

LABORATUVARIMIZDA HAZIRLANAN ELISA TESTİNİN BOĞMACA SEROLOJİSİNDE STANDARDİZASYONU VE SEROEPİDEMİYOLOJİK BİR ÇALIŞMADA KULLANILMASI*

STANDARDIZATION OF AN IN-HOUSE ELISA FOR PERTUSSIS SEROLOGY AND ITS APPLICATION IN A SEROEPIDEMIOLOGICAL STUDY

Nilay ÇÖPLÜ**, **Berrin ESEN****, **Demet KURTOĞLU****

Aysegül GÖZALAN**, **Kikuko MIYAMURA*****, **Iwao YOSHIDA*****

ÖZET: Seroepidemiyojik çalışmalarda çok sayıda örneğin incelenebilmesi için duyarlı, pratik ve ucuz yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmada, boğmaca serosürveyansı için, laboratuvarımızda anti-pertusis toksin (PT) ve anti-filamentöz hemagglütinin (FHA) antikorlarını saptayan bir ELISA yöntemi geliştirilmiş ve daha önceki çalışmalarda güvenilir olduğu belirlenen Ball-ELISA kiti ile karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemle 60 serum örneği test edilmiş ve iki yöntem arasındaki korelasyon katsayısı anti-PT ve anti-FHA için sırasıyla 0.729 ve 0.776, regresyon katsayısı ise sırasıyla 0.623 ve 0.693 olarak saptanmıştır. Laboratuvarımızda hazırladığımız ELISA yöntemi, Antalya ilinde yapılmış olan serosürvey çalışmasında toplanan 373 sağlıklı bireyin (6 ay- 91 yaş arası) serum örneklerinde uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Her iki antikorun hareketli ortalamalarının 10 yaşına kadar yükselerek anti-PT ve anti-FHA için sırasıyla 31 EU/ml ve 65 EU/ml'ye ulaştığı, daha sonraki yaş gruplarında da bu seviyeyi koruduğu gözlenmiştir. Çalışmada laboratuvarımızda hazırlanan ELISA yöntemi güvenilir bulunurken, uygulamanın yapıldığı serosürvey sonuçlarının antikor titreleri için anlamlı bir dağılım gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Boğmaca, seroepidemiyoloji, in-house ELISA, Ball ELISA.

ABSTRACT: Seroepidemiological studies need sensitive, practicle and cost-effective methods. For pertussis serosurveillance, an in-house ELISA for anti-pertussis-toxin (PT) and anti-filamentous-hemagglutinin (FHA) were established in our laboratory and compared by a Ball-ELISA which had been reported to be reliable previously. Sixty sera with various antibody titers were tested by both of

* Bu araştırma, "Türkiye'de Enfeksiyon Hastalıklarının Kontrolü Projesi" kapsamında yapılmış olan "Aşı ile Önlenebilir Hastalıkların Ulusal Seroepidemiyojik Sürveyans Çalışması"nın bir parçasıdır.

** Refik Saydam Hıfızssihha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara.

*** Japan International Cooperation Agency, Tokyo 151-8558, Japan.

the methods. The correlation coefficients between two methods were 0.729 and 0.776 for anti-PT and anti-FHA, respectively, and regression coefficients were 0.623 and 0.693, respectively. The in-house ELISA was applied to a serosurvey including 373 healthy subjects (6 months-91 years old) in Turkey to observe the results. The moving averages of both antibodies were increased until 10 years old, reaching to 31 EU/ml for anti-PT and 65 EU/ml for anti-FHA and kept around this level in the older ages. The in-house ELISA was found to be reliable and the serosurvey results obtained by ELISA showed a characteristic distribution of antibody titers in each age group.

Key words: Pertussis, seroepidemiology, in-house ELISA, Ball ELISA.

GİRİŞ

Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü ve JICA (Japan International Cooperation Agency) işbirliği ile "Türkiye'de Enfeksiyon Hastalıklarının Kontrolü Projesi"ni gerçekleştirmiştir. Bu projede seçilmiş üç ilde aşı ile önlenabilen hastalıklardan boğmaca, difteri, tetanoz, çocuk felci, kızamık ve hepatit B'ye karşı toplumun bağışıklık düzeyini saptamak amacıyla, 2000-2001 yıllarında bir dizi seroepidemiyolojik araştırma yapılmıştır¹. Seroepidemiyolojik araştırmalarda, çok sayıda örneğin antikor düzeylerinin hızlı, güvenilir ve ucuz yollardan ölçülebilmesine gereksinim vardır. ELISA bu gereksinimlere cevap verebilecek bir yöntem olup, birçok ülke tarafından bu amaçla kullanılmakta, güvenilirlik açısından standardizasyon çalışmaları bir çok laboratuvar tarafından gerçekleştirilmektedir²⁻⁹.

Bu çalışmanın amacı laboratuvarımızda kurulmuş olan (in-house) ELISA testinin güvenilirliğini daha önce kullanılmış ve doğru sonuçlar verdiği saptanmış olan Ball ELISA testi ile karşılaştırmak ve seroepidemiyolojik bir araştırmaya uygulayarak sonuçları değerlendirmektir. Bu amaçla *Bordetella pertussis*'e ait iki önemli antijen olan pertussis toksini (PT) ve filamentöz hemagglütinine (FHA) karşı antikor düzeylerinin ölçülmesi öngörülmüştür.

GEREÇ ve YÖNTEM

"In-house" ELISA Hazırlama ve Uygulama: Anti-PT ve anti-FHA IgG antikorları, 96 çukurlu düz tabanlı mikropaklar (Greiner, 655001, Frickenhausen, Germany) kullanılarak araştırıldı. Mikropakların antijen ile kaplanması aşamasında saflaştırılmış "Pertussis Toxin" (PT; 10 µg PN/ampul, JNIIH-5, Biken, Japan) ve saflaştırılmış "Pertussis Filamentous Hemagglutinin" (FHA; 10 µg PN/ampul, JNIIH-4, Biken, Japan) kullanıldı. Çukurların kaplanmasında 0.05 M karbonat-bikarbonat tampon (pH: 9.6) ile her iki antijen 100 µl'de 0.1 µg PN/ml PT, 0.04 µg PN/ml FHA olacak şekilde eklendi ve nemli ortamda, 4°C'de 48 saat inkübe edildi. Test günü, öncelikle mikropaklar 125 µl bloke edici tampon [(%0.5 Bovine Serum Albumin içeren fosfat tampon saline (FTS-BSA))] ile 37°C'de bir saat çalkalamalı inkübatörde (Incubator/shaker, Labsystem iEM8, Helsinki, Finland) bekletildi. Çalkalamalı inkübatör bundan sonraki tüm inkübasyonlarda kullanıldı. Daha

sonra mikropalaklar üç kez %0.05 Tween 20 içeren FTS (FTS-T) ile yıkandı ve bu işlem her inkübasyondan sonra tekrarlandı. Denek serumları ve referans serum [Anti-Pertussis Reference human sera IgG (anti-PT IgG için 250 ELISA Unit (EU), anti-FHA IgG için 400 EU) Biken, Japan] %0.05 Tween 80 içeren FTS-BSA ile, sekiz kez iki kat artan seri dilüsyonda hazırlandı ve mikropalaklar bu ve takip eden basamaklardan sonra 22°C'de bir saat inkübe edildi. Bundan sonraki basamaklar; FTS-T'de sulandırılmış konjugat [Fc-specific alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG (Seikagaku, Kogyo, Tokyo, Japan)] eklenmesi, yıkama ve sonrasında substrat eklenmesi [diethanolamine tamponda (1 mg/ml, pH: 9.6) sulandırılmış "P-nitrophenyl phosphate" (Wako, Tokyo, Japan)] ve 3M NaOH ile durdurma şeklinde gerçekleştirildi. Mikropalaklar ELISA okuyucusu (Labsystem, Multi Skan EX, Helsinki, Finland) kullanılarak $A_{405/630}$ dalga boylarında okutuldu. Anti-PT and anti-FHA IgG antikor titreleri "parallel line assay" ($p=0.05$) kullanılarak hesaplandı¹⁰. Bu yöntemle tespit edilebilen en düşük antikor titresi her iki antikor için de 1.0 EU/ml idi.

Ball-ELISA Yöntemi: Ball-ELISA kiti (Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Kısaca; 24 çukurlu mikropalakların (Greiner, no. 662160, Frickenhausen, Germany) her çukuruna denek serumu ya da standart solüsyon (anti-PT, 125 EU/ml; anti-FHA, 200 EU/ml) (10 µl), tampon solüsyonu (1200 µl) ve PT ya da FHA antijeni ile kaplanmış olan birer polistiren boncuk eklendi. Mikropalaklar 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra "horseradish peroxidase-labeled antihuman IgG" (1200 µl) eklendi, yine inkübasyondan sonra boncuklar ayrı çukurlara alındı. Sitrat tamponda sulandırılmış "orthophenylenediamine" (500 µl) ile inkübasyondan sonra 0.5 M H₂SO₄ (1500 µl) ile tepkime durduruldu ve ELISA okuyucusu (Labsystem, Multi Skan EX, Helsinki, Finland) ile A_{492} dalga boyunda okutuldu. Antikor titreleri, standart serumların sonuçları kullanılarak çizilen grafik yardımı ile saptandı. Bu yöntemle tespit edilebilen en düşük antikor seviyesi her iki antikor için de 1.0 EU/ml idi^{2,3}.

Çalışma Grubu ve Serum Örnekleri: Uygulama için Antalya ilinde 2000 yılında yapılmış olan araştırmada, 6 ay-91 yaş arasındaki bireylerden alınan serumlar kullanıldı. Araştırma grubu sağlık ocakları tarafından her yaş grubundan, kırsal-kentsel ve kadın-erkek oranı eşit olacak şekilde randomize olarak seçilmişti. Katılım için kişilerin onayı alınmış ve kan örnekleri yüz yüze görüşme yöntemiyle yapılan bir anket sonrasında fizik muayene yapılarak toplanmışti. Serumlar ayrıldıktan sonra test gününe kadar -80°C'de saklandı.

Araştırma grubunun cinsiyet, yerleşim yeri, difteri-boğmaca-tetanoz (DBT) aşı dozu ve geçirilmiş boğmaca enfeksiyonu öykülerinin yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 1'de gösterildi.

Anti-PT için 373, anti-FHA için 371 serum örneği öncelikle "in-house" ELISA testi ile çalışıldı. Bu şekilde antikor düzeyi belirlenmiş olan serumlardan değişik titrelere sahip olan 60 adedi seçilerek Ball-ELISA ile tekrar çalışıldı.

İstatistiksel Değerlendirme: İstatistiksel analizde bağımlı örneklerde t testi kullanıldı. Hareketli ortalama üçlü yaş bantları için uygulandı.

Tablo I: Araştırma Grubunda Bazı Değişkenlerin Yaş Grubuna Göre Dağılımı, Antalya-2000

Yaş Grubu (yıl)	Cinsiyet			Yerleşim Yeri		DBwT dozu				Boğmaca Enfeksiyonu		
	Toplam	E	K	Kırsal	Kentsel	0	1-2	3-4	Bilinmiyor	Hayır	Evet	Bilinmiyor
0-1	36	16	20	18	18	–	1	35	–	36	–	–
2-3	38	20	18	20	18	–	1	37	–	38	–	–
4-5	41	20	21	22	19	1	–	38	2	40	–	1
6-7	33	14	19	16	17	2	–	31	–	32	1	–
8-9	31	14	17	15	16	–	–	27	4	29	1	1
10-19	30	13	17	17	13	–	1	21	8	29	–	1
20-29	43	15	28	20	23	3	–	8	32	38	–	5
30-39	40	20	20	21	19	–	–	3	37	33	–	7
40-49	31	16	15	13	18	3	–	3	25	22	3	6
≥50	50	23	27	27	23	4	–	1	45	41	–	9
Toplam	373	171	202	189	184	13	3	204	153	338	5	30

BULGULAR

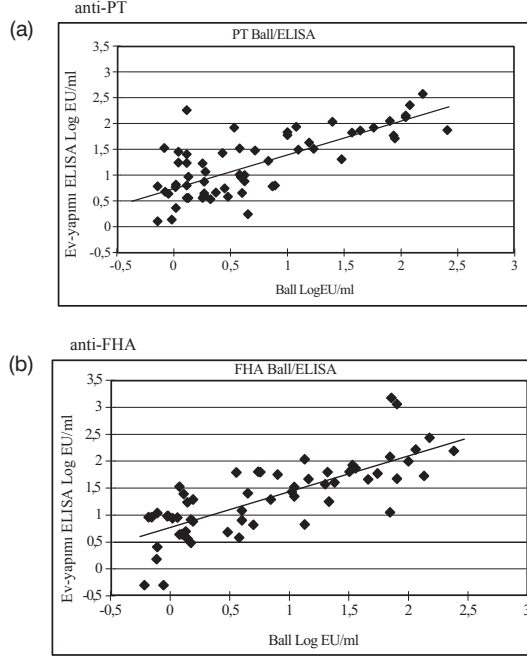
Anti-PT ve anti-FHA antikorları için her iki ELISA yönteminin karşılaştırmalı sonuçları Şekil 1a ve 1b'de sunulmuştur.

"In-house" ELISA ile Ball-ELISA sonuçlarının arasındaki korelasyon katsayısı anti-PT ve anti-FHA için sırasıyla 0.729 ve 0.776, regresyon katsayıları ise sırasıyla 0.623 ve 0.693 olarak saptanmıştır.

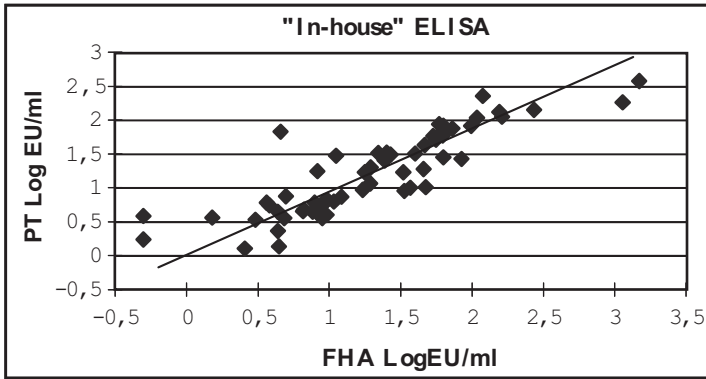
"In-house" ELISA testi ile anti-PT ve anti-FHA titrelerinin karşılaştırılması Şekil 2'de gösterilmiştir. İki antikoru titreleri arasındaki korelasyon ve regresyon katsayıları sırasıyla 0.867 ve 0.970 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar "in-house" ELISA testinin, süreyans çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

"In-house" ELISA yöntemi ile Antalya süveyinde saptanan antikor titreleri anti-PT için Şekil 3a ve anti-FHA için Şekil 3b'de verilmiştir. Kişilerin antikor titrelerinin yaşa göre dağılımı nokta grafik ile sunulurken antikor seviyelerinin hareketli ortalaması düz çizgi ile gösterilmiştir.

Her iki antikor için de titrelerin yaşa göre dağılımının benzer olduğu gözlenmiştir. Anti-PT ve anti-FHA titreleri 0-1 yaş grubunda sırasıyla 7 EU/ml ve 10 EU/ml olup, yaşla birlikte artış göstermekte, 10 yaş grubunda sırasıyla 31 EU/ml ve 65 EU/ml seviyesine çıkmaktadır. Daha ileri yaş gruplarında bu seviyeler, kısmen düşme ve dalgalanma göstermekle birlikte, 10 yaş grubundaki seviyeleri büyük ölçüde korunmaktadır. İstatistiksel analiz sonucuna göre, anti-FHA antikor seviyeleri anti-PT'ye göre 2.5 kat yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$).

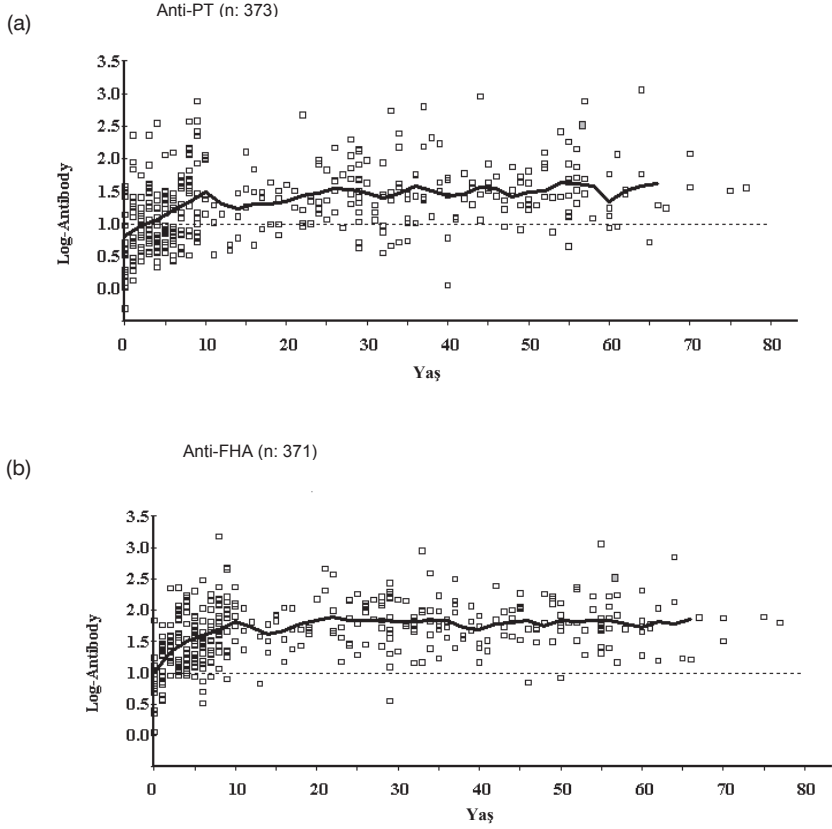


Şekil 1: "In-house" ELISA ile Ball-ELISA antikor titreleri arasındaki korelasyon (n=60). [x ekseninde "in-house" ELISA, y ekseninde ise Ball-ELISA testinin antikor titre sonuçları $\log_{10}$ EU/ml olarak sunulmaktadır. Titresi 1 EU/ml'den düşük bulunan serum örnekleri için 0.5 EU/ml değeri kullanılarak regresyon eğrisi çizilmiştir. Şekil 1a anti-PT korelasyon katsayısı=0.729, regresyon katsayısı=0.623; Şekil 1b anti-FHA korelasyon katsayısı=0.776, regresyon katsayısı=0.693 olarak saptanmıştır.].



Şekil 2: "In-house" ELISA yöntemi ile saptanmış olan anti-PT ve anti-FHA antikor titrelerinin karşılaştırılması. (n=60).

[Her iki eksen de antikor titreleri $\log_{10}$ EU/ml olarak sunulmuştur. Titresi 1 EU/ml'den düşük bulunan serum örnekleri için 0.5 EU/ml değeri kullanılmıştır.].



Şekil 3: Yaşa göre *B.pertussis* antikor titrelerinin Antalya sürveyindeki dağılımı (2000).

[Antikor titreleri "in-house" ELISA ile saptanmıştır. x ekseninde yaş, y ekseninde ise $\log_{10}$ EU/ml olarak antikor titreleri sunulmuştur. Her nokta bir deneği göstermektedir. Kesiksiz çizgi, üçlü yaş bantları uygulanarak hesaplanan hareketli ortalamayı göstermektedir.

Kesiksiz çizgi 10 EU/ml seviyesini göstermektedir.].

TARTIŞMA

Boğmaca hastalığının etkeni *Bordetella pertussis* olup etkene karşı immün cevap, hem doğal enfeksiyon, hem de aşı ile gelişebilmektedir. Tam hücre aşısı ile elde edilen bağışıklık aşı dozuyla orantılı olup, aşılardan sonra yaklaşık 2-5 yıl sürebilmektedir. Aşının etkinliği içeriğine göre değişmekte ve çocukların %70'den fazlası üç doz difteri toksoidi, tam hücre boğmaca aşısı ve tetanoz toksoidine (DBT) cevap vermektedir^{4,11}. Hastalığın patogeneğinde en etkili olduğu bilinen PT ve FHA antijenlerine karşı gelişen antikorlar, bağışıklığın ölçümünde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Antikor cevabının ölçümünde kullanılan başlıca teknikler Chinese hamster ovary test, bakteriyel aglütinasyon testi ve ELISA'dır^{4,5,7,8,12}.

Laboratuvarımızda, çok sayıda örneği aynı anda çalışma olanağı sağlaması, ucuz olması ve aynı proje kapsamında çalışılacak olan diğer antijenlere de uygulanabilir olması nedeniyle, boğmaca serolojisi çalışmalarında kullanılmak

üzere “in-house” ELISA tekniği geliştirilmiştir. Bu tekniğin güvenilirliğini saptamak için bulunan sonuçlar, daha önceki çalışmalarda ölçümlerinin başarılı olduğu saptanmış ve benzeri seroepidemiolojik araştırmalarda kullanılmış olan Ball-ELISA kitinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır^{2,3,13}. Sonuçların karşılaştırılmasında saptanan korelasyon ve regresyon katsayıları (Şekil 1a ve 1b) ve “in-house” ELISA testinin, iki antikor titrelerinin ölçümünde kendi içinde gösterdiği uyum (Şekil 2), bu tekniğin serolojik bir çalışmada kullanılabilir olduğunu düşündürmüştür.

“In-house” ELISA tekniğinin Antalya ilinde gerçekleştirilen serosürveye uygulanmasından elde edilen sonuçlar irdelendiğinde, her iki antikor için hareketli ortalamanın 0-1 yaş grubunda artmaya başladığı ve artışın 10 yaş grubuna kadar sürdüğü izlenmektedir (Şekil 3a ve 3b). Bu durum ülkemizde uygulanan ulusal aşılama programı ile uyumludur. Bu programa göre boğmaca aşısı 2, 3 ve 4 aylık çocuklara, rapel doz ise 18-24 aylık çocuklara uygulanmaktadır. Rapel dozun gecikmesi halinde aşının tam hücre aşısı olması nedeniyle 6 yaşından büyük çocuklara uygulanamamaktadır. Ülkemizdeki 1., 2. ve 3. doz aşılama oranları sırası ile %85, %82, %79 olup, Antalya ili için bu oranlar %93, %92 ve %88'dir¹⁴. Antalya ilindeki yüksek aşılama hızları bizim verilerimizle uyumludur. Buna karşılık erişkin yaş gruplarında saptanan yüksek antikor seviyelerinin, çocukluk çağında uygulanmış olan aşı ile açıklanması mümkün değildir⁴. On yaş grubu ve daha ileri yaş gruplarında saptanmış olan antikorlar büyük olasılıkla doğal enfeksiyona bağlı olup *B.pertussis*'in dolaşımında olduğuna işaret etmektedir. Son zamanlarda primer aşılama hızlarının yüksek olduğu ülkelerde bile okul çocuklarında, adolesanlarda ve erişkinlerde boğmaca hastalığının rapor edildiği gözlenmiştir^{4,6,8,9,13,15-17}. Bu durum boğmaca hastalığının yaşa göre dağılımında bir değişimin söz konusu olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, adolesanların ve erişkinlerin toplum için boğmaca açısından bulaş kaynağı olduklarını da göstermektedir. Bazı yazarlar yedi yaş üstündeki çocukları, hatta adolesan ve erişkinleri hücresiz aşı ile rutin olarak aşılamayı ve böylece toplumda boğmaca enfeksiyonunun önlenmesini önermektedir^{6,8,17}. Buna karşılık Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), DBT aşısında ek doz düşünen ülkelere maliyet-kar analizlerinin yapılmasını, kaynakların ve kaynak devamlılığının sağlanıp sağlanamayacağının iyi araştırılmasını, uygulanması planlanan ek dozun boğmaca epidemiyolojisine, özellikle de yaş dağılımına olan etkilerinin de gözönünde bulundurularak hareket edilmesini önermektedir^{4,9}.

ELISA testi ile saptanan antikorların koruyucu düzeyleri hakkında genel kabul görmüş bir titre bulunmamaktadır. Bununla birlikte, DSÖ'ne göre aşidan beklenen minimum antikor seviyesi 4 EU/ml'dir⁴. Öte yandan, boğmaca enfeksiyonundan iyileşen çocuklarda saptanan en düşük antikor titresinin 10 EU/ml olması nedeniyle, bu değerın sınır kabul edildiğini belirten bir çalışma vardır¹³. Bizim çalışmamızda 10 EU/ml değeri koruyucu antikor titresini açısından sınır değer olarak kabul edilmiştir. Bu bakış açısı ile, koruyucu titrelerin altında anti-PT antikoruna sahip bireylerin 10 yaşına kadar saptandığı (Şekil 3a), anti-FHA antikorlarına sahip olan bireylerin ise 2 yaş altında kaldıkları (Şekil 3b) gözlenmektedir. Ek olarak, anti-FHA antikor seviyeleri, anti-PT antikor seviyelerinden yüksek seyretmektedir. Değişik ülkelerde yapılmış olan pek çok çalışmada da benzer bulgular gözlenmiştir^{4,6,8,9,13,15}.

Bu durum, diğer *Bordetella* türleri ile karşılaşma olasılığının yanısıra, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydia pneumoniae* türleri ile enfeksiyon sonrasında da anti-FHA antikorları gelişirken, anti-PT antikorlarının gelişmemesine bağlı olabilir^{8,13,18,19}. Ayrıca anti-PT antikorunun titresi anti-FHA antikoruna göre daha hızlı bir düşüş göstermektedir⁹.

Bu çalışma, "in-house" ELISA tekniğinin uygulanmasının boğmaca serosürveyinin kantitatif olarak analiz edilebilmesi için uygun olduğunu ve gelecekte yapılacak olan geniş çaplı seroepidemiolojik çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

T E Ş E K K Ü R

Bu çalışmada serum örneklerinin toplanmasında emeği geçen Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Bölge Laboratuvarları ve Antalya İl Sağlık Müdürlüğü elemanlarına katkılarından dolayı teşekkürü borç biliriz.

KAYNAKLAR

1. Aşı ile önlenebilir hastalıkların laboratuvar verilerine dayalı ulusal epidemiyolojik sürveyansı. Türk Hij Den Biyol Der 2001, 58: 1 (Ek 1).
2. Sato Y, Sato H, Kodama H, et al: An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) in human sera. Develop Biol Standard 1990, 73: 167-174.
3. Kuno-Sakai H, Kimura M, Ohta K, et al: A simple and sensitive ELISA of antibodies to pertussis antigens. Vaccine 1992, 10: 350-353.
4. Immunological basis for immunization. Module 4: Pertussis. WHO/EPI/GEN/93.14
5. Giammanco A, Chiarini A, Maple PA, et al: European Sero-Epidemiology Network: Standardisation of the assay results for pertussis. Vaccine 2003, 21: 112-120.
6. Dominguez A, Vidal J, Plans P, Salleras L: The seroepidemiology of *B.pertussis* infection in Catalonia, Spain. Epidemiol Infect 2001, 126: 205-210.
7. Meade BD, Deforest A, Edwards KM, et al: Description and evaluation of serologic assays employed in a multicenter trial of acellular pertussis vaccines. Pediatrics 1995, 96 (Suppl): 570-575.
8. Van der Wielen M, Van Damme PV, Van Herck K, Schlegel-Haueter S, Siegrist CA: Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies in Flanders (Belgium). Vaccine 2003, 21: 2412-2417.
9. Cattaneo LA, Reed GW, Haase DH, Wills MJ, Edwards KM: The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* infections: A study of persons ages 1-65 years. J Infect Dis 1996, 173: 1256-1259.
10. Finney DJ: Statistical Method in Biological Assay. 1987, Charles Griffin Co Ltd, London.
11. Petersen JW: Cellular immunity in relation to pertussis vaccination and infection. Danish Medical Bulletin 1995, 42: 121-140.
12. Onorato I, Wassilak S: Laboratory diagnosis of pertussis: The state of the art. Pediatr Infect Dis J 1987, 6: 145-151.
13. Konda T, Kamachi K, Iwaki M, Matsunaga Y: Distribution of pertussis antibodies among different age groups in Japan. Vaccine 2002, 20: 1711-1717.
14. T.C.Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Çalışma Yıllığı 2001. T.C.Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü ve Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Ankara, 2002.
15. Corbeira PC, Dal-Re R, Aguilar L, Garcia-de-Lomas J: Seroepidemiology of *Bordetella pertussis* infections in the Spanish population: A cross-sectional study. Vaccine 2000, 18: 2173-2176.

16. Buydner PGV, Owen D, Vurdien JE, Andrews NJ, Matthews RC, Miller E: *Bordetella pertussis* surveillance in England and Wales: 1995-1197. *Epidemiol Infect* 1999, 123: 403-411.
17. Campins-Marti M, Cheng HK, Forsyth K, et al: Recommendations are needed for adolescent and adult pertussis immunisation: Rationale and strategies for consideration. *Vaccine* 2001, 20: 641-646.
18. Barenkamp SJ, Leininger E: Cloning, expression and DNA sequence analysis of genes encoding nontypable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1992, 60: 1302-1313.
19. Vincent JM, Cherry JD, Nauschuetz WF, et al: Prolonged afebrile nonproductive cough illness in American soldiers in Korea: A serological search for causation. *Clin Infect Dis* 2000, 30: 534-539.