

8-1-1985

## Enzyme-linked immunosorbent assay for early detection of whooping cough

P. Luksamijarulkul

S. Phirapakorn

S. Limpiwattakee

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal>



Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

---

### Recommended Citation

Luksamijarulkul, P.; Phirapakorn, S.; and Limpiwattakee, S. (1985) "Enzyme-linked immunosorbent assay for early detection of whooping cough," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 29: Iss. 8, Article 5.  
Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal/vol29/iss8/5>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact [ChulaDC@car.chula.ac.th](mailto:ChulaDC@car.chula.ac.th).

นิพนธ์ต้นฉบับ

## การใช้วิธีเอนซัยม์-ลิงค์ อิมมูโนซอบเบนท์ แอสเส ในการวินิจฉัยโรคไอกรนอย่างรวดเร็ว

พิพัฒน์ ลักษมีจรัลกุล\*  
สมชาย พีระปรกรณ์\*\*  
เสาวลักษณ์ ลิมปิวัตต์กี\*\*\*

**Luksamijarulkul P, Phirapakorn S, Limpiwattakee S. Enzyme-linked immunosorbent assay for early detection of whooping cough. Chula Med J 1985 Aug ; 29 (8) : 889-896**

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure the serum Ig M and Ig G antibodies in the rapid diagnosis of 62 pertussis and 102 healthy children. The validity of the test was evaluated in this study in which the sensitivity, specificity and efficiency were found to be 79.03%, 91.18% and 86.59% respectively. The duration of positive results for Ig M and Ig G ranged from under 2 weeks to 8 weeks after the onset of coughing, with a single serum sample. So, an ELISA may be valuable for the rapid diagnosis of whooping cough.*

- 
- \* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400
  - \*\* แพทย์ในโครงการฝึกอบรมระดับบัณฑิตศึกษา กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ 10200
  - \*\*\* ภาควิชาพยาบาลสาธารณสุข คณะพยาบาลศาสตร์ วิทยาลัยหัวเฉียว กรุงเทพฯ 10100

การวินิจฉัยโรคไอกรนที่แน่นอน โดยทั่วไปใช้วิธีการแยกเชื้อไอกรน (*Bordetella pertussis*) ได้จากสารคัดหลั่ง nasopharynx แต่มักได้ผลบวกต่ำ และประสบปัญหามาก<sup>(1-3)</sup> ไม่สามารถแยกเชื้อ *B. pertussis* จากผู้ป่วยที่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคไอกรนมาก่อนหรือมี partial immunity<sup>(4)</sup> ในประเทศไทยผลการแยกเชื้อให้ผลบวกต่ำเพียง 10.8% จากการศึกษาที่โรงพยาบาลเด็ก<sup>(5)</sup> และ 6.5% จากการศึกษาที่อำเภอบัวใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา<sup>(6)</sup> ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยยังคงแพร่โรคไปสู่ทารกและเด็กอื่นที่มีภูมิคุ้มกันต่ำได้<sup>(7)</sup> จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาและอิมมูโนวิทยา มาช่วยในการวินิจฉัย วิธีอิมมูโนเรืองแสงมีความไว (sensitivity) สูง แต่มีความจำเพาะ (specificity) ต่ำ พบผลบวกปลอมถึง 40%<sup>(8,9)</sup> วิธีจับกลุ่มแบคทีเรีย (Bacterial Agglutination) ไม่สามารถวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว ต้องใช้ซีรัมผู้ป่วยอย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกัน 6-8 สัปดาห์<sup>(10)</sup> ดังนั้นการปรับปรุงวิธีการวินิจฉัยโรคให้รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูงและทำง่าย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการค้นหาผู้ป่วยให้ถูกต้องและการควบคุมโรคให้ได้ผลอย่างจริงจัง วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เพิ่งได้รับการพัฒนามาใช้เพื่อการวินิจฉัยโรคไอกรน พบว่าใช้ได้ผลดีในต่างประเทศ<sup>(11-13)</sup> สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการใช้วิธี ELISA มาช่วยวินิจฉัยโรคไอกรน การวิจัยนี้จึงได้นำวิธีดังกล่าวมาประเมิน Validity ตลอดจนระยะเวลาที่สามารถให้ผลบวกในการวินิจฉัยได้

## วัสดุและวิธีการ

### กลุ่มที่ใช้ศึกษา (Subjects)

1. ผู้ป่วยโรคไอกรนที่ได้รับการยืนยันผลทางห้องปฏิบัติการแล้ว 62 ราย เป็นผู้ป่วยที่แยกเชื้อ

*B. pertussis* ได้ 9 ราย และผู้ป่วยที่แสดงความแตกต่างของระดับแอกกลูตินินมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า จากการตรวจซีรัม 2 ครั้ง ห่างกัน 4-8 สัปดาห์ ด้วยวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย (Micro-agglutination test)<sup>(14)</sup> จำนวน 53 ราย

2. กลุ่มเด็กปกติ (Healthy children) เป็นเด็กที่ไม่มีอาการทางระบบหายใจส่วนบนขณะตรวจอายุต่ำกว่า 15 ปี อาศัยอยู่นอกเขตการระบาดของโรคแต่อยู่ในตำบลหรืออำเภอเดียวกันกับผู้ป่วย จำนวน 102 ราย ผู้ป่วยและเด็กกลุ่มปกติทุกรายได้รับการซักประวัติโดยใช้แบบซักประวัติเดียวกัน

### สิ่งส่งตรวจ (Specimens)

เก็บตัวอย่างซีรัมครั้งแรก (first serum) จากผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันทางห้องปฏิบัติการแล้ว 62 ตัวอย่าง และจากเด็กปกติ 102 ตัวอย่าง นำมาหาซีรัม Ig M และ Ig G แอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA คัดแปลงจากวิธีของ Viljanen และคณะ<sup>(11)</sup>

### วิธีการ

ใช้ sonicated *Bordetella pertussis* strain no. 134+165 Phase I ขนาดความเข้มข้นโปรตีน 5 ug/ml coat polystyrene micro-plate ชนิดกันแบบ (Nunc) อบ (incubate) 37°C นาน 3 ชั่วโมง ภายใต้ความชื้นล่างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 ซึ่งมี 0.05% Tween 20 รวมอยู่ด้วย ลด non-specific ด้วย PBS-Tween-1% normal sheep serum ตรวจหาซีรัม Ig G และ Ig M แอนติบอดีโดยใช้ซีรัมขนาดความเจือจาง 1:500 และ 1:50 ตามลำดับ (ได้จาก Chequer-board titration) สำหรับ Anti-Human Ig G หรือ Ig M Alkaline Phosphatase Conjugate และ p-nitrophenyl phosphate substrate ใช้ของ Behring เยอรมัน

เกิดสีเหลืองอมเขียว หยดปฏิกิริยาด้วย 2N NaOH วัดความเข้มของสีที่  $\lambda$  410 nm. ด้วยเครื่องอ่าน ELISA Minireader II (Dynatech Laboratory) ในการทดสอบแต่ละ plate จะทำ High positive serum และ Low positive serum

ควบคุมไปด้วยทุกครั้ง

**การอ่านผลและการควบคุมคุณภาพ**

อ่านค่าความเข้มของสี (Optical Density) แล้วแปลงเป็นค่า Optical Density Index (ODI.) ตามสูตร

$$ODI. = \frac{OD. \text{ of tested serum } \times \text{ Mean OD. of High positive serum}}{OD. \text{ of High positive serum on the same day}}$$

โดย High positive serum ที่ใช้ได้จากผู้ป่วยโรคไทรนที่มีไตเตอร์สูง ๆ ตั้งแต่ 1:1280 ขึ้นไป แบ่งใส่ vial เล็ก ๆ vial ละ 100 ul. แช่แข็ง

ที่ -20° C เอามาใช้วันละ vial ส่วนที่เหลือของแต่ละวันให้ทิ้งไม่นำมาใช้อีก ค่า OD ของ High positive serum มีค่าดังนี้

OD เฉลี่ย ( $\bar{X}$ )	สำหรับ Ig G = 1.20, Ig M = 0.61
ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.)	สำหรับ Ig G = 0.19, Ig M = 0.21
95% confidence interval of $\bar{X}$	สำหรับ Ig G = 1.11-1.29, IgM = 0.51-0.71

ในการทำการทดสอบแต่ละครั้ง หากค่า OD ของ High positive serum อยู่นอกช่วง 95% confidence interval ดังแสดงไว้ ผลในครั้งนั้นใช้ไม่ได้ต้องทำการตรวจหาใหม่

**การแปลผล**

การศึกษาถือว่าซีรัมผู้ป่วยให้ผลบวกที่ระดับ ODI. > ค่าเฉลี่ย ( $\bar{X}$ ) + 2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\bar{X}$  + 2SD.) ของค่า ODI ในเด็กกลุ่มปกติ 102 ราย

สำหรับซีรัมที่ให้ผลบวก Ig M จะนำมาหา

Rhumatoid Factor (RF) ถ้าให้ผลบวก RF ซีรัมรายนี้จะตัดออกจากการศึกษาเนื่องจากอาจให้ผลบวกปลอมได้

**ผลการศึกษา**

จากการตรวจหาระดับซีรัม Ig G และ Ig M แอนติบอดี ในเด็กปกติอายุต่ำกว่า 15 ปี จำนวน 102 ราย พบค่า ODI เฉลี่ย เท่ากับ 0.21 และ 0.17 ตามลำดับ โดยมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็น 0.19 สำหรับ Ig G และ 0.18 สำหรับ Ig M ดังแสดงใน Table 1

**Table 1** The optical density index (ODI) of 102 healthy children for Ig G and Ig M antibodies against *Bordetella pertussis*

Statistics	ODI for Ig G	ODI for Ig M
Mean + Standard Deviation ( $\bar{X}$ + SD)	0.21 + 0.19 (= 0.40)	0.17 + 0.18 (= 0.35)
Mean + 2 Standard Deviation ( $\bar{X}$ + 2SD)	0.21 + 0.38 (= 0.59)	0.17 + 0.36 (= 0.53)

ถ้าใช้ระดับการวินิจฉัยที่  $ODI > \bar{X} + 2SD$  ของค่าปกติแล้ว ซีรัมใดให้ค่า ODI ตั้งแต่ 0.60 ขึ้นไปสำหรับ Ig G และตั้งแต่ 0.54 ขึ้นไป สำหรับ Ig M ถือว่าให้ผลบวก การศึกษาพบว่า วิธี ELISA

มีความไว (sensitivity) 79.03% ความจำเพาะ (specificity) 91.18% และประสิทธิภาพ (efficiency) 86.59% จากการตรวจซีรัมครั้งแรก (ซีรัมเดียว) ดังแสดงใน Table 2

**Table 2** The validity of an ELISA measuring serum Ig M and Ig G antibodies for pertussis diagnosis

Results for ELISA*	Disease		Total
	positive	negative	
positive	49	9	58
negative	13	93	106
Total	62	102	164

  

Sensitivity of test	= 79.03 %
Specitivity of test	= 91.18 %
Predictive value of positive	= 84.48 %
Predictive value of negative	= 87.74 %
False positive	= 8.82 %
False negative	= 20.97 %
Efficiency of test	= 86.59 %

\* Cut-off levels of positive results for Ig M  $\geq$  0.54  
Ig G  $\geq$  0.60

เมื่อเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยระหว่างวิธี ELISA กับวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย (Bacterial Agglutination) โดยใช้ซีรัมที่เจาะครั้งแรกเป็นหลัก (ซีรัมเดียว) พบว่า จำนวนผู้ป่วยที่ให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี เท่ากับ 33 ราย (53.22%) ในขณะที่วิธี ELISA ให้ผลบวกแก่วิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียให้ผลลบจำนวน

16 ราย (25.81%) และวิธี ELISA ให้ผลลบแต่ วิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียให้ผลบวกเพียง 6 ราย (9.68%) ดังแสดงใน Table 3 เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี  $X^2$  (Mc Nemar's test) พบว่าวิธี ELISA ให้ผลบวกสูงกว่าวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .005$ )

**Table 3** Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterial agglutination (BA) for diagnosis of pertussis from the first serum of patients with pertussis

Laboratory Results	No.	% of total
ELISA* positive, BA**	33	53.22
ELISA positive, BA negative	16	25.81
ELISA negative, BA positive	6	9.68
ELISA negative, BA negative	7	11.29
Total	62	100.00

\* Cut-off levels of positive results for Ig M  $\geq$  0.54 and Ig G  $\geq$  0.60

\*\* Cut-off titers of positive results for BA  $\geq$  1:320

$X^2$  (McNemar's test) = 16.9 at df = 1, P-value < .005

ความสามารถในการวินิจฉัยโรคไอกรนอย่างรวดเร็วโดยวิธี ELISA พบว่า Ig M แอนติบอดีให้ผลบวกได้ตั้งแต่ระดับแอกกลูตินินต่ำ ๆ 1:10 ขึ้นไปในขณะที่ Ig G ให้ผลบวกตั้งแต่ 1:80 ขึ้นไป ดังนั้นผู้ป่วยในระยะแรก ๆ ซึ่งมีระดับแอกกลูตินินแอนติบอดีต่ำ ๆ ก็สามารถวินิจฉัยได้ด้วยวิธี ELISA แต่ไม่สามารถวินิจฉัยได้ด้วยวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย (เกณฑ์การวินิจฉัยโดยวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย จากการตรวจซีรัมที่เจาะครั้งแรกในผู้ป่วยที่มีอาการไอ นานกว่า 2 สัปดาห์ โดยทั่วไปถือว่า ให้ผลบวกการวินิจฉัยที่ระดับแอกกลูตินิน  $\geq$  1:320) ดังแสดง

ใน Table 4 ซึ่งจะเห็นชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาหลังผู้ป่วยมีอาการไอกับผลการตรวจหาซีรัม Ig M และ Ig G แอนติบอดีใน Table 5 พบว่า Ig M แอนติบอดีให้ผลบวกสูงสุดก่อนสัปดาห์ที่ 2 สูงถึง 62.5% แล้วลดลงเป็น 50% และ 28.0% ในสัปดาห์ที่ 2-4 และ 4-6 ตามลำดับ ในขณะที่ Ig G จะให้ผลบวกสูงขึ้นจาก 12.5% เป็น 56.25% และ 84.0% ในสัปดาห์ที่ 0-2, 2-4 และ 4-6 ตามลำดับ แล้วจะลดลงเป็น 40% ในสัปดาห์ที่ 6-8 ถ้าคิดผลบวกรวมกันจะพบว่าวิธี ELISA สามารถให้ผลบวกในการวินิจฉัย

โรคได้ก่อน 2 สัปดาห์ หลังผู้ป่วยมีอาการไอ โดยให้ผลบวกสูงขึ้นตามระยะเวลาแล้วจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4-6 จึงค่อยลดลง ในขณะที่วิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียให้ผลบวกต่ำกว่าวิธี ELISA ในสัปดาห์แรก ๆ

(สัปดาห์ที่ 0-2 และ 2-4) ตามที่แสดงไว้ใน Table 5 ดังนั้นวิธี BLISA จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคไอกรนในระยะแรกของโรค

**Table 4** The comparison of pertussis agglutinin titers and positive results for ELISA Ig M and Ig G from the first serum sample of pertussis patients

Agglutinin titers	No. of tested	No. of positive results for		
		Ig M	Ig G	Ig M and/or Ig G*
1 : 10	5	2	0	2
1 : 20	3	2	0	2
1 : 40	6	4	0	4
1 : 80	5	4	1	4
1 : 160	4	4	1	4
1 : 320	7	1	5	5
1 : 640	17	4	15	15
1 : 1280	8	3	6	7
≥ 1 : 2560	7	1	6	6
<b>Total</b>	<b>62* *</b>	<b>25</b>	<b>34</b>	<b>49</b>

\* Cut-off levels of positive results for Ig M  $\geq 0.54$  and  
Ig G  $\geq 0.60$

\* \* Only 39 cases were positive for bacterial agglutination method.  
(criteria diagnosis  $\geq 1 : 320$  from the single serum sample)

**Table 5** The relation of weeks after onset of cough and positive results for ELISA Ig M and Ig G antibodies in pertussis patients

Weeks after onset of cough	No. of tested	Positive for Agglutination**		Positive for ELISA*					
				Ig M		Ig G		Ig M and/or Ig G	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0-2	16	2	12.5	10	62.5	2	12.5	10	62.5
2-4	16	11	68.75	8	50.0	9	56.25	14	87.5
4-6	25	23	92.0	7	28.0	21	84.0	23	92.0
6-8	5	3	60.0	0	0	2	40.0	2	40.0
<b>Total</b>	<b>62</b>	<b>39</b>	<b>62.9</b>	<b>25</b>	<b>40.32</b>	<b>34</b>	<b>54.84</b>	<b>49</b>	<b>79.03</b>

\* Cut-off levels of positive results for Ig M  $\geq$  0.54 and Ig G  $\geq$  0.60

\*\* Cut-off titer of positive results for bacterial agglutination  $\geq$  1 : 320 from the single serum

### วิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ประเมินการใช้วิธี ELISA ในการช่วยวินิจฉัยโรคไอกรนซึ่งพบว่าวิธีดังกล่าว ให้ค่าความไวและความจำเพาะสูง และสามารถวินิจฉัยได้รวดเร็วกว่าวิธีการตรวจทางน้ำเหลือง วิทยาวิธีอื่น เช่น วิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย (Bacterial Agglutination) ให้ผลบวกค่อนข้างต่ำ<sup>(6)</sup> และต้องใช้ซีรัมอย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกัน 6-8 สัปดาห์<sup>(10)</sup> จึงจะให้ผลบวกสูงขึ้น วิธีอิมมูโนเรืองแสง ให้ผลบวกปลอมถึง 40%<sup>(8,9)</sup> ตลอดจนวิธีการแยกเชื้อก็ ให้ผลบวกเพียง 6.5%<sup>(6)</sup> และ 10.8%<sup>(5)</sup> การศึกษา ในต่างประเทศพบว่าวิธี ELISA ให้ค่าความไวสูง และใช้วินิจฉัยได้ดี แต่ใช้ Filamentous hemagglutinin เป็นแอนติเจนแทน<sup>(12,13)</sup> การศึกษาของ Viljanen และคณะ<sup>(11)</sup> ใช้ sonicated antigen ซึ่งเป็น crude แอนติเจน เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค ไอกรนเช่นกันและได้ศึกษาถึง specific properties ของวิธี ELISA นี้โดยใช้ inhibition technique

กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่พบได้ในทางเดินหายใจ เช่น *Bordetella parapertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae type b* และ *Haemophilus influenzae (non typable)* เป็นต้น พบว่า มีเพียงเชื้อ *B. parapertussis* เท่านั้นที่อาจให้ผลบวกได้

การวินิจฉัยโรคไอกรนด้วยวิธี ELISA โดยหา Ig M และ Ig G แอนติบอดี จากซีรัมที่เจาะครั้งแรก สามารถวินิจฉัยได้ตั้งแต่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการไอใน 2 สัปดาห์แรก (62.5%) ซึ่งวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันไม่ค่อยให้ผลบวกต้องรอเจาะเลือดครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4-6 ซึ่งผู้ป่วยกลับบ้านแล้ว ดังนั้นวิธี ELISA จึงสามารถช่วยให้การวินิจฉัยโรคไอกรนเป็นไปได้รวดเร็วยิ่งขึ้นโดยไม่ต้องรอเจาะเลือดครั้งที่ 2 (แต่ถ้าสามารถเจาะเลือดครั้งที่ 2 ได้จะช่วยให้การวินิจฉัยสูงมากยิ่งขึ้น)



## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข ศูนย์ระบาดวิทยา

ภาคเหนือ และ ศูนย์ระบาดวิทยาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ได้ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

## อ้างอิง

1. Preston NW. Technical problems in the laboratory diagnosis and prevention of whooping cough. *Lab Pract* 1970; 19 : 480-486
2. Linnemann CC. Host-Parasite Interactions in Pertussis. *International Symposium on Pertussis, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, 1978.* 3-18
3. Ross FW, Cumming CG. Isolation of *bordetella pertussis* from Swabs *Br Med J* 1981 Aug 8; 283(6288) : 403-404
4. Cruickshank R. Public Health Laboratory Services. Diagnosis of whooping cough : comparison of serological tests with isolation of *bordetella pertussis* : a combined scottish study. *Br Med J* 1970 Dec 12; 4 (5736) : 637-639
5. เพชรไสว เลียงจินดาถาวร. การศึกษาโรคไอกรนในทารกอายุต่ำกว่า 6 เดือน ที่โรงพยาบาลเด็ก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2523. 1-102
6. ไพบรพันธ์ คุณเกษม, สมชาย พิระปรกรณ์, พิพัฒน์ ลักษณะจรัลกุล. การเฝ้าระวังโรคไอกรนและศึกษาทางระบาดวิทยาในต่างจังหวัด ปี พ.ศ. 2526. รายงานฉบับสมบูรณ์ เสนอต่อ **China Medical Board** และคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2527, 1-37
7. Nelson JD. The changing epidemiology of pertussis in young infants : the role of adults as reservoirs of infection. *Am J Dis Child* 1978 Apr; 132(4) : 371-373
8. Broome CW, Fraser DW, English WJ. Pertussis diagnostic methods and surveillance. *International Symposium on Pertussis, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, 1978.* 19-22
9. Linnemann CC, Partein PH, Englender GS. Pertussis : persistent problems. *J Pediatr* 1974; 85(4) : 589-591
10. Lautrop H. Laboratory diagnosis of Whooping cough or bordetella in fections. *Bull WHO* 1960; 23 : 15-35
11. Viljanen MK, Ruuskanen O, Granberg C, Salmi TT. Serological Diagnosis of pertussis : IgM, IgA and IgG antibodies against *Bordetella pertussis* measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Scand Infect Dis* 1982; 14 : 117-122
12. Granstrom M, Granstrom G, Lindfors A, Askelof P. Serologic diagnosis of whooping cough by an enzyme-linked immuno-sorbent assay using fimbrial hemagglutinin as antigen. *J Infect Dis* 1982 Dec; 146 (6) : 741-745
13. Mertsola J, Ruuskanen O, Kuronen T, Viljanen MK. Serologic diagnosis of pertussis : comparison of enzyme-linked immuno-sorbent assay and bacterial agglutination. *J Infect Dis* 1983 Feb; 147 (2) : 252-257
14. Manclark CR, Meade BE. Serological response to *Bordetella pertussis* In : Rose NR, Friedman H. eds. *Manual of Clinical Immunology, 2ed American Society for Microbiology, Washington DC. 1980 : 496-499*