MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2013, 65: 161 - 169

Wykrywanie pałeczek *Bordetella* w ramach międzynarodowego sprawdzianu Eupert-labnet Bordetella PCR EQA

Detection of *Bordetella* within the framework of the Eupert-labnet Bordetella PCR EQA

Magdalena Rzeczkowska, Katarzyna Piekarska

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny

Celem badania była molekularna identyfikacja DNA *Bordetella* sp. w ramach pierwszego międzynarodowego sprawdzianu External Quality Assessment (Eupert-labnet Bordetella PCR EQA) oraz porównanie wyników uzyskanych w Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH z wynikami uzyskanymi w specjalistycznych laboratoriach w innych krajach EU. Materiał do badań stanowił panel 10 zakodowanych próbek genomowego DNA, w tym DNA *Bordetella pertussis* w różnym stężeniu. Molekularną identyfikację przeprowadzono przy użyciu metody: standardowy PCR, multiplex-PCR i real-time PCR. Wśród 10 próbek DNA nadesłanych do identyfikacji znajdowały się 4 zawierające DNA *B. pertussis* i po jednej próbce zawierającej DNA odpowiednio: *B. parapertussis, B. holmesii* i *B. bronchiseptica*. Wyniki sprawdzianu potwierdziły kompetencje naszego laboratorium w zakresie molekularnego wykrywania materiału genetycznego *Bordetella* sp.

Słowa kluczowe: *EQA, PCR, real-time PCR, Bordetella pertussis, krztusiec*

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was evaluation of molecular identification results of samples including genomic DNA of *Bordetella* by using PCR method, obtained by laboratory of Department of Bacteriology NIZP-PZH and their comparison with the results obtained by other reference laboratories in EU. The study was conducted within the framework of the first external quality assessment (Eupert-labnet Bordetella PCR EQA).
Methods: The panel of ten coded samples of purified genomic DNA was investigated. The panel was designed to include dilution of genomic DNA from *B. pertussis* at the three concentrations 2 pg/µl (high), 0,2 pg/µl (medium) and 0,02 pg/µl (low).
The panel included as well DNA of other *Bordetella* species (*B. parapertussis*, *B. holmesii*,

B. bronchiseptica) and *H. influenzae* at concentrations 2 pg/µl. There was also two „blank" samples containing only Tris Buffet (10mM, pH 8,0). Presence or absence of *B. pertussis* DNA in the tested samples was determined by using four PCR assays: conventional in-house PCR (detection of IS*481 B. pertussis* and IS*1001 B. parapertussis*), commercial multiplex PCR (detection of DNA *B. pertussis*), conventional in-hause real-time PCR (detection of IS*481 B. pertussis*) and commercial real-time PCR (detection of IS*1001 B. parapertussis*).
Results: All but one samples were correctly identified in our laboratory. Laboratory of Department of Bacteriology NIZP-PZH correctly detected DNA of *B. pertussis* at both the „high" and „medium" dilution. In addition, the distinction between *B. pertussis* and other *Bordetella* species was correctly obtained by our laboratory. The negative samples, the two blank samples and one containing *H. influenzae* were correctly detected.
Conclusions: Results of the first international external quality assessment have confirmed competences of laboratory of Department of Bacteriology NIZP-PZH in molecular identification of *Bordetella pertussis.*

Key words: *EQA, PCR, real-time PCR, Bordetella pertussis, whooping cough*

WSTĘP

Rodzaj *Bordetella* obejmuje cztery gatunki bakterii chorobotwórczych dla człowieka: *B. pertussis* (pałeczka krztuśca), *B. parapertussis* (pałeczka parakrztuśca)*, B. bronchiseptica* oraz *B. holmesii* (11). Te Gram-ujemne pałeczki wykazują powinowactwo do nabłonka migawkowego układu oddechowego, wywołując zakażenia u ludzi i zwierząt. *B. pertussis* jest chorobotwórcza wyłącznie dla ludzi, u których wywołuje ostrą zakaźną chorobą układu oddechowego charakteryzującą się długotrwałym, napadowym kaszlem, zwaną krztuścem (11, 14). Pałeczki *B. parapertussis* wywołują zakażenia układu oddechowego o znacznie łagodniejszym przebiegu. Co więcej, ze względu na podobną manifestację objawów klinicznych, praktycznie nie jest możliwe rozróżnienie zakażenia wywołanego przez *B. pertussis* od *B. parapertussis* (5). Krztusiec nadal utożsamiany jest z typową chorobą zakaźną wieku dziecięcego i bardzo rzadko bywa uwzględniany w diagnostyce różnicowej przewlekłego kaszlu, zwłaszcza u osób dorosłych. Jednak, w ostatnich latach zaobserwowano także występowanie choroby u starszych dzieci, młodzieży oraz osób dorosłych (14, 16). W tych grupach wiekowych choroba może przebiegać z różnym nasileniem objawów, lub może przebiegać bezobjawowo. Objawy choroby mogą być na tyle nietypowe, iż długotrwały kaszel będący dominującym objawem choroby rzadko diagnozowany jest w kierunku zakażenia pałeczkami krztuśca lub parakrztuśca (1, 14).

Pozostałe dwa gatunki tj. *B. bronchiseptica* oraz *B. holmessi* są rzadziej izolowane z materiału klinicznego uzyskanego z dróg oddechowych od ludzi (11).

Wśród metod stosowanych w diagnostyce krztuśca a rekomendowanych przez WHO, nadal złotym standardem w laboratoryjnym potwierdzeniu przypadku pozostaje hodowla (6, 16). Jednak ze względu na pewne ograniczenia związane z hodowlą pałeczek krztuśca (np. wraz z czasem trwania choroby zmniejsza się czułość metody), w wielu laboratoriach na świecie zajmujących się diagnostyką krztuśca, hodowla zastępowana jest przez metody

wykorzystujące technikę PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (1, 3, 14). Metoda PCR pozwala wykryć DNA pałeczek *Bordetella* w materiale klinicznym już we wczesnym etapie choroby do 3-4 tygodnia jej trwania. Ponadto, charakteryzuje się możliwością uzyskania wyniku w krótkim czasie, co pozwala lekarzom na szybkie wdrożenie leczenia u chorego (1, 13). Obecnie, zalecaną i najczęściej stosowaną przez laboratoria referencyjne jest technika real--time PCR (4, 13). Niestety, choć bardzo czuła i pomocna, w Polsce, ze względu na koszt nie jest rutynowo stosowana w diagnostyce.

W wielu laboratoriach w przypadku molekularnej identyfikacji *B. pertussis* stosuje się tylko jedną sekwencję docelową tj. wysoce swoistą i występującą w wielu kopiach w genomie sekwencję insercyjną IS*481*, co według ekspertów zajmujących się diagnostyką krztuśca może prowadzić do fałszywie dodatnich wyników (4, 13). Zaobserwowano bowiem, że sekwencja ta może występować także w genomie innych gatunków *Bordetella* tj. *B. holmesii* i *B. bronchiseptica* (12, 13). W świetle powyższych informacji, w najnowszych wytycznych ECDC (październik 2012), zalecane jest wykrywanie DNA *B. pertussis*, przy zastosowaniu dwóch sekwencji docelowych tzn. IS*481* oraz sekwencje promotora toksyny krztuścowej *ptxA*-Pr. Natomiast, w przypadku molekularnej diagnostyki *B. parapertussis* rekomendowane jest stosowanie sekwencji insercyjnej IS*1001*. Ponieważ występuje ona również w genomie *B. bronchiseptica* także należy uwzględnić możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych.

Na rynku istnieje wiele firm oferujących komercyjne zestawy do real – time PCR służące do wykrywania DNA *B. pertussis* i/lub *B. parapertussis*, jednak większość z nich opiera się na wykrywaniu tylko jednej sekwencji docelowej tj. sekwencji insercyjnej IS*481* (*B. pertussis)* i/lub IS*1001* (*B. parapertussis*). Jednak, wciąż brak jest zestawów zawierających jako sekwencję docelową, rekomendowaną przez ECDC sekwencję promotora toksyny krztuścowej *ptx*-Pr.

W poniższej pracy przedstawiono wyniki molekularnej identyfikacji DNA pałeczek *Bordetella* sp. uzyskane w Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w ramach międzynarodowego sprawdzianu External Quality Assessment (Eupert-labnet Bordetella PCR EQA), a następnie porównano je z wynikami uzyskanymi przez inne laboratoria zajmujące się diagnostyką *Bordetella.*

MATERIAŁ I METODY

Badane próbki. Materiał do badań stanowił panel 10 zakodowanych próbek DNA oznaczonych numerami od 1 do 10, dostarczonych przez organizatorów sprawdzianu. Przesłane próbki zawierały oczyszczone genomowe DNA, w tym DNA *Bordetella* w różnym stężeniu, mogły również zawierać jedynie bufor Tris. Ekstrakty DNA przygotowano w Laboratorium Health Protection Agency w Londynie i przesłano do uczestników sprawdzianu zgodnie z obowiązującymi w EU regulacjami prawnymi przyjętymi dla transportu substancji biologicznych.

Materiał odniesienia. W badaniach molekularnych wykorzystano DNA wyizolowane ze szczepów referencyjnych tj. *Bordetella pertussis* TohamaI (CIP 81.32=NCTC 13251=ATCC BAA -589) oraz *Bordetella parapertussis* (CIP12822=NCTC 13253=ATCC BAA -587).

Identyfikacja pałeczek *Bordetella* metodami molekularnymi. Obecność DNA pałeczek *Bordetella* w badanych próbkach stwierdzano przy użyciu:

1) metody in-house PCR. Do identyfikacji *B. pertussis* i *B. parapertussis* wykorzystano chromosomalne markery tj. w przypadku *B. pertussis* poszukiwanym markerem była sekwencja insercyjna IS*481*, zaś *B. parapertussis* - IS*1001*. Sekwencje użytych starterów oraz oczekiwaną wielkość produktów PCR podano w Tabeli I.

Tabela I. Startery i sondy molekularne użyte w prezentowanych badaniach.

Wykrywane markery	Nazwa startera lub sondy	Sekwencja nukleotydowa (5'- 3')	Oczekiwana wielkość produktu	Referencje
Standardowy PCR				
IS*481*	BP-1	GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT	145 pz	9
	BP-2	TGGACCATTTCGAGTCGACG		
IS*1001*	BPPAZ	CACCGCCTACGAGTTGGAGAT	498 pz	15
	BPPA	CGCCGCTTGATGACCTTGATA		
Real-time PCR				
IS*481*	PPert	ATCAAGCACCGCTTTACCC	-	10
	APPert	TTGGGAGTTCTGGTAGGTGTG	-	
	SPert	FAM-AATGGCAAGGCCGAACGCTTCCA-TAMRA	-	

2) metody multipleks PCR. Zastosowano komercyjny zestaw Pneumo Bacter ACE Detection (Seegene). Zestaw ten przeznaczony jest do wykrywania DNA 6 patogenów dróg oddechowych, w tym *B. pertussis*. Amplifikację charakterystycznego dla *B. pertussis* fragmentu DNA o wielkości 201 pz przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.
3) metody in-house real-time PCR (qPCR). W reakcji qPCR do amplifikacji IS*481 B. pertussis* zastosowano startery (Tabela I) i warunki termiczne reakcji według metodyki wcześniej opisanej przez *Kösters i* wsp. (10).
4) metody real-time PCR (qPCR). DNA *B. parapertussis* wykrywano przy użyciu komercyjnego zestawu *Bordetella parapertussis* R-gene (Argene) zgodne z instrukcją producenta.

WYNIKI

Oczekiwane przez organizatora wyniki sprawdzianu wraz z wynikami uzyskanymi w Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH przedstawiono w tabeli II. Wśród 10 próbek DNA przesłanych do identyfikacji znajdowały się 4 zawierające DNA *B. pertussis,* 1 - *B. parapertussis,* 1 - *B. holmesii* i 1 - DNA *B. bronchiseptica*. Ponadto, w próbce oznaczonej nr. 9 znajdowało się DNA *Haemophilus influenzae.* Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH poprawnie oznaczono 9 spośród 10 badanych próbek.

W tej edycji sprawdzianu uczestnicy otrzymali DNA *B. pertussis* w trzech stężeniach, tj. 2 pg/µl(wysokie), 0,2 pg/µl(średnie) i 0,02 pg/µl (niskie) (Tabela II). Wszystkie laboratoria biorące udział w sprawdzianie (n=22) poprawnie wykryły DNA *B. pertussis* w próbce numer 2 zawierającej „wysokie" stężenie materiału genetycznego tego drobnoustroju (Tabela

Tabela II. Wyniki sprawdzianu EUpert-labnet *Bordetella pertussis* PCR EQA no.1.

Oznaczenie próbki	Dane przekazane przez organizatorów:				Wynik uzyskany w Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH
	B. pertussis	*Bordetella* spp.	DNA	Stężenie DNA w próbce (pg/µl)	
1	–	–	Bufor Tris (10mM, pH 8.0)	–	–
2	+	+	*Bordetella pertussis* (H114260371)	2	*B. pertussis*
3	+	+	*Bordetella pertussis* (H114260371)	0,2	*B. pertussis*
4	–	+	*Bordetella holmesii* (H104780607)	2	*Bordetella* spp.
5	+	+	*Bordetella pertussis* (H114260371)	0,2	*B. pertussis*
6	–	–	Bufor Tris (10mM, pH 8.0)	–	–
7	–	+	*Bordetella bronchiseptica* (H111580382)	2	*Bordetella* spp.
8	–	+	*Bordetella parapertussis* (H11456043)	2	*B. parapertussis*
9	–	–	*Haemophilus influenzae* (H120420371)	2	*H. influenzae*
10	+	+	*Bordetella pertussis* (H114260371)	0,02	–

IV). W przypadku próbek oznaczonych numerem 3 i 5, zawierających „średnie" stężenie DNA *B. pertussis*, poprawne wyniki uzyskano odpowiednio w 95% i 100% laboratoriów. Natomiast próbka oznaczona numerem 10, zawierająca najniższe stężenie DNA *B. pertussis*, która przysporzyła uczestnikom sprawdzianu najwięcej problemów, poprawnie została oznaczona w 68% laboratoriach. W Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH poprawnie oznaczono próbki oznaczone numerami 2, 3 i 5 (Tabela II). Dla wymienionych próbek przy

Tabela III. Wyniki uzyskane w Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w pierwszym sprawdzianie EUpert-labnet *Bordetella pertussis* PCR EQA z uwzględnieniem zastosowanych metod diagnostycznych.

DNA wykrywanego patogenu:	Zastosowana metoda	Numer badanej próbki									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B. pertussis	in-house PCR (IS*481*)	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–
	Pneumo Bacter ACE Detection	–	+	+	–	+	–	–	–	*H. influenzae*	–
	in-house real-time PCR (IS*481*)	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–
B. parapertussis	in-house PCR (IS*1001*)	–	–	–	+	–	–	+	+	–	–
	Bordetella parapertussis R-gene (Argene)	–	–	–	+	–	–	+	+	–	–

zastosowaniu trzech różnych metod uzyskano tożsame wyniki (Tabela III). Natomiast, podobnie jak w przypadku 7 innych laboratoriów (Tabela IV), nie udało się wykryć DNA *B. pertussis* w próbce numer 10 zawierającej najniższe stężenie DNA (0,02pg/µl).

Ponadto, przy zastosowaniu różnych metod, wszystkie laboratoria uczestniczące w sprawdzianie prawidłowo oznaczyły próbkę numer 8 zawierającą DNA *B. parapertussis* (Tabela IV).

Jednak, próbkę oznaczoną numerem 4, w której znajdowało się DNA *B. holmesii*, prawidłowo oznaczono w 73% laboratoriów (Tabela IV). W tym miejscu należy podkreślić, że dopuszczalne i interpretowane przez organizatorów jako wynik prawidłowy było zaraportowanie przez uczestników wykrycia DNA *Bordetella* sp. Podobnie w przypadku zawierającej DNA *B. bronchiseptica* próbki numer 7, która poprawnie została oznaczona przez 59% laboratoriów. W obu wymienionych próbkach, w Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH wykryto DNA *Bordetella* sp.

DYSKUSJA

W ramach międzynarodowej współpracy laboratoriów, we wrześniu 2011 roku z ramienia ECDC powstała sieć EUpert-labnet skupiająca ekspertów zajmujących się diagnostyką krztuśca w Europie. Jednym z podstawowych założeń ECDC było ujednolicenie oraz udoskonalenie metod molekularnej diagnostyki krztuśca stosowanych w laboratoriach wielu krajów Unii Europejskiej. W tym celu przeprowadzone są szkolenia, spotkania i konferencje. Elementem doskonalenia są również wieloośrodkowe, międzynarodowe sprawdziany oceniające kompetencje europejskich laboratoriów badawczych w zakresie identyfikacji i genotypowania pałeczek *Bordetella.*

W pierwszym sprawdzianie *Bordetella pertussis* PCR EQA zorganizowanym w ramach działalności sieci EUpert-labnet, udział wzięły 21 laboratoria z krajów EU. Jednakże, organizatorzy otrzymali i zamieścili w raporcie 22 wyniki, co było związane z tym, że jedno z laboratoriów zaprezentowało swoje wyniki dwukrotnie. Uczestnicy sprawdzianu stosowali różne techniki PCR tj. standardowy PCR i/lub real-time PCR (przy użyciu tzw. „in –hause" PCR lub komercyjnych zestawów). Przy czym, większość laboratoriów 13/22 wykorzystywało wyłącznie technikę real-time PCR (Tabela IV).

Jednym z celów postawionych przez organizatorów sprawdzianu była ocena poprawności oznaczenia próbek zawierających wysokie i średnie stężenie DNA *B. pertussis*. Dlatego też, próbki zawierające *B. pertussis* przesłano w trzech różnych stężeniach DNA. Natomiast, w celu sprawdzenia powtarzalności metod używanych w laboratoriach, przygotowano dwie próbki zawierające DNA o stężeniu 0,2 pg/µl. Jednak najwięcej trudności sprawiła laboratoriom próbka nr. 10, zawierająca najniższe stężenie (0,02 pg/µl) DNA *B. pertussis.* Wśród 7 laboratoriów stosujących technikę tradycyjnego PCR, tylko w 4 udało się wykryć DNA *B. pertussis*. Znacznie skuteczniejsza okazała się technika real-time PCR (qPCR), dzięki której 10 laboratoriów spośród 11 ją stosujących wykryło niskie stężenie DNA *B. pertussis*. Warto podkreślić, że obecnie najbardziej zalecaną przez ekspertów i stosowaną przez laboratoria referencyjne jest technika real – time PCR (3, 4, 7). Co więcej, poza tym, że czułość tej metody pozwala wykryć już niewielkie ilości DNA pałeczek *Bordetella* w materiale klinicznym (2, 8), to niewątpliwą zaletą tej metody jest także możliwość jej

Tabela IV. Zestawienie poprawnych wyników uzyskanych przez laboratoria biorące udział w pierwszym sprawdzianie EUpert-labnet *Bordetella pertussis* PCR EQA z uwzględnieniem zastosowanych metod diagnostycznych.

Oznaczenie próbki	Szczep	Stężenie DNA w próbce (pg/µl)	Liczba otrzymanych wyników n=22	PCR						Inne n=2
				Standardowy			qPCR			
				Komercyjny n=1	In-house n=4	Dwie metody n=2	Komercyjny n=1	In-house n=11	Dwie metody n=1	
2	*B. pertussis*	2	22	1/1	4/4	2/2	1/1	11/11	1/1	2/2
3	*B. pertussis*	0,2	21	1/1	4/4	2/2	1/1	11/11	1/1	1/2
5	*B. pertussis*	0,2	22	1/1	4/4	2/2	1/1	11/11	1/1	2/2
10	*B. pertussis*	0,02	15	0/0	4/4	0/0	0/0	10/11	1/1	0/0
8	*B. parapertussis*	2	22	1/1	4/4	2/2	1/1	11/11	1/1	2/2
4	*B. holmesii*	2	16	1/1	1/4	2/2	0/0	9/11	1/1	2/2
7	*B. bronchiseptica*	2	12	1/1	2/4	0/0	0/0	8/11	0/0	1/2
9	*H. influenzae*	2	20	1/1	3/4	2/2	1/1	10/11	1/1	2/2
1	Negatywna	–	22	1/1	4/4	2/2	1/1	11/11	1/1	2/2
6	Negatywna	–	22	1/1	4/4	2/2	1/1	11/11	1/1	2/2

zastosowania już we wczesnym etapie choroby. Niestety jednak, technika ta ze względu na koszt nie jest rutynowo stosowana we wszystkich laboratoriach.

Sekwencją docelową najczęściej poszukiwaną w genomie krztuśca w przypadku większości (n = 20) laboratoriów była występująca w wielu kopiach w genomie *B. pertussis* sekwencja insercyjną IS*481*. Jednakże, w celu potwierdzenia *B. pertussis* 11 laboratoriów dodatkowo stosowało również jednokopijny marker tj. promotor toksyny krztuścowej *ptxA*--Pr. W świetle najnowszych doniesień, sekwencja inercyjna IS*481*, może również występować w genomie *B. holmessi* i niektórych szczepach *B. bronchiseptica* (12, 13). W związku z czym, biorąc pod uwagę wyłącznie detekcję IS*481* możemy stwierdzić tylko obecności DNA *Bordetella* sp. Dlatego też, w celu zwiększenia czułości identyfikacji *B. pertussis*, najnowsze wytyczne ECDC (październik 2012) rekomendują stosowanie dodatkowych sekwencji docelowych, takich jak promotor toksyny krztuścowej *ptxA*-Pr.

Kolejnym celem organizatorów sprawdzianu było ocena poprawności rozróżnienia próbek zawierających DNA *B. pertussis* od tych, które zawierały DNA innych gatunków *Bordetella,* potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka. Dlatego też, od uczestników sprawdzianu oczekiwano wyników oznaczenia tych próbek jako niezawierających DNA *B. pertussis* lub zawierających DNA *Bordetella* sp. Należy podkreślić, że wszystkie laboratoria biorące udział w sprawdzianie poprawnie oznaczyły próbkę zawierające DNA *B. parapertussis*. Również w przypadku tego gatunku należy pamiętać o możliwości wystąpienia reakcji krzyżowych, bowiem IS*1001* może występować zarówno w genomie *B. parapertussis*, jak i w genomie *B. bronchiseptica*. Jednak, pomimo tych doniesień, wciąż jedyną rekomendowaną sekwencją docelową stosowaną w identyfikacji DNA *B. parapertussis* pozostaje nadal sekwencja insercyjna IS*1001* (4, 7).

Ponadto, wszyscy uczestnicy sprawdzianu poprawnie oznaczyli również próbki nie zawierające DNA bakteryjnego, co świadczy o braku kontaminacji w trakcie przeprowadzania reakcji PCR i zachowaniu zasad właściwej pracy laboratoryjnej.

Według organizatorów pierwszego sprawdzianu Eupert-labnet Bordetella PCR EQA, laboratoria osiągnęły zadowalające wyniki, co zostało dokładnie omówione w przesłanym do uczestników raporcie.

PODSUMOWANIE

Ze względu na wzrost liczby zachorowań na krztusiec, także w Polsce, chorobę tę należy rozważać jako powracające zagrożenie. Dlatego też, z punktu widzenia troski o zdrowie publiczne, niezwykle istotna jest działalność laboratorium dysponującego wysokospecjalistycznymi metodami diagnostycznymi oraz kompetentnym personelem. Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH jako jedyne w Polsce uczestniczyło w międzynarodowym sprawdzianie (Eupert-labnet Bordetella PCR EQA) dotyczącym wykrywania DNA pałeczek *Bordetella*. Wyniki sprawdzianu potwierdziły kompetencje jednostki w zakresie wykrywania materiału genetycznego pałeczek *Bordetella pertussis.*

PODZIĘKOWANIE

Autorzy pracy dziękują dr Aleksandrze Zasadzie z Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH za udostępnienie komercyjnego zestawu *Bordetella parapertussis* R-gene (Argene).

PIŚMIENNICTWO

1. Bamberger ES, Srugo I. What is new in pertussis? Eur J Pediatr. 2008;167:133-9.
2. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009; 55:611-22
3. Dalby T., Fry N.K., Krogfelt K.A, Jansen J.S. Evaluation of PCR methods for the diagnosis of pertussis by the European surveillance network for vaccine-preventable disease (EUVAC.NET). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32:1285-9.
4. Dalby T, Krogfelt KA, Wirsing von Koenig CH, Riffelmann M, Guido N, Guillot S, Fry N, He Q. Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with Bordetella pertussis or Bordetella parapertussis. As part of the EUpert-Labnet surveillance network. ECDC Technical Report. 2012.
5. Elahi S, Thompson DR, Strom S, O'Connor B, Babiuk LA, Gerdts V. Infection with Bordetella parapertussis but not Bordetella pertussis causes pertussis-like disease in older pigs. J Infect Dis. 2008;198: 84-92.
6. EU case definition Pertussis: Commission Decision of 28 April 2008 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No. 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Union. (http://ec.europa.eu/health/ph_threats/com/docs/1589_2008_en.pdf)
7. Fry NK, Dalby T, He Q. External quality assurance scheme on PCR for Bordetella pertussis, 2012. On behalf of EUpert-labnet network. ECDC Technical Report. 2012.
8. Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, Doshi N, Litt DJ, Crowcroft N, Miller E, George RC, Harrison TG. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. J Med Microbiol. 2009; 58:1023-9.
9. Fry NK, Tzivra O, Li YT, McNiff A, Doshi N, Maple PA, Crowcroft NS, Miller E, George RC, Harrison TG. Laboratory diagnosis of pertussis infections: the role of PCR and serology. J Med Microbiol. 2004; 53:519-25.
10. Kösters K, Riffelmann M, Wirsing von König CH. Evaluation of a real-time PCR assay for detection of Bordetella pertussis and B. parapertussis in clinical samples. J Med Microbiol. 2001; 50:436-40.
11. Mattoo S. Cherry J.D. Molecular pethogenesis, epidemiology and clinical manifestations of respiratory Infectious due to Bordetella pertussis and other i Bordetella subspecies. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 2: 326-82.
12. Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of Bordetella holmesii DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. J Clin Microbiol. 2011; 49:4347-8.
13. Riffelmann M., Wirsing von König C.H., Caro V., Guiso N. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 4925-9.
14. Tozzi AE, Celentano LP, Ciofi degli Atti ML, Salmaso S. Diagnosis and management of pertussis. CMAJ. 2005;172:509-15.
15. van der Zee A, Agterberg C, Peeters M, Schellekens J, Mooi FR. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis. J Clin Microbiol. 1993; 31:2134-40.
16. Wood N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, managment and prevention. Pediatr. Respir. Rev. 2008; 9: 201-12.

Otrzymano: 30 IX 2013 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii NIZP-PZH
e-mail: mrzeczkowska@pzh.gov.pl