labcode van 5 of 6 aan de arts te rapporteren dat de patiënt op grond van serodiagnostiek verdacht wordt van kinkhoest, maar dat het inzenden van een tweede serummonster geadviseerd wordt voor het verkrijgen van meer zekerheid. Voor patiënten ≥ 2 jaar met labcode in het eerste serummonster boven de cut-off wordt de conclusie "hoge waarden, passend bij actuele of recente infectie met *B. pertussis*" afgegeven en zal niet routinematig om een tweede serummonster worden gevraagd.

De juistheid van de cut-off waarde dient mede gezien de bevindingen van de DKTP-Hib-studie regelmatig gecontroleerd te worden aan de hand van populatie-onderzoek. Hierbij is het van belang dat een differentiatie naar leeftijd onder nuljarigen wordt gemaakt. Dit was voor de pilot voor het PIENTER-project niet mogelijk door de kleine aantallen. Momenteel wordt een grootschalig landelijk onderzoek van het PIENTER-project uitgevoerd waardoor in 1997 de cut-off waarden gevalideerd of aangepast kunnen worden.

4.2 Epidemiologische validatie

Toepassing van de hier gevonden cut-off waarden voor positieve eenpuntsserologie bij een heranalyse van de serodiagnostische gegevens van LBA van 1989-1994 liet zien dat de seizoenspiek van positieve eenpuntsserologie ieder jaar exact samenviel met de seizoenspiek van positieve tweepuntsserologie en van de aangifte (figuur 7). Deze congruentie van curves is een

sterk argument voor de juistheid van de gekozen cut-off waarden voor positieve eenpuntsserologie. Ook het "waning-waxing" patroon van de jaarlijkse incidentie van kinkhoest over die periode was kwalitatief identiek.

4.3 Incidentie kinkhoest op basis van eenpuntsserologie

Positieve eenpuntsserologie leverde gemiddeld 4,5 keer meer gevallen op dan positieve tweepuntsserologie of aangifte. Echter, die meeropbrengst was leeftijdsafhankelijk (1.0x bij kinderen <1 jaar, 15.8x bij twintigplussers). Dat eenpuntsserologie proportioneel vaker positief is bij ouderen dan bij jongeren is juist als argument gebruikt voor het mogelijk fout-positief zijn van eenpuntsserologie (8). Uit de analyse onder deelnemers aan de pilot voor het PIENTER-project blijkt echter dat vergeleken met titers in "*immuunsera*" hoge titers ("immuunwaarden") in de bevolking nauwelijks voorkomen. Dit suggereert dat het aantal fout-positieve bevindingen op grond van eenpuntsserologie belangrijk kleiner is dan werd aangenomen bij de introductie van tweepuntsserologie. Voor het verschil in leeftijdsverdeling zijn diverse verklaringen mogelijk.

In een recent klinisch onderzoek naar de waarde van PCR voor diagnostiek van kinkhoest hebben wij kunnen vaststellen dat de snelheid van de IgA en IgG immuunrespons en de intensiteit van de IgA respons door natuurlijke infectie leeftijdsafhankelijk is (2). Het is duidelijk dat het vermogen om na natuurlijke infectie met *B.pertussis* een (specifieke) IgA respons te genereren op zeer jonge leeftijd zeer beperkt is en vaak zelfs volledig ontbreekt, en dat dat vermogen "rijpt" met toename van de leeftijd en pas optimaal is vanaf de leeftijd van circa 5 jaar. Kinderen jonger dan vijf jaar, en vooral kinderen jonger dan één jaar, hebben vaak een deficiënte en trage IgA respons en ook een tragere maar uiteindelijk volledige IgG-respons. In relatie daarmee is bij hen de bacterie ook langer aantoonbaar, c.q. wordt minder snel geëradiceerd (2). Bovendien konden wij in die studie vaststellen dat bij oudere kinderen over het algemeen later in het ziektebeloop laboratorium-diagnostiek wordt geïnitieerd dan bij jongere kinderen; hierdoor zouden bij jongere kinderen de titers nog niet op het hoogtepunt zijn. Ook zou men kunnen vermoeden dat de arts bij oudere individuen pas relatief laat op het idee komt dat kinkhoest in het spel is. Maar ook zal wellicht een rol spelen dat op jonge leeftijd vaker de ernst van de symptomen op de voorgrond staat (en aanleiding geeft tot relatief vroege diagnostiek) terwijl bij ouderen vaker de chroniciteit van de hoestklachten de reden is om uiteindelijk de arts te bezoeken.

In figuur 10 is de jaarlijkse incidentie van kinkhoest volgens de aangifte weergegeven sinds 1977. Na de verandering in aangiftencriteria in 1987-1988 is de geschatte incidentie enorm en acuut gedaald. In figuur 10 is ook de jaarlijkse incidentie van positieve serologie sinds 1989 aangegeven: positieve eenpuntsserologie en positieve tweepuntsserologie bij elkaar geteld. De geschatte incidenties op basis van positieve serologie benaderen de als grotendeels fout-positief beschouwde aangifte-incidenties van 1986 en 1987. De gestage toename van de aangifte-incidentie tussen 1982 en 1987 moet achteraf verklaard worden door 1. een ware toename van de kinkhoest-incidentie, 2. het beschikbaar komen (in 1981 en 1984) van de IgA en IgG immuno-assays, waardoor de

gevoeligheid van de kinkhoest-diagnostiek (i.v.m. alleen kweek) sterk is toegenomen, 3. verspreiding van de kennis over de beschikbaarheid van die immuno-assays, waardoor gestage toename van serologische inzendingen, 4. te ruime interpretatie van eenpuntsserologie (fout-positieve aangifte). De hypothese dat fout-positieve aangifte een rol speelde blijft intact omdat in de periode vóór 1988 ook bij waarden beneden de nu berekende cut-off de interpretatie "mogelijk" of "waarschijnlijk" of "zeer waarschijnlijk kinkhoest" werd gegeven (tabel 1; labcodes 2, 3 en 4). Achteraf lijkt het erop dat de proportionele bijdrage van fout-positieve aangifte aanzienlijk lager was dan rond 1987 werd ingeschat.

4.4 Consequenties van toepassing van eenpuntsserologie

Indien de hier gepresenteerde cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie gebruikt gaan worden heeft dit consequenties voor de continuïteit van surveillance. In de serologische lab-surveillance is het mogelijk een onderscheid te maken tussen de categorieën "positief op grond van titerstijging in gepaarde sera" en "positief op grond van hoge waarde in het eerste c.q. een enkel serum". Echter de positieve tweepuntsserologie zal 10-15% lager zijn aangezien deze proportie reeds positief is op grond van de nieuwe cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie. Van deze patiënten zal bij gebruik van eenpuntsserologie geen tweede serummonster worden verkregen. Door retrospectieve toepassing van de nieuwe cut-off waarden is vergelijking van de trend over de jaren (vanaf 1989) op grond van serodiagnostiek mogelijk. Echter in de aangiften zal door toepassing van de nieuwe cut-off waarden een verandering optreden. Indien de huidige aangiftencriteria van kracht blijven zal het aantal aangiften relatief lager zijn doordat het percentage positieve tweepuntsserologie 10-15% lager zal zijn. Indien de aangiftencriteria worden aangepast zal eveneens de incidentie op basis van aangiften veranderen. Ook patiënten die positief zijn op grond van eenpuntsserologie zullen worden aangegeven waardoor de incidentie toeneemt. Derhalve verdient het aanbeveling in de aangiften te registreren op grond van welk laboratoriumcriterium aangifte is gedaan.

Toepassing van eenpuntsserologie heeft belangrijke voordelen. Bij gebruik van de gevonden cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie kan bij een groter deel van de patiënten een conclusieve uitslag worden gegeven en is het inzenden van een tweede serummonster niet meer voor alle patiënten noodzakelijk. Door toepassing van de nieuwe criteria wordt waarschijnlijk ook een beter inzicht gekregen in de werkelijke incidentie van kinkhoest. Voor adequaat outbreakmanagement is toepassing van de snellere eenpuntsserologie zeer waardevol. Bij een groter deel van de kinkhoestpatiënten en in een vroeger stadium kunnen preventieve maatregelen voor bescherming van de kwetsbare nauwe contacten worden genomen.

Aangezien de aantallen in de pilot voor het PIENTER-project beperkt zijn, verdient het aanbeveling de gevonden cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie te valideren aan de hand van de resultaten die in 1997 beschikbaar komen uit het landelijke onderzoek naar de immuunstatus van de algemene Nederlandse bevolking.

Tevens zal op korte termijn een nadere analyse uitgevoerd worden van de gegevens van deze studie om te onderzoeken of cut-off waarden geformuleerd zouden kunnen worden voor separaat de IgG-titer en de IgA-titer. Op die manier zouden internationale vergelijkingen mogelijk worden van antistofpatronen in de bevolking en bij patiënten, met name ten aanzien van IgG tegen pertussis toxine, welke internationaal de meest toegepaste immuno-assay is.

5. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

- Het bleek mogelijk hoogten van IgG/IgA concentraties (labcodes) te definiëren die kenmerkend zijn voor de acute immuunrespons door natuurlijke *B.pertussis* infectie en die niet of nauwelijks (<2.5%) voorkomen in gezonde individuen van gelijke leeftijd.
- De patronen van voorkomen van kinkhoest in de tijd zoals bepaald op basis van aangifte, op basis van positieve serologie volgens klassieke criteria (titerstijging in gepaarde sera) en op basis van waarden in een eerste serum die hoger waren dan de in deze studie bepaalde cut-off waarde, leverden kwalitatief identieke, zij het kwantitatief verschillende, curves op met piek-incidenties in de nazomer maanden juli, augustus en september, hetgeen aangeeft dat positieve eenpuntsserologie werkelijk gassocieerd is met actuele kinkhoest.
- Wanneer in een eerste serum van een patiënt ouder dan 2 jaar met klachten verdacht voor kinkhoest waarden hoger dan of gelijk aan de cut-off waarden gevonden worden, kan de klinische diagnose als laboratorium-bevestigd beschouwd worden en is onderzoek van een tweede serum niet noodzakelijk. Voor patiënten van 0-2 jaar met kinkhoest waarden gelijk aan of hoger dan de cut-off wordt de diagnose 'actuele of recente infectie met *B. pertussis*' zeer waarschijnlijk geacht, maar wordt bij labcodes 5 of 6 in het eerste serum voor definitieve bevestiging van de serologische diagnose om een tweede serummonster gevraagd.
- Het criterium 'laboratorium-bevestigd' zou in de casus-definitie voor aangifte van kinkhoest aangepast moeten worden aan de bevindingen in deze studie.
- Retrospectieve toepassing van het verruimde serologische criterium over de periode 1989-1994 resulteerde in 4,5 maal meer patiënten met laboratorium-bevestigde kinkhoest en een hogere proportionele bijdrage van oudere kinderen aan de incidentie van kinkhoest dan vastgesteld volgens klassieke serologische criteria of volgens aangifte.
- De continuïteit van de surveillance van kinkhoest (sinds 1989) op grond van laboratoriums Surveillance kan redelijk gehandhaafd blijven doordat retrospectieve toepassing van de gevonden cut-off waarden voor positiviteit van eenpuntsserologie mogelijk is. Echter in de aangiften zal door toepassing van de nieuwe cut-off waarden een verandering optreden. Indien de huidige aangiftecriteria van kracht blijven zal het aantal aangiften 10-15% lager zijn doordat voor een deel van de patiënten op grond van eenpuntsserologie positief zijn, geen tweede serummonster wordt ingezonden en derhalve geen titerstijging meer zal worden aangetoond. Indien de aangiftencriteria worden aangepast zal eveneens de geschatte incidentie op basis van aangiften veranderen. Ook patiënten die positief zijn op grond van eenpuntsserologie zullen worden aangegeven waardoor de aangifte-incidentie sterk zal toenemen (ca 4,5 voudig).
- Door toepassing van eenpuntsserologie kan voor een groter deel van de kinkhoestpatiënten en in een vroeger stadium preventieve maatregelen ter bescherming van kwetsbare nauwe contacten worden genomen.
- De hier gevonden leeftijdsspecifieke cut-off waarden moeten regelmatig gevalideerd worden door populatieonderzoek en vaccinatiestudies.
- Onderzocht zou moeten worden of cut-off waarden gebaseerd op separaat de IgG-titer en de IgA-titer geformuleerd kunnen worden.

LITERATUUR

1. Circulaire Geneeskundige Hoofdinspectie/INFZ 162859 dd. 18 december 1987.
2. Zee A van der, Agterberg C, Peeters MF, Mooi F, Schellekens JFP. A clinical validation of *B.(para)pertussis* PCR: comparison with culture and serology using samples of patients suspected for whooping cough from a highly immunized population. J Infect Dis 1996 accepted for publication.
3. Inspectie voor de Gezondheidszorg. Protocolen Infectieziekten, Rijswijk 1995.
4. Nagel J, Poot-Scholtens EJ. Serum IgA antibody to *Bordetella pertussis* as an indicator of infection. J Med Microbiol 1983; 16: 417-26.
5. Nagel J, Graaf de S, Schijf-Evers D. Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels. Develop Biol Standard 1985; 61: 325-30.
6. Nagel J, Poot-Scholtens L, Conyn-van Spaendonck MAE, Noorle Jansen van LM, Hannik ChA, Ruitenber EJ. Onderzoek naar de immuunstatus ten opzichte van kinkhoest met behulp van ELISA in 1980 (peilstations). RIVM-rapport nr. 927901005. Bilthoven, 1983.
7. Nagel J, Graaf de S, Schijf-Evers D. Onderzoek naar de immuunstatus t.a.v. kinkhoest bij 1-12 jaar oude kinderen. RIVM-rapport nr. 448303001. Bilthoven, 1985.
8. Nagel J, Angulo-Laurent MS, Graaf de S, Rümke HC. Onderzoek naar het effect van kinkhoestvaccinatie met twee DKTP-vaccins met verschillende concentraties van de kinkhoestcomponent. RIVM-rapport nr.448471001. Bilthoven, 1988.
9. Water van de HPA. Kinkhoestaangiften in Nederland in de periode 1976-1986 en de noodzaak van een uniforme ziekte-definitie. Ned Tijdschr Geneesk 1988; 132(18):821-8
10. Melker de HE, Schellekens JFP, Boshuis HGL, Conyn-van Spaendonck MAE. Kinkhoest surveillance 1989-1993: de mogelijke rol van serodiagnostiek. RIVM-rapport No 128507001, augustus 1994.
11. Melker de HE, Conyn-van Spaendonck MAE, Rümke HC, Sprenger MJW, Schellekens JFP. Kinkhoest in Nederland, 1989-1994. Ned Tijdschr Geneesk 1995; 139: 1280-86

12. Melker de HE, Conyn-van Spaendonck MAE, Schellekens JFP. Kinkhoest surveillance 1989-1994. RIVM-rapport No 128507002, november 1995.
13. Melker de HE, van der Peet TE, Berbers WAM, van de Akker R, van Knapen F, Schellekens JFP, Conyn van Spaendonck MAE. Pilot-onderzoek voor het PIENTER-project. Seroprevalenties voor bof, mazelen, rubella, kinkhoest, hepatitis A, Toxoplasma gondii, Toxocara en T.spiralis. RIVM-rapport no 213675004, december 1995.
14. Labadie J, Sundermann LC, Rümke HC and the DTP-IPV~Hib vaccine study group. Multi-center study on the simultaneous administration of DTP-IPV and Hib PRP-T vaccines. Part 1. Immunogenicity. RIVM-report No 124001003, april 1996.
15. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P et al. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. N Engl J Med 1996; 334: 341-8.

Tabel 3. Procentueel voorkomen van IgG/IgA hoogtecategoriën (labcodes) in "DKTP-Hib-studie-sera" serieel afgenomen sera van kinderen voor, tijdens en na DKTP-vaccinatie en het procentuele voorkomen van labcodes in "immuun-sera" (het tweede serummonster van patiënten met een significante titerrstijging in gepaarde sera) (% in DKTP-Hib-studie-sera / % in immuunsera)

	t=1*		t=2*		t=3*		t=4*	
N	503	/ 206	503	/ 130	503	/ 94	503	/ 86
labcode								
≥ 10	0	/ 0,5	0	/ 1,5	0	/ 3,2	0	/ 9,3
9	0	/ 4,4	0	/ 3,1	0	/ 18,1	0,2	/ 8,6
8	0	/ 15,0	0,2	/ 21,5	0,6	/ 28,7	1,0	/ 23,3
7	0	/ 13,6	0,4	/ 26,2	0,4	/ 18,1	0,8	/ 17,4
6	0	/ 44,7	0	/ 30,8	0,4	/ 18,1	1,0	/ 16,3
5	0,4	/ 13,6	0,4	/ 8,5	0	/ 9,6	2,0	/ 9,3
4	1,8	/ 8,3	1,6	/ 8,5	0,2	/ 4,3	4,8	/ 5,8
3	3,0	/ 0	4,2	/ 0	2,8	/ 0	10,1	/ 0
2	5,8	/ 0	11,3	/ 0	6,4	/ 0	18,1	/ 0
1	89,1	/ 0	81,9	/ 0	89,3	/ 0	62,0	/ 0
totaal	100	/ 100	100	/ 100	100	/ 100	100	/ 100

* t=1: leeftijd circa 3 maanden

t=2: leeftijd circa 6 maanden

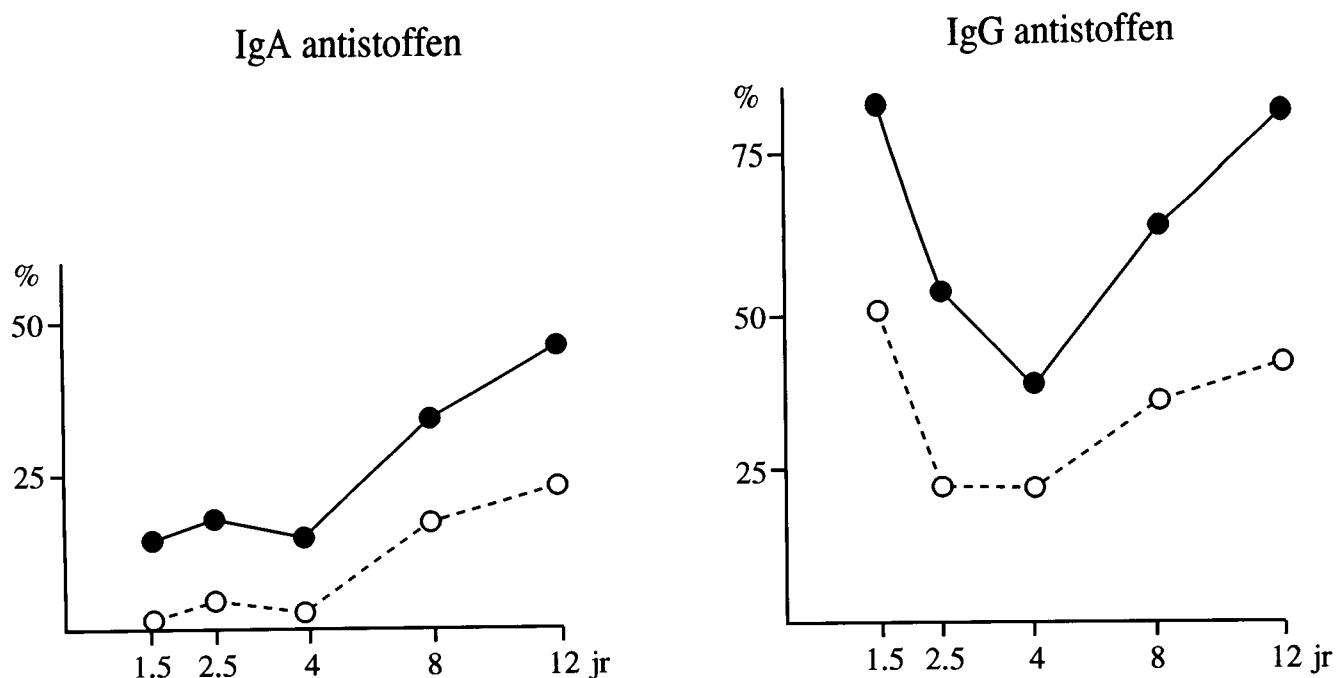
t=3: leeftijd circa 11 maanden

t=4: leeftijd circa 13 maanden

Tabel 4. Vaststelling van de leeftijdsspecifieke cut-off voor hoogte-categoriën van IgG/IgA combinaties (labcodes) die kenmerkend zijn voor akuele of recente kinkhoest

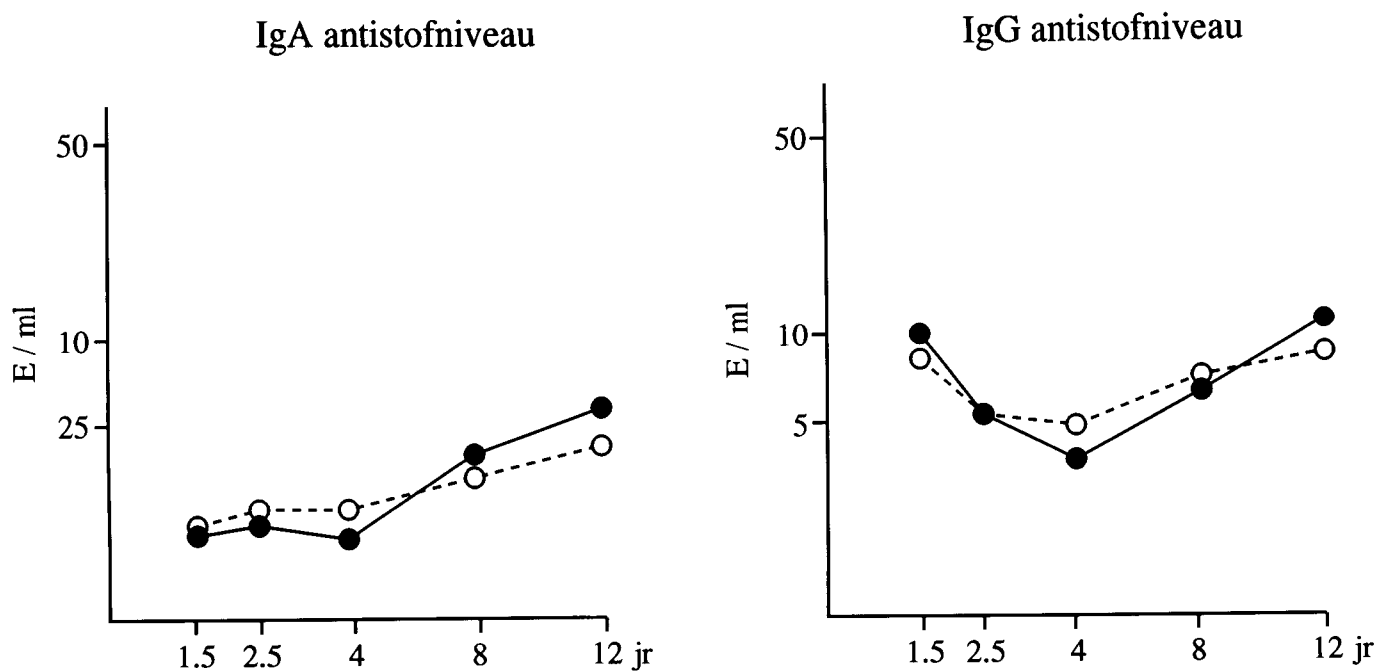
Leeftijdsgroep	(aantal "normaal" of "DKTP"-sera / aantal "immuun sera")	97,5 percentiel in "normaal" of "DKTP-Hib-studie-sera"	10 percentiel in "immuun sera"	Cut-off
<i>"DKTP-Hib-studie-sera" versus "immuun sera"</i>				
± 3 maanden	503 / 206	3	5	≥ 5
± 6 maanden	503 / 130	4	5	≥ 5
± 11 maanden	503 / 94	3	5	≥ 5
± 13 maanden	503 / 86	6*	5	≥ 7*
<i>"Normaal-sera" versus "immuun sera"</i>				
0 jaar	22 / 431	1	5	≥ 5
1-4 jaar	32 / 415	3	5	≥ 5
5-9 jaar	66 / 484	6	6	≥ 7
10-14 jaar	57 / 163	5	6	≥ 7
15-24 jaar	84 / 21	6	8	≥ 8
≥ 25 jaar	538 / 76	6	7	≥ 8

* Niet meegewogen in vaststelling van de cut-off waarden (zie tekst)



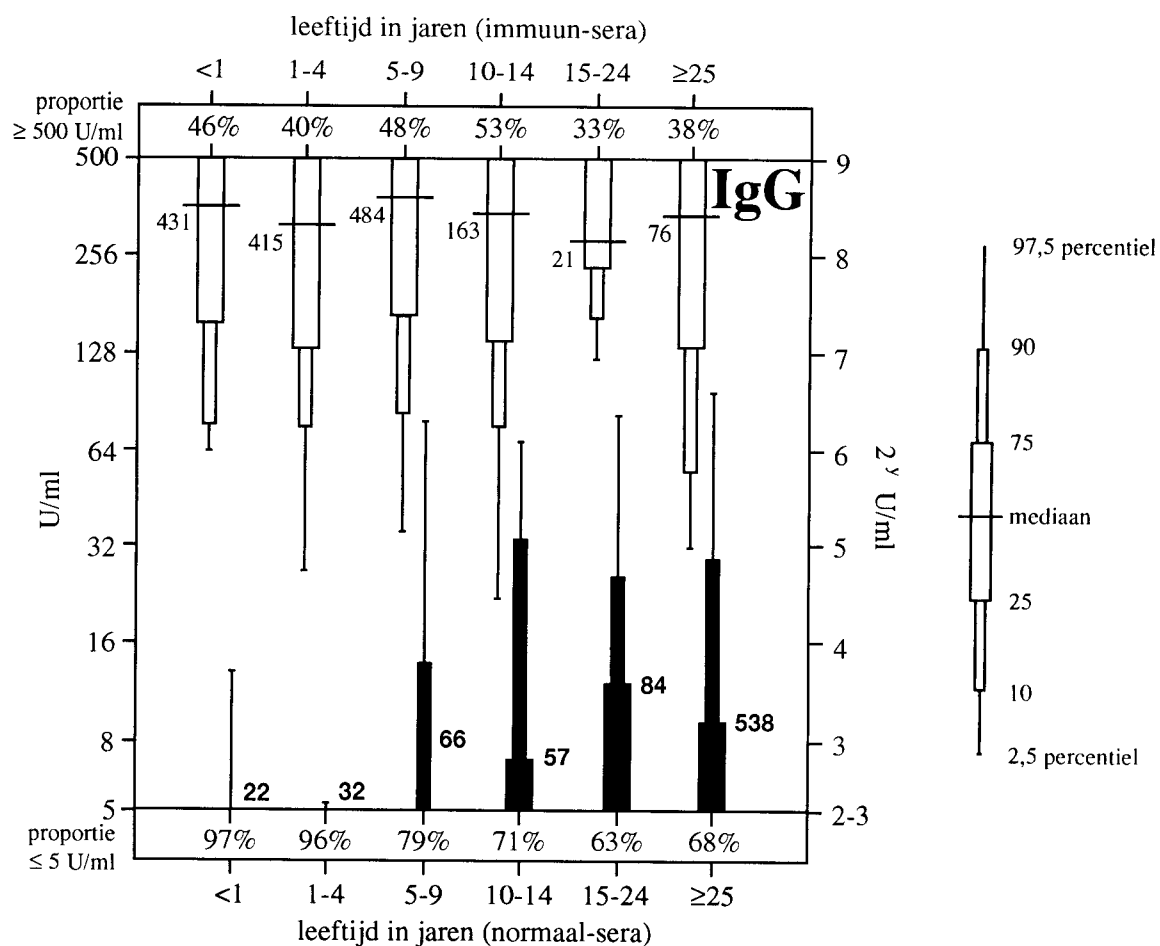
Figuur 1*. Percentages van sera van kinderen van verschillende leeftijden (n=548) met antistofniveaus van ≥ 5 (●) of ≥ 10 U/ml (○)

* Uit: RIVM-rapport nr. 4480303001, Bilthoven 1985 (ref. 7)

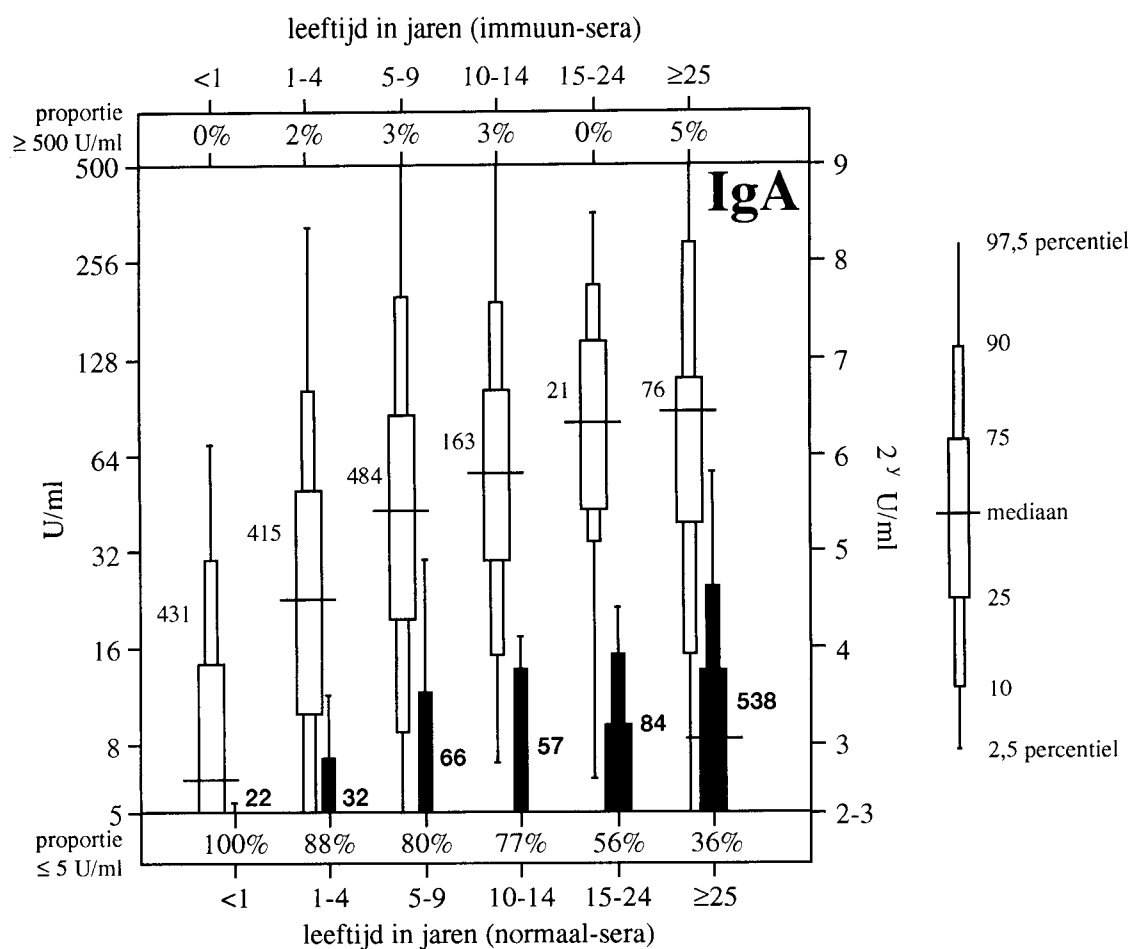


Figuur 2*. Geometrisch gemiddelde antistofniveaus bij jongens (●) en meisjes (○) van verschillende leeftijden (n=548).

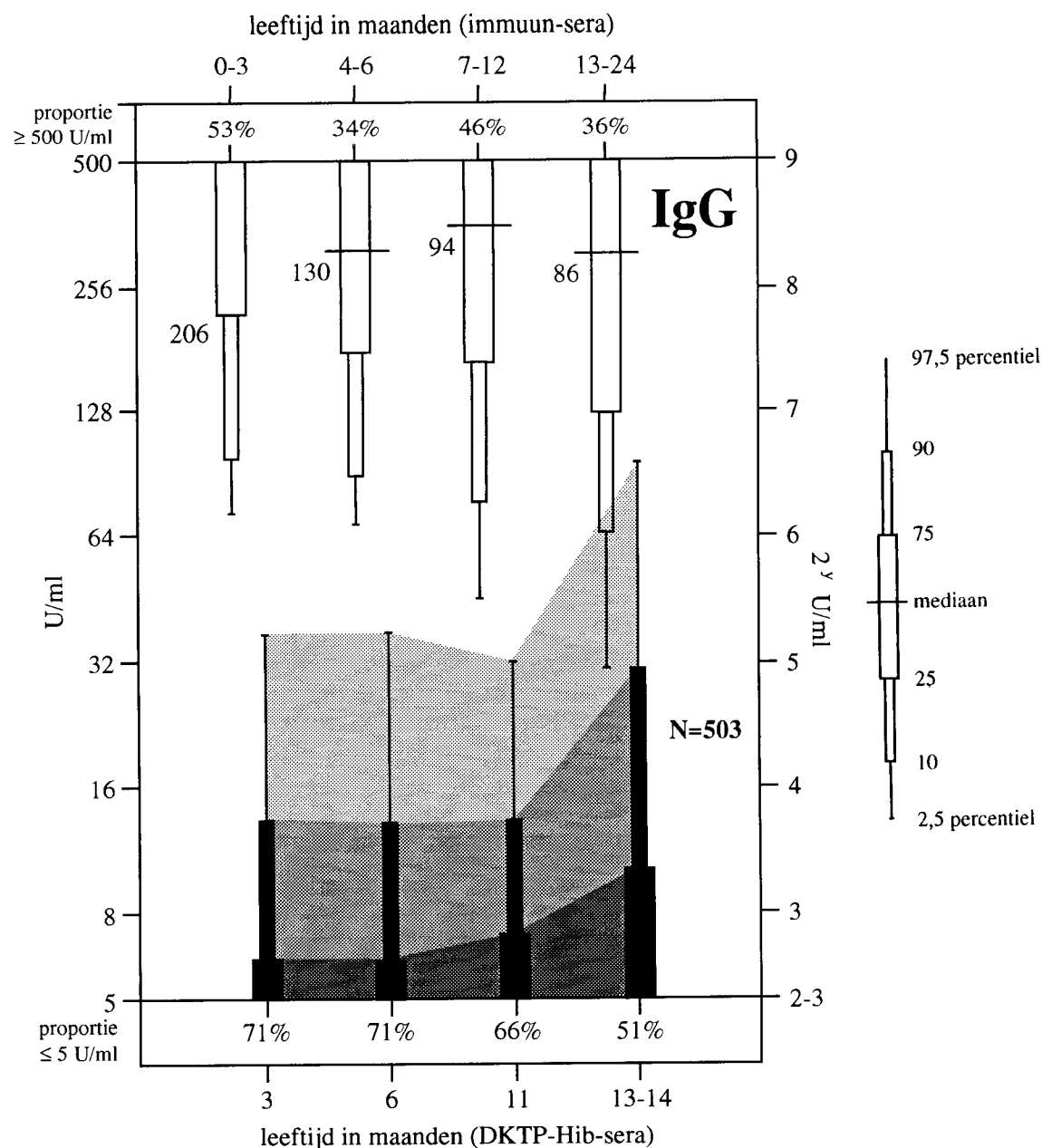
* Uit: RIVM-rapport nr. 4480303001, Bilthoven 1985 (ref. 7)



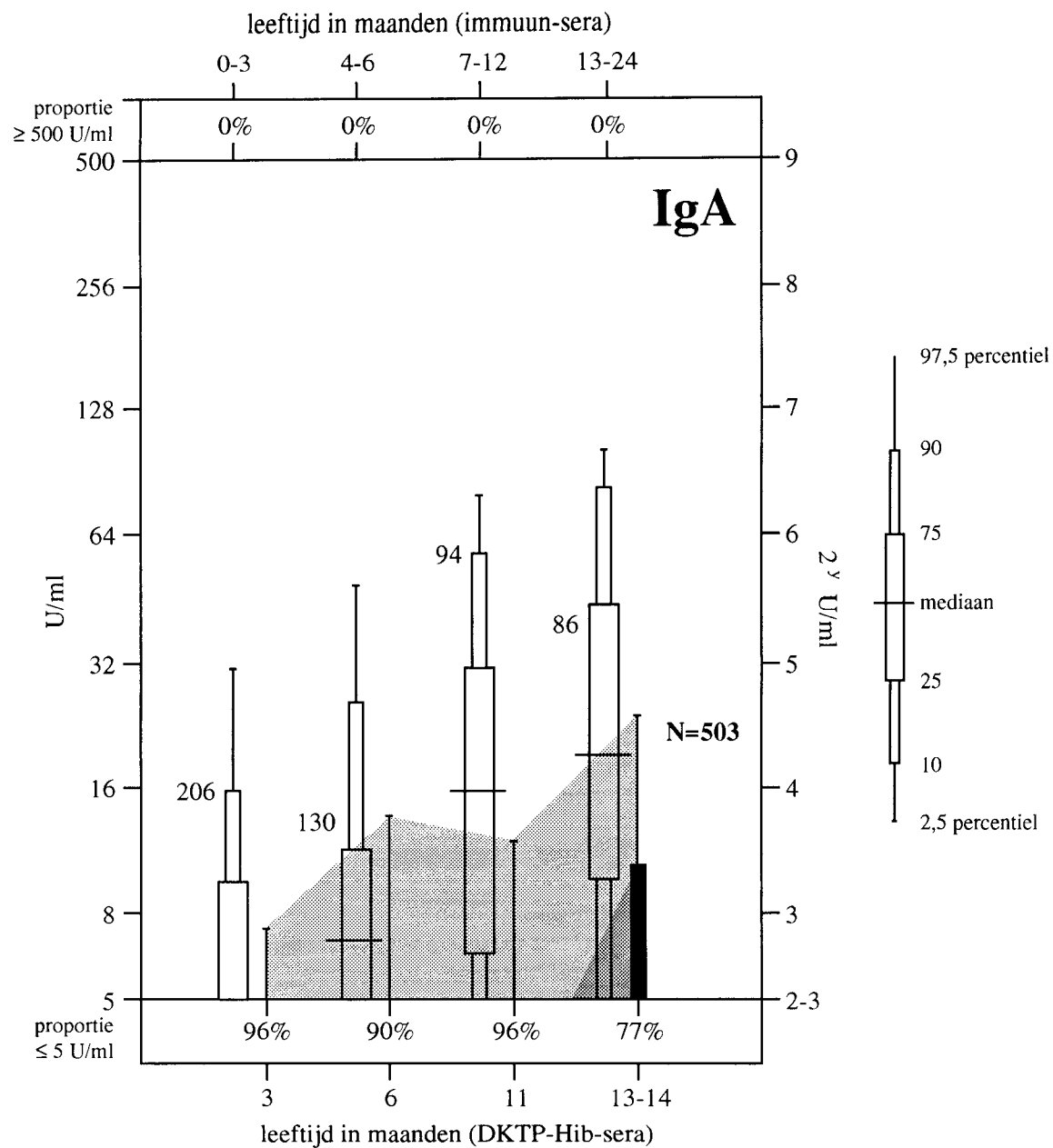
Figuur 3A. Leeftijdsafhankelijke spreiding van IgG tegen pertussis toxine in "*normaal-sera*" (van deelnemers aan de pilot van het PIENTER-project; N=799) en in "*immuun-sera*" (reconvalescentie-sera van patiënten met recente kinkhoest; N=1590).



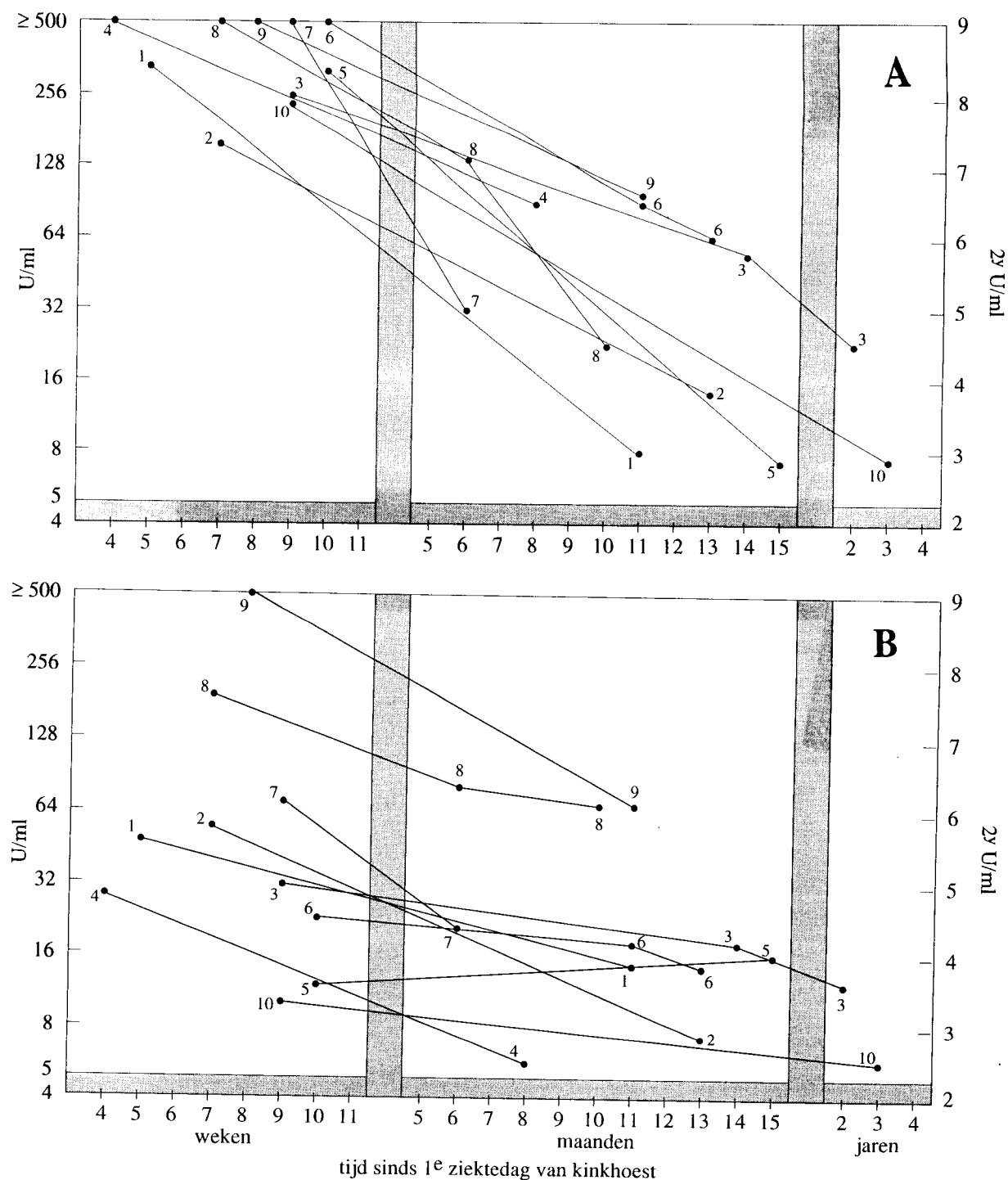
Figuur 3B. Leeftijdsafhankelijke spreiding van IgA antistofconcentraties tegen *B.pertussis* in "normaal-sera" (van deelnemers aan de pilot van het PIENTER-project; N=799) en in "immuun-sera" (reconvalescentie-sera van patiënten met recente kinkhoest; N=1590).



Figuur 4A. Longitudinaal beloop van de spreiding van IgG antistofconcentraties tegen pertussis toxine in "DKTP-Hib-studie-sera", verkregen van kinderen (N=503) op de leeftijd van 3 maanden (vóór start DKTP-Hib-vaccinaties), van 6 maanden (na 3 DKTP-Hib immunisaties), van 11 maanden (vóór de DKTP-Hib-revaccinatie) en van 13-14 maanden (na de DKTP-Hib-revaccinatie), in vergelijking met de spreiding van die waarden in "immuun-sera" van kinkhoest patiënten van overeenkomstige leeftijd (respectievelijk N=206, N=130, N=94, N=86).

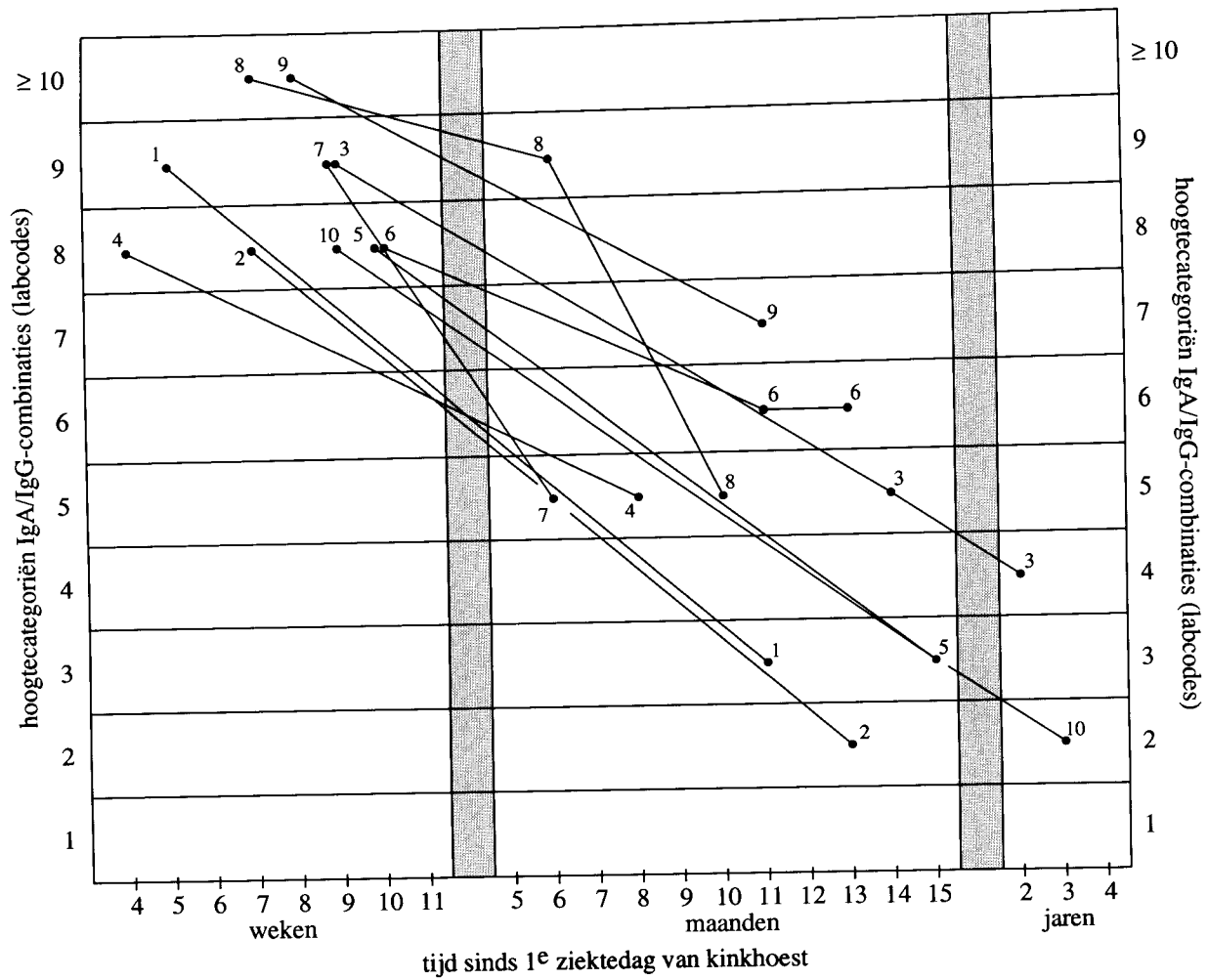


Figuur 4B. Longitudinaal beloop van de spreiding van IgA antistofconcentraties tegen *B. pertussis* in "DKTP-Hib-studie-sera", verkregen van kinderen (N=503) op de leeftijd van 3 maanden (vóór start DKTP-Hib-vaccinaties), van 6 maanden (na 3 DKTP-Hib-immunisaties), van 11 maanden (vóór de DKTP-Hib revaccinatie) en van 13-14 maanden (na de DKTP-Hib revaccinatie), in vergelijking met de spreiding van die waarden in "immuun-sera" van kinkhoest patiënten van overeenkomstige leeftijd (respectievelijk N=206, N=130, N=94, N=86).



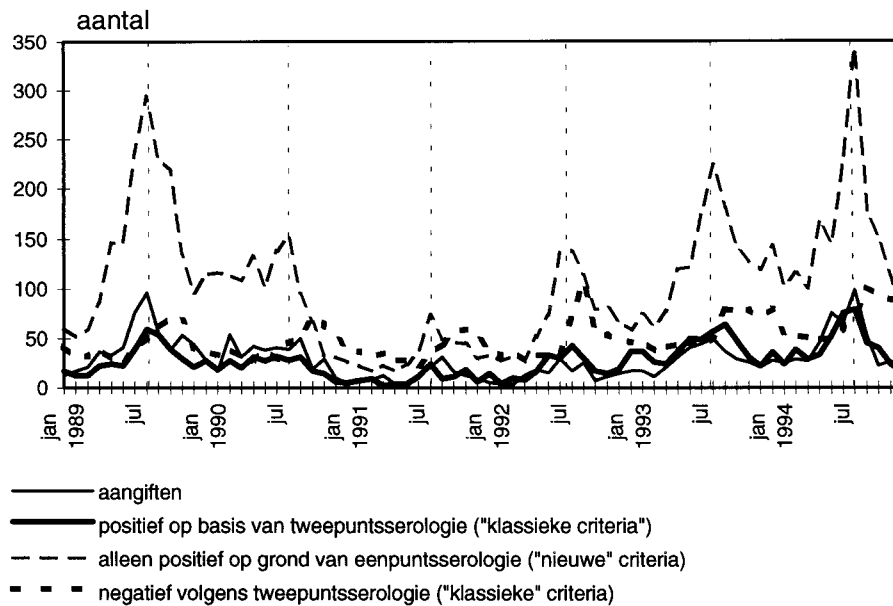
Figuur 5. Longitudinaal beloop van IgG concentraties tegen pertussis toxine (panel A) en van IgA concentraties tegen *B. pertussis* (panel B) in seriële sera van patiënten (N=10)* met klinisch vastgestelde kinkhoest.

* De nummers in de figuur verwijzen naar individuele patiënten: nr.1: ♀, 8 jaar; nr.2: ♂, 14 maanden; nr.3: ♀, 3 jaar; nr.4: ♂, 10 maanden; nr.5: ♂, 2,5 jaar; nr.6: ♂, 8 maanden; nr.7: ♀, 5 jaar; nr.8: ♀, 35 jaar; nr.9: ♂, 7 jaar; nr.10: ♀, 2,5 jaar.

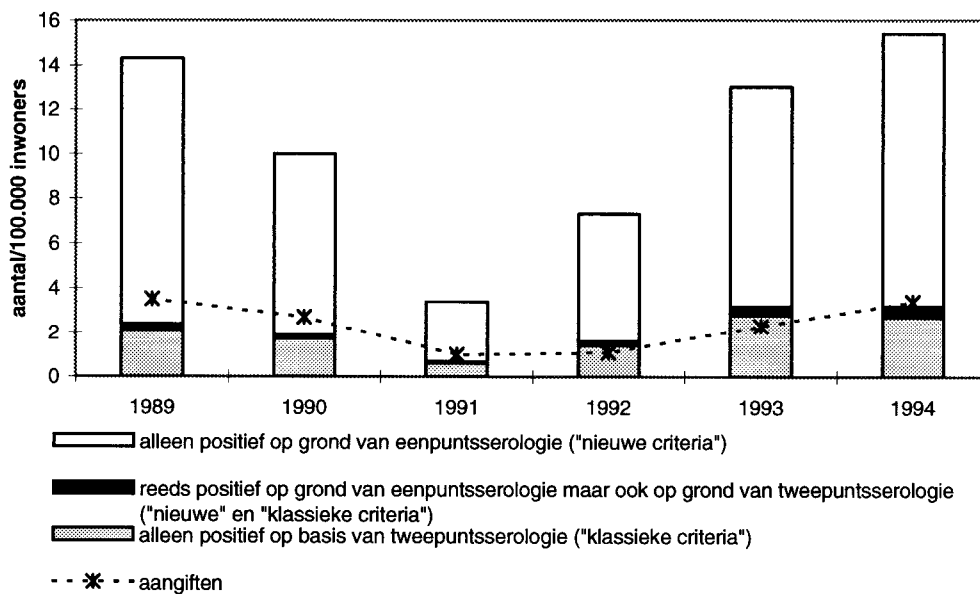


Figuur 6. Longitudinaal beloop van hoogtecategorieën van IgA/IgG-combinaties (labcodes) in seriële sera van patiënten (N=10)* met klinisch vastgestelde kinkhoest.

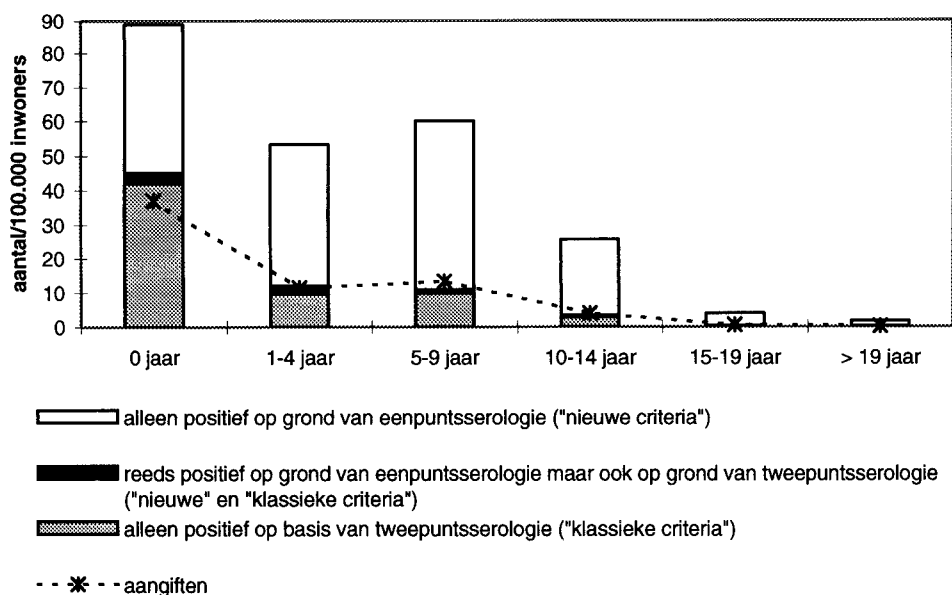
* De nummers in de figuur verwijzen naar individuele patiënten: nr.1: ♀, 8 jaar; nr.2: ♂, 14 maanden; nr.3: ♀, 3 jaar; nr.4: ♂, 10 maanden; nr.5: ♂, 2.5 jaar; nr.6: ♂, 8 maanden; nr.7: ♀, 5 jaar; nr.8: ♀, 35 jaar; nr.9: ♂, 7 jaar; nr.10: ♀, 2.5 jaar.



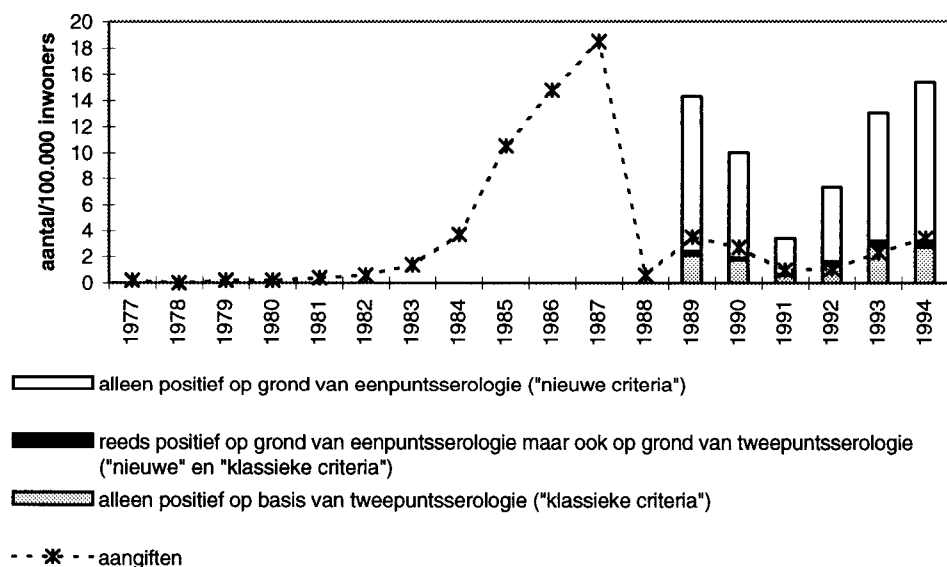
Figuur 7. Aantal kinkhoestpatiënten per maand in de periode 1989-1994 op basis van aangiften bij de IGZ, positieve serodiagnostiek volgens klassieke criteria van tweepuntsserologie, positieve eenpuntsserologie op basis van nieuwe cut-off waarden en negatieve serodiagnostiek volgens klassieke criteria van tweepuntsserologie.



Figuur 8. Incidentie van kinkhoest per jaar over de periode 1989-1994 op grond van aangiften bij de IGZ, positieve serodiagnostiek volgens klassieke criteria van tweepuntsserologie en positieve eenpuntsserologie op basis van nieuwe cut-off waarden.



Figuur 9. Gemiddelde leeftijdspecifieke incidentie van kinkhoest over de periode 1989-1994 op grond van aangiften bij de IGZ, positieve serodiagnostiek volgens klassieke criteria van tweepuntsserologie en positieve eenpuntsserologie op basis van nieuwe criteria.



Figuur 10. Jaarlijkse incidentie van kinkhoest volgens aangiften over de periode 1977-1994 en volgens positieve serodiagnostiek op basis van klassieke criteria op grond van tweepuntsserologie en nieuwe criteria op basis van eenpuntsserologie over de periode 1989-1994.

* Voor de periode 1977-1988 zijn de aangiften gebaseerd op meldingsdatum, voor 1989-1994 op de eerste ziektedag