# 漫談百日咳菌檢驗

百日咳是一種具有高度傳染性的急性呼吸道疾病，尤其會對嬰幼兒造成嚴重傷害。臺灣陸續有零星案件被各地醫院發現提報，顯示百日咳菌持續存在並危害臺灣嬰幼兒健康，尤以民國 81 年 8 月花蓮爆發之百日咳疫情更引起各界的注意。近年臺灣極欲提昇爲已開發國家，爲此政府正積極推動全方位的提

昇，除工業技術昇級與發展經濟之外，醫療公共衛生也將是重要的一門。因此，衛生單位實有必要針對臺灣地區百日咳菌感染情況，細菌之基本特性，疫苗改進，與分子流行病學等進一步加以整體探討與研究，以提供臨床醫師及公共衛生政策釐定參考。

百日咳是由百日咳菌(Bordetella pertussis)感染發病所致，典型病程分卡他性(catarrhal)期、陣發咳嗽(paroxysmal coughing)期、及恢復(convalescent)期。臨床症狀具有陣發性咳嗽，吸氣喘息聲(whoop), 或咳後嘔吐(post-tussive)等特徵。1981 年Trollfors 與Rabo 研究[1]174 位百日咳菌培養陽性的成人患者，有 76 位(44 %)症狀嚴重，有 129 位(74 %)曾有喘息聲，但由於成人症狀通常無特異性，因此在其接觸的小孩被感染而發生典型症狀前，成人很少被懷疑感染百日咳菌。1989 年Morgan 及 1990 年Long 等人也提出類似的案例報告[2]。筆者於行政院衛生署預防醫學研究所(以下簡稱預研所)也曾發現類似案例，即有幼兒因持續咳嗽赴醫院求診，臨床醫師診斷爲百日咳並採其鼻咽檢體送驗，經實驗室分離培養出感染之百日咳菌，隨後勞駕區衛生人員再赴患者家中查訪接觸者，發現早已在家咳嗽多時之成人，竟是百日咳菌分離鑑定陽性，且血清抗體力價也明顯偏高。

**百口咳菌特性**

百日咳菌是好氧的革蘭氏陰性球桿菌(gram-negative cocco-bacilli)，有莢膜，無鞭毛，會自然感染而使人類致病。同屬(genus)中尚有副百日咳菌(Bordetella parapertussis)及 Bordetella brochiseptica 等。副百日咳菌也可使人發生類似百日咳症狀，不過多爲無症狀感染；B.bron - chiseptica 。會出現在狗或豬隻身上，偶有引起人類肺炎症狀報告。百日咳菌對環境抵抗力不強，易被化學消毒劑、乾燥、高溫所破壞。在培養基上長成之菌落經數代培養後會產生變異性，甚而喪失毒素產生能力。表一即顯示此三細菌的生化特性比較。

百日咳菌會表現多種與致病相關之表面蛋白質(surface protein)，包括脫酸環化醇(adenylate cyclase)，凝集原(agglutinogens)2 與 3 ，絲狀血球凝集素(filamentous hemagglutinin , FHA)，百日咳毒素(pertussis toxin , PT)，外膜蛋白質(outer membrane protein , OMP)30 / 32 , OMP 91 等等[3]。百日咳毒素會作用在宿主呼吸道上皮細胞，它是由具有酵素活性的A 寡元體(monomer)與具鍵結細胞表面能力的B 寡元體(oligomer)組成的

表一 **Bordetella** 屬之三種主要細菌的生化特性比較

| Species | Oxidase | Urea | Motility | M-H agar[a] | BAP[b] | M-C agar[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *B. pertussis* | | – | – | – | – | – |
| *B. parapertussis* | – | | – | | | |
| *B. bronchiseptica* | | | | – | | |

a : browning on Mueller-Hinton
b : sheep blood agar
c : MacConkey agar

A- B蛋白質毒素分子。當B 次元體(subunit)鍵結到細胞表面後，就把A 次元體送人細胞，接著A 次元體催化細胞膜上GTP 鍵結調節蛋白質(GTP-binding regulatory protein)的ADP 核糖基化作用(ribosylation)，進而誘導中國頰鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell , CHO)產生細胞病變。同時百日咳毒素也有淋巴球增多促進因子(lymphocytosis-promoting factor)，組織氨敏化作用(histamine sensitization)及胰島活化(Islet activation)等作用功能。百日咳菌的脫酸環化則會干擾白血球功能。氣管細胞毒素(trachealcy - totoxin)則是會傷害氣管上皮細胞的一種小分子物質。在免疫學上，百日咳毒素與絲狀血球凝集素扮演重要角色，1984 年Sato[(4)]等發現具有anti-PT 抗體的老鼠可對抗活百日咳菌腦內注射攻擊，anti-FHA 抗體雖不能完全保護攻擊，但卻可增加anti -PT 的保護效果。又pertactin(69 -kDa outer membrane protein)因在人類也具有抗原性，且其抗體在小白鼠呼吸道攻擊上具有保護作用，故於近來受到研究者的注意。在治療方面，紅黴素(erthromycin)較氯黴素(chloramphenicol)，四環素(tetracycline)有效。Sprauer 等也報告運用紅黴素可以有效預防家庭內的二次傳播感染[(5)]。

**流行病學**

Farizo 等人[(6)]統計分析美國 1980－1989 年間的 27 , 826 個百日咳案例，在患者年齡分佈上，有 49.9 %案例是發生在l 歲以下嬰兒，有 21.2 %案例是發生在l－4 歲小孩。在季節分佈則發現有 57 %是發生在 6－10 月間；1990 年 Gan 及Murphy 則表示在 1967－1986 年間，美國德州達拉斯的 182 例嬰兒百日咳患者中，48.4 %是發生在 5－8 月間。在百日咳患者的性別上，Farizo 等也發現 5 歲以上患者中，女性發生在 5－8 月間。在百日咳患者的性別上，

Farizo 等也發現 5 歲以上患者中，女性的發生率高於男性，5 歲以下小孩則無明顯性別差異。

百日咳菌感染小孩後會導至嚴重的病症，但有多篇報告指出成人是重要的儲菌者(reservoir)。1965 年lambert[7]等人曾指出人類在最後一次疫苗接種後 12 年，免疫保護力價會減弱喪失，以致很多成人變成百日咳菌易感染者。由於美國小孩在 6 歲以後就未再補強疫苗注射，成人免疫力僅因偶然性的自然暴露而補強，1987 年Bass 與stephenson 即估計美國大約有 5 千萬成人是百日咳菌易感染者，且此數目仍會繼續增加[8]。1987 年Robertson 等人調查 218 位咳嗽症狀長達一個月以上的澳洲成人，利用IgA 酵素免疫分析法(enzy - me -linked immunosorbent assay , ELISA)檢測血清，認爲其中 56 位(26 %)是百日咳菌新近感染所致[9]。1989 年Morgan 等人研究 118 位咳嗽持續超過 6 天以上的大學生，發現其中 24 位(20 %)呈血清學陽性[10]。同樣地，1992 年Mink 等人也分析咳嗽超過 6 天以上的 130 位大學生，也發現其中 34 位(26 %)具有百日咳菌的感染證據，包括 1 位直接螢光抗體扶(direct flu - orescentantibody , DFA)及 33 位血清學證據[11]。綜合以上研究報告都支持成人就是百日咳菌主要儲菌者的論點。

## 實驗室診斷

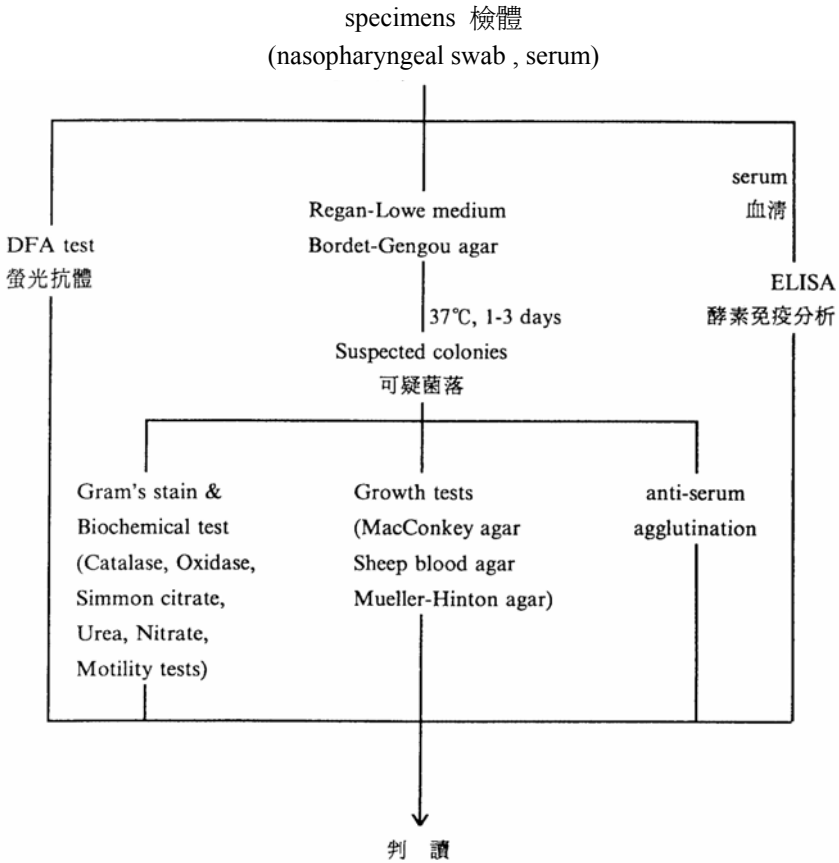
百日咳菌是一種挑惕不易培養生長且採檢運送困難的細菌。今日科技雖一日千里，但即是美國目前也仍無一套能夠同時兼具高敏感性及高特異性的例行實驗診斷方法[12]。美國現雖訂有百日咳案例報告的臨床症狀及實驗室標準，但仍有 41 %州或地區健康部門會接到實驗室診斷爲陰性的醫生百日咳案例報告，甚至有的連實驗室診斷都沒作也被接受爲案例報告[6]。

美國疾病管制中心認爲百日咳的確認案例需包括咳嗽至少持續 2 週以上，有陣發性咳嗽，吸氣時喘息聲，或咳後嘔吐等臨床症狀而無其他明顯病因，且須經實驗室自臨床檢體分離出百日咳菌者。1988 年Stekctee 等人表示，百日咳菌的陽性分離率與發病時間有關[13]，在第三週爲 25 ％陽性率，第四週爲 14 %，第五週爲 0 ％。不過Farizo等表示，百日咳患者在抗生素治療時可能呈細菌培養陰性，但若未經完整持續治療，則有可能再變成細菌培養陽性。圖一即是目前預研所參考Manual of clinical micorbiology(5th Edition , ASM.Washington)等資料所運用之百日咳檢驗流程圖。預研所自 81 年 8 月至 82 年 11 月問北部地區的送驗檢體中，共分離鑑定出百日咳菌 18 株，表二即

顯示 82 年度細菌培養陽性患者分佈情形。然而由於百日咳菌是挑惕不易培養生長且

Isolation & Identification of Bordetella pertussis

**百日咳菌分離鑑定**




採檢困難的細菌，因此有多件臨床醫師診斷爲百日咳之病例但卻分離不到菌體，顯示仍有必要研究與改進鑑驗方法，以提昇檢驗陽性率。

血清學診斷方面，1982 年viljanen([14])等利用超音波打碎的福馬林殺死(formalinkilled)菌體做抗原，以ELISA 方法檢測患者血清中IgM ，IgA 及IgG 抗體效價，認爲是有助於百日咳快速診斷，尤其對是細菌培養陰性之患者。爾

後，又有多篇利用ELISA 偵測百日咳毒素，FHA 及凝集原等抗體的研究報告。不過 1989 年Halperin 等人在評估百日咳的細菌培養，血清學診斷檢

**表二　民國 82 年台灣北部地區百日咳菌分離陽性者分佈情形**

| 編　號 | 年紀[a] | 檢驗月份 | 細菌檢驗 | 住地/提報醫院 | 咳嗽 | 備考說明 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PT-177 | 1m | 8月 | + | 中和/婦幼醫院 | + | 病患 |
| PT-181 | 2y | 8月 | + | 三重/長庚醫院 | + | 病患 |
| PT-186 | 29y | 8月 | + | 木柵/婦幼醫院 | + | PT-184[c]接觸者 |
| PT-188 | 14m | 8月 | + | 羅東/王維昌診所 | + | 病患 |
| PT-204 | 28y | 9月 | + | 羅東/宜縣衛局 | –[b] | PT-188[c]接觸者 |
| PT-215 | 2m | 9月 | + | 桃園/婦幼醫院 | + | 病患 |
| PT-243 | 3m | 11月 | + | 木柵/國泰醫院 | + | 病患 |
| PT-244 | 9m | 11月 | + | 新莊/婦幼醫院 | + | 病患 |
| PT-246 | 10y | 11月 | + | 新莊/北縣衛局 | + | PT-244[c]接觸者 |

a : m , month　　y , year
b：無咳嗽，但有痰
c : PT －184 爲血清學診斷陽性病患

驗，及免疫螢光抗體檢驗等方法後，認爲僅依據典型症狀與細菌培養結果作爲確認案例標準，似乎低估百日咳診斷的實際證據，所以較適宜的實驗室診斷，應是同時進行鼻咽培養及血清學ELISA檢驗。目前血清學ELISA 檢驗已有數種商品化套組販售，可以用來偵測百日咳菌的IgM , IgG , IgA 等特異性抗體。在血清診斷判讀上有兩種方法，一是適當時間間隔之成對血清力價上升 4 倍以上者，但會有合適間隔時間成對血清檢體不易獲得的困擾[15]。二是恢復期血清力價(標準偏差)高於未感染人口族群之平均值者[16]。1990 年Me - rtsola 等也針對百日咳毒素或外膜蛋白質評估患者血清的IgM , IgA 及IgG 抗體情形，結果認爲偵測百日咳毒素IgA 抗體效價是較有價值的，可以作爲細菌培養陰性者的輔助診斷[17]。

**國內外相關之檢驗研究**

近年國內有關百日咳研究較偏重疫苗相關研究。民國 80 年黃立民等針對 104 位小孩，評估接種三劑三合一疫苗後免疫效果，發現至少有 85 %小孩具有anti-PT 與anti-FHA 等百日咳保護抗體[18]。民國 80 年李慶雲等對 366 名嬰兒進行非細胞性疫苗及單成份百日咳疫苗的免疫學及副作用評估，發現接種後

之anti-PT 及anit-FHA 抗體效價均比傳統疫苗高，且副作用也比較低[19]。民國 80 年林勝育等對百日咳培養液中百日咳毒素與FHA 進行濃縮製備研究，結果可製得濃度爲 460－2600EU / mL 之百日咳毒素[20]。民國 77 年劉宗榮等研究三合一疫苗對肝臟藥物代謝的影響，結果在鼴鼠實驗模式上，舊式三合一疫苗會抑制肝臟細胞色素P-450 及其相關酵素活性，相對的，新式三合一疫苗無抑制效應[21]。另外，民國 77 年馮濟敏等研究百日咳毒素對脂肪細胞分化之影響，結果顯示百日咳毒素可促進 3T3－LI細胞分化，但不影響分化過程中之細胞增殖情形[22]。此外，在小兒科醫學會發表的口頭報告有江宗明等之〝嬰幼兒三合一疫苗之接種及百日咳流行之調查[23]〞，劉暄峰等之〝中部地區百日咳抗體血清學之調查研究[24]〞，謝煌德等之〝三合一疫苗併發急性腦病變一病例報告[25]〞；可惜這三個報告尚未以完整的正式書面報告發表於國內學術期刊。

由上可知，臺灣地區似乎明顯缺乏百日咳菌特性及其分子流行病學之相關研究。例如，目前發生的確認案例之間是否有關連性？傳染源相同或相異？目前三合一疫苗注射產生的抗體是否對所有臨床菌株都有效果？由於種族生活或疫苗接種時程差異，疫苗接種後之台灣小孩到底應有多少抗體力價才算有保護力？疑似百日咳菌感染之台灣幼兒或成人，進行血清學抗體診斷時之判讀標準值(cut-off)又應是多少？將來若改用非細胞性疫苗注射產生的抗體，是否又對所有的臨床菌株都有效果？有少數小孩記錄上是已接種疫苗，卻發生百日咳的可能原因又爲何？

由於百日咳菌對一般棉棒的脂肪酸敏感，所以採檢棉棒品質與輸送培養基種類都會影響百日咳菌檢驗結果。1987 年Hoppe 與Weiss[26]比較 4 種鼻咽腔採檢棉棒及輸送分離培養基後，認爲海藻酸鈣(calcium alginate)是最適宜的細菌採檢輪送與分離方法。1989 年Hoppe 與Schlagenhauf 進一步比較三種不同動物血與不同培養氣體條件[27]，結果顯示Charcoal agar 添加 10 %脫纖維馬血並在一般空氣培養箱內培養，菌落可長得較多較快。又 1993 年Hallander 等比較鼻咽抽氣吸出及棉棒兩種採檢方法後，顯示抽氣吸出法可以得到較多檢體量，更方便加作其他檢驗以提高診斷敏感度，也因而被運用在瑞典 1992 - 1995 年百日咳疫苗效力試驗計畫中[28,29]。預研所目前乃採用台大陳中明醫師口頭建議，以Amies charcoal medinm 作爲鼻咽採檢輸送培養基後，結果顯示百日咳菌分離率是比早先使用之方法來的高。筆者也曾請教民國 82 年 7 月間自美國來台訪問之李忠明醫師，李醫師表示：鼻咽抽氣吸出法固然效果優良，但較適合有經驗之醫院人員使用，若全面推廣台灣區域衛生人員運用採檢，對工作業

務繁多的區域衛生人員而言，可能會碰上正確使用技巧的訓練問題。預研所也將擬定計畫研究一套適合台灣現況的採檢器材與輸送培養基。

此外，也有一些研究者發展其他方法檢驗百日咳。1990 年Zackrisson 等以ELIAA 直接檢測百日咳患者唾液中百日咳毒素及FHA 的IgA 抗體[30]，但效果低於血清的ELISA 檢驗。 1989 年Friedeman[31]等利用單株抗體(monoclonal antibody)以點墨免疫分析法(Dot blot immunoassay)直接檢測呼吸道抽氣吸出分泌物內之百日咳毒素，其敏感度達 10ng ，初步認爲可能是有用的快速檢驗方法。1993 年Sanden 等人也利用醋寡糖的單株杭體發展rapid im - munodot 技術，認爲優於螢光抗體檢驗方法[32]。1990 年Confer[33]等檢測鼻咽棉棒檢體中百日咳菌的脫苷酸環化醇活性，認爲有助於百日咳的快速診斷；1991 年Eriksson 等則改從鼻咽抽氣吸出分泌物檢測脫苷酸環化酶活性，也認爲可以作爲早期快速診斷方法[34]。由於百日咳毒素會使CHO 細胞產生特異性的細胞病變，其敏感性高達 1ng / ml ; 1990 年Halperin 等研究利用百日咳抗毒素中和特異性細胞病變後，認爲CHO 細胞毒性分析(cytotoxicity assay)是一種具有高敏感性及高特異性的百日咳快速診斷方法。

自聚合酯鏈反應技術(polymerase chain reaction , PCR)發明以來，其一直被認爲是一種具有高特異性及高敏感性的快速實驗診斷方法，目前利用PCR 技術檢測百日咳的研究報告已有多篇。1989 年Houard 等發展PTp1 , PTp 2 與PIpl , Pip2 兩組引子(primer[35])，分別產生 191 bp 與 121 bp DNA 片段產物，敏感度達 6 個純百日咳菌，鼻咽分泌檢體可達 50 個菌體。1990 年Glare 等也發表利用百日咳菌的重複序例(repetitive sequence)發展一組引子[36], 可產生一個 153 bp DNA 片段產物，可以檢驗 30 個純百日咳菌。1992 年Olcen 等也利用百日咳菌的重複序列發展可產生 400 bp DNA 片段的一組引子[37]。1993 年He 等也發表利用百日咳菌的repeated gene element 發表一組PCR 引子，並應用於兩個爆發案例後，認爲可以用於鼻咽棉棒及鼻咽抽出液檢驗[38]。1993 年Douglas 等也以百日咳菌的脫菌的脫苷酸環化酶基因序列上的一段 522 bp 爲目標發展PCR 技術，可以檢測 100 CFU 純百日咳菌液，若用模擬棉棒加菌檢體則可檢測 10 , 000 CFU 菌數[39]。1993 年Zee 也報告利用百日咳菌insertion sequence element IS452 及副百日咳菌的IS1001 發展兩組引子，在一起組合使用下，可以同時檢測並區分百日咳菌與副百日咳菌，其敏感度達一個純百日咳菌或副百日咳菌[40]。總之，以上諸篇報告都一致認爲PCR 有助百日咳案件快速正確診斷。李忠明醫師在比較百日咳菌及副百日咳菌porin 的DNA 鹽基序列差異後，發展一組PCR 引子可以有效地一次同時檢出並區分百日菌或副百日咳咳菌，其敏感度也高達一個純百日咳菌或副百日咳菌；筆者已著手

引進此項PCR 技術，並評估應用於預研所百日咳菌例行檢驗過程中的效果，期能有效提昇檢驗品質與能力。

台大醫院小兒科李慶雲教授多年來一直從事百日咳之研究計畫，並對衛生單位多方卓越建議與指導。目前項研所所長洪其璧也正領導一組人員從事百日咳疫苗開發研究計畫，希望改進台灣現有百日咳疫苗缺點。此外，也有一些國內研究者從事百日咳不同方向之研究。關於檢驗部份，筆者也逐步嘗試提昇檢驗品質，並積極蒐集與分析台灣的臨床分離株，希望能對本土性的百日咳菌有更多的認識，俾能提供台灣百日咳疫情管制與撲滅工作參考，以盡防疫人員之職責。

**撰稿者**：李永盛、邱秀櫻、潘子明、林勝育(行政院衛生署預防醫學研究所)

**參考文獻：**

1.Trollfors B , Rabo E.Whooping cough in adults.B.M.J.1981 ; 283 : 686－697.

2.Morgan C , Pineda E , Blumberg D.Adults as the reservoir of Bordetella perlussis infection for Children.Presented at the 29th On the science Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.1989a ; Septem - ber 17－20 , Houston , Tex.

3.Hodder SL , Mortimer EA.Epidemiology of pertussis and reactions to pertussis vaccine.Epidemiol.Rev.1992 ; 14 : 243－267.

4.Sato H , Sato Y.Bordetella pertussis infection in mice : correlation of specific antibodies against two antigens , pertussis toxin , and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system.Infect.Immun ; 1984;46 : 415－421.

5.Sprauer MA , Cochi SL , Zell ER , et al.Prevention of secondary transmission of pertussis in households with early use of erythromycin.AIDC.1992 ; 146 : 177－181.

6.Farizo KM , Cochi ST , Zell ER , et al.Epidemiological features of pertusis in the United States , 1980－1989.Clin Infect Dis 1992 ; 14 : 708－719 .

7.Lambert HJ.Epidemiology of a small pertussis outbreak in Kentcounty , Michigan.Public.Health.Rep.1965 ; 80 : 365－369.

8.Bass JW , Stephenson SR.The return of pertussis.Pediatr.Infect Dis J 1987 ;6 : 141－144.

9.Robertson PW , Goldberg H , Jarvie BH.Bordetella pertussis infection : a cause of cough in adults.Med J Aust 1987 ; 146 : 522－525.

10.Morgan C , Pineda E , Lewis K.A reserachfor Bordetella perlussis infection in college students.Presented at the 29th On the science Conference on Antimicrobail Agents and Chemotherapy.1989b ; Septem - ber 17－20 , Houston , Tex.

11.Mink CAM , Cherry JD , Christenson P.A search for Bordetella perlussis infection in university students.Clin Infect Dis 1992 ; 14 : 464－471 .

12.Strebel PM , Cochi SL , Farizo KM , et al.Pertussis in Missouri : evaluation of nasopharyngeal culture , direct fluorescent antibody testing , and clinical case definition in the diagnosis of pertussis.Clin Infect Dis 19939 16 : 276－285.

13.Steketee RW , Burstyn DG , Wassilak SGF.A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosis pertussis in an outbreak in a facility for the developmentally disabled.J Infect Dis 1988 ; 157 : 441－449 .

14.Viljanen MK , Ruuskanen O , Granberg C.Serological diagnosis of pertussis IgM , IgA , and IgG antibodies against Bordetella pertussis measured by enzyme－linked immunosorbent assay(ELISA). ScandJ Infect Dis 1 982 ; 14 : 1 17－122.

15.Onoraato IM , Waassilak SGP.Laboratory diagnosis of pertussis : the state of the art.Pediatr.Infect Dis J 1987 ; 6 : 145－151.

16.Long SS, Weljon CJ , Clark JL , et al.Widespread silent transmission of pertussis in families : antibody correlates of infection and symptoma - tology.J Infect Dis 1990 ; 161 : 480－486.

17.Mertsola J , Ruuskanen O , Kuronen T , et al.Serologic diagnosis of pertussis : Evaluation of pertussis toxin and other antigens in enzy – me-linked immunosorbent assay.J Infect Dis 1990 ; 1 61 : 966 －971 .

18 .黃立民、李慶雲、許靜瑛：三合一疫苗接種之免疫效果，臺灣醫學會 1991 ; 90 : 670－674 。

19 .李慶雲、林壽延、黃立民等：非細胞及單成份百日咳疫苗之免疫學及副作用研究，1991 ；科資中心編號：R76-QR018 。

20 .林勝育、蔡美雲：百日咳保護抗原之研究及其抗體之偵測：百日咳抗原之製備及其含量之測定，1991 ；科資中心編號：RB80-1121 。
21 .劉宗榮、陳莉莉：比較舊式與新式白喉百日咳破傷風三合一疫苗在體內對肝臟藥物代謝的影響，1988 ；科資中心編號：MB80－1192 。
22 .馮濟敏、叢興平：百日咳毒素對 3T3-L1 脂肪細胞分化之影響。1988 ；科資中心編號：MA78－1646 。
23 .江宗明：嬰幼兒三合一疫苗之接種及百日咳流行之調查，中華民國小兒科醫學會雜誌，1993.supplement A 。
24 .劉暄峰，李明鎮，吳珍容等，中部地區百日咳抗體血清學之調查研究，中華民國小兒科醫學會雜誌，1993 , supplement B 。
25 .謝煌德，張正成，施永泰等，三合一疫苗併發急性腦病變──病例報告，中華民國小兒科醫學會雜誌，1993 , supplement C。
26.Hoppe JE , Weiss A.Recovery of Bordetella pertussis from four kinds of swabs.Eur J Clin.Microbiol 1987 ; 6 : 203－205.
27.Hoppe JE , Schlagenhauf M.Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of Bordetella pertussis on charcoal agar.J Clin Microbiol 1 989 ; 27 : 1097－1098.
28.Hallander HO , Reizenstein E , Renemar B , et al.Comparison of nasopharyngeal aspirates with swabs for culture of Bordetella pertussis.J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 50－52.
29.Halperin S , Kasina A , Swift M.Prolonged survival of Bordetella pertussis in a simple buffer after nasopharyngeal secretion aspiration.Can J Microbiol 1992 ; 38 : 1210－1213.
30.Zackrisson G , Lagergard T , Trollfors B.Immunoglobulin A antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in saliva from patients with pertussis.J Clin Microbiol 1990 ; 28 : 1502 －1505.
31.Friedman RL , Paulaitis S , Mcmillan JW.Development of a rapid diagnostic test for pertussis : direct detection of pertussis toxin in respiratory secretions.J Clin Mecrobiol 1989 ; 27 : 2466－2470 .
32.Sanden GN , Cassiday PK , Barbaree JM.Rapid immunofot technique for identifying Bordetella perlussis.J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 170－172 .

33.Confer DL , Zackrisson G , Lagergard T.Rapid diagnosis of pertussis.Scand J Infect Dis 1990 ; 22 : 175－177.
34.Eriksson M , Gunnar G , Wretlind B , et al.Bordetella pertussis adenylate cyclase activity in nasopharyngeal aspirates for Rapid diagnosis of whooping cough in relation to culture and sreology.Scand J Infect Dis 1991 ; 23 : 731－735.
35.Houard S , Hackel C , Herzog A.Speciflc identification of Bordetella pertussis by the polymerase chain reaction.Res Microbiol 1989 ; 140 : 477－487.
36.Glare EM , Paton JC , Premier RR.Analysis of a repetitive DNA sequence from Bordetella pertussis and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction.J Clin Microbiol 1990 ; 28 : 1982－1987.
37.Olcen P , Backman A , Johansso B , et al.Amplification of DNA by the polymerase chain reaction for the efficient diagnosis of pertussis.Scand J Infect Dis 1992 ; 24 : 339－345.
38.He Q , Mertsola J , Soini H , et al.Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis.J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 642－645.
39.Douglas E , Coote JG , Parton R , et al.Identification of Bordetella pertussis in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene.J Med Microbiol 1993 ; 38 : 140－144 .
40.Zee A , Agterberg C , Peeters M , et al.Polymerase chain reaction assay for pertussis : simultaneous detection and discrimination of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis.J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 2 1 34－2140.