

# Uzamış Öksürüğü Olan Çocuklarda Kültür, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Seroloji ile *Bordetella pertussis* Enfeksiyonunun Araştırılması\*

## Detection of *Bordetella pertussis* Infection by Culture, Real-Time Polymerase Chain Reaction and Serologic Tests Among Children with Prolonged Cough

Derya GÜRSEL<sup>1</sup>, Aslı ASLAN<sup>2</sup>, Cemile SÖNMEZ<sup>3</sup>, Güldane KOTUROĞLU<sup>2</sup>, Nilay ÇÖPLÜ<sup>3</sup>, Zafer KURUGÖL<sup>2</sup>, Şöhret AYDEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>1</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>2</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, İzmir, Turkey.

<sup>3</sup> Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara.

<sup>3</sup> Refik Saydam National Public Health Agency, Department of Communicable Diseases Research, Ankara, Turkey.

\* Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlük Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 24.09.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 27.12.2011

### ÖZET

Boğmaca, *Bordetella pertussis*'in neden olduğu, tüm yaş gruplarını etkileyen, bulaşıcı bir solunum sistemi enfeksiyonudur. Özellikle yenidoğan ve bebeklerde yüksek morbidite ve mortaliteye yol açar. Ergen ve erişkinlerde atipik ve ılımlı seyreden hastalığa çoğu zaman tanı konulamamakta; bu hastalar duyarlı bebek ve çocuklara bulaşmada önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Bu nedenle iki haftadan daha uzun süren öksürük semptomu olan çocuk ve ergenlerde *B.pertussis* enfeksiyonunun laboratuvar incelemeleriyle araştırılması önerilmektedir. Bu çalışmada, uzamış öksürüğü olan çocuk yaş grubu hastalarda kültür, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) ve serolojik yöntemler ile *B.pertussis* enfeksiyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genel Pediatri Polikliniğine Aralık 2009-Ağustos 2010 tarihleri arasında başvuran, uzamış ( $\geq 14$  gün) öksürüğü olan 2 ay-14 yaş (ortanca: 7.0) arasındaki 51 (19 kız, 32 erkek) hasta dahil edilmiştir. Olguların 48 (%94)'i yaşına uygun olarak aşı şeması uygulanan, üçü ise boğmaca aşısı yapılmamış hastalar olup, 38 (%75) olgunun başvuru öncesinde antibiyotik kullandığı belirlenmiştir. Hastalardan alınan nazofarengeal sürüntü örneklerinde *B.pertussis* araştırılması için kültür (%7 at kanı ve kömür içeren Borde-

**İletişim (Correspondence):** Uzm. Dr. Derya Gürsel, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, 35100 İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 390 3303, **E-posta (E-mail):** deryagursel@gmail.com

tella Agar; Becton Dickinson, Almanya) ve IS481 gen bölgesinin hedeflendiği Rt-PCR (Roche Applied Science, Almanya) yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca 2-4 hafta arayla elde edilen iki serum örneğinde anti-pertussis toksin (anti-PT) IgG ve antifilamentöz hemaglutinin (anti-FHA) IgG düzeylerinin ölçüldüğü "in-house" ELISA çalışılmış; antikor titresinde dört kat artış veya tek serum örneğinde 100 EU/ml'nin üzerindeki anti-PT IgG titreleri *B.pertussis* enfeksiyonunun serolojik kanıtı olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya alınan 51 hastadan birinin nazofarengeal sürüntü kültüründe *B.pertussis* üremiş; 6 (%11.8) hastanın nazofarengeal sürüntü örneğinde IS481 Rt-PCR testi ile pozitiflik saptanmış ve 9 (%17.6) olgu serolojik testlerle *B.pertussis* enfeksiyonu olarak değerlendirilmiştir. Buna göre toplam 12 hastada en az bir yöntemle pozitif sonuç alınmış; bu hastalardan birinde her üç yöntemle, ikisinde IS481 Rt-PCR ve serolojik testlerle, üçünde sadece IS481 Rt-PCR ile, altısında ise sadece serolojik testlerle tanı konulmuştur. Dolayısıyla çalışmamızda, uzamış öksürüğü olan çocukların %23.5 (12/51)'inde *B.pertussis* enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu olguların (5 kız, 7 erkek) yaş aralığı 2 ay-11 yıl arasında olup, biri aşılanmamış, dördü aşı şeması tamamlanmamış hastalardır. Sonuç olarak, uzamış öksürüğü olan çocuklarda *B.pertussis* varlığının araştırılmasında kültür, PCR ve serolojik testlerin kullanılması gerektiği ve bu alanda standardize edilmiş testlere ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Bordetella pertussis*; kültür; seroloji; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; uzamış öksürük.

## ABSTRACT

Pertussis is a respiratory infection caused by *Bordetella pertussis*. It attacks all age groups. It has significantly higher mortality and morbidity among newborns and children. Adolescents and adults with symptomatic but unrecognized pertussis are often the source of the infection for pediatric cases. Therefore, it is suggested to perform laboratory diagnostic tests for *B.pertussis* infection in children and adolescents with prolonged cough of more than two weeks. In this study, it was aimed to identify *B.pertussis* infection by culture, real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) and serological methods among children with prolonged cough. Nasopharyngeal swab samples were obtained from 51 children (19 female, 32 male; age between 2 months-14 years; median age: 7.0), who attended the outpatient clinic of Ege University Medical Faculty Department of Pediatrics, Izmir, Turkey with prolonged cough ( $\geq 14$  days) during December 2009-August 2010. While pertussis vaccination had been completed in 48 (94%) of the cases, three cases had not been vaccinated. Previous antibiotic treatment was reported for 38 (75%) of the cases. Cultivation was done by using 7% horse blood and charcoal containing Bordetella Agar (Becton Dickinson, Germany) and Rt-PCR targeting IS481 sequence (Roche Applied Science, Germany) was used to detect *B.pertussis*. In addition, in house ELISA was performed to detect titers of anti-pertussis toxin (anti-PT) IgG and anti-filamentous hemagglutinin (anti-FHA) IgG antibodies in paired sera collected in 2-4 week intervals. Fourfold titer increase of antibodies or anti-PT IgG levels of at least 100 EU/ml in one serum were evaluated as serological confirmation of *B.pertussis* infection. In our study, *B.pertussis* was isolated from one nasopharyngeal swab samples culture among the 51 patients, and IS481 Rt-PCR yielded positive results for *B.pertussis* in 6 (11.8%) samples. Nine (17.6%) patients were diagnosed as *B.pertussis* infection by serological tests. Totally 12 patients were evaluated as positive using at least one method. Among them only one had positive results with three of the tests used and two were positive with IS481 Rt-PCR assay and serologic tests. Three patients were found positive with only IS481 Rt-PCR and six were identified only with serologic diagnosis. In this study, 23.5% (12/51) of children with persistent cough were evaluated as having *B.pertussis* infection. The age range of these cases (5 female, 7 male) was 2 months-11 years and one case had not been vaccinated at all while four cases had not completed the vaccination schedule. It was concluded that since *B.pertussis* can be detected as the etiologic agent of persistent cough in a significant number of children by culture, PCR and serologic tests, diagnostic tests must be applied to evaluate *B.pertussis* infection. However, standardized serological methods and PCR protocols are needed for accurate and reliable diagnosis.

**Key words:** *Bordetella pertussis*; culture; serology; real time polymerase chain reaction; prolonged cough.

## GİRİŞ

Boğmaca, *Bordetella pertussis*'in neden olduğu tüm yaş gruplarını etkileyen bulaşıcı bir solunum sistemi enfeksiyonudur. Özellikle yenidoğan ve bebeklerde yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Aşılama programlarının uygulanmaya başlamasından bu yana, hastalığın ortaya çıkış sıklığı ve ölüm oranlarında belirgin düşüş olmuştur<sup>1,2</sup>. Bununla beraber boğmaca, son 20 yılda yeniden artma eğilimindedir. Aşının sağladığı koruyuculuğun yıllar içinde azaldığı, yaygın aşılama faaliyetinin doğal yoldan oluşan bağışıklamayı engellediğı ve böylelikle yaygın aşılanmanın olduğu bölgelerde ergen ve erişkinlerin bu hastalığa karşı daha duyarlı hale geldiğı savunulmaktadır<sup>2,3</sup>. Ergen ve erişkinlerde atipik ve ılımlı seyreden hastalığa çoğu zaman tanı konulamamakta; bu hastalar duyarlı bebek ve çocuklara bulaşmada önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Bu nedenle iki haftadan uzun süren öksürüğü olan çocuk ve ergenlerde *B.pertussis* enfeksiyonunun laboratuvar incelemeleriyle araştırılması önerilmektedir<sup>1-3</sup>.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC; Centers for Disease Control and Prevention) tarafından boğmaca olgu tanımları yapılmıştır; ancak boğmaca özellikle ergen ve erişkinlerde tanısı zor konulan bir hastalıktır. Öykü ve fizik muayene bulguları ile tanı konulduğunda birçok olgu yanlış tanımlanmakta ya da atlanmaktadır. Bu nedenle klinik tanının laboratuvar ile doğrulanması önemlidir. Boğmacanın mikrobiyolojik tanısında; kültür, direkt antijen testi, moleküler ve serolojik yöntemler kullanılabilmektedir<sup>2,4</sup>. Bu çalışmada, uzamış öksürüğü olan 0-18 yaş grubu hastalarda kültür, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) ve serolojik yöntemlerle *B.pertussis* enfeksiyonunun araştırılması amaçlanmıştır; *B.pertussis* tanı testlerinin rutin laboratuvar çalışmalarına yerleştirilmesi ve boğmaca tanısında kliniklere laboratuvar desteğı verilmesi hedeflenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hastalar ve Örnekler

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genel Pediatri Polikliniğine Aralık 2009-Ağustos 2010 tarihleri arasında başvuran, 14 günden uzun süren öksürüğü olan ve öksürüğe sebep olacak başka bir tanısı bulunmayan 0-18 yaş grubu 51 hasta çalışmaya alındı. Başvuru sırasında astım, tüberküloz, kronik bronşit, reaktif hava yolu hastalığı, gastroözefageal reflü hastalığı, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü ilaç kullanımı gibi kronik öksürük nedenleri olanlar veya öykü ve fizik muayenede bunlardan şüphelenilen hastalar ile bilinen immünyetmezliğı olanlar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışma etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Hasta ve hasta yakını çalışma hakkında bilgilendirildi, "bilgilendirilmiş onam formu" hasta yakını tarafından dolduruldu.

Polikliniğe ilk başvuru sırasında hastalardan bir adet nazofarengeal sürüntü (NFS) örneğı ve bir serum örneğı, 2-4 hafta sonra yine bir serum örneğı alındı. NFS, uzman hekim tarafından rayon uçlu, esnek saplı eküvyon (Transwab, İngiltere) ile nostrilden girilip nazofarenks arka duvarında 3-5 saniye rotasyon yapılarak alındı. Kömürlü Amies taşı-

ma besiyerinde (Transwab, İngiltere) birkaç saat içinde Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarına ulaştırıldı. NFS örnekleri kültür ve Rt-PCR testi için kullanıldı. Hastalardan polikliniğe ilk başvuruda ve 2-4 hafta sonra elde edilen serum örnekleri alikotlanarak antipertussis toksin (anti-PT) IgG ve antifilamentöz hemaglutinin (anti-FHA) IgG ELISA testleri uygulanıncaya kadar -80°C'de saklandı.

### Kültür ve Direkt Floresan Antikor (DFA) Testi

*B.pertussis* izolasyonu için NFS örnekleri, "%7 at kanı ve odun kömürü (charcoal) içeren Bordetella Agar (Becton Dickinson, Almanya)" ticari besiyerine ekildi. Plaklar 36°C'de, nemli ortamda, parafilm ile sarılarak 10 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinde, plaklar şüpheli koloniler açısından her gün kontrol edildi; şüpheli koloniler (üçüncü günden sonra üreyen, yaklaşık 1 mm çaplı, parlak, inci renkli S koloniler) pasajlandı. Bunlardan gram-negatif boyanan ince basil morfolojisine sahip, katalaz pozitif, üreaz negatif, hareketsiz olan ve koyun kanlı agarda üremeyen bakteriler, tanımlama için DFA ve IS481 gen bölgesinin hedeflendiği Rt-PCR testine alındı. Örneklerle eş zamanlı olarak başka bir plağa *B.pertussis* ATCC 9797 standart suşu pasajlanarak üreme kontrol edildi.

Kültürde üreyen şüpheli kolonilerin tanımlanmasında kullanılan DFA testi, üretici firmanın (Difco FA *Bordetella pertussis*; Becton Dickinson, ABD) önerilerine göre uygulandı ve değerlendirildi. Testte, kit ile sağlanan FITC ile işaretli poliklonal *B.pertussis* antikoruna kullanıldı. Antiserumun ve yöntemin kontrolü için, pozitif (*B.pertussis* ATCC 9797) ve negatif (*Bordetella parapertussis* ATCC 15311 ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları) antijen kontrolleri de test edildi. Pozitif ve negatif kontrol preparatları, NFS örneğinden yapılan kültürde üreyen şüpheli koloniden hazırlanan preparatla eş zamanlı olarak hazırlandı, boyandı ve değerlendirildi.

NFS örnekleri, ekim yapıldıktan sonra 400 µl fosfat tamponu (PBS) içinde süspansiyon edilip 200 µl'lik iki alikot şeklinde DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

### Gerçek Zamanlı PCR (Rt-PCR) Testi

Daha önce ayrılmış olan 200 µl'lik NFS örneklerinden DNA ekstraksiyonu, "High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Almanya)" ile önerildiği şekilde yapıldı. Elde edilen 200 µl'lik nükleik asit solüsyonunun 5 µl'si amplifikasyona alındı. Her çalışmada negatif kontrol olarak PBS ve pozitif kontrol olarak *B.pertussis* ATCC 9797 suşunun PBS içindeki süspansiyonu kullanıldı. NFS örneklerinde *B.pertussis* DNA'sının araştırılması amacıyla *B.pertussis* için IS481, *B.parapertussis* için IS1001 gen bölgesinin hedeflendiği kantitatif multipleks Rt-PCR yöntemi uygulandı. Çalışmada "LightCycler FastStart DNA Master HybProbe, Versiyon Ocak 2006 (Roche Applied Science, Almanya) "PCR için "hot start" reaksiyon karışımı ve "LightMix (*Bordetella pertussis* ve *parapertussis*) Kit (Roche Diagnostics LightCycler 1.x/2.0 ve 480 II cihazları için) (TIB MOLBIOL GmbH, Almanya)" ticari kitleri kullanıldı.

Kullanılan kit ile *B.pertussis* için IS481 bölgesinden 130 baz çift (bc)'lik bir bölüme amplifikasyonu yapılmakta, LC640 işaretli hibridizasyon problemleriyle saptanmak-

tadır. *B.parapertussis* için ise IS1001 bölgesinden 97 bç'lik bir bölümün amplifikasyonu yapılmakta, saptamada LC690 işaretli hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır. Internal kontrol (İK) LC640 işaretli kısa problemlerle saptanmakta ve ergime eğrisinde 49.5°C'de pik oluşturmaktadır. Kit içeriğine göre testin duyarlılığı 10 kopya *B.pertussis/B.parapertussis* DNA'sı; linear ölçüm aralığı ise  $10^2$ - $10^6$  kopya *B.pertussis/B.parapertussis* DNA'sıdır.

Test için "LightCycler 1.5" cihazı, kit önerisinde belirtildiği şekilde programlandı ve yöntem kit önerilerine uygun olarak çalışıldı. Kit ile sağlanan *B.pertussis* ve *B.parapertussis* için  $10^5$  hedef molekül/5 µl konsantrasyondaki kontrol DNA'ları, ATCC 9797 suşunun PBS içindeki süspansiyonundan elde edilen DNA ekstraktı ve nükleazdan arındırılmış distile su her çalışmaya dahil edildi. Hasta örneklerinin çalışılmasından önce *B.pertussis* ATCC 9797 suşu ile hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstrakte edilen örneğin elüsyon tamponu içinde 10 kat dilüsyonları (7 dilüsyon) hazırlandı. Testin performansının değerlendirilmesi için DNA ekstraktının dilüsyonları Rt-PCR testine alındı.

Amplifikasyon, saptama ve veri analizi "LightCycler 1.5" cihazında gerçekleştirildi. Sonuçlar hedef DNA kopya sayısı olarak elde edildi. Örnekte floresans sinyali yokken internal kontrolde 49.5°C'de pik gözlenmişse ve ekstraksiyon ve amplifikasyon için pozitif kontroller pozitif, negatif kontroller negatif sonuçlanmış ise test sonucu negatif kabul edildi. Negatif kontroller negatif veya pozitif kontroller pozitif olarak sonuçlanmamışsa ya da örnekler negatif olduğu durumda internal kontrolde floresans gözlenmemişse test geçersiz kabul edildi ve tekrarlandı.

### Serolojik Testler

Hastaların ilk başvurusunda ve 2-4 hafta sonra elde edilen serum örneklerinde, anti-pertussis toksin (PT) IgG ve antifilamentöz hemagglutinin (FHA) IgG antikor seviyelerinin saptanması için daha önce standardize edilmiş olan "in-house" kantitatif indirekt ELISA yöntemi kullanıldı<sup>5</sup>. Düz tabanlı 96 çukurlu mikropiplakların (Greiner, Almanya) antijenle kaplanması aşamasında, saflaştırılmış "Pertussis Toxin" ve "Pertussis Filamentous Hemagglutinin" (10'ar µg PN/ampul, Japonya) kullanıldı. Test günü %0.5 sığır serum albumini ile inkübatörde bloke edildi. Plaklar üç kez %0.05 Tween 20 içeren PBS ile yıkandı ve bu işlem her inkübasyondan sonra tekrarlandı. Referans serum ve hasta serumları iki kat artan sekiz seri dilüsyonda hazırlandı ve plaklar bu aşamada ve takip eden aşamalarda 22°C'de bir saat inkübe edildi. Konjugat aşamasında; "Fc-specific alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG" (Seikagaku, Kogyo, Japonya); substrat aşamasında dietanolamin tamponda 1 mg/ml, pH: 9.6 sulandırılmış "P-nitrophenyl phosphate" (Sigma N2765); durdurma aşamasında ise 3M NaOH uygulandı. Mikropiplaklar ELISA okuyucusu (Labsystem, Finlandiya) kullanılarak 405/630 nm dalga boylarında okutuldu. Anti-PT ve anti-FHA IgG antikor seviyeleri "paralel line assay" ile boğmaca referans serum (anti-PT için 250 EU/ampul ve anti-FHA için 400 EU/ampul) ile karşılaştırma yapılarak hesaplandı ve ELISA ünitesi/ml (EU/ml) şeklinde ifade edildi. Bu testte saptanabilen en düşük anti-PT ve anti-FHA antikor konsantrasyonu 1.0 EU/ml'dir<sup>5,6</sup>. İlk serum örneği

ile karşılaştırıldığında ikinci serum örneğinde anti-PT IgG ve anti-FHA IgG titresinde dört kat titre artışı ve tek serum örneğinde 100 EU/ml'nin üzerindeki anti-PT IgG titresi seropozitiflik olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların 19 (%37)'u kız, 32 (%63)'si erkek olup, yaş aralığı 2 ay-14 yaş (ortanca: 7.0) arasında değişmektedir. Olguların 48 (%94)'i yaşına uygun olarak aşı şeması uygulanmış, üçü ise boğmaca aşısı yapılmamış hastalar olup, 38 (%75)'inin başvuru öncesinde antibiyotik kullanım öyküsü vardır (Tablo I). Uzamış öksürüğü olan hastaların polikliniğe başvurularına kadar olan öksürük süreleri 15-180 gün arasındadır (Tablo I).

Çalışılan 51 hastaya ait NFS örneklerinden 1 (%1.96)'inde kültür, 6 (%11.8)'sında ise IS481 Rt-PCR pozitifliği saptanmıştır (Tablo I). Serolojik tanı için 31 (%61) hastadan 2-4 hafta arayla çift, 20 (%39) hastadan ise tek serum örneği alınabilmiş ve 9 (%17.6) olguda serolojik testlerde pozitiflik belirlenmiştir (Tablo I). Toplam 12 (%23.5) hastada en az bir yöntemle pozitiflik tespit edilmiştir (Tablo II).

*B.pertussis* ATCC 9797 suşundan elde edilen DNA örneğinin IS481 Rt-PCR amplifikasyon eğrileri, ürünlerin "crossing point" ve konsantrasyonları Resim 1'de gösterilmiştir. *P.aeruginosa* DNA süspansiyonu (negatif kontrol), amplifikasyona alındığında negatif sonuç vermiştir (Resim 1).

Başvuru sırasında 30 günden kısa süredir öksürük semptomu olan 15 hastanın birinde her üç yöntemle pozitiflik saptanmıştır. İki olguda IS481 Rt-PCR ve seroloji pozitifliği, üçünde sadece IS481 Rt-PCR, birinde ise sadece seroloji pozitifliği belirlenmiştir. Öksürük semptomunun 30-60. gününde başvuran 17 hastanın dördünde sadece serolojik testlerde pozitiflik izlenmiştir. Polikliniğe başvuru sırasında 60 gün ve daha uzun süredir öksürüğü olan 19 olgunun ise sadece birinde seroloji pozitifliği görülmüştür. *B.pertussis* enfeksiyonu yönünden yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda, pozitiflik saptanan 12 (5 kız, 7 erkek) olgunun yaş aralığı 2 ay-11 yaş (ortanca: 6.5) arasındadır. *B.pertussis* enfeksiyonu olan olguların Aralık 2009-Ağustos 2010 tarihleri arasında aylara göre dağılımları Şekil 1'de görülmektedir.

## TARTIŞMA

*B.pertussis* enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı; kültür, DFA ile antijen saptama, PCR ve serolojik yöntemlerle yapılmaktadır. DFA testi, hızlı, ucuz ve basit bir yöntem olmakla birlikte özgüllük ve duyarlılığı (%30-71) düşüktür<sup>7</sup>. Değerlendirmenin subjektif olması, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar ile sık karşılaşılması gibi nedenlerle CDC, DFA testinin kullanımını önermemekte, kullanılırsa mutlaka kültürle birlikte yapılması gerektiğini vurgulamaktadır<sup>7,8</sup>. Birçok ülkenin sürveyans sisteminde DFA, *B.pertussis* enfeksiyonunun laboratuvar kanıtı olarak kabul edilmemektedir<sup>1</sup>. Bu kısıtlamalar nedeniyle çalışmamızda DFA testi, sadece kültürde üreyen şüpheli bakterilerin tanımlanmasında kullanılmıştır.

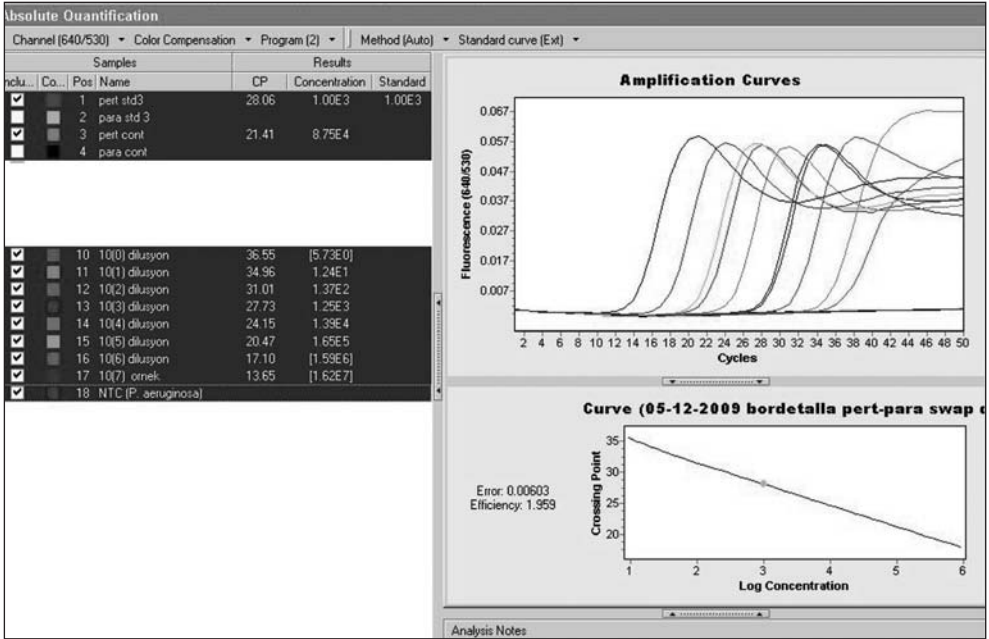
**Tablo I. Çalışmaya Alınan Hastaların Özellikleri ve Mikrobiyolojik Tanı Sonuçları**

Hasta no	Yaş (yıl)	Aşılama durumu	Antibiyotik kullanımı	Öksürük süresi (gün)	Kültür	IS487 Rt-PCR	Serolojik tanı
1	2	E	V	35	N	N	N
2	6	E	V	60	N	N	N
3	11 ay	E	Y	25	N	N	N
4	5	E	V	20	N	N	N
5	7	E	V	45	N	N	N
6	5	E	V	60	N	N	N
7	6	E	V	120	N	N	N
8	3	E	V	60	N	N	N
9	4	E	V	20	N	N	N
10	6	H	Y	30	N	N	N
11	8	H	Y	30	N	N	N
12	4	E	Y	60	N	N	N
13	4	E	V	150	N	N	N
14	5	E	V	60	N	N	N
15	14	E	V	30	N	N	N
16	7	E	Y	150	N	N	N
17	10	E	V	90	N	N	N
18	8	E	V	60	N	N	N
19	6	E	V	60	N	N	N
20	7	E	V	30	N	N	N
21	5	E	V	30	N	N	P
22	2	E	V	30	N	N	N
23	8	E	Y	90	N	N	N
24	9	E	V	20	N	N	P
25	7	E	V	60	N	N	N
26	2 ay	H	Y	15	N	10 <sup>2</sup> kopya	N
27	13	E	V	30	N	N	N
28	14	E	V	75	N	N	N
29	6	E	V	180	N	N	N
30	7	E	V	90	N	N	N
31	10	E	V	30	N	N	P
32	12	E	V	60	N	N	N
33	14	E	Y	30	N	N	N
34	10	E	V	15	N	N	N
35	12	E	V	30	N	N	N
36	6	E	V	15	N	N	N
37	11	E	V	50	N	N	N

**Tablo 1. Çalışmaya Alınan Hastaların Özellikleri ve Mikrobiyolojik Tanı Sonuçları (Devamı)**

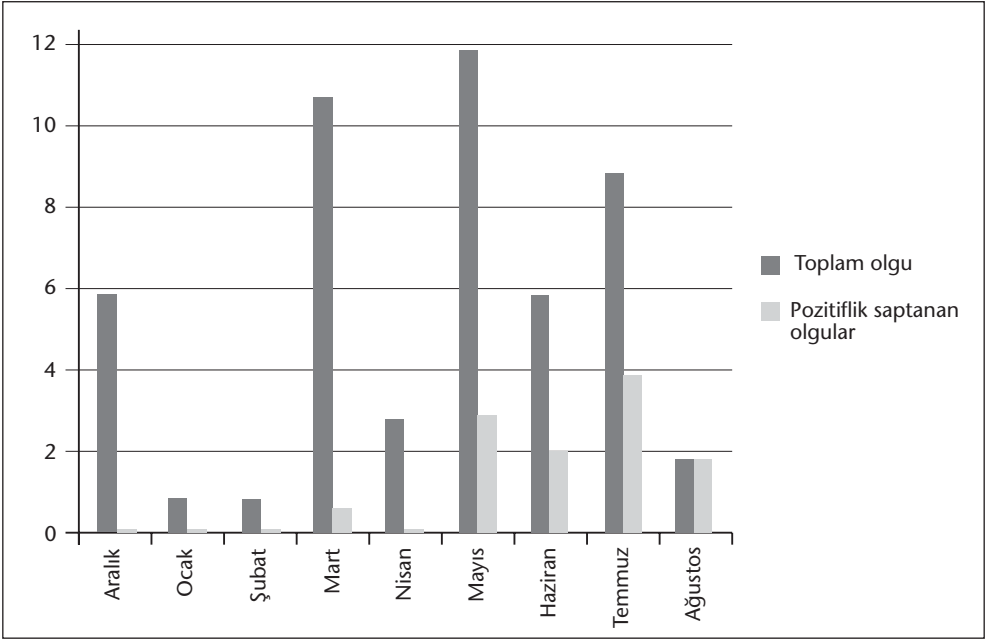
Hasta no	Yaş (yıl)	Aşılama durumu	Antibiyotik kullanımı	Öksürük süresi (gün)	Kültür	IS481 Rt-PCR	Serolojik tanı
38	10	E	Y	15	N	N	N
39	10	E	V	20	N	10 <sup>2</sup> kopya	N
40	11	E	V	30	N	N	P
41	2 ay	H	V	20	N	N	N
42	2 ay	E (1 doz)	Y	15	N	10 <sup>4</sup> kopya	N
43	2	E	V	15	N	N	N
44	9	E	Y	60	N	N	P
45	3 ay	E (1 doz)	V	15	N	10 <sup>2</sup> kopya	P
46	9	E	V	180	N	N	N
47	14	E	V	30	N	N	N
48	3 ay	E (1 doz)	Y	15	N	10 <sup>6</sup> kopya	P
49	10 ay	E (3 doz)	V	20	P	10 <sup>6</sup> kopya	P
50	8	E	Y	30	N	N	P
51	14	E	V	30	N	N	N

Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; E: Boğmaca aşısı yaşına uygun olarak yapılmış; H: Boğmaca aşısı yapılmamış; V: Var; Y: Yok; P: Pozitif; N: Negatif.



**Resim 1.** 0.5 McFarland standardı olarak hazırlanan ATCC 9797 standart suşunun 200 µl'sinden elde edilen DNA ekstraktının ve bunun 10 katlık yedi dilüsyonunun IS481 Rt-PCR amplifikasyon eğrileri (negatif kontrol olarak *P.aeruginosa* suşunun DNA ekstraktı kullanılmıştır).





Şekil 1. Aralık 2009-Ağustos 2010 tarihleri arasında Bordetella pertussis enfeksiyonu için yapılan mikrobiyolojik tanı testlerinde pozitiflik saptanan olguların aylara göre dağılımı.

Tablo II. Tanı Testlerinden Herhangi Birinde Pozitiflik Saptanan Hastalara Ait Sonuçlar

Hasta no	Öksürük süresi (gün)	Anti-PT IgG (EU/ml)		Anti-FHA IgG (EU/ml)		IS481 Rt-PCR	Kültür
		1. serum	2. serum	1. serum	2. serum		
21	30	36.15	287.23	23.63	635.99	N	N
24	20	12.26	302.9	11.71	26.56	N	N
26	15	8	Alınamadı	16.38	Alınamadı	10 <sup>2</sup> kopya	N
31	30	13.62	90.23	22.12	140.29	N	N
39	20	25.46	Alınamadı	41.78	Alınamadı	10 <sup>2</sup> kopya	N
40	30	97.07	133.471	121.06	197.57	N	N
42	15	2.01	Alınamadı	7.97	Alınamadı	10 <sup>4</sup> kopya	N
44	60	110.9	133.4	0.81	10.51	N	N
45	15	2.93	226.56	38.02	218.53	10 <sup>2</sup> kopya	N
48	15	5.11	64.94	6.9	55.23	10 <sup>6</sup> kopya	N
49	20	80.02	288.44	43.61	101.6	10 <sup>6</sup> kopya	P
50	30	153.7	Alınamadı	70.61	Alınamadı	N	N

Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; P: Pozitif; N: Negatif.

Kültür ve PCR ile *B.pertussis* araştırılmasında, bakterinin tutunduğu üst solunum yolunun siliyalı epitelini içeren nazofarengeal aspirat veya nazofarenks arka duvarı sürüntüsü tercih edilen örneklerdir. Boğaz sürüntüsü, burun sürüntüsü ve balgam, siliyalı epiteli içermediğinden ve çok sayıda normal flora üyesi bulduğundan uygun örnekler değildir. NFS örneğinin alınması invaziv değildir ve rutin kullanım için pratiktir. Bu çalışmada çocuk yaş grubu poliklinik hastaları hedeflendiğinden, hasta uyumunun daha iyi olduğu NFS örnekleri tercih edilmiştir. NFS, esnek tel saplı, dakron ya da rayon uçlu eküvyon ile alındığında hem kültür hem de nükleik asit testi için uygun örnektir. Pamuk uçlu eküvyonların içerdikleri yağ asitleri nedeniyle *B.pertussis* kültürü için inhibitör olması; kalsiyum aljinat uçlu eküvyonların ise PCR'yi inhibe etmesi nedeniyle, bu çalışmada rayon uçlu esnek tel saplı eküvyonlar kullanılmıştır<sup>4,7,9</sup>. Uygulanan PCR testinde hiçbir örnekte inhibisyona rastlanmamıştır.

Kültür, *B.pertussis* enfeksiyonu tanısında en özgül yöntem olarak kabul edilmektedir; ancak duyarlılığı düşüktür. Yapılan çalışmalarda kültürün duyarlılığı, hastanın semptomlarının süresi, yaşı, aşılama durumu, antibiyotik kullanımı gibi faktörlere, örnek alım ve transport koşullarına ve kullanılan besiyerine bağlı olarak değişmektedir<sup>7</sup>. Öksürük semptomunun ilk iki haftasında etkenin kültürde izolasyon oranları daha yüksektir. Ancak tipik hastalık tablosu yerleştiğinde bu oranlar düşer. Yapılan farklı çalışmalarda kültürün duyarlılığı için %12-60 arasında değişen oranlar bildirilmiştir<sup>10</sup>. *B.pertussis* izolasyonu için Bordet-Gengou ve Regan-Lowe agar sıklıkla kullanılan besiyerleridir. Ancak Regan-Lowe besiyerinin raf ömrü daha uzundur ve bakterinin izolasyon oranlarını artırdığı gösterilmiştir<sup>11</sup>. Bu çalışmada, NFS örneklerinin kültüründe, %7 at kanı ve kömür içeren ticari Bordetella Agar (Becton Dickinson GmbH) kullanılmıştır. Bu besiyeri, Mishulow ve arkadaşlarının<sup>12</sup> formülü baz alınarak hazırlanmış Regan-Lowe agar benzeri bir besiyeridir ve normal flora elemanlarının baskılanması için 0.04 g/L sefalekssin içerir. Besiyeri ve ortam şartlarının kontrolü için kullanılan *B.pertussis* standart suşu, bu besiyerinde sorunsuz olarak üremiştir. Çalışmada, örnek akışının yavaş olduğu göz önüne alındığında, besiyerinin iki ay olan raf ömrü avantaj sağlamıştır. Klinisyenin katılımını gerektireceğinden örnekler hasta başında ekilmemiş; kömürlü Amies taşıma besiyerinde birkaç saat içinde laboratuvara ulaştırılıp hemen kültür yapılmıştır.

Çalışmamızda, hastaların %23.5 (12/51)'inde en az bir test ile pozitiflik saptanmış, 1 (%2) hastanın kültüründe ise *B.pertussis* üremiştir. Çalışmaya alınan olguların 15 günden uzun süredir semptomları olan, çoğu aşılı ve başvuru öncesinde antibiyotik almış hastalar olduğu göz önüne alındığında (sadece dört hasta 20 günden daha kısa süredir semptomu olan ve antibiyotik almamış olgulardır), bu oran kabul edilebilir. *B.pertussis* izole edilen hasta ise üç doz aşılanmış, ancak boğmaca aşı şeması tamamlanmamış, 20 gündür öksürüğü olan 10 aylık bir olgudur. Bu hastada PCR ve serolojik testler de pozitif bulunmuştur.

*B.pertussis* enfeksiyonunun moleküler tanısında, farklı gen bölgelerini hedefleyen PCR yöntemlerinin arasında Rt-PCR yöntemi, kontaminasyonu en aza indiren kapalı sistem olması, DNA ekstraksiyonu sonrası kısa sürede sonuç vermesi, özgül problemlerle yakalanan

yüksek özgüllük ve duyarlılık oranlarıyla öne çıkmıştır<sup>13</sup>. Kültürde olduğu gibi PCR'nin duyarlılığı da, semptomların başlangıcından itibaren geçen süre uzadıkça azalmaktadır. Ancak kültürden farklı olarak ölü bakterilerin DNA'sının saptanabilmesi nedeniyle PCR ile nazofarengeal örneklerde dört haftadan sonra da *B.pertussis* DNA'sı gösterilebilmektedir<sup>14</sup>. Antibiyotik tedavisinden sonra da PCR pozitifliği kültüre göre daha uzun süre devam etmektedir. Bidet ve arkadaşları<sup>14</sup>, boğmaca için antibiyotik tedavisi verilen 22 hastanın seri nazofarengeal aspirat örneklerinde *B.pertussis* DNA'sının persistansını araştırmışlar; izlemde ulaşılabilen hastalarda, tedavinin başlangıcından itibaren beşinci günde 21/21, 14. günde 10/12, 21. günde 4/6 ve 30. günde 1/1 hastada Rt-PCR pozitifliği saptamışlardır. Bu hastaların 11'inin başlangıç kültürlerinde *B.pertussis* üremesi varken, 5-14. günde tekrarlanan kültürleri negatifleşmiştir.

*B.pertussis* araştırılmasında genomda sıklıkla kullanılan iki hedef IS481 ve pertussis tok-sin promotör gen bölgeleridir<sup>15,16</sup>. Daha duyarlı olması nedeniyle tercih edilen IS481'i hedefleyen primerlerin, aynı zamanda *Bordetella holmesii*'yi de saptaması, bu bölgenin özgüllüğünün sorgulanmasına neden olmaktadır. Ancak, boğmaca benzeri öksürüğü olan hastalarda nazofarengeal örneklerde *B.holmesii* ya nadiren izole edilmiş ya da hiç saptanmamıştır<sup>17</sup>. "Pertussis Consensus Group" tarafından 2005 yılında, boğmaca tanısında nükleik asit amplifikasyon testlerinin kullanımı ile ilgili yayınlanan önerilerde; toplumda solunum yolu enfeksiyonlarında *B.holmesii* insidansı çok düşük olduğundan, hastanın semptomları uyumlu ise, rutinde klinik örnekteki IS481 PCR pozitifliğinin *B.pertussis* enfeksiyonu olarak değerlendirilebileceği belirtilmektedir<sup>18</sup>. Ayrıca yapılan çalışmalar, IS481 gen bölgesini hedefleyen PCR testlerinin analitik özgüllüğünün yüksek olduğunu göstermektedir<sup>13,15</sup>. Yine de Rt-PCR yöntemlerinin uygulanmasında, kalite kontrol önerilerine titizlikle uyulması ve testin performansının değerlendirilmesinde pozitif kontrol olarak standart suşların kullanılması gerekliliği vurgulanmaktadır<sup>13,15,18</sup>. Bizim çalışmamızda da kontrol olarak *B.pertussis* ATCC 9797 kullanılmıştır.

Nazofarengeal sürüntü örneklerinde DNA ekstraksiyonu sonrası IS481 gen bölgesinin araştırılmasında kullanılan kit, aynı zamanda *B. paraptussis* DNA'sını da saptayan multipleks Rt-PCR formatındadır. Bu çalışmada *B.paraptussis* araştırılması hedeflenmemiş, ancak mevcut ticari kit olması nedeniyle bu kit tercih edilmiştir. Çalışmaya alınan örneklerde *B.paraptussis* için PCR pozitifliği saptanmamıştır. Çalışmamızda, 6 (%11.8) hastada Rt-PCR pozitifliği belirlenmiş; bunlardan birinde aynı zamanda kültür ve serolojiyle de pozitiflik saptanırken, ikisinde PCR ve seroloji pozitif bulunmuştur. Kalan üç olguda ise sadece IS481 Rt-PCR pozitifliği saptanmıştır. Çalışmamızın verileri, IS481 PCR'nin duyarlılığının (%93) kültüre göre (%58) daha üstün olduğunu rapor eden Dragsted ve arkadaşlarının<sup>19</sup> çalışmasıyla uyumludur. Ayrıca, literatürle uyumlu olarak, PCR pozitifliği saptanan olguların<sup>19</sup> çoğu aşı şeması tamamlanmamış ve semptomların başlangıcından örnek alınmasına kadar geçen süre daha az olan hastalardır<sup>19,20</sup>.

Boğmacaya karşı koruyucu antikor seviyesi henüz belirlenmemiş olmasına karşın, PT ve FHA'ya karşı 10 EU/ml düzeyindeki titreleri koruyucu olarak kabul eden çalışmalar mevcuttur<sup>20-22</sup>. Bu çalışmada anti-PT IgG ve anti-FHA IgG titresinde dört kat artış ve tek

serum örneğinde 100 EU/ml'nin üzerindeki anti-PT IgG titreleri *B.pertussis* enfeksiyonunun serolojik kanıtı olarak değerlendirilmiştir. Anti-PT antikoları *B.pertussis*'e özgüdür; ancak farklı bakteriyel enfeksiyonlar, FHA ile çapraz reaksiyon veren antikoların gelişmesine neden olabilir<sup>23</sup>. *B.pertussis* ile enfekte bireylerin %90'dan fazlasının her iki antijenik yapıya karşı antikor geliştirdiği bilinmektedir<sup>9</sup>. Çalışmamızda, serolojik tanı pozitifliği olan hastaların çoğunda, birinci ve ikinci serum örnekleri arasında anti-PT IgG ile paralel olarak anti-FHA IgG antikolarında da artış görülmüştür. Hastaların 9 (%17.6)'u serolojik olarak *B.pertussis* enfeksiyonu olarak değerlendirilmiş; bunların üçünde (15-20 gündür öksürük semptomu olan olgular) aynı zamanda Rt-PCR pozitifliği de saptanmıştır. Başvuru sırasında 30-60 gündür öksürük semptomu olanlarda saptanan pozitiflikler değerlendirildiğinde, beş hastada ve sadece serolojik olarak *B.pertussis* enfeksiyonunun saptanması, özellikle hastalığın ilerleyen dönemlerinde serolojinin PCR'ye üstün olduğunu yönündeki literatür bilgisiyle paraleldir<sup>10,24</sup>. Ankara'da 2007 yılında yapılan bir çalışmada<sup>25</sup> 14 günden uzun süren öksürüğü olan 6-14 yaş grubu çocuklarda anti-PT IgG ELISA ile boğmaca sıklığı araştırılmış ve 307 öğrencinin %16.6'sında *B.pertussis* enfeksiyonu saptanmıştır. Yıldırım ve arkadaşlarının<sup>26</sup> çalışmasında da, 0-16 yaş grubu uzamış öksürüğü ( $\geq 14$  gün) olan çocuklarda; kültür, IS481 gen bölgesini hedefleyen konvansiyonel PCR ve anti-PT IgA ve IgG ELISA yöntemleri kullanılarak boğmaca sıklığı araştırılmıştır. Bir yıllık dönemde, olguların %16.9 (25/148)'unda en az bir yöntemle pozitiflik belirlenmiş; 12 olguda sadece PCR, dokuz olguda sadece seroloji, dört olguda ise hem PCR hem de seroloji ile pozitiflik izlenmiş; kültür pozitifliği saptanmamıştır<sup>26</sup>.

Hastalığın serolojik tanısı, çift serum örneği arasında serokonversiyonun gösterilmesiyle konulmaktadır<sup>2</sup>. Bu uygulama, zaman alıcı olmasının yanı sıra, hastaların ikinci başvurusunun her zaman sağlanamaması ya da ilk başvurunun geç dönemde yapılması gibi nedenlerden dolayı pratik değildir. Çalışmamızda, tüm hastalardan (n= 51) ilk serum örnekleri ilk poliklinik başvurusu sırasında alınmış; ancak ikinci serum örnekleri ancak 31 hastadan elde edilebilmiştir. Hastaların şehir dışında olmaları, semptomlarının kaybolması ve özellikle bebeklerde, tekrar kan alma işlemi konusunda ailenin direnç göstermesi gibi nedenler ikinci serum örneklerinin elde edilmesini zorlaştırmıştır. Bu nedenle çalışmamızda, başka çalışmalarda<sup>27</sup> belirtildiği şekilde, tek serum örneğindeki 100 EU/ml'nin üzerindeki anti-PT IgG titreleri de *B.pertussis* enfeksiyonunun kanıtı olarak değerlendirilmiştir. IS481 Rt-PCR pozitifliği olan üç hastada, ikinci serum örnekleri alınamadığından olası bir titre artışı araştırılamamıştır (Tablo II). Bu hastalar 15-20 gündür öksürüğü olan hastalardır. Dolayısıyla, özellikle hastalığın erken döneminde, tek serum örneğinin yeterli olmayabileceği kanısına varılmıştır. Seroloji ve PCR için optimal örnek alma zamanları farklı olduğundan bu iki testin sonuçlarının tam olarak uyumu beklenmemektedir<sup>28</sup>. Çalışmadan elde edilen sonuçlar da bu yöndedir. Öksürüğün başlangıcından itibaren üç hafta içinde örnek alındığında kültür ve özellikle PCR ile; üç hafta sonrasında, büyük çocuk ve erişkinlerde ise seroloji ile tanı konulması daha olası görünmektedir.

Çalışmamıza, Aralık 2009-Ağustos 2010 tarihleri arasındaki dokuz aylık dönemde başvuran hastalar alınmıştır. *B.pertussis* enfeksiyonu en fazla ilkbahar sonu ve yaz aylarında başvuran hastalarda saptanmış, kış aylarında başvuran hiçbir hastada izlenme-

miştir. Literatürde de yaz ve sonbahar aylarında olguların sıklığında artış olduğu bildirilmektedir<sup>4,19</sup>.

Ege bölgesi genelinde 2005 yılı verilerine göre boğmaca aşılama oranı %93'tür. Aynı yıl Ege bölgesinde bildirilen olgu sayısı 42 ve insidans 0.44/100.000'dir<sup>29</sup>. Bu çalışmaya dahil edilen hastaların aşılama oranı ise %94 olarak hesaplanmıştır. Ancak bu çalışmanın ve ülkemizde yapılan benzer çalışmaların sonuçları, yüksek aşılama oranlarına rağmen *B.pertussis*'in toplumda dolaşmaya devam ettiğini göstermektedir<sup>25,26,30</sup>. Uzamış öksürüğü olan çocuk yaş grubunda kültür, PCR ve serolojik yöntemler kullanıldığında, etken olarak *B.pertussis* önemli oranda saptanmaktadır. Kültür, duyarlılığı düşük ve geç sonuç veren bir yöntem olduğundan, özellikle semptomların ilk üç haftasında PCR yönteminin, daha geç dönemde ise serolojinin tanıya önemli katkıda bulunduğu söylenebilir. Ancak bu alanda standardize PCR protokollerine ve serolojik yöntemlere gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

1. Waters V, Halperin S. *Bordetella pertussis*, pp: 2955-64. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010, 7<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia.
2. Cherry DJ, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24 (Suppl 5): 25-35.
3. Kurugöl Z. Türkiye'de boğmaca epidemiyolojisi: Pekiştirme aşı dozları gerekli mi? *Çocuk Enf Derg* 2009; 3(1): 14-8.
4. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2): 326-82.
5. Coplu N, Esen B, Kurtoglu D, Gozalan A, Miyamura K, Yoshida I. Standardization of an in-house ELISA for pertussis serology and its application in a seroepidemiological study. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39(3): 281-289.
6. Vatanser U, Coplu N, Oner N, et al. Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies among healthy adolescent girls in Edirne. *Swiss Med Wkly* 2005; 135(35-36): 531-6.
7. Birinci A. *Bordetella*, s: 803-13. Başustaoglu A (çeviri ed.), *Klinik Mikrobiyoloji*. 2009, 9. Baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for the control of pertussis outbreaks. 2000, CDC. Atlanta, GA.
9. Winn WC, Allen SD, Janda WM, et al (eds), *Bordetella* species, pp: 510-23. Koneman's Color Atlas and Diagnostic Microbiology. 2006, 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
10. Wendelboe AM, Van Rie A. Diagnosis of pertussis: a historical review and recent developments. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6(6): 857-64.
11. Morril WE, Barbaree JM, Fields BS, Sanden GN, Martin WT. Effects of transport temperature and medium on recovery of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* 1988; 26(9): 1814-7.
12. Mishulow L, Sharpe LS, Cohen LL. Beef-heart charcoal agar for the preparation of pertussis vaccines. *Am J Public Health Nations Health* 1953; 43(11): 1466-77.
13. Kösters K, Reischl U, Schmetz J, Riffelmann M, Wirsing von König CH. Real time LightCycler PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5): 1719-22.
14. Bidet P, Liguori S, De Lauzanne A, et al. Real-time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J Clin Microbiol* 2008; 46(11): 3636-8.

15. Sloan LM, Hopkins MK, Mitchell PS, et al. Multiplex LightCycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 96-100.
16. Knorr L, Fox JD, Tilley PA, Ahmed-Bentley J. Evaluation of real-time PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. BMC Infect Dis 2006; 6: 62.
17. Antila M, He Q, de Jong C, et al. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 8): 1043-51.
18. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N; Pertussis PCR Consensus Group. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. J Clin Microbiol 2005; 43(10): 4925-9.
19. 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(Pt 8): 749-54.
20. Holberg-Petersen M, Jenum PA, Mannsaker T, Melby KK. Comparison of PCR with culture applied on nasopharyngeal and throat swab specimens for detection of *Bordetella pertussis*. Scand J Infect Dis 2011; 43(3): 221-4.
21. World Health Organization. Immunological basis for immunization. Module 4: Pertussis WHO/EPI/GEN/98.14.
22. Konda T, Kamachi K, Iwaki M, Matsunaga Y. Distribution of pertussis antibodies among different age groups in Japan. Vaccine 2002; 20(13-14): 1711-7.
23. Vincent JM, Cherry JD, Nauschuetz WF, et al. Prolonged afebrile nonproductive cough illnesses in American soldiers in Korea: a serological search for causation. Clin Infect Dis 2000; 30(3): 534-9.
24. Birkebaek NH, Kristiansen M, Seefeldt T, et al. *Bordetella pertussis* and chronic cough in adults. Clin Infect Dis 1999; 29(5): 1239-42.
25. Aksakal FN, Coplu N, Ceyhan MN, et al. High incidence of pertussis among schoolchildren with prolonged cough in Turkey. Tohoku J Exp Med 2007; 211(4): 353-8.
26. Yıldırım I, Ceyhan M, Kalaycı O, et al. Frequency of pertussis in children with prolonged cough. Scand J Infect Dis 2008; 40(4): 314-9.
27. Giammanco A, Chiarini A, Maple PA, et al. European Sero-Epidemiology Network: standardisation of the assay results for pertussis. Vaccine 2003; 22(1): 112-20.
28. Fry NK, Tzivra O, Li YT, et al. Laboratory diagnosis of pertussis infections: the role of PCR and serology. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 6): 519-25.
29. Dilli D, Bostancı I, Dallar Y, Buzgan T, Irmak H, Torunoglu MA. Recent findings on pertussis epidemiology in Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27(5): 335-41.
30. Esen B, Coplu N, Kurtoglu D, Gozalan A, Akin L. Prevalence of high antibody titers of pertussis in Turkey: reflection of circulating microorganism and a threat to infants. J Clin Lab Anal 2007; 21(3): 154-61.