Diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał dla toksyny krztuścowej u dorosłych osób w Polsce

Establishment of the diagnostic cut-off points for levels of serum antibodies to pertussis toxin in adults in Poland

Waldemar Rastawicki, Natalia Rokosz-Chudziak, Karolina Śmietańska, Anna Chróst, Urszula Roguska

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

Na podstawie badania próbek surowicy uzyskanych od 236 krwiodawców wyznaczono diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej u osób dorosłych w Polsce. Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG za diagnostycznie znamieny poziom (cut-off) należałoby przyjąć wartość 120 IU/ml, natomiast przy poszukiwaniu przeciwciał klasy IgA wartość 16 IU/ml. Obecność przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej na diagnostycznie znamienym poziomie wykazano w 18 (7,6%) próbkach, natomiast przeciwciał klasy IgA w 14 (5,9%) próbkach surowicy krwiodawców.

Słowa kluczowe: krztusiec, toksyna krztuścowa, diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał, cut-off, ELISA

ABSTRACT

Introduction: Standardization of ELISA tests for the diagnosis of infections caused by *B. pertussis* remains challenging despite efforts to improve it. It is recommended that serology testing should use purified pertussis toxin as the only coating antigen and that concentration of antibodies should be expressed in international units per mL (IU/ml) according to the First WHO International Standard for Pertussis Antiserum. However, available commercial ELISAs are often of different antigen composition and quality and sometimes do not calculate antibody levels in IU/ml. Furthermore, for single-sample serology, various cut-off values for IgG- and IgA-anti pertussis toxin in different EU reference laboratories have been proposed. The aim of this study was to establish of the diagnostic cut-off points for levels of serum IgG and IgA antibodies to pertussis toxin in adults in Poland and determine the seroprevalence of these antibodies among Polish blood donors.

Materials and Methods: The IgG and IgA antibodies in serum samples collected from 236 blood donors were measured by in-house ELISA with purified pertussis toxin as antigen (0,5 µg/ml). The cut-off value was settled by calculation the OD₄₅₀ results from all blood donors (arithmetic mean plus 2 standard deviations). Antibody levels were quantitated with respect to the First WHO International Standard for Pertussis Antiserum (06/140) and results were expressed in IU/mL.

Results: According to the obtained results, in the case of searching for IgG and IgA antibodies for pertussis toxin, a cut-off of 120 IU/ml and 16 IU/ml respectively, should be taken as diagnostic significant level in the adult population in Poland. A study showed the presence of IgG antibodies at a diagnostic level in 18 (7.6%) samples, and IgA antibodies to pertussis toxin in 14 (5.9%) serum samples obtained from blood donors.

Conclusions: The established in our investigation cut-off values for anti-PT IgG and IgA good correspond with values recommended by reference laboratories in other European countries.

Key words: pertussis, pertussis toxin, diagnostic significant level of antibodies, cut-off, ELISA

WSTĘP

Krztusiec jest ostrą, zakaźną chorobą dróg oddechowych, wywoływaną przez pałeczki *B. pertussis*. Pomimo, że jest to choroba głównie wieku dziecięcego, coraz częściej dotyka również osób dorosłych (1, 3, 13, 18, 19, 26).

Poszukiwanie odczynem ELISA swoistych przeciwciał dla toksyny krztuścowej, zwłaszcza u osób dorosłych, jest bardzo często wykorzystywaną metodą w diagnostyce krztuśca. Badania te są prowadzone zarówno testami ELISA opracowanymi we własnym zakresie (in-house) jak też zestawami komercyjnymi, które ze względu na zastosowany rodzaj antygeny, jego użytkowe stężenie jak również ustalony przez producenta poziom przeciwciał, który należy uznać za diagnostycznie znamienne (cut-off), różnią się między sobą czułością i swoistością (2, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 20, 21). Co więcej, w niektórych zestawach oznaczany poziom przeciwciał podawany jest jedynie jako indeks wartości w stosunku do surowicy kontrolnej cut-off dołączanej do testu, zamiast w jednostkach międzynarodowych (IU/ml), wyliczanych na podstawie badania wzorca WHO. Wszystko to powoduje, że trudno jest porównywać między sobą wyniki serologicznych badań w kierunku krztuśca prowadzonych w różnych laboratoriach oraz nie pozwala ustalić faktycznej częstości występowania krztuśca w poszczególnych krajach.

Celem prezentowanej pracy było ustalenie w międzynarodowych jednostkach (IU/ml) diagnostycznie zmiennego poziomu przeciwciał dla toksyny krztuścowej u dorosłych osób w Polsce a także określenie częstości występowania tych przeciwciał u badanej grupy krwiodawców.

MATERIAŁ I METODY

Próbki surowicy. Przedmiotem badań było 236 próbek surowicy uzyskanych od klinicznie zdrowych osób dorosłych (krwiodawców) zamieszkających w Polsce. Nie dysponowano danymi dotyczącymi wieku badanych osób.

Odczyn ELISA. Badania przeprowadzono pośrednim testem immunoenzymatycznym ELISA opracowanym we własnym zakresie zgodnie z ogólnie przyjętą metodyką. Jako antygenu w odczynie ELISA użyto oczyszczonej toksyny krztuścowej (PT), otrzymanej od Statens Serum Institute w Kopenhadze. Użytkowe stężenie toksyny krztuścowej nanoszonej do dołków płytki metapleksowej wynosiło 0,5 µg/ml. W badaniach zastosowano koniugaty firmy Dako (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/IgG/IgM/HRP) dla ludzkich przeciwciał klasy IgG i IgA. Wartości absorbancji odczytywano przy długości fali światła 450 nm.

Wyznaczanie diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał w jednostkach międzynarodowych (IU/ml). W pierwszej kolejności wartość diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej wyliczano ze średniej arytmetycznej wartości OD_{450} oznaczonych w próbkach surowicy 236 krwiodawców powiększonej o 2 odchylenia standardowe. Następnie, w celu przeliczenia tak wyznaczonej wartości cut-off na jednostki międzynarodowe (IU/ml), posłużono się krzywą logarytmiczną wyznaczoną w programie Excel na podstawie badania międzynarodowego wzorca (WHO International Standard Pertussis Antiserum, code 06/140; National Institute for Biological Standards and Control, Poppers Bar, United Kingdom) o stężeniu przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej równym 335 IU/ml oraz klasy IgA równym 65 IU/ml.

WYNIKI

W tabeli I przedstawiono diagnostycznie znamienne poziomy przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej (wartości cut-off) podane w jednostkach międzynarodowych, wyznaczone na podstawie badania próbek surowicy 236 krwiodawców. I tak, zgodnie z uzyskanymi wynikami, w populacji osób dorosłych w Polsce za wynik diagnostycznie znamieny, w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej należałoby przyjąć wartość 120 IU/ml, natomiast przeciwciał klasy IgA wartość 16 IU/ml.

Tabela I. Diagnostycznie znamienne poziomy przeciwciał klasy IgG i IgA (cut-off) dla toksyny krztuścowej u osób dorosłych w Polsce.

	Klasa IgG	Klasa IgA
Średnia wartość OD_{450} ($\bar{x}$)	0,634	0,348
Odchylenie standardowe (SD)	0,300	0,131
Wartość: $\bar{x} + 2SD$	1,235	0,611
Wyliczony, wobec standardu WHO 06/140, diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał dla toksyny krztuścowej (cut-off)	120 IU/ml	16 IU/ml

Badanie 236 próbek surowicy krwiodawców wykazało obecność przeciwciał klasy IgG na poziomie 30-60 IU/ml w 57 (24,2%) próbkach, na poziomie 60-120 IU/ml w 29 (12,3%) próbkach, natomiast na diagnostycznie znamionym poziomie ≥ 120 IU/ml w 18 (7,6%) próbkach surowicy. Przeciwciała klasy IgA dla toksyny krztuścowej na poziomie 4-8 IU/ml wykryto w 48 (20,4%) próbkach, na poziomie 8-16 IU/ml w 26 (11,0%) próbkach, natomiast na poziomie ≥ 16 IU/ml w 14 (5,9%) próbkach surowicy krwiodawców (Tabela II).

Tabela II. Występowanie przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej w próbkach surowicy uzyskanych od 236 krwiodawców.

Poziom przeciwciał klasy IgG	Liczba (odsetek) próbek surowicy
<30 IU/ml	132 (55,9%)
30-60 IU/ml	57 (24,2%)
60-120 IU/ml	29 (12,3%)
≥ 120 IU/ml	18 (7,6%)
Poziom przeciwciał klasy IgA	Liczba (odsetek) próbek surowicy
<4 IU/ml	148 (62,7%)
4 - 8 IU/ml	48 (20,4%)
8-16 IU/ml	26 (11,0%)
≥ 16 IU/ml	14 (5,9%)

Rycina 1. Diagnostyczny algorytm w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej (23).

DYSKUSJA

Podczas interpretacji wyników badań serologicznych niezmiernie istotne jest precyzyjne określenie diagnostycznie znamionego poziomu przeciwciał (tzw. wartości cut-off) świadczącego o świeżym lub niedawno przeżytym zakażeniu. Określenie tego poziomu utrudnia fakt obecności przeciwciał u osób w danej populacji, związany zarówno z występowaniem nieswoistych reakcji krzyżowych, przeciwciał po przeżytym bezobjawowym zakażeniu czy też przeciwciał poszczepiennych, które bardzo trudno odróżnić od przeciwciał wyprodukowanych podczas choroby. Może to prowadzić do wydawania wyników fałszywie dodatnich, zwłaszcza w przypadku badania próbek uzyskanych od osób niedawno szczepionych (22).

Wiarygodne ustalenie tej wartości w serodiagnostyce krztuśca, ze względu na wysoki poziom przeciwciał dla antygenów *B. pertussis* w populacji osób szczepionych, jest zadaniem szczególnie trudnym. Dodatkowo, w prawidłowo przeprowadzonych badaniach serologicznych może zająć potrzeba ustalenia różnej wartości diagnostycznie znamiennej poziomu przeciwciał w zależności od badanej populacji osób. Z tego powodu, niektórzy producenci wyznaczają nawet różne poziomy cut-off dla osób z różnych grup wiekowych.

W praktyce laboratoryjnej, diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał określa się najczęściej na podstawie badania surowicy kontrolnej cut-off, dołączonej przez producenta do danego zestawu ELISA. Wielkość wartości cut-off oblicza się ze średniej (arytmetycznej bądź geometrycznej) wartości poziomu przeciwciał oznaczonych w próbkach surowicy osób klinicznie zdrowych, powiększonej o 2 lub 3 odchylenia standardowe. Wartość cut-off jest wygodnym w użyciu kryterium, który stosuje się przy badaniu jednokrotnie uzyskanej w przebiegu choroby próbki surowicy. Trzeba jednakże pamiętać, że wiarygodność poziomu cut-off ma krytyczne znaczenie dla czułości i swoistości odczynu serologicznego. W przypadku zaniżenia tej wartości zwiększamy czułość testu a obniżamy swoistość, natomiast przy jej zawyżeniu mamy sytuację odwrotną (22).

Powszechnie w serodiagnostyce krztuśca wykorzystuje się komercyjne zestawy ELISA, oferujące możliwość oznaczenia przeciwciał klasy IgG i IgA skierowanych najczęściej dla toksyny krztuścowej. Dołączone do zestawów surowice kontrolne pozwalają na określenie poziomu przeciwciał, który należy uznać za diagnostycznie znamieny (surowica cut-off) oraz na kontrolę poprawności wykonania testu (surowica kontrolna dodatnia i ujemna). Ponieważ wartość odcięcia została ustalona przez producentów tych zestawów na podstawie poziomu przeciwciał w populacji osób zdrowych zamieszkających w krajach Europy Zachodniej bądź też nawet Ameryki Północnej, zachodzi pytanie czy jest ona odpowiednia do badania poziomu krztuścowych przeciwciał u osób w Polsce. Może zaistnieć bowiem sytuacja, że ustalona w komercyjnych zestawach wartość surowicy cut-off nie będzie adekwatna do wartości cut-off wyliczonej na podstawie badania próbek uzyskanych od osób zdrowych zamieszkających w naszym kraju. Dobitym tego przykładem są wyniki badań przeprowadzonych przez nas uprzednio, dotyczących wiarygodności wartości cut-off w dwóch wykorzystywanych w serodiagnostyce krztuśca w Polsce komercyjnych zestawach ELISA (21).

Mając na uwadze argumenty podane powyżej, w aktualnie prezentowanej pracy postanowiono ustalić diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał dla toksyny krztuścowej u dorosłych osób w Polsce w jednostkach międzynarodowych (IU/ml). Poznanie tej wartości może być bardzo przydatne w analizie porównawczej komercyjnych zestawów ELISA wykorzystywanych w serodiagnostyce krztuśca a także w badaniach epidemiologicznych. I tak, zgodnie z uzyskanymi wynikami, w populacji osób dorosłych w Polsce za wynik diagnostycznie znamieny, w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej, należałoby przyjąć wartość 120 IU/ml, natomiast przy poszukiwaniu przeciwciał klasy IgA wartość 16 IU/ml. Przy tak wyliczonym cut-off, badając stosunkowo niewielką grupę 236 krwiodawców zamieszkających w Polsce, dodatni wynik w klasie IgG uzyskano w 7,6% a w klasie IgA w 5,9% próbek surowicy.

W dostępnym piśmiennictwie, w zależności od kraju i grupy badawczej, istnieją spore rozbieżności co do wartości cut-off przeciwciał klasy IgG, którą należy przyjąć w serodiagnostyce krztuśca. Wartości te wahają się od ≥ 200 IU/ml (Massachusetts, USA), poprzez

≥ 125 IU/ml (Holandia), 50 IU/ml (Australia) do nawet 40 IU/ml (Niemcy) (23). W seroepidemiologicznych badaniach prowadzonych w krajach Europy Zachodniej w 2005 roku przyjęto poziom cut-off przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej równy 125 IU/ml (17). Techniczny dokument ECDC z 2012 roku (6) zaleca stosowanie w serodiagnostyce krztuśca dwóch wartości cut-off przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej: 62 IU/ml i 125 IU/ml, do określenia wyniku ujemnego, wątpliwego oraz dodatniego u osób, które nie były szczepione w ostatnich 12 miesiącach. W Danii, za diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej, przyjęto w odczynie ELISA in-house wartość 75 IU/ml (5). Podobnie jak w naszym badaniu, wielkość tą wyznaczono na poziomie średniej wartości poziomu przeciwciał oznaczonych w próbkach surowicy 271 krwiodawców powiększonej o dwa odchylenia standardowe. Przy takim kryterium cut-off, w badaniach przeprowadzonych w tym kraju w latach 2006-2008, dodatni wynik badania serologicznego w kierunku krztuśca uzyskano u 3,0% badanych osób dorosłych (25).

Na rycinie 1 przedstawiono algorytm, zaproponowany przez *Riffelmann* i wsp. (23), według którego należałoby interpretować wyniki badań serologicznych w kierunku krztuśca. I tak, wykrycie w próbce surowicy przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej na poziomie poniżej 40 IU/ml świadczy o braku świeżego zakażenia pałeczkami *B. pertussis*. W przypadku oznaczenia przeciwciał klasy IgG na poziomie wątpliwym (40-100 IU/ml) do potwierdzenia zakażenia ważne jest wykazanie diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał klasy IgA (≥ 12 IU/ml), natomiast przy poziomie przeciwciał IgG ≥ 100 IU/ml, bez względu na poziom przeciwciał klasy IgA, mamy już do czynienia ze świeżym lub niedawno przeżytym zakażeniem pałeczkami krztuśca.

Zgodnie z tym algorytmem, w większości komercyjnych zestawów ELISA wykorzystywanych do serodiagnostyki krztuśca, producenci przyjmują za dodatni wynik badania, świadczący o świeżym lub niedawno przeżytym zakażeniu, wartość cut-off przeciwciał klasy IgG ≥ 100 IU/ml, natomiast za wynik ujemny wartość < 40 IU/ml.

Przyjęcie wspólnego, jednoznacznego kryterium pozwala w sposób bardziej miarodajny porównać wyniki badań prowadzonych w poszczególnych krajach. Przykładowo, przy wykorzystaniu zestawu firmy Virion-Serion diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej (≥ 100 IU/ml) wykryto w 4,0% próbek surowicy uzyskanych od zdrowych osób w wieku 20-39 lat w Belgii (11). Z kolei w badaniach prowadzonych komercyjnym zestawem firmy Euroimmun wykryto przeciwciała klasy IgG dla toksyny krztuścowej na poziomie wątpliwym (62,5-125 IU/ml) w 2,7% próbek oraz na poziomie diagnostycznie znamienym (≥ 100 IU/ml) tylko w 0,6% próbek surowicy uzyskanych od osób dorosłych w Estonii (12). Odczynem ELISA Pertussaan PT-G Euro Diagnostica AB, wysoki poziom przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej (≥ 110 IU/ml) wykryto u 3,3% pracowników medycznych w trzech szpitalach w Hiszpanii (24). Przy użyciu zestawu tej samej firmy wykryto świeże lub niedawno przebyte zakażenie pałeczkami *B. pertussis* u 1,2% osób dorosłych na Węgrzech oraz 0,4% osób dorosłych w Czechach (4, 27).

Podsumowując, wyniki naszych badań dotyczących określenia diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał dla toksyny krztuścowej u osób dorosłych w Polsce, bardzo dobrze korespondują z wynikami badań przeprowadzonych w innych krajach oraz oficjalnymi zaleceniami ECDC. Stosunkowo wysoki odsetek wyników dodatnich uzyska-

nych podczas badania klinicznie zdrowych krwiodawców może świadczyć o tym, że osoby dorosłe, często nie wykazujące objawów choroby, są istotnym rezerwuarem dla pałeczek krztuśca. Jednakże, na podstawie badania tak małej grupy krwiodawców trudno wyciągać daleko idące wnioski co do częstości występowania krztuśca u osób dorosłych w Polsce. Konieczne są dalsze badania, przeprowadzone na reprezentatywnej grupie osób.

Z powodu trudności z ustaleniem wartości cut-off, za bardziej miarodajne kryterium występowania aktualnego zakażenia przyjmuje się wykazanie diagnostycznie znamiennej dynamiki przeciwciał, za którą uważa się czterokrotny wzrost lub spadek miana przeciwciał w dwóch próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby. Ta klasyczna zasada odnosi się jednak do przypadków, kiedy wykonujemy kolejne, zazwyczaj dwukrotne rozcieńczenia badanej próbki surowicy, np. w aglutynacji probówkowej. Aktualnie, w badaniach wykonywanych odczynem immunoenzymatycznym ELISA, posługujemy się najczęściej jednym rozcieńczeniem próbki surowicy. W takim przypadku nie możemy mówić o mianie przeciwciał, lecz jedynie o poziomie przeciwciał (wyrażonym w konkretnych jednostkach) przy danym rozcieńczeniu próbki surowicy. Z powodu zastosowania jednego rozcieńczenia badanej próbki oraz ograniczeń spektrofotometrycznych czytnika ELISA rzadko mamy do czynienia z czterokrotnymi różnicami w wartości poziomu przeciwciał w kolejnych dwóch próbkach surowicy (22). Tak więc, według ECDC, w serodiagnostyce krztuśca za diagnostycznie znamiennej dynamikę przeciwciał w odczynie ELISA należy przyjąć 100% wzrost lub 50% spadek poziomu przeciwciał w dwóch, kolejnych próbkach surowicy uzyskanych w odstępie 2-4 tygodni (10).

PIŚMIENNICTWO

1. *Bamberger E, Srugo I.* What is new in pertussis? *Eur J Pediatr* 2008; 167: 133-9.
2. *Baughman AL, Bisgard KM, Edwards KM i inni.* Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 1045-53.
3. *Branski D, Kerem E.* Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* 1999; 115:1254-8.
4. *Chlibek R, Smetana J, Sosovickova R i inni.* Seroepidemiology of whooping cough in the Czech Republic: estimates of incidence of infection in adults. *Public Health* 2017; 77-83.
5. *Dalby T, Harrboe ZB, Krogfelt KA.* Seroprevalence of pertussis among Danish patients with cough of unknown etiology. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 2016-23.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. ECDC Technical Document, Stockholm, 2012
7. *Fedele G, Leone P, Bellino S i inni.* Diagnostic performance of commercial serological assays measuring *Bordetella pertussis* IgG antibodies. *Diag Microbiol Infect Dis* 2018; 90: 157-62.
8. *Friedman R.* Pertussis: The disease and new diagnostic methods. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 365-76.

9. Granström G, Wretling B, Salenstedt CR, Granström M. Evaluation of serologic assay for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1818-23.
10. Guiso, Berbers G, Fry NK i inni. 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: 307-12.
11. Huygen K, Rodeghiero C, Govaerts D i inni. *Bordetella pertussis* seroprevalence in Belgian adults aged 20-39 years, 2012. *Epidemiol Infect* 2014; 142: 724-8.
12. Jögi P, Oona M, Toompere K, Lutsar I. Estimated and reported incidence of pertussis in Estonian adults: A seroepidemiological study. *Vaccine* 2015; 33: 4756-61.
13. Kapaskelis AM, Vouloumanou EK, Rafailidis PI i wsp. High prevalence of antibody titers against *Bordetella pertussis* in adult population with prolonged cough. *Resp Med* 2008; 102: 1586-91.
14. Kösters K, Riffelmann M, Dohrn B i inni. Comparison of five commercial enzyme – linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. *Clin Diag Lab Immunol* 2000; 7: 422-6.
15. Melker HE, Versteegh FGA, Conyn-van Spaendonck i inni. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 800-6.
16. Mertens P, Stals F, Steyerberg E, Richardus J. Sensitivity and specificity of single IgA and IgG antibody concentration for early diagnosis of pertussis in adults: an evaluation for outbreak management in public health practice. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 53.
17. Pebody RG, Gay NJ, Giammanco A i inni. The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* in Western Europe. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 159-71.
18. Palazzo R, Carollo M, Fedele G i inni. Evidence of increased circulation of *Bordetella pertussis* in the Italian adult population from seroprevalence data (2012-2013). *J Med Microbiol* 2016; 65: 649-57.
19. Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M. Częstość wykrywania przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla toksyny krztuścowej w rutynowo prowadzonej serodiagnostyce krztuśca u osób ze stanami zapalnymi układu oddechowego w Polsce. *Przegl Epidemiol* 2009; 63: 513-8.
20. Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M i inni. Porównanie wyników serologicznych badań w kierunku krztuśca rutynowo prowadzonych w trzech różnych laboratoriach w Polsce. *Med Dośw Mikrobiol* 2010; 109-17.
21. Rastawicki W, Paradowska-Stankiewicz I, Stefanoff P, Zasada AA. Ocena wiarygodności poziomu przeciwciał przyjmowanego za diagnostycznie znamienne w serodiagnostyce krztuśca wykonywanej odczynem ELISA. *Med Dośw Mikrobiol* 2011; 63: 73 – 80.
22. Rastawicki W. Serologiczna diagnostyka bakteryjnych zakażeń człowieka – błędy popełniane w wyborze i wykonaniu badań laboratoryjnych oraz w interpretacji ich wyników. *Med Dośw Mikrobiol* 2017; 69: 289 – 99.
23. Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J i inni. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4459-63.

24. *Rodriguez de la Pinta ML, Castro Lareo MI, Ramon Torrell JM i inni.* Seroprevalence of pertussis amongst healthcare professionals in Spain. *Vaccine* 2016; 34: 1109-114.
25. *Rønn PF, Dalby T, Simonsen J, Jørgensen CS i inni.* Seroepidemiology of pertussis in a cross-sectional study of an adult general population in Denmark. *Epidemiol Infect* 2014; 142: 729-37.
26. *Senzilet LD, Halperin SA, Spika JS.* Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1691-7.
27. *Torzsa P, Devadiga R, Tafalla M.* Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies in adults in Hungary: results of an epidemiological cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2017; 17: 242-9.

Otrzymano: 24 IX 2018 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych NIZP-PZH