

PCR en tiempo real, inmunofluorescencia y cultivo para la detección de *Bordetella pertussis*: evaluación prospectiva y epidemiología molecular

Jesús García-Martínez, Fernando Chaves, Efrén Salto y Joaquín R. Otero

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN. En los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia de tos ferina. El objetivo de este estudio fue evaluar la aportación de varios procedimientos, incluyendo una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, al diagnóstico microbiológico de tos ferina, así como conocer la relación clonal de los aislamientos clínicos de *Bordetella pertussis*.

MÉTODOS. Desde agosto de 2002 a octubre de 2003, se recogieron los exudados nasofaríngeos de pacientes pediátricos y adultos con signos clínicos de tos ferina o como parte de estudios de contactos. Estas muestras fueron procesadas para la detección de *B. pertussis* mediante cultivo, inmunofluorescencia directa (IFD) y PCR en tiempo real. Los aislamientos disponibles se caracterizaron molecularmente mediante electroforesis en campo pulsante (ECP).

RESULTADOS. De las 121 muestras recogidas de 117 pacientes, se detectó *B. pertussis* en cultivo en 17 muestras (14,1%), con IFD en 30 (24,8%) y con PCR en 41 (33,9%). Un total de 17 aislamientos clínicos, 14 obtenidos durante el período de estudio y 3 en los años 1997, 2000 y 2001, estuvieron disponibles para ECP. Se identificaron 5 genotipos, dos de ellos (C y E) mayoritarios, con 8 y 6 aislados, respectivamente. Uno de ellos incluyó aislamientos de 1997 y 2001.

CONCLUSIÓN. La PCR en tiempo real aplicada a la detección de *B. pertussis* proporcionó más resultados positivos que la IFD o el cultivo, pero su valor diagnóstico debe ser aclarado. Entre los aislamientos conseguidos predominaron dos clones, uno de ellos en circulación desde al menos 1997.

Palabras clave: *Bordetella pertussis*. Tos ferina. PCR en tiempo real. Epidemiología molecular.

Bordetella pertussis detection by real-time PCR, immunofluorescence and culture: prospective evaluation and molecular epidemiology

INTRODUCTION. An increase in the incidence of pertussis has been observed in recent years. The aim of this study was to determine the usefulness of several procedures, including real-time PCR, for the laboratory diagnosis of pertussis, and to investigate clonal relationships among clinical isolates of *Bordetella pertussis*.

METHODS. During the period of August 2002 to October 2003, nasopharyngeal swabs were collected from pediatric and adult patients with symptoms of pertussis, and contact cases. The samples were processed by culture, direct fluorescence assay (DFA), and real-time PCR. Most of the isolates were further characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

RESULTS. Among 121 clinical samples corresponding to 117 patients, *B. pertussis* was detected in 17 samples by culture (14.1%), 30 samples (24.8%) by DFA and 41 samples (33.9%) by real-time PCR. Real-time PCR diagnosed 26 and 24 more cases than culture and DFA, respectively. Seventeen clinical isolates were available for PFGE analysis, 14 collected during the study period and three in 1997, 2000 and 2001. PFGE identified 5 different genotypes, 2 of which included 8 (genotype C) and 6 (genotype E) isolates. Two of the older isolates (1997 and 2001) were identified as genotype C.

CONCLUSION. Real-time PCR applied to the diagnosis of pertussis provided more positive results than DFA and culture, but the true diagnostic value of these results should be clarified. Two bacterial clones were dominant, and one of them has circulated at least since 1997.

Key words: *Bordetella pertussis*. Whooping cough. Real-time PCR. Molecular epidemiology.

Introducción

Históricamente, las infecciones por *Bordetella pertussis* han sido una importante causa de morbilidad y mortalidad en niños en edad escolar¹. La implantación de la vacunación sistemática de la población, a mediados del siglo pasado, consiguió un descenso significativo de la incidencia²,

Correspondencia: Dr. F. Chaves.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario 12 de Octubre.
Avda. Córdoba, s/n. 28041 Madrid. España.
Correo electrónico: fchaves.hdoc@salud.madrid.org

Manuscrito recibido el 29-8-2005; aceptado el 23-2-2006.

así como de las complicaciones graves y muertes asociadas¹. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto un aumento de los casos de tos ferina, incluso entre poblaciones con gran cobertura vacunal^{3,4}, sobre todo a expensas del incremento de casos declarados en niños mayores, adolescentes y adultos^{3,5}. También parece evidente la emergencia de brotes epidémicos cada 2-5 años⁴⁻⁷.

El control y la prevención de la tos ferina requieren un diagnóstico rápido, junto con el aislamiento y tratamiento de los casos confirmados y la profilaxis antibiótica de los contactos. Las técnicas diagnósticas habitualmente disponibles (cultivo, inmunofluorescencia directa [IFD] o serología) han sido consideradas poco sensibles y específicas o demasiado lentas⁸⁻¹¹. Las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han aplicado con éxito a la detección de *B. pertussis* en diferentes muestras clínicas⁸⁻¹³, aunque la ausencia de un buen estándar de referencia^{9,10,13} y la falta de estandarización^{2,8,9,13} han impedido su evaluación e implantación como método diagnóstico.

Con este trabajo nos planteamos evaluar la aportación de una técnica de PCR en tiempo real al diagnóstico rutinario de *B. pertussis*, comparándola con dos técnicas convencionales (cultivo e IFD), así como conocer la relación clonal de las cepas de *B. pertussis* aisladas en nuestra área.

Material y métodos

Pacientes y recogida de muestras

Este estudio se realizó en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid entre agosto de 2002 y octubre de 2003. Se obtuvieron prospectivamente los exudados nasofaríngeos de pacientes pediátricos (< 16 años de edad) y adultos que acudieron a nuestro centro con signos clínicos de tos ferina (tos de al menos 2 semanas de duración acompañada de alguno de los siguientes síntomas: paroxismo, emesis postusiva o gallo inspiratorio) o como parte de estudios de contacto de pacientes infectados. Las muestras se recogieron con dos torundas flexibles con punta de Dacron® introducidas por las fosas nasales hasta la pared posterior de la nasofaringe². Una de las torundas se utilizó exclusivamente para el cultivo y fue procesada inmediatamente, mientras que la torunda restante se mantuvo en un tubo estéril a 4 °C durante un máximo de 24 h hasta su posterior procesamiento.

Cultivo de *B. pertussis*

Inmediatamente después de la recogida de la muestra, la primera de las torundas se utilizó para la inoculación directa de los medios de cultivo. En primer lugar, se extendió sobre una placa de Petri con medio de agar de Regan-Lowe con 40 µg/ml de cefalexina; posteriormente, la misma torunda se introdujo en un tubo con medio semisólido de enriquecimiento de Regan-Lowe, cuidando que la punta de Dacron quedara justo bajo la superficie. Ambos medios se incubaron en atmósfera aerobia y húmeda a 37 °C. Las placas se incubaron durante 7 días, y se comprobó la existencia de crecimiento de colonias típicas de *Bordetella* spp. a diario a partir del tercer día de incubación. Pasadas 48 h de su inoculación, las torundas mantenidas en el medio semisólido de enriquecimiento fueron subcultivadas en placas con medio de agar de Regan-Lowe e incubadas en las condiciones ya descritas.

Las colonias sugerentes de *B. pertussis* fueron identificadas mediante la tinción de Gram, la producción de oxidasa, la ausencia de ureasa y la aglutinación con antiseros específicos anti- *B. pertussis* (Becton-Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, Estados Unidos).

Inmunofluorescencia directa (IFD)

Con la segunda torunda se practicó en primer lugar una extensión sobre portaobjetos, sobre la que se aplicó un reactivo de IFD a base

de anticuerpos policlonales dirigidos contra lipooligosacáridos de la pared de *B. pertussis* y *Bordetella parapertussis*, conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Becton-Dickinson Diagnostic Systems). Las extensiones se examinaron con un microscopio de fluorescencia con un objetivo de inmersión de 100 aumentos.

PCR en tiempo real

La misma torunda utilizada para la extensión sobre porta se aprovechó posteriormente para la detección de ADN de *B. pertussis*. La extracción del material genético se realizó con el *kit* de extracción Qiagen Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de 200 µl de emulsión de la torunda en solución salina. El extracto recogido en 50 µl de *buffer* de elución se utilizó para amplificar, mediante los primers BP1 (5' GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT3') y BP2 (5' TTCAGGCACAAACTTGATGGGCG3') y detectar, mediante una sonda tipo *molecular beacon* (5' FAM-CGGACCTTCCTACGTCGCCCTCGAAATGGTCCG-BHQ 3'), un fragmento de 181 pb de la secuencia de inserción IS481, específica de *B. pertussis*^{12,14}. La amplificación se produjo en un volumen final de 10 µl, en el que se incluyeron 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer*, 3 mM de MgCl₂, 0,3 µM de la sonda, 1 µl de Master Mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y 2 µl de muestra o controles. En cada mezcla de amplificación se utilizó 0,05 U/µl de uracil-ADN-glicosilasa (Roche Molecular Biochemicals) para evitar la contaminación. Como control positivo interno de la reacción de PCR se usó el LightCycler Control DNA Kit (Roche Molecular Biochemicals), que incluye los *primers* (1 µl) y sondas (0,5 µl) para la amplificación y detección de un fragmento del gen de la β-globina humana. Se utilizaron controles negativos (agua destilada estéril y muestras recogidas de individuos sanos no portadores de *B. pertussis*) y un control positivo (ADN de *B. pertussis*) en cada reacción de amplificación. Para la amplificación se utilizó un instrumento de PCR en tiempo real (LightCycler Instrument, Roche Molecular Biochemicals), con una incubación inicial de 10 min a 95 °C seguida por 35 ciclos de 5 s a 95 °C, 15 s a 58 °C y 15 s a 72 °C. Como medidas generales para evitar la contaminación de las muestras se incluyeron la separación de las áreas de trabajo, el uso de cabinas de seguridad biológica y la utilización de puntas de pipeta con filtro.

Tipificación molecular

Se caracterizaron molecularmente 14 de 17 aislamientos clínicos obtenidos durante el período de estudio, así como 3 cepas obtenidas en 1997, 2000 y 2001, mediante electroforesis en campo pulsante (ECP) tras la extracción de su material genético y digestión con la enzima *XbaI* durante 48 h a 37 °C, según los métodos descritos previamente¹⁵. Los fragmentos de restricción obtenidos fueron separados a 14 °C en un sistema de campos eléctricos homogéneos (CHEF DRIII, BioRad, Richmond, Estados Unidos) sobre un gel de agarosa al 1% con una fuerza de campo de 6 v/cm y 2 bloques de pulsos eléctricos: un primer bloque de 11,5 h con pulsos de 5 a 15 s y un segundo de 11,5 h con pulsos de 15 a 40 s. La migración de los fragmentos de ADN se normalizó usando un marcador de peso molecular standard (Lambda ladder, New England Biolabs, Beverly, Estados Unidos). Los fragmentos de ADN con un tamaño superior a 48,5 kilobases fueron incluidos en el análisis. Los patrones moleculares resultantes fueron analizados con la ayuda de la aplicación informática Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) utilizando una tolerancia del 1,5%. Los patrones de macrorrestricción que se diferenciaron en una o más bandas se consideraron correspondientes a diferentes genotipos¹⁵, identificados con letras.

Resultados

Pacientes y diagnóstico de tos ferina

Se recogieron un total de 121 muestras procedentes de 117 pacientes, de los que, en 108 (92,3%), existía una sospecha clínica de tos ferina, mientras que los 9 restantes (7,7%) eran contactos de pacientes. Un total de 98 (83,8%)

TABLA 1. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *B. pertussis*

	Niños n (%) ^a	Adultos n (%) ^b	Total n (%) ^c
Cultivo	15 (14,7)	2 (10,5)	17 (14,1)
IFD	27 (26,5)	3 (15,8)	30 (24,8)
PCR	38 (37,3)	3 (15,8)	41 (33,9)

^aPorcentajes respecto al número total de muestras procedentes de pacientes pediátricos.

^bPorcentajes respecto al número total de muestras procedentes de pacientes adultos.

^cPorcentajes globales respecto al número total de muestras.

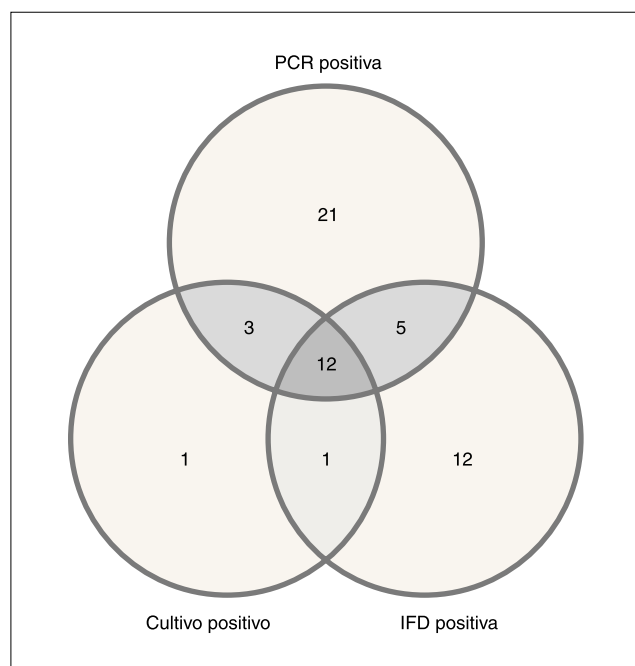


Figura 1. Grado de coincidencia entre los resultados del cultivo, IFD y PCR.

eran pacientes pediátricos, con una edad media de 14,5 meses (rango: 6 días a 12,7 años), y 19 (16,2%) eran adultos, con una edad media de 40,3 años (rango: 17,0-63,3 años).

Se consiguió el aislamiento de *B. pertussis* de 17 muestras (14,1%), correspondientes a 17 pacientes (tabla 1). Un total de 15 aislamientos (88,2%) procedían de niños (rango: 20 días-8,6 meses), y 2 (11,8%) de adultos. La IFD resultó positiva en 30 muestras (24,8%) y la PCR en tiempo real en 41 (33,9%).

En la figura 1 se resume el grado de coincidencia de cada una de las pruebas diagnósticas. En 2 muestras (correspondientes a un adulto de 62 años y un niño de 1 año) se cultivó *B. pertussis* mientras la PCR permaneció negativa (sensibilidad de PCR con relación al cultivo, 88,2%), mientras que en el caso de la IFD, hubo 4 casos de cultivo positivo con IFD negativa (sensibilidad de IFD con relación al cultivo, 76,5%). Por otra parte, se registraron 26 muestras (21,5%) (de 2 pacientes adultos y 24 pediátricos) en las que se detectó ADN de *B. pertussis* con cultivo negativo (especificidad de PCR con relación al cultivo, 75%), y 17 muestras en las que la IFD fue positiva con cultivo negativo (especificidad de IFD con relación al cultivo, 83,6%). El

subgrupo de niños con PCR positiva y cultivo negativo tenía una edad media de 27 meses (rango: 22 días-152,4 meses), superior a la de los niños en los que las dos técnicas, cultivo y PCR, fueron simultáneamente positivas, con 3,6 meses (rango: 20 días-8,6 meses) ($p = 0,09$).

Epidemiología molecular

Un total de 17 aislados clínicos, 14 obtenidos durante el período de estudio y 3 obtenidos en los años 1997, 2000 y 2001, estuvieron disponibles para su caracterización molecular. Se identificaron 5 genotipos mediante ECP (fig. 2). Los genotipos C y E fueron mayoritarios y representaron 8 (47%) y 6 (35,3%) aislados, respectivamente. De los aislamientos pertenecientes al genotipo C 6 se concentraron entre junio y agosto de 2003 y los otros 2 en 1997 y 2001. El genotipo E incluyó únicamente aislados obtenidos entre los meses de abril y julio de 2003. Los otros 3 genotipos incluyeron un solo aislamiento cada uno, 2 de ellos obtenidos en el año 2003 y otro en el año 2000.

Discusión

Diferentes métodos basados en la PCR han sido aplicados con éxito al diagnóstico de tos ferina^{9-11,13,16}, pero la comparación de resultados se complica enormemente debido a sus diferentes diseños, técnicas de extracción, regiones amplificadas y métodos de detección del producto amplificado. Nuestro protocolo se diseñó para detectar una secuencia redundante en el genoma de *B. pertussis*, IS 481, de la que existen unas 80 copias por célula aproximadamente¹⁷. Esta es, de hecho, la región del genoma, junto con las del promotor de la toxina *pertussis*, que más frecuentemente se ha utilizado en la detección molecular de *B. pertussis* y con la que mejores resultados se han obtenido sobre muestras clínicas^{9,10,12,13,16,18}. La región genética elegida como diana de amplificación, además de sensible, ha demostrado ser sumamente específica cuando la técnica se aplicó a microorganismos aislados^{14,18}. Únicamente se han descrito reacciones cruzadas con *Bordetella holmesii*¹⁹, debido al alto grado de homología en la región IS481^{14,17}.

La técnica de PCR en tiempo real descrita en este trabajo se reveló como el método aparentemente más sensible, puesto que consiguió hasta 26 resultados positivos más que el cultivo. Estos datos están en concordancia con la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares descrita en estudios previos^{9,10,13,16}. Pero además conviene tener en cuenta que el propio diseño del estudio pudo sesgar los valores de sensibilidad de la PCR a la baja, ya que la torunda empleada para realizar la extracción y posterior amplificación fue la misma que se empleó previamente para la realización de la de IFD, con lo que parte de su carga bacteriana pudo perderse en la extensión sobre el portaobjetos. Esta circunstancia puede también contribuir a explicar el fallo de la PCR en 2 casos con cultivo positivo. Sin embargo, si aceptamos que la presencia de *B. holmesii* es probablemente infrecuente, queda por aclarar el valor de tantas muestras con PCR positivas aisladas (fig. 1). No es probable que se trate (en todos los casos) de falsos positivos por contaminación de las reacciones de amplificación, ya que se siguieron estrictamente las reglas establecidas para evitarla. Es posible que una cierta inmuni-

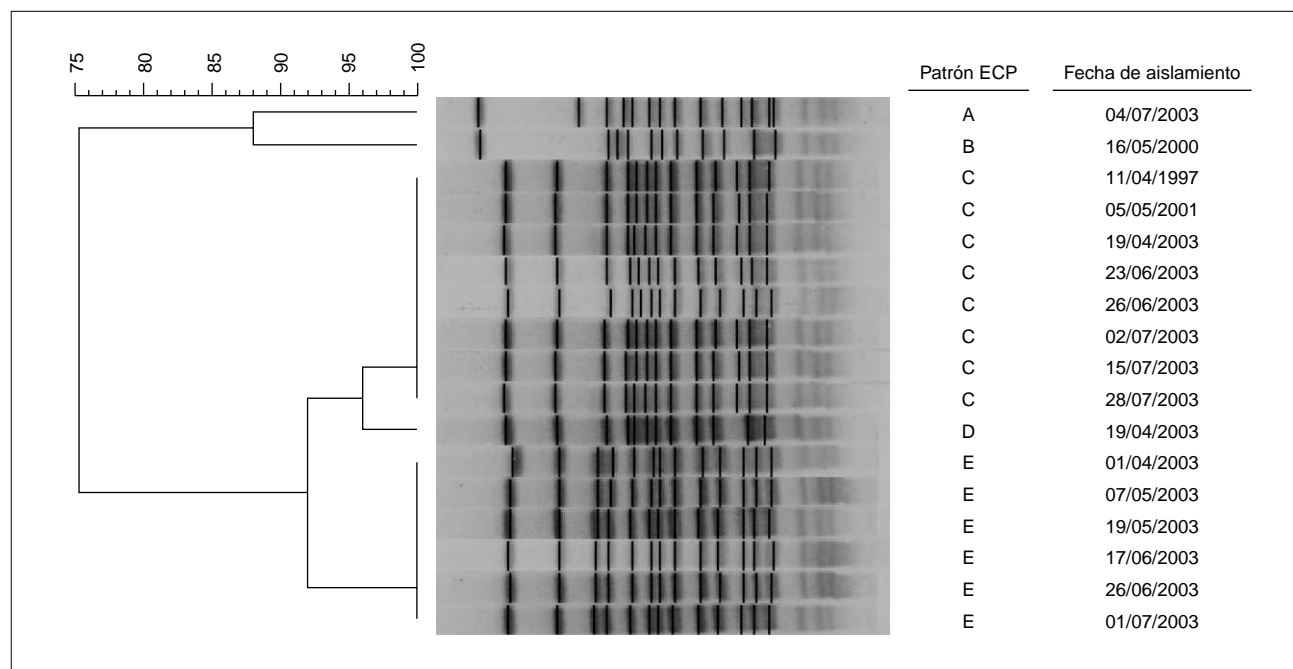


Figura 2. Dendrograma con los patrones de electroforesis en campo pulsante de los aislados clínicos de *B. pertussis*. La escala superior izquierda representa el porcentaje de similitud. ECP: electroforesis en campo pulsante.

dad parcial pueda ser responsable del fallo del cultivo, mientras que no impide la positividad de la PCR²⁰.

A pesar de la limitada sensibilidad del cultivo, la posibilidad de testar la sensibilidad antibiótica y la necesaria vigilancia epidemiológica de las cepas circulantes hacen que mantener esta técnica sea muy conveniente¹¹. En cuanto a la IFD, existen datos contradictorios sobre su valor diagnóstico^{2,10,11,16}, y en algunos laboratorios de referencia se ha desestimado su uso en función de una supuestamente deficiente sensibilidad y especificidad²¹. El único dato objetivo que proporciona nuestro estudio para analizar la IFD (fig. 1) es una sensibilidad con relación al cultivo (76,5%) ligeramente inferior a la que ofrece la PCR (88,2%). Por lo demás, y por las mismas razones que en el caso de la PCR (la ausencia de un estándar de referencia mejor que el cultivo), no es posible saber si los 12 casos en que sólo la IFD fue positiva (fig. 1) son, o no, falsos positivos. Un inconveniente mayor de la IFD es la relativa subjetividad de la lectura de los resultados y la necesidad de experiencia para su interpretación².

Una cuestión sin resolver plenamente es por qué *B. pertussis* no ha dejado de circular entre la población, incluso cuando la que se usaba sistemáticamente era la vacuna celular^{1,3}. Al mismo tiempo, también resultan intrigantes los brotes cíclicos cada 2-5 años, característicos tanto de poblaciones con una gran cobertura vacunal como de las que carecen de protección inmunitaria inducida^{1,5}, así como la incidencia aparentemente creciente de tos ferina que se viene produciendo en los últimos 25 años^{3,4}, fundamentalmente a costa de un cambio en el perfil de la población más frecuentemente afectada³. Entre las teorías expuestas para explicar estos fenómenos^{3,22,23}, una de las que mayor atención ha suscitado en los últimos años es la posible selección de cepas “resistentes” a la acción inmunitaria inducida por la vacunación^{22,24}. Aunque estudios pos-

teriores han descartado esta posibilidad^{23,25-27}, lo que se ha puesto de manifiesto es una continua evolución genética de las cepas circulantes²⁸ que, aunque afecta incluso a los genes que codifican los principales determinantes antigénicos, como la subunidad S1 de la toxina *pertussis* y la pertactina²⁴⁻²⁷, no parece obedecer a una acción selectiva inmunitaria^{23,25,26}, pero tiende a una disminución de la diversidad clonal^{6,7} y la expansión de aquellos clones más “eficaces” que se asocian a los períodos epidémicos cíclicos descritos^{6,24}. Nuestros resultados, en los que se demuestra, no la exclusividad, pero sí el predominio de dos únicos clones, son concordantes con estos estudios previos.

Este estudio muestra que la técnica de la PCR en tiempo real aplicada al diagnóstico proporciona muchos más resultados positivos que la IFD y el cultivo, pero la existencia, o no, de falsos positivos debe ser aclarada en el futuro. Nuestros resultados sugieren que dos cepas de *B. pertussis* fueron las responsables de la mayoría de los casos observados durante el período de estudio, y parece evidente que una de ellas estuvo presente, al menos, desde 1997. Estos resultados, creemos que los primeros de estas características extraídos de población española, indican que es probable que sólo un limitado número de clones circulen en poblaciones con gran cobertura vacunal.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Mar Aguilera y Antonia Martín su excelente asistencia técnica.

Bibliografía

- Cherry JD. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis.* 1996;174(S3):259-63.
- Marcon JM. Clinical and laboratory diagnostic features of *Bordetella* spp. Pertussis and beyond. *Clin Microbiol Newsl.* 1997;19:185-91.

3. Hewlett EL, Edwards KM. Pertussis-Not just for kids. *N Engl J Med*. 2005; 352:1215-22.
4. Poynten M, McIntyre PB, Mooi FR, Heuvelman KJ, Gilbert GL. Temporal trends in circulating *Bordetella pertussis* strains in Australia. *Epidemiol Infect*. 2004;132:185-93.
5. Guris D, Strebel PM, Bardenheier B, Brennan M, Tachdjian R, Finch E, et al. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults 1990-1996. *Clin Infect Dis*. 1999;28:1230-7.
6. Schouls LM, Van der Heide HG, Vauterin L, Vauterin P, Mooi FR. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J Bacteriol*. 2004;186:5496-505.
7. Hardwick TH, Cassidy PK, Weyant RS, Bisgard KM, Sanden GN. Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of *B. pertussis* isolated in the United States, 1935 to 1999. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:44-9.
8. Hallander H. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis*. 1999;28 (Suppl 2):99-106.
9. Lind-Brandberg L, Welinder-Olsson C, Lagergard T, Taranger J, Trollfors B, Zackrisson G. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *J Clin Microbiol*. 1998;36:679-83.
10. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2872-6.
11. McGowan KL. Diagnostic tests for pertussis: Culture vs. DFA vs. PCR. *Clin Microbiol Newsl*. 2002;24:143-9.
12. Poddar SK, Le CT. *Bordetella pertussis* detection by spectrofluorometry using polymerase chain reaction (PCR) and a molecular beacon probe. *Mol Cell Probes*. 2001;15:161-7.
13. Templeton KE, Scheltinga SA, Van der Zee A, Diederien BMW, Kruijsen AM, Goossens H, et al. Evaluation of Real-Time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4121-6.
14. Poddar SK. Detection and discrimination of *B. pertussis* and *B. holmesii* by real-time PCR targeting IS481 using a beacon probe and probe-target melting analysis. *Mol Cell Probes*. 2003;17:91-8.
15. Advani A, Donnelly D, Hallander H. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2890-7.
16. Tilley PAG, Kanchana MV, Knigh I, Blondeau J, Antonishyn N, Deneer H. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, polymerase chain reaction, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;37:17-23.
17. Glare EM. Analysis of a repetitive sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1982-7.
18. Poddar SK. Differential detection of *B. pertussis* from *B. parapertussis* using a polymerase chain reaction (PCR) in presence of SYBR green1 and amplicon melting analysis. *Mol Cell Probes*. 2004;18:429-35.
19. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2000;38:467.
20. Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, Jensen JS. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol*. 2004;53:749-54.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for the control of pertussis outbreaks. Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, 2000.
22. Mooi FR, Van Oirschot H, Heuvelman K, Van der Heide HGJ, Gaastra W, Willems RJJ. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun*. 1998;66:670-5.
23. Bisgard K, Christie CDC, Reising DF, Sanden GN, Cassidy PK, Gomersall C, et al. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* by pulsed-field gel electrophoresis profile: Cincinnati, 1989-1996. *J Infect Dis*. 2001;183:1360-7.
24. Van Loo IH, Van der Heide HG, Nagelkerke NJ, Verhoef J, Mooi FR. Temporal trends in the population structure of *Bordetella pertussis* during 1949/1996 in a highly vaccinated population. *J Infect Dis*. 1999;179:915-23.
25. Mastrantonio P, Spigaglia P, Van Oirschot H, Van der Heide HGJ, Heuvelman K, Stefanelli P, et al. Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology*. 1999;145:2069-75.
26. Hallander HO, Advani A, Donnelly D, Gustafsson L, Carlsson RM. Shifts of *Bordetella pertussis* variants in Sweden from 1970 to 2003, during three periods marked by different vaccination programs. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2856-8.
27. Gzyl A, Augustynowicz E, Gniadek G, Rabczenko D, Dulny G, Slusarczyk J. Sequence variation in pertussis S1 subunit toxin and pertussis genes in *Bordetella pertussis* strains used for the whole-cell pertussis vaccine produced in Poland since 1960. Efficiency of the DTwP vaccine-induced immunity against currently circulating *B. pertussis* isolates. *Vaccine*. 2004;22:2122-8.
28. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol*. 2001;39:4396-403.