

Nadège BOURGEOIS-NICOLAOS\*, \*\* et Florence DOUCET-POPULAIRE \*, \*\*\*

# Intérêt de la PCR en temps réel dans le diagnostic biologique de la coqueluche

## RÉSUMÉ

Avec l'introduction de la vaccination généralisée, l'épidémiologie de la coqueluche en France s'est modifiée. Une résurgence de la maladie est observée chez les nourrissons non vaccinés contaminés par des adolescents ou des adultes de leur entourage présentant des symptômes atypiques. Afin de pouvoir bénéficier d'un diagnostic bactériologique précoce dans ce contexte épidémiologique, des techniques d'amplification génique se sont développées, avec notamment l'utilisation récente de la PCR en temps réel. La PCR en temps réel par sa sensibilité, sa spécificité et sa rapidité offre au clinicien un outil performant pour le diagnostic d'infection à *Bordetella pertussis*. La culture doit être réalisée en parallèle avec la PCR afin de suivre la sensibilité aux antibiotiques de *B. pertussis* et l'analyse de l'évolution antigénique des souches.

## MOTS CLÉS

*Bordetella pertussis*, PCR en temps réel, coqueluche

## Real-time PCR interest in diagnosis of whooping cough

### SUMMARY

Following generalized vaccination whooping cough epidemiology has been modified in France. Resurgence of the disease, very often clinically atypical is currently observed in non-vaccinated infants contaminated by adults. This resurgence convinced us to develop DNA amplification assay to detect *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal secretions, especially real time PCR. Real Time PCR due to its sensibility, its specificity and its rapidity, offers to the clinician a powerful tool for the diagnosis of whooping cough. Nevertheless, the culture must be associated with PCR, in order to follow the epidemiology and it's the antibiotic susceptibility of *B. pertussis*.

### KEYWORDS

*Bordetella pertussis*, real-time PCR, Whooping cough diagnosis

## I - Introduction

La coqueluche est une infection bactérienne des voies respiratoires, hautement contagieuse, dont l'agent pathogène essentiel est *Bordetella pertussis*. Depuis 1966, date de la généralisation de la vaccination, une remarquable régression de la morbidité et de la mortalité coquelucheuses ont été observées en France, mettant en évidence l'excellente efficacité du vaccin combiné cellulaire (1). Depuis 1985 cependant, une recrudescence de la coqueluche est

observée aussi bien en Europe qu'en Amérique du Nord (2). La raison retenue est une perte progressive de l'immunité vaccinale, liée à l'absence de rappel tardif et une plus grande circulation de la bactérie. La coqueluche a été classée par l'OMS parmi les maladies ré-émergentes (3)

Le diagnostic microbiologique de la coqueluche par les techniques classiques s'avère délicat, long et incertain. Les méthodes conventionnelles reposent aujourd'hui sur la mise en culture du prélèvement nasopharyngé et la sérologie sur deux prélèvements

\*Laboratoire de Microbiologie - UFR de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques - Université René Descartes - 4 avenue de l'observatoire - 75006 Paris  
Tél. : 01 53 73 97 39 - E-mail : florence.doucet-populaire@univ-paris5.fr

\*\*Laboratoire de bactériologie - CHU Xavier Bichat-Claude Bernard - 46 rue Henri Huchard - 75018 Paris - Tél. : 01 40 25 85 04

E-mail : nadege.bourgeois@bch.ap-hop-paris.fr

\*\*\* Laboratoire de Microbiologie - CH Versailles - 177 rue de Versailles - 78157 Le Chesnay cedex - Tél. : 0 1 39 63 91 07 - E-mail : fdoucet@ch-versailles.fr

## Intérêt de la PCR en temps réel dans le diagnostic biologique de la coqueluche

sanguins à un mois d'intervalle. Compte tenu de la fragilité du germe en cause, de sa faible concentration dans les prélèvements et de l'impossibilité de le cultiver sur des milieux usuels, la culture de *B. pertussis* est longue, fastidieuse et peu sensible. La sérologie reste un argument rétrospectif qui nécessite chez le jeune nourrisson une interprétation prenant en compte le statut sérologique maternel. Devant la nécessité d'une méthode sensible et rapide permettant un diagnostic de certitude, des techniques de détection d'ADN génomique par Polymerase Chain Reaction (PCR) ont été développées (4). La nouvelle technologie de PCR en temps réel commence à se développer dans le diagnostic d'infection bactérienne et notamment dans le diagnostic de la coqueluche. L'objectif de cet article est de définir la place de la PCR en temps réel dans le diagnostic microbiologique de la coqueluche en routine.

### II - Épidémiologie de la maladie

La coqueluche est une maladie infectieuse ubiquitaire. Parmi les maladies à prévention vaccinale, la coqueluche reste une des plus difficiles à éliminer bien que l'homme soit le seul hôte connu de *B. pertussis*. C'est une maladie très contagieuse, évoluant sur un mode endémique avec des cycles épidémiques périodiques survenant tous les 2 à 5 ans. Avant la généralisation de la vaccination la plupart des enfants étaient infectés avant l'âge de 15 ans avec un pic d'incidence vers 5 ans (1).

La situation épidémiologique de la coqueluche est hétérogène en Europe reflétant des différences dans la politique vaccinale des pays. Les données épidémiologiques de la France sont discontinues. La coqueluche a été surveillée par notification de 1903 à 1986. À partir de 1986, la déclaration obligatoire est arrêtée et la maladie paraissait contrôlée. Les seules données recueillies en continu sont celles de la mortalité. La France est avec les États-Unis et certains pays de l'Europe de l'Est, un des rares pays au monde à avoir obtenu de manière permanente depuis maintenant 40 ans des niveaux élevés de couverture vaccinale avec un vaccin très efficace. Le maintien de la bonne couverture vaccinale a permis de réduire de façon spectaculaire la morbidité et la mortalité coquelucheuse. Depuis 1989 comme aux États-Unis, une résurgence de la coqueluche est observée en France. Le réseau de surveillance des formes pédiatriques sévères (RENACOQ), ne montre pas d'augmentation du nombre de cas depuis 1996. Cependant une augmentation de la fréquence des formes atypiques, voire asymptomatiques chez le grand enfant, l'adolescent et l'adulte, est observée (5). Cette résurgence s'accompagne d'une modification de l'épidémiologie de la maladie qui touche désormais avec prédilection des adultes et des grands enfants anciennement vaccinés qui peuvent ainsi contaminer des jeunes nourrissons non vaccinés de moins de 1 an (incidence moyenne nationale estimée à 98/100 000) exposés aux formes graves de la

maladie. L'étude faite dans 30 unités de réanimation en France en 1999-2000 montre que la coqueluche est la première cause de décès par infection bactérienne communautaire chez les nourrissons entre 10 jours de vie et 2 mois et la troisième cause de décès (13%) tout âge confondu après le méningocoque (34%) et le pneumocoque (28%) (6). Aux États-Unis, 62 décès liés à la coqueluche ont été rapportés entre 1997 et 2000 dont 56 cas soit 90% chez des nourrissons de moins de 6 mois (7).

### III Diagnostic

#### 1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique repose essentiellement sur trois critères : le déroulement de la maladie, le caractère de la toux et l'identification des contaminants

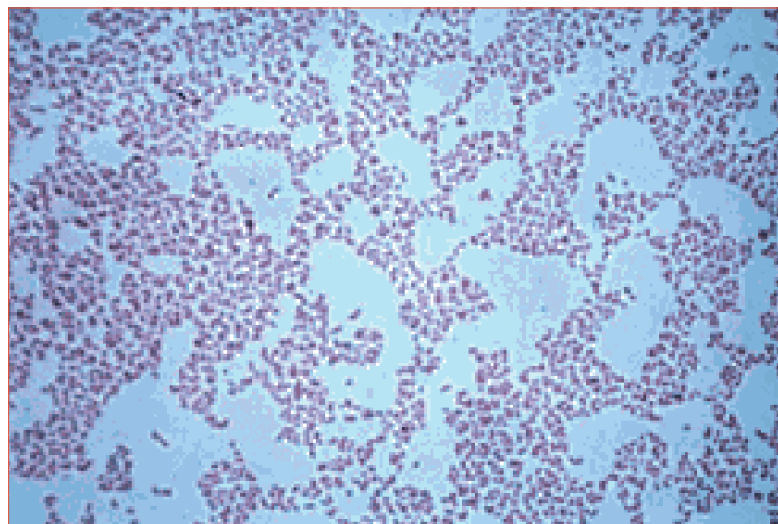
Le déroulement de la maladie est stéréotypé. La période d'incubation est généralement comprise entre 7 et 10 jours. Elle débute pendant les 4 à 6 premiers jours par des signes discrets d'infections des voies respiratoires supérieures : rhinite, toux légère. Puis la toux se modifie, elle devient caractéristique car spasmodique, en particulier nocturne, survenant de façon paroxystique et évoluant vers la persistance ou l'aggravation au bout de 7 jours. Elle est souvent quinteuse : accès violents et répétés de toux sans respiration efficace, qui aboutissent à une turgescence du visage, rougeur conjonctivale, des vomissements une cyanose et une reprise inspiratoire en fin de quinte, sonore et comparable au chant du coq. Chez les nourrissons, le chant du coq est souvent absent, ce qui rend le diagnostic initial difficile.

L'identification du contaminateur doit être systématiquement recherchée car cette information aide fortement au diagnostic. Les parents sont à l'origine de la maladie chez les enfants dans 43% des cas contre 32% pour la fratrie (5).

#### 2. Diagnostic biologique de la coqueluche

##### 2.1 - Prélèvement

Le prélèvement des sécrétions nasopharyngées (SNP) par aspiration est le matériel le mieux adapté pour l'isolement des bordetelles (8). Elle est réalisée sur un tube sec et stérile à l'aide d'une sonde molle et fine le plus rapidement possible au cours de la maladie. Cependant ce mode de prélèvement n'est pas toujours applicable et notamment chez l'adulte où les aspirations nasopharyngées sont peu abondantes. Dans ce cas, la recherche de *B. pertussis* peut être faite par écouvillonnage au niveau du nasopharynx. Il est recommandé d'utiliser des écouvillons en alginate de calcium ou des Dacrons (9). Les écouvillons en coton sont déconseillés car ils contiennent à la surface des fibres de coton des acides gras qui peuvent inhiber la croissance des bordetelles.



**Figure 1**  
Coloration de Gram d'une colonie de *Bordetella pertussis*, obj x 1000.

## 2.2 - Culture

*B. pertussis* est un coco-bacille à gram négatif une bactérie difficile à cultiver et à isoler du fait de sa fragilité et de ses exigences nutritives (figure 1). La culture de *B. pertussis* nécessite des milieux spécifiques enrichis et frais. Traditionnellement, le milieu utilisé en France est celui de Bordet et Gengou, décrit en 1906, à base d'infusion de pomme de terre additionné de sang de cheval frais, qui doit être préparé extemporanément (10). Cependant le milieu de Regan-Lowe, à base de charbon additionné de 10% sang de mouton, nous paraît mieux adapté à la routine d'un laboratoire hospitalier, ce milieu pouvant être conservé pendant plus d'un mois à +4°C (11). La sensibilité de la culture est classiquement de 50 à 60% (8). Actuellement, il n'existe pas de milieu de transport commercialisé en France et l'acheminement doit être le plus rapide possible au laboratoire à température ambiante. Le taux d'isolement est maximal lorsque le prélèvement est fait lors des trois premières semaines après le début de la toux et lorsque le patient n'a pas reçu de traitement antibiotique adapté (Macrolides). Bien que l'isolement de *B. pertussis* par la culture soit délicat et puisse manquer de sensibilité, il reste indispensable pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques et suivre l'évolution antigénique des souches.

## 2.3 - Sérologie

Les méthodes sérologiques permettent un diagnostic tardif le plus souvent rétrospectif, avec deux prélèvements réalisés à quatre semaines d'intervalle. Les deux techniques actuellement utilisées en France sont l'ELISA et l'immuno-empreinte (8). Ces deux techniques sont sensibles et spécifiques mais d'interprétation délicate. La détection d'anticorps dirigés contre la toxine de pertussis est spécifique d'une infection à *B. pertussis*, les autres antigènes sont communs à *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*. Le recours aux sérologies suppose d'avoir à traiter 2 sérums à 4 semaines d'intervalle. En pratique, le second sérum, souvent décisif pour conclure, n'est pas toujours prélevé.

## 2.4 - Immunofluorescence

L'immunofluorescence directe permet de détecter directement la présence de la bactérie dans les SNP à l'aide d'anticorps marqués par une molécule fluorescente. Cette technique manque de sensibilité et de spécificité. Elle n'est plus actuellement recommandée en France.

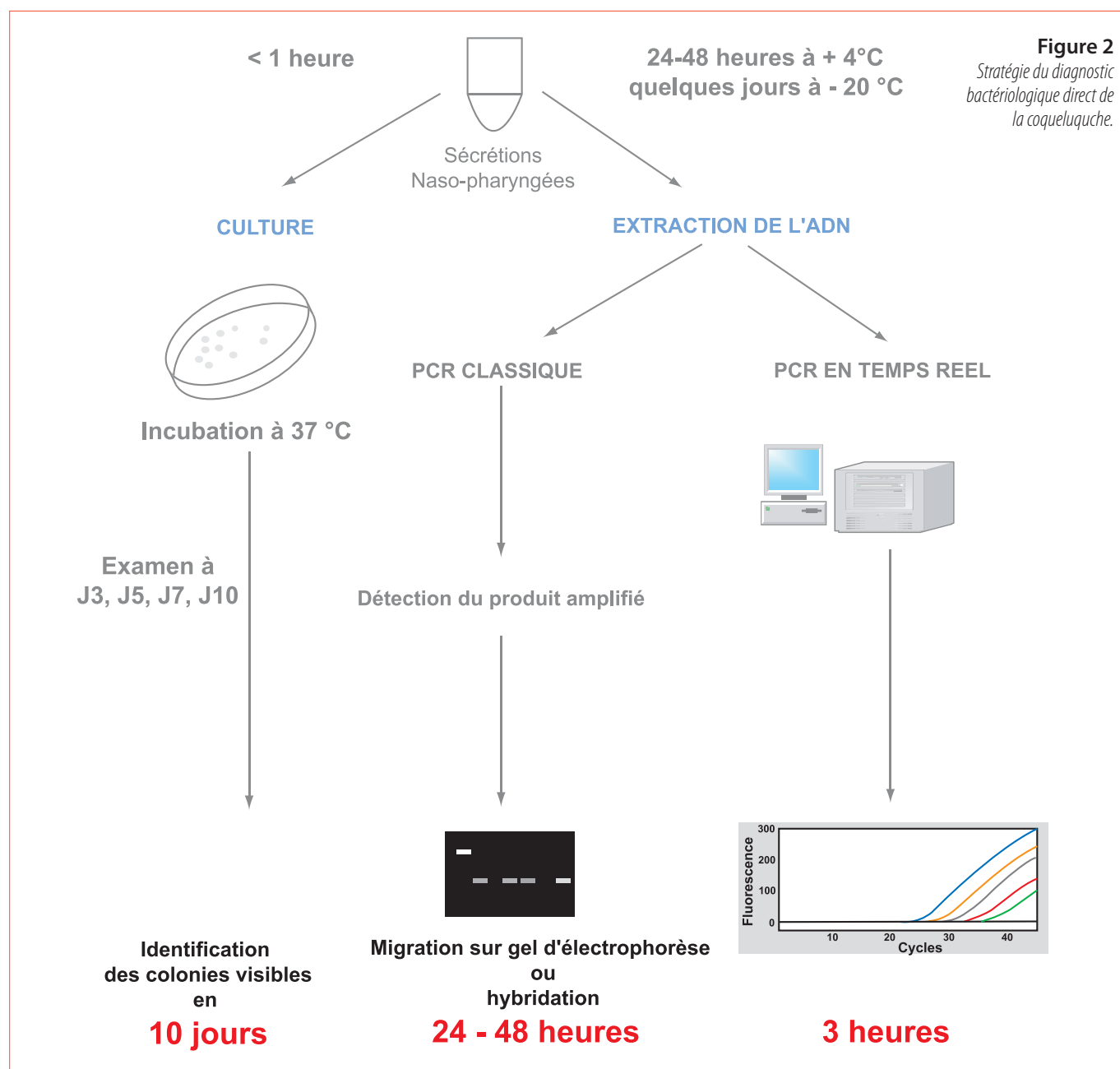
## 2.5 - PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'inadaptation des techniques conventionnelles en routine a conduit au développement de techniques de PCR afin de détecter directement un fragment du génome de *B. pertussis* à partir des SNP. Plusieurs types de technologies de PCR ont été mis au point pour détecter directement l'ADN de *B. pertussis* à partir des SNP, la technologie de PCR conventionnelle, comportant les trois étapes (extraction de l'ADN bactérien, amplification et révélation du produit amplifié) et plus récemment la technologie de PCR en temps réel en cours de développement. La PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR sans nécessité de l'étape de post-amplification (12).

Quatre régions du génome de *B. pertussis* ont été utilisées pour l'amplification : la région promotrice du gène de structure de la toxine de pertussis (13, 14), la région située en amont des gènes de structure des porines (15), des séquences d'insertion répétées (IS481) (16, 17) et le gène codant pour l'adénylate cyclase (18). Les trois premières régions sont spécifiques de *B. pertussis*, la quatrième ne permet pas de différencier les différentes espèces de *Bordetella*. La séquence d'insertion (IS481) présente en plusieurs copies dans le chromosome de *B. pertussis* (80 à 100 copies), apparaît comme une cible de choix pour l'amplification en augmentant la sensibilité de la détection. Cependant des homologies de séquences sont observées avec une autre bordetelle (*Bordetella holmesii*) au niveau de la séquence d'insertion IS481, pouvant donner des fausses réactions positives (19, 20).

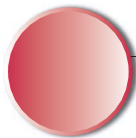
Théoriquement dans les techniques de PCR conventionnelle, il existe une relation quantitative entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. En pratique, il n'est pas rare que les réactions de PCR en répliqua donnent des résultats différents. Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités traditionnelles associées à la PCR quantitative et permet une quantification fiable et routinière. Cette technique peut aussi estimer la concentration de la cible amplifiée d'ADN par rapport à un standard et ainsi quantifier la charge bactérienne. Elle fait donc un suivi de la fluorescence émise pendant la réaction de PCR avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle. Cette technique permet le suivi en temps réel de la réaction par le signal émis grâce à l'incorporation d'un marqueur fluorescent aux doubles brins d'ADN (SYBR® Green I) ou par

## Intérêt de la PCR en temps réel dans le diagnostic biologique de la coqueluche



l'utilisation de sondes spécifiques fluorescentes après la phase d'élongation. Pour cette dernière catégorie, il existe 4 technologies principales : hydrolyse de sonde (Taqman® assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpions (Scorpion primers). Plusieurs appareils de PCR en temps réel sont mis sur le marché notamment : iCycler™ IQ (Bio-Rad), LightCycler® (Roche), Smart Cycler® (Cepheid), Rotor-Gene 3000™ (Corbett Research) et Applied Biosystems 7500. Ces appareils utilisent généralement des systèmes en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification. A l'opposé, dans la PCR conventionnelle les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus après migration sur gel d'électrophorèse ou l'hybridation avec une sonde spécifique. Cette étape post-amplification augmente le risque de faux positifs dus à la contamination des échantillons à étudier par des produits de PCR d'une manipulation précédente (phénomène de «carry-over»), ainsi que la durée de la technique.

La technique de PCR est rapide. Elle permet de rendre un résultat fiable en 48 heures pour la PCR conventionnelle et en quelques heures pour la PCR en temps réel, alors que le délai de résultat de la culture est de 6 jours (figure 2). L'utilisation de la PCR dépend moins que la culture des contraintes liées au transport et à la conservation des prélèvements. La viabilité de la bactérie n'est pas nécessaire pour sa détection. Les SNP peuvent être conservés 48 heures à +4°C ou plusieurs jours après congélation en vue de la PCR. De plus, l'utilisation de la PCR dépend moins que la culture de la prise éventuelle d'antibiotique actif vis à vis de *B. pertussis*. Dans notre série nous avons suivi l'évolution de la PCR, après mise sous traitement par macrolides. La PCR est restée positive jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour de traitement (21). Eldeman et collaborateurs ont montré qu'après 4 jours de traitement, 56 % des échantillons avaient une culture positive et 89 % une PCR positive. Après 7 jours de traitement, aucune culture n'était positive et seulement 56% des échantillons avaient une PCR positive (22). Globalement,



la sensibilité de la PCR pour le diagnostic de coqueluche varie entre 80 et 100% selon les auteurs (23, 14, 24). La PCR en temps réel apparaît plus sensible que la PCR conventionnelle (20,25) et une étude américaine récente montre une sensibilité supérieure de 200 % à la culture (26).

L'une des limites de la PCR est la présence d'inhibiteurs de la réaction d'amplification dans les SNP, rendant le résultat de la PCR ininterprétable de ce fait. La présence d'inhibiteurs doit être recherchée systématiquement par l'utilisation d'un contrôle interne afin d'éviter des résultats faussement négatifs. Le taux d'inhibiteurs peut aller de 6 à 18% selon les auteurs (9). Comme pour toute technique de biologie moléculaire, la PCR suppose un laboratoire spécifiquement conçu avec des locaux dédiés et un personnel spécialisé permettant de limiter les risques de contamination. La PCR reste une technique hors nomenclature en France, tandis que la culture est remboursée par l'assurance maladie. Le prix du diagnostic par PCR varie de 35 à 60 Euros en fonction du laboratoire d'analyses spécialisées auquel il est adressé.

## IV - Conclusion

L'utilisation en routine de la PCR pour le diagnostic de coqueluche offre un diagnostic rapide, fiable, tant par sa sensibilité que par sa spécificité. Elle ne nécessite qu'un seul prélèvement non invasif. La précocité du diagnostic qu'apporte la PCR peut permettre de repérer une coqueluche avant que le tableau clinique ne soit complet ou dans les coqueluches atypiques de l'adolescent ou de l'adulte. Le développement de la nouvelle technologie de PCR en temps réel dans le diagnostic de la coqueluche en routine offre un outil encore plus rapide avec une bonne sensibilité et spécificité. Contrairement aux méthodes conventionnelles de PCR, cette nouvelle technologie diminue les risques de contamination lors de l'étape de post-amplification, en éliminant cette étape. De plus, cette méthode permet aussi d'indiquer la quantité de bactérie dans le prélèvement. La culture doit cependant rester associée à la PCR afin de suivre la sensibilité aux antibiotiques et surveiller les souches circulantes afin de vérifier l'échappement antigénique de ces souches vis-à-vis des vaccins actuels.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) BARON S., HAEGHEBAERT S., LÉVY-BRUHL D., LAURENT E., GUIISO N. Epidémiologie de la coqueluche en France. *Méd Mal Infect*, 2001, 31, 12-9.
- (2) SIMONDON F., GUIISO N. Epidémiologie de la coqueluche dans le monde. *Méd Mal Infect*, 2001, 31, 5-11.
- (3) COCKERILL F.R., III, SMITH T.F. Response of the clinical microbiology laboratory to emerging (New) and re-emerging infectious diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42, 2359-2365.
- (4) DORSON O., DOUCET-POPULAIRE F. Le diagnostic biologique de la coqueluche par PCR. *J. Pédiatr. Puériculture*, 1999, 12, 474-9.
- (5) BONMARIN I., SIX C., LAURENT E., BARON S., HAEGHEBAERT S., GUIISO N. Renacoq : Surveillance de la coqueluche à l'hôpital en 1999 bilan de 4 années de surveillance. *BEH*, 2001, 18, 83-87.
- (6) FLORET D. Pediatric deaths due to community-acquired bacterial infection. Survey of French pediatric intensive care units. *Arch. Pediatr.*, 2001, 8 (Suppl.), 705s-711s.
- (7) MATTOO S., CHERRY J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* Subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, 18, 326-382.
- (8) GUEIRARD P., NJAMKEPO E., GUIISO N. Diagnostics biologiques directs et indirects de la coqueluche. *Méd. Mal. Infect*, 2001, 31, 75-81.
- (9) MULLER F.M., HOPPE J.E., WIRSING VON KONIG C.H. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J Clin Microbiol*, 1997, 35, 2435-43.
- (10) BORDET J., GENGOU O. Le microbe de la coqueluche. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, 20, 731-41.
- (11) REGAN J., LOWE F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol*, 1977, 6, 303-9.
- (12) PODDAR S.K. Rapid detection of *Bordetella pertussis* by real-time PCR using SYBR green I and a LightCycler instrument. *J. Clin Lab Anal.*, 2004, 18, 265-270.
- (13) HOUARD S., HACKEL C., HERZOG A., BOLLEN A. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol*, 1989, 140, 477-87.
- (14) GRIMPREL E., BEGUE P., ANJAK I., BETSOU F., GUIISO N. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J. Clin Microbiol*, 1993, 31, 2745-50.
- (15) LI Z., JANSEN D.L., FINN T.M., HALPERIN S.A., A.K., O'CONNOR S.P. Identification of *Bordetella pertussis* infection by schared-primer PCR. *J. Clin Microbiol*, 1994, 32, 783-9.
- (16) HE Q., MERTSOLA J., SOINI H., VILJANEN M.K. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal specimens. *J Pediatr*, 1994, 124, 421-6.
- (17) CIMOLAI N., TROMBLEY C. Insertional sequence primers for *Bordetella pertussis* diagnostic polymerase chain reaction differentiate strains of *Pseudomonas cepacia*. *J Infect Dis*, 1995, 172, 293-5.
- (18) DOUGLAS E., COOTE J.G., PARTON R., MCPHEAT W. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. *J. Med Microbiol*, 1993, 38, 140-4.
- (19) REISCHL U., LEHN N., SANDEN G.N., LOEFFELHOLZ M.J. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J. Clin Microbiol*, 2001, 39, 1963-1966.
- (20) PODDAR S.K. 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, 91-98.
- (21) DOUCET-POPULAIRE F., BOURGEOIS N., CHARARA O., BELLAICHE M., RICHARDIN F., SALOMON J.L., BERARDI-GRASSIAS L., GHNASSIA J.C., FOUCAUD P. Routine use of gene amplification for pertussis diagnosis in children. *Arch. Pediatr.*, 2002, 9, 1145-1152.
- (22) EDELMAN K., NIKKARI S., RUUSKANEN O., HE Q., VILJANEN M., MERTSOLA J. Detection of *Bordetella pertussis* by polymerase chain reaction and culture in the nasopharynx of erythromycin-treated infants with pertussis. *Pediatr Infect Dis J*, 1996, 15, 54-7.
- (23) DOUCET-POPULAIRE F., RICHARDIN F., BELLAICHE M., SALOMON J.L., BERTRAND D., PANGON B., BERARDI-GRASSIAS L., GHNASSIA J.C. Routine application of PCR for whooping cough diagnosis in infants. In abstracts of the 98th general meeting of the American Society of Microbiology, 1998, C222, 168.
- (24) LOEFFELHOLZ M.J., THOMPSON C.J., LONG K.S., GILCHRIST M.J. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol*, 1999, 37, 2872-6.
- (25) TEMPLETON K.E., SCHELTINGA S.A., VAN DER Z.A., DIEDEREN B.M., VAN KRUIJSSSEN A.M., GOOSSENS H., KUIJPER E., CLAAS E.C. 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, 4121-4126.
- (26) SLOAN L.M., HOPKINS M.K., MITCHELL P.S., VETTER E.A., ROSENBLATT J.E., HARMSSEN W.S., COCKERILL F.R., PATEL R. Multiplex Lightcycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. *J.Clin. Microbiol.*, 2002, 40, 96-100.