

Waldemar Rastawicki, Iwona Pradowska-Stankiewicz, Paweł Stefanoff,
Aleksandra A. Zasada

Ocena wiarygodności poziomu przeciwciał przyjmowanego za diagnostycznie znamienne w serodiagnostyce krztuśca wykonywanej odczyńnem ELISA

¹Zakład Bakteriologii NIZP-PZH w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. M. Jagielski

Przeanalizowano wiarygodność diagnostycznie zmiennego poziomu przeciwciał klasy IgA i IgG (wartość cut off) przyjętego w komercyjnych zestawach ELISA firmy NovaTec i Virotech do serodiagnostyki krztuśca. Wykazano, że o ile w zestawie ELISA firmy Virotech wartość cut off była zbliżona do wartości wyznaczonej przez nas podczas badania osób zdrowych, to w zestawie ELISA firmy Novatec, wartość diagnostycznie zmiennego poziomu przeciwciał klasy IgG była około 3-krotnie zaniżona.

Krztusiec jest ostrą, zakaźną chorobą dróg oddechowych, wywoływaną przez pałeczki *B. pertussis*. Pomimo, że jest to choroba głównie wieku dziecięcego, coraz częściej dotyka również młodzieży i osób dorosłych (1, 2, 6, 13, 14). Poszukiwanie obecności swoistych przeciwciał, ze względu na rzadko wykonywane badanie bakteriologiczne, jest podstawą w laboratoryjnym rozpoznaniu krztuśca (3, 4, 7, 8, 9, 10, 11).

Najlepszym potwierdzeniem w badaniach serologicznych aktualnego zakażenia jest wykazanie diagnostycznie zmiennego przyrostu lub spadku poziomu przeciwciał w co najmniej dwóch próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby, najczęściej w odstępie 2-3 tygodni. Przyjmuje się, że 100% przyrost poziomu przeciwciał lub 50% jego spadek jest wystarczająco czułym i swoistym markerem aktualnego zakażenia pałeczkami *B. pertussis* (5).

W przypadku, kiedy nie ma możliwości uzyskania drugiej próbki surowicy, zachodzi konieczność interpretacji wyniku badania serologicznego na podstawie poziomu przeciwciał oznaczonego w jednej próbce. O dodatnim wyniku badania świadczy poziom przeciwciał przekraczający wartość cut-off, tj. wartość diagnostycznie zmiennego poziomu przeciwciał, ustalona przez producenta zestawu. Wiarygodne ustalenie tej wartości w serodiagnostyce krztuśca, ze względu na wysoki poziom przeciwciał dla antygenów *B. pertussis* w populacji osób poddanych szczepieniu przeciw krztuścowi, jest zadaniem trudnym. Dodatkowo, w prawidłowo przeprowadzonych badaniach serologicznych może zająć potrzeba ustalenia różnej wartości cut-off w zależności od badanej populacji osób.

Powszechnie w serodiagnostyce krztuśca wykorzystuje się komercyjne zestawy ELISA, oferujące możliwość oznaczenia przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM, skierowanych najczęściej dla toksyny krztuścowej bądź włóknikowej hemaglutyniny (7, 10, 11). Testy te, według deklaracji producentów, charakteryzują się wysoką czułością i swoistością, i mogą być wykorzystywane do badania poziomu przeciwciał u osób w różnym wieku. Dołączone do zestawów surowice kontrolne (zazwyczaj jest to surowica cut-off, surowica ujemna i surowica dodatnia), pozwalają na określenie poziomu przeciwciał, który należy uznać za diagnostycznie znamienne oraz na kontrolę poprawności wykonania testu.

Ponieważ wartość odcięcia została ustalona przez producentów tych zestawów na podstawie poziomu przeciwciał w populacji osób zdrowych zamieszkałych w krajach Europy Zachodniej bądź też nawet Ameryki Północnej, zachodzi pytanie czy jest ona odpowiednia do badania poziomu krztuścowych przeciwciał u osób w Polsce. Wartość cut-off ma bowiem zasadnicze znaczenie w uzyskaniu wiarygodnych wyników badań serologicznych, pozwalając na rozróżnienie poziomu przeciwciał charakterystycznego dla aktualnie trwającego zakażenia, od poziomu przeciwciał, które pozostały we krwi osób z dawno przebyłym krztuścem lub też tylko po szczepieniu ochronnym. Wypada nadmienić, że opinia na temat wysokości wartości cut-off, którą należy przyjąć w serodiagnostyce krztuśca różni się dość istotnie, w zależności od kraju w którym przeprowadzano badania. I tak, w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej wartość ta, w zależności od badania, została określona w USA na 50, 100 a nawet 200 EU/ml, w Holandii na 62 EU/ml i 125 EU/ml, w Niemczech na 40 EU/ml (5).

Celem podjętych badań było określenie, czy wartość cut off przyjęta w dwóch, najczęściej wykorzystywanych w serodiagnostyce krztuśca w Polsce komercyjnych zestawach ELISA, jest wiarygodna i odpowiada rzeczywistej wartości wyznaczonej przez nas podczas badania próbek surowicy uzyskanych od zdrowych osób zamieszkałych na terenie kraju.

MATERIAŁ I METODY

1. Badane próbki surowicy. Badaniom poddano 100 próbek surowicy uzyskanych od klinicznie zdrowych, dorosłych osób – krwiodawców oraz 60 próbek surowicy uzyskanych od dzieci i młodzieży w wieku od 3 do 18 lat bez klinicznych objawów ze strony układu oddechowego.
2. Immunoenzymatyczne testy ELISA. W badaniach wykorzystano dwa komercyjne zestawy ELISA, powszechnie stosowane w serodiagnostyce krztuśca na terenie kraju, tj. zestaw ELISA NovaLisa Bordetella pertussis firmy NovaTec i zestaw ELISA Bordetella pertussis firmy Virotech. W obydwu zestawach poszukiwano przeciwciał klasy IgA i IgG.
 - 2.1 Zestaw ELISA NovaLisa Bordetella pertussis firmy NovaTec. Posłużono się dwoma zestawami (nr kat. BOPA0030) do poszukiwania przeciwciał klasy IgA (LOT BOPA-057-1 i BOPA-063-2) oraz dwoma zestawami (nr kat. BOPG0030) do poszukiwania przeciwciał klasy IgG O (LOT BOPG-057 i BOPG-067-3). Jako preparat antygenowy producent zastosował mieszaninę toksyny krztuścowej oraz włóknikowej hemaglutyniny. Odczyn przeprowadzono zgodnie ze wskazówkami producenta, wykorzystując trzy surowice kontrolne wchodzące w skład zestawu: ujemną, cut off oraz dodatnią. Surowice kontrolne cut off, w celu kontroli powtarzalności uzyskanych wyników, nakładano do

- dwóch dołek płytki. Interpretację wyników testu ELISA przeprowadzano zgodnie ze wskazówkami producenta, przyjmując wynik poniżej 9 jednostek NTU (NovaTec – Units) jako ujemny, wynik pomiędzy 9-11 jako wątpliwy i powyżej 11 za dodatni.
- 2.2. Zestaw ELISA Bordetella pertussis ELISA firmy Virotech. W badaniach wykorzystano zestaw EC215A00 (LOT 129-01) i EC 215G00 (LOT 128-01) do oznaczania przeciwciał odpowiednio klasy IgA i IgG. Podobnie jak w przypadku zestawu firmy NovaTec, w odczynie tym zastosowano preparat antygenowy, będący mieszaniną toksyny krztuścowej oraz włóknikowej hemaglutyniny. Interpretację wyników testu ELISA przeprowadzano zgodnie ze wskazówkami producenta, przyjmując wynik poniżej 9 jednostek VE (Virotech – Units) jako ujemny, wynik pomiędzy 9-11 jako wątpliwy i powyżej 11 za dodatni.
3. Analiza statystyczna. Statystyczną analizę uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Instant (Instant Biostatistic). Obliczano średnią arytmetyczną wartość uzyskanych absorbancji (OD) i odchylenie standardowe. Istotność różnic w częstości wykrywania przeciwciał w próbkach surowicy osób z różnych grup oceniano testem niezależności chi-kwadrat z zastosowaniem poprawki Yatesa. Za znamienne statystycznie przyjęto różnice, gdy poziomy istotności były mniejsze od 0,05 ($p < 0,05$).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Analiza zgodności uzyskanych wyników badania próbek kontrolnych z wartościami deklarowanymi przez producentów wykazała, że w obydwu komercyjnych zestawach uzyskano wyniki prawidłowe, świadczące o poprawności przeprowadzenia testu. Na szczególną uwagę zasługują bardzo zbliżone wyniki badania kontrolnych próbek surowicy cut off w obydwu użytych seriach zestawu ELISA firmy NovaTec. Może to świadczyć o tym, że określony poziom przeciwciał, zarówno klasy IgA jak i IgG w próbce surowicy kontrolnej cut off nie jest przypadkowy, charakterystyczny jedynie dla określonej serii badania.

Wyznaczając poziom przeciwciał, który można uznać za diagnostycznie znamienne, określa się zazwyczaj średnią arytmetyczną wartości wyników uzyskanych podczas badania osób klinicznie zdrowych, powiększoną o dwa lub trzy odchylenia standardowe. W celu poprawnego ustalenia tego poziomu, niezwykle istotne jest aby osoby te stanowiły reprezentatywną grupę dla danego kierunku badania. W przypadku poszukiwania przeciwciał dla pałeczek krztuśca istotny może być między innymi wiek badanych osób, przebyte szczepienia ochronne czy też miejsce zamieszkania. W zależności od wieku badanych osób różny może być bowiem poziom odcięcia, czyli poziom przeciwciał przyjęty za diagnostycznie znamienne. Niektórzy producenci wyznaczają nawet różne poziomy cut off dla osób z różnych grup wiekowych. Taki sposób interpretacji wyników, chociaż jak najbardziej uzasadniony, z przyczyn praktycznych jest jednak rzadko wykorzystywany.

W przeprowadzonych przez nas badaniach wykorzystaliśmy zarówno próbki pochodzące od dzieci i młodzieży do 18 roku życia jak również od osób dorosłych, w wieku powyżej 21 lat. Chcieliśmy sprawdzić, czy ustalony przez producentów diagnostycznie znamienne poziom przeciwciał, wyznaczany każdorazowo dla danej serii zestawu, odpowiada wartości wyliczonej przez nas podczas badania osób zdrowych na terenie Polski.

W tabelach I-IV przedstawiliśmy wartości OD przyjęte za diagnostycznie znamienne (wartość cut off) zarówno przez producentów testów ELISA jak i w badaniach przeprowa-

dzonych przez nas, jak również liczbę i odsetek próbek surowicy osób zdrowych, w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał. Ponieważ w różnych badaniach poziom odcięcia ustala się na wysokości średniej arytmetycznej wartości wyników uzyskanych podczas badania osób klinicznie zdrowych, powiększonej o dwa lub trzy odchylenia standardowe, w tabelach przedstawiono je w osobnych rubrykach.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, wartość OD surowicy kontrolnej cut off dostarczonej przez producenta zestawu NovaTec do wyznaczania poziomu odcięcia przeciwciał klasy IgA (średnia 0,65) dokładnie odpowiada średniej wartości OD odcięcia wyliczonej przez nas na wysokości $x + 2SD$ i jest o 0,2 niższa niż średnia wartość OD odcięcia wyliczonej przez nas na wysokości $x + 3SD$ podczas badania zdrowych dzieci i osób dorosłych. Całkowicie odmiennie wygląda sytuacja w przypadku porównania wartości OD surowicy kontrolnej cut off służącej do oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgG z wynikami uzyskanymi przez nas podczas badania osób zdrowych. Średnia wartość odcięcia wyznaczona na poziomie $x + 2SD$ wynosząca 1,48 jest prawie 2,8x wyższa, a wyznaczona na poziomie $x + 3SD$ 3,6x wyższa niż wartość OD surowicy kontrolnej (0,53-0,54) dostarczonej przez producenta zestawu ELISA firmy NovaTec do poszukiwania przeciwciał klasy IgG (Tabela I-II).

Tabela I. Wartość OD przyjęta za diagnostycznie znamiennej oraz liczba i odsetek próbek surowicy osób zdrowych w wieku do 18 roku życia, w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał klasy IgA i IgG odczynem ELISA firmy NovaTec.

Przyjęte kryterium poziomu cut off	Wartość OD przyjęta za diagnostycznie znamiennej w klasie przeciwciał:		Liczba (odsetek) próbek surowicy, w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał:	
	IgA	IgG	IgA	IgG
$x + 2 SD$	0,54	1,33	5 (8,3)	3 (5,0)
$x + 3 SD$	0,71	1,76	3 (5,0)	2 (3,3)
Surowica cut off firmy NovaTec	0,69	0,53	3 (5,0)	14 (23,3)

x – średnia arytmetyczna wyliczona z 60 próbek surowicy osób zdrowych w wieku do 18 roku życia
SD – odchylenie standardowe

Tabela II. Wartość OD przyjęta za diagnostycznie znamiennej oraz liczba i odsetek próbek surowicy osób zdrowych w wieku powyżej 21 lat (krwiodawców), w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał klasy IgA i IgG odczynem ELISA firmy NovaTec.

Przyjęte kryterium poziomu cut off	Wartość OD przyjęta za diagnostycznie znamiennej w klasie przeciwciał:		Liczba (odsetek) próbek surowicy, w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał:	
	IgA	IgG	IgA	IgG
$x + 2 SD$	0,77	1,62	5 (5,0)	8 (8,0)
$x + 3 SD$	1,00	2,06	4 (4,0)	-
Surowica cut off firmy NovaTec	0,61	0,54	5 (5,0)	55 (55,0)

x – średnia arytmetyczna wyliczona ze 100 próbek surowicy osób zdrowych w wieku powyżej 21 roku życia (krwiodawców)
SD – odchylenie standardowe

Istniejące różnice pomiędzy poziomem odcięcia wyznaczonym przez nas i przez producenta zestawu ELISA firmy NovaTec mają swoje odzwierciedlenie w odsetku próbek surowicy osób zdrowych, w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał dla antygenów pałeczek krztuśca. O ile, w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgA odsetek ten jest prawie identyczny, to w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG jest kilkakrotnie wyższy jeśli przyjmie się kryterium proponowane przez producenta zestawu. Statystyczna analiza istotności różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami wykazała, że odczynem ELISA firmy NovaTec znamiennej częściej wykrywano przeciwciała klasy IgG w mianie diagnostycznie znamiennej przy zastosowaniu poziomu cut-off przyjętego przez producenta zestawu niż w przypadku zastosowania poziomu cut-off wyznaczonego przez nas ($p < 0,05$). Nie stwierdzono tej statystycznej różnicy ($p > 0,05$) w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgA.

W przeprowadzonych badaniach odczynem ELISA firmy Virotech nie uzyskano tak istotnych różnic w wartości cut off wyznaczonej przez producenta zestawu i przez nas jak w przypadku użycia zestawu firmy Novatec. Wartość OD surowicy cut-off dostarczonej przez producenta zestawu do oznaczania przeciwciał klasy IgA, była bardzo zbliżona do wyznaczonej przez nas wartości odcięcia, u dzieci na wysokości $x + 2SD$ i u dorosłych na

Tabela III. Wartość OD przyjęta za diagnostycznie znamiennej oraz liczba i odsetek próbek surowicy osób zdrowych w wieku do 18 roku życia, w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał klasy IgA i IgG odczynem ELISA firmy Virotech.

Przyjęte kryterium poziomu cut off	Wartość OD przyjęta za diagnostycznie znamiennej w klasie przeciwciał:		Liczba (odsetek) próbek surowicy, w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał:	
	IgA	IgG	IgA	IgG
$x + 2 SD$	0,35	0,74	4 (6,7)	3 (5,0)
$x + 3 SD$	0,47	1,00	3 (5,0)	2 (3,3)
Surowica cut off firmy Virotech	0,39	0,58	3 (5,0)	4 (6,7)

x – średnia arytmetyczna wyliczona z 60 próbek surowicy osób zdrowych w wieku do 18 roku życia
SD – odchylenie standardowe

Tabela IV. Wartość OD przyjęta za diagnostycznie znamiennej oraz liczba i odsetek próbek surowicy osób zdrowych w wieku powyżej 21 lat (krwiodawców), w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał klasy IgA i IgG odczynem ELISA firmy Virotech.

Przyjęte kryterium poziomu cut off	Wartość OD przyjęta za diagnostycznie znamiennej w klasie przeciwciał:		Liczba (odsetek) próbek surowicy, w których wykryto diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał:	
	IgA	IgG	IgA	IgG
$x + 2 SD$	0,25	0,73	5 (5,6)	2 (2,2)
$x + 3 SD$	0,31	0,96	2 (2,2)	2 (2,2)
Surowica cut off firmy Virotech	0,36	0,62	-	2 (2,2)

x – średnia arytmetyczna wyliczona ze 90 próbek surowicy osób zdrowych w wieku powyżej 21 roku życia (krwiodawców)

SD – odchylenie standardowe

wysokości $x + 3SD$. Poziom przeciwciał klasy IgG u dzieci i osób dorosłych był bardzo zbliżony, czego wynikiem były niemal identyczne wartości cut off uzyskane w przeprowadzonych przez nas badaniach. Wartość $OD=0,6$ surowicy cut off, dołączonej do zestawu ELISA firmy Virotech, był niższy tylko o niecałe 20% i 40% od wartości wyliczonej przez nas odpowiednio na wysokości $x+2SD$ i $x+3SD$. Odzwierciedleniem tego był również podobny odsetek próbek surowicy (różnice statystycznie nieistotne), w których wykryto diagnostycznie znamienne poziomy przeciwciał dla pałeczek *B. pertussis*, przy zastosowaniu obydwu kryteriów wartości cut off (Tabela III-IV).

Jak wykazały przeprowadzone przez nas badania, wiarygodność diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał klasy IgA, wyliczonego na podstawie wartości surowicy cut off dostarczonej przez producentów, jest wysoka w obydwu zestawach ELISA. Wartość surowicy cut off do oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgG jest tylko nieznacznie zaniżona w przypadku zestawu ELISA firmy Virotech i drastycznie zaniżona w przypadku zestawu firmy NovaTec. Przyjęta przez producenta wartość surowicy cut off, powoduje, że odsetek próbek surowicy z diagnostycznie znamienym poziomem przeciwciał jest kilkakrotnie wyższy niż wyliczony przy użyciu najczęściej przyjętego kryterium w badaniach serologicznych, tj. średniej wartości arytmetycznej OD próbek surowicy osób zdrowych, powiększonej o dwa odchylenia standardowe. Proste wyliczenie matematyczne pokazuje, że aby wartość podaną w jednostkach NTU przez producenta zestawu NovaTec jako wynik dodatni dostosować do wiarygodnego poziomu, trzeba by ją podnieść z 11 NTU proponowanego przez producenta, do co najmniej 30 NTU.

Zaniżona wartość poziomu cut off przy poszukiwaniu przeciwciał klasy IgG zestawem ELISA firmy NovaTec, została również potwierdzona między innymi w pracy Riffelman i wsp. (12). Autorzy ci, ocenili swoistość odczynu ELISA firmy Novatec w stosunku do odczynu ELISA opracowanego we własnym zakresie z antygenem oczyszczonej toksyny krztuścowej zaledwie na 54%.

Analizując wiarygodność diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał w komercyjnych zestawach ELISA, zwrócono również uwagę na różnice wynikające z wieku badanych osób zdrowych. W zestawie ELISA firmy NovaTec, wyznaczony przez nas poziom odcięcia przeciwciał klasy IgA jak i IgG był niższy w próbkach surowicy dzieci niż osób dorosłych. W przypadku użycia zestawu ELISA firmy Virotech nie zaobserwowano zmian w poziomie odcięcia przeciwciał klasy IgG u dzieci i osób dorosłych, a poziom odcięcia przeciwciał klasy IgA, odwrotnie niż w zestawie firmy NovaTec, był niższy u osób dorosłych. Taki obraz odpowiedzi humoralnej można wytłumaczyć faktem, że poziom przeciwciał klasy IgA, po przebytej chorobie czy też szczepieniu ochronnym, spada o wiele szybciej niż poziom przeciwciał klasy IgG, który może utrzymywać się w surowicy nawet przez kilkanaście lat (8, 10, 11). Warto zauważyć, że producenci obydwu zestawów nie zróżnicowali wartości cut off w zależności od wieku badanych osób.

Podsumowując wyniki naszych badań, należy stwierdzić, że wykazanie w pojedynczej próbce surowicy podwyższonego poziomu przeciwciał klasy IgG w przypadku użycia zestawu firmy NovaTec, nie może być podstawą do laboratoryjnego rozpoznania krztuśca. O wiele lepiej nadaje się do tego celu oznaczenie poziomu przeciwciał klasy IgA. Niestety słaba produkcja przeciwciał klasy IgA dla antygenów *B. pertussis*, zwłaszcza przez małe dzieci, może być przyczyną wyników fałszywie ujemnych (10). Nie można zapominać, że najbardziej wartościowe jest zawsze wykazanie znamiennego przyrostu przeciwciał w co

najmniej dwóch próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby. W zależności od użytego zestawu ELISA, celowe wydaje się również rozważenie zastosowania różnych wartości cut off w przypadku badania surowic uzyskanych od dzieci i osób dorosłych.

W. Rastawicki, I. Pradowska-Stankiewicz, P. Stefanoff, A. A. Zasada

Reliability of the cut-off value in the routine serodiagnosis of pertussis performed by the commercial ELISA assays

SUMMARY

In clinical practise, serodiagnosis of pertussis is mostly based on single-sample serology using a single cut-off. The reliability of the cut-off value has the crucial influence for the sensitivity and specificity of the used tests. In this context we compared the value of cut-off used in two commercial ELISA kits (NovaLisa Bordetella pertussis-NovaTec and ELISA Bordetella pertussis ELISA-Virotech) with cut-off settled by calculation the IgA and IgG results from the 60 healthy Polish children and 100 blood donors (arithmetic mean plus 2 or 3 standard deviations). Our study indicates that IgA cut-off used in NovaTec ELISA, in contrary to Virotech ELISA, correspond better to the level $x+3SD$ calculated in children sera and $x+2SD$ calculated in adult blood donors sera. The value of IgG cut-off used in Virotech ELISA was lower about 20% and 30% from the cut-off settled by us respectively on the level of $x+2SD$ and $x+3SD$ in all tested sera. The most inadequate value had the IgG cut-off used in NovaTec ELISA, which was over three times lower than mean cut-off value settled by calculation results from the sera obtained from healthy children and blood donors. This low cut-off value established by the NovaTec was the reason that 23.3% of healthy children and 55.0% of blood donors have the IgG antibodies on the diagnostic significant level. Our data suggest that commercial ELISAs need further improvement and standardization.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bamberger E, Srugo I.* What is new in pertussis? *Eur J Pediatr*, 2008;167:133-139.
2. *Branski D, Kerem E.* Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* 1999; 115:1254-8.
3. *Friedman R.* Pertussis: The disease and new diagnostic methods. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 365-76.
4. *Granström G, Wretlind B, Salenstedt CR, Granström M.* Evaluation of serologic assay for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1818-23.
5. *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*, 2010,
6. *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.
7. *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.
8. *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.

9. *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.
10. *Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M.* Częstość wykrywania przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla toksyny krztuscowej w rutynowo prowadzonej serodiagnostyce krztusca u osób ze stanami zapalnymi układu oddechowego w Polsce. *Przeegl Epidemiol* 2009; 63: 513-18.
11. *Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M, i inni* Porównanie wyników serologicznych badań w kierunku krztusca rutynowo prowadzonych w trzech różnych laboratoriach w Polsce. *Med Dośw Mikrobiol* 2010; 109-117.
12. *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.
13. *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.
14. *Zieliński A.* Krztusiec w Polsce w 2007 roku. *Przeegl Epidemiol* 2009; 63: 191-3.

Otrzymano: 04 II 2010 r.

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