

# Diagnóstico de laboratorio de tos ferina. Papel de la serología

Juan Carlos Sanz Moreno<sup>a</sup>, Fernando de Ory Manchón<sup>b</sup> y Grupo de Trabajo sobre Tos Ferina\*

<sup>a</sup>Laboratorio Regional de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad Comunidad de Madrid.

<sup>b</sup>Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

El cultivo constituye el método de referencia para el diagnóstico de la infección por *Bordetella pertussis*. Sin embargo, el retraso en la obtención de muestras y el tratamiento antibiótico previo pueden limitar su sensibilidad. La inmunofluorescencia directa proporciona, teóricamente, un diagnóstico inmediato. No obstante, es un procedimiento subjetivo que resulta poco sensible y específico. Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incrementan la sensibilidad del cultivo, manteniendo una elevada especificidad, pero también en este caso su rendimiento disminuye a lo largo de la evolución de la enfermedad. Los métodos serológicos representan la principal alternativa en los casos en los que el diagnóstico se demore. Se recomiendan técnicas de enzimoimmunoanálisis (ELISA) que incluyan antígenos purificados como la hemaglutinina filamentosa y, especialmente, la toxina pertussis. Aunque la confirmación tradicional del diagnóstico serológico se realiza mediante demostración de seroconversión, en la actualidad se plantea el diagnóstico basado en la titulación de una única muestra de suero.

**Palabras clave:** Tos ferina. Diagnóstico. Serología.

Laboratory diagnosis of *Pertussis*. Role of the serology. Culture is the reference method for the diagnosis of infection by *Bordetella pertussis*. Nevertheless, delayed sample collection and previous antibiotic treatment can limit culture sensitivity. In principle, direct immunofluorescence provides immediate diagnosis. It is, however, a subjective procedure that shows low sensitivity and specificity. PCR techniques increase culture sensitivity while maintaining high specificity, but their performance decreases along the evolution of the disease.

Serologic methods are the main alternative for cases in which diagnosis is delayed. Current recommendations center on ELISA techniques that include purified antigens, such as filamentous hemagglutinin, and particularly, pertussis toxin. Traditionally, serological diagnosis requires confirmation by demonstrated seroconversion, but now the possibility of diagnosis based on titration of a single serum sample is being evaluated.

**Key words:** *Bordetella pertussis*. Diagnosis. Serology.

## Introducción

La introducción generalizada de la vacuna frente a la tos ferina redujo notablemente la incidencia de esta enfermedad en el tercio final del pasado siglo. Este descenso en morbilidad y mortalidad se asoció desdichadamente con una subestimación de la tos ferina como un problema clínico de importancia y, a causa de ello, con una reducción en el arsenal de pruebas para su diagnóstico de rutina. Sin embargo, en los últimos años y en países con una elevada cobertura de vacunación se ha registrado una alarmante reemergencia de este proceso<sup>1-3</sup>. Este aumento en el número de casos afecta cada vez con más frecuencia a adultos jóvenes y adolescentes<sup>4</sup> que, a su vez, pueden representar la fuente de infección para los niños más pequeños<sup>5</sup>. Aunque la eficacia de la vacuna clásica de células completas se sitúa entre el 84-100%<sup>6</sup>, la duración de la protección es transitoria. En el declive de la protección vacunal pueden influir, además de la pérdida de memoria inmunitaria, las variaciones antigénicas de la cepas salvajes<sup>7</sup>. El manejo efectivo de los brotes de tos ferina requiere un diagnóstico ágil que permita adoptar las medidas necesarias para su resolución. Estas medidas comprenden el tratamiento de los casos, la quimioprofilaxis de los contactos y la vacunación de los susceptibles<sup>5</sup>. La aparición de las nuevas vacunas acelulares posiblemente genere cambios en los programas y las dianas poblacionales de vacunación. No obstante, previamente es preciso disponer de métodos diagnósticos lo suficientemente sensibles y específicos para perfilar la situación real de la tos ferina en un determinado entorno. Los procedimientos empleados para el diagnóstico de tos ferina pueden agruparse en dos categorías: métodos directos, basados en el aislamiento de la bacteria, o en la detección de alguno de sus componentes (cultivo, inmunofluorescencia directa, reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) y métodos indirectos en los que el diagnóstico se realiza mediante la determinación de la respuesta inmunitaria específica del paciente (serología).

\*Grupo de trabajo sobre tos ferina: Julia González Alonso<sup>a</sup>, José Luis de la Torre<sup>a</sup>, Francisco Salmerón<sup>b</sup>, Aurora Limia<sup>b</sup>, Odorina Tello<sup>c</sup>, Isabel Pachón<sup>c</sup>, Carmen Amela<sup>c</sup>, Julio Vázquez<sup>d</sup>, Fernando de Ory<sup>d</sup> y Juan Carlos Sanz<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Subdirección General de Promoción de la Salud y Epidemiología, Ministerio de Sanidad y Consumo; <sup>b</sup>División de Productos Biológicos y Biotecnología, Agencia Española del Medicamento; <sup>c</sup>Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III; <sup>d</sup>Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III; <sup>e</sup>Laboratorio de Salud Pública. Comunidad de Madrid.

Correspondencia: Dr. J.C. Sanz Moreno. Laboratorio Regional de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad Comunidad de Madrid. General Orta, 15. 28006 Madrid. Correo electrónico: jcsanz1@teleline.es

Manuscrito recibido el 12-12-2001; aceptado el 22-01-2002.

En este estudio se pretende realizar una descripción de las principales técnicas destinadas al diagnóstico de laboratorio de esta enfermedad, comentando sus ventajas y limitaciones e incidiendo de una manera especial en la aplicación de los métodos serológicos.

## Diagnóstico diferencial

La aparición de un cuadro de tos paroxística de más de 2 semanas de duración acompañado o no por síntomas clásicos como estridor respiratorio de alto tono, vómitos postusúgenos y cianosis y por signos de laboratorio como linfocitosis, debe hacer pensar en una posible tos ferina. Sin embargo, la inespecificidad de las manifestaciones de los síndromes pertusoides observados en lactantes (grupo de población en el que se dan la mayoría de estos cuadros) y la presentación leve o subclínica en adultos y adolescentes hace que la sospecha clínica no sea evidente y que en muchas ocasiones se vea demorada, retrasando y dificultando así la confirmación microbiológica. En estas situaciones es conveniente realizar un diagnóstico diferencial con otras bacterias como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y virus como el virus sincitial respiratorio (fundamentalmente en niños pequeños), adenovirus, enterovirus, influenza A y B y parainfluenza 1, 2 y 3<sup>8-11</sup>. En ocasiones, se ha detectado coinfección por varios agentes<sup>10</sup>. En los casos aparentemente típicos de tos ferina también es preciso realizar una confirmación de laboratorio. Un elevado porcentaje de cuadros con tos espasmódica de más de 21 días de duración (criterio de la Organización Mundial de la Salud [OMS] para definición de caso de tos ferina) están originados por otras bacterias<sup>10</sup>.

## Cultivo

El aislamiento en cultivo representa el procedimiento de referencia o patrón oro para el diagnóstico microbiológico de la infección por *Bordetella pertussis*<sup>12</sup>. Sin embargo, pese a que posee evidentemente una excelente especificidad, presenta la desventaja de carecer de una adecuada sensibilidad. Entre los factores que condicionan su rentabilidad destacan: el momento de la toma de muestras, la técnica de obtención, el uso de medios de enriquecimiento y transporte, el tipo de medio selectivo empleado y las condiciones de incubación. El mejor momento para la toma de muestras se da al final del período de incubación, durante la fase catarral y al comienzo de la fase de tos convulsiva<sup>13-18</sup>. La demora en la consulta médica y los problemas derivados del diagnóstico diferencial en los estadios tempranos de la enfermedad pueden retrasar la obtención de las muestras y limitar la eficacia del cultivo<sup>17,19</sup>. Otro factor de importancia que afecta el rendimiento del cultivo es la instauración de un tratamiento temprano con macrólidos. En estas circunstancias, el cultivo puede resultar prácticamente inútil. El aspirado de moco nasofaríngeo constituye la mejor muestra<sup>12,20</sup> y su sensibilidad es muy superior a la aportada por los frotis nasofaríngeos y sobre todo por los simples frotis faríngeos. Un problema para la obtención de

este tipo de muestra es que muchos pediatras y médicos de atención primaria no están familiarizados con las técnicas de aspiración y/o no disponen en consulta del material adecuado. Por ello, en la mayoría de las ocasiones las únicas muestras disponibles son frotis nasofaríngeos. El uso de estas muestras para aislamiento de *B. pertussis* puede estimarse el 12% menos eficaz que la toma de muestras mediante aspiración<sup>21</sup>. *B. pertussis* muestra tropismo especial por el epitelio ciliado respiratorio. Esta clase de epitelio no se encuentra en la faringe y por ello los hisopos faríngeos resultan menos adecuados que los nasofaríngeos<sup>12,22,23</sup>. Las fibras de algodón pueden resultar tóxicas para *B. pertussis* por lo que no se deben emplear torundas con este material<sup>24</sup>. Las torundas de alginato de calcio son las recomendadas para la toma de muestras para cultivo<sup>12,25</sup>. Sin embargo, este material puede inhibir las reacciones de amplificación de ADN por lo que, en caso de que, además de cultivo, la muestra vaya a ser procesada para PCR el empleo de torundas de Dacrón puede representar una buena alternativa<sup>12,20,26</sup>. Una vez obtenida la muestra, se recomienda la siembra directa e inmediata “a pie de cama” en placas de agar selectivo<sup>20,27-29</sup>. Este procedimiento puede incrementar el éxito del cultivo en un 29%<sup>21</sup>. Sin embargo, como en la mayoría de los casos esto no es factible, puede recurrirse al uso de medios específicos de transporte y conservación. *B. pertussis* es una bacteria muy lábil, extremadamente sensible a condiciones físicas y químicas. Esto hace que el transporte al laboratorio deba ser lo más rápido posible. El medio de Casamino ácido puede emplearse para el enriquecimiento y transporte rápido de *B. pertussis*<sup>30</sup>. Este medio tiene como ventaja su larga caducidad y como inconveniente que el transporte debe realizarse en un tiempo máximo de 4 h y en condiciones de refrigeración. El medio de elección para el transporte es el medio semisólido de Regan-Lowe<sup>31-33</sup>. En caso de que el envío de muestras al laboratorio se demore durante 1-2 días, este medio debe mantenerse en incubación a 36 °C.

Se dispone de varios medios selectivos para el cultivo de *Bordetella*. Algunos autores recomiendan como medio de elección el agar-carbón suplementado con el 10% de sangre de caballo y cefalexina (40 mg/l)<sup>12,20,22,29</sup>. Otros medios de cultivo útiles para el aislamiento de esta bacteria son el medio clásico de Bordet-Gengou<sup>12,17,34</sup>, agar-carbón tamponado con extracto de levadura (*buffered charcoal-yeast extract agar*)<sup>35</sup> y el medio sólido con cycloextrina<sup>36</sup>. Una vez inoculadas las placas de medio selectivo, éstas deben ser incubadas a 35-36 °C a lo largo de 7 días. Durante este período es preciso humidificar el ambiente y evitar la desecación del agar<sup>20</sup>. *B. pertussis* es un bacilo aerobio estricto y, por tanto, la atmósfera aeróbica normal es preferible a la atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> empleada para el crecimiento de otros microorganismos exigentes<sup>12,37,38</sup>. Con respecto a la mayoría de las bacterias de importancia clínica, *B. pertussis* se considera un patógeno de crecimiento lento. Las placas deben revisarse a diario para detectar la aparición de las colonias. En general, el crecimiento es visible al 3-4 día<sup>12,20</sup>. La identificación de las colonias sospechosas se realiza sobre la base de su morfología, su velocidad de crecimiento, sus características en determinados medios, su aspecto microscópico en la tinción de Gram y la reacción obtenida con pruebas

TABLA 1. Características de crecimiento de *Bordetella* sp.

Especie	Tiempo de crecimiento	Hemólisis (Bordet-Gengou)	Morfología de la colonia
<i>B. pertussis</i>	2-4 días (hasta 7)	Betahemólisis estrecha	Pequeñas, convexas y translúcidas (perlas o gotas de mercurio)
<i>B. parapertussis</i>	2 días	Gammahemólisis	Mayores, opacas, pálidas
<i>B. bronchiseptica</i>	1-2 días	Gammahemólisis	Aún mayores, superficie rugosa

TABLA 2. Diferenciación de especies de *Bordetella* sp.

Especie	Crecimiento agar-sangre	Gram	Catalasa	Oxidasa	Ureasa	Aglutinación (antisuero específico)
<i>B. pertussis</i>	No crece	Cocobacilo gramnegativo	+	+	—	Pertussis +
<i>B. parapertussis</i>	Si crece	Cocobacilo gramnegativo	+	—	+	Parapertussis +
<i>B. bronchiseptica</i>	Si crece	Cocobacilo gramnegativo	+	+	+	Bronchiseptica +

TABLA 3. Causas de la aparición de resultados falsos negativos y falsos positivos por reacción en cadena de la polimerasa

*Resultados falsos negativos*

Demora en la toma de muestras  
Mayor edad del paciente  
Empleo de frotis en lugar de aspirados  
Uso de torundas de alginato de calcio  
Presencia de inhibidores en la muestra  
Daño del ADN bacteriano durante el procesamiento  
Infección por cepas con mutaciones en la diana  
Problemas técnicos

*Resultados falsos positivos*

Presencia de bacterias con homología en la diana  
Contaminación por aislamientos de laboratorio  
Contaminación por amplificadores de laboratorio

este procedimiento, no debe considerarse una alternativa al cultivo sino que debe ser empleado como un complemento de éste<sup>23</sup>.

## Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR también aporta agilidad al diagnóstico de tos ferina. Sin embargo, presenta como desventaja su mayor coste<sup>30,43</sup>. El uso de esta técnica incrementa la sensibilidad del cultivo en casi el 40%<sup>20</sup> pero, también en este caso la sensibilidad disminuye con el tiempo de evolución de la enfermedad, con la vacunación y con edad del paciente<sup>44-46</sup>. El incremento de sensibilidad respecto a la serología es menos evidente<sup>47</sup> y por ello se recomienda su uso en combinación con las técnicas inmunológicas<sup>48</sup>. Su especificidad, estimada por algunos autores en el 97,1-99,7%<sup>30,46,49,50</sup>, debe ser teóricamente igual a la del cultivo, pero en la práctica pueden surgir problemas de contaminación<sup>51</sup>. La tabla 3 muestra posibles causas de aparición de resultados de PCR falsos negativos y falsos positivos. Al igual que para el cultivo, las muestras utilizadas en PCR son el aspirado nasofaríngeo y los frotis nasofaríngeos. En este caso los requerimientos de transporte y preservación son menos estrictos<sup>52</sup>. El empleo de tubos vacíos parece preferible al uso de medios específicos de transporte<sup>53</sup>. Debido a la carencia de estudios de validación y comparación entre diferentes ensayos de PCR, por el momento no existe una región específica de ampliación que pueda ser universalmente recomendada. Las dianas de amplificación usadas con más frecuencia son la región promotora de la TP<sup>48,54-57</sup> y la secuencia repetida de inserción 481<sup>30,50,58,59</sup>. También se han utilizado con éxito otros genes como el de adenilatociclase<sup>38</sup> y el de la porina<sup>60</sup>. La PCR basada en un bajo número de ciclos de amplificación (entre 20 y 25) de las secuencias repetidas de inserción posiblemente sea el método más sensible; sin embargo, cabe el riesgo de que estas regiones presenten homologías con otras especies<sup>12,20</sup>. La amplificación del gen de la adenilatociclase no distingue entre *B. pertussis* y *B. parapertussis*<sup>12</sup>. Los sistemas de PCR anidada sobre la región promotora de la TP (*nested PCR*)<sup>59,61</sup> permiten la detección simultánea y la diferenciación de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*.

rápidas de identificación<sup>23</sup> (tablas 1 y 2). La diferenciación al nivel de especie es importante, ya que, aunque tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis* son capaces de causar un síndrome pertusoide clínicamente similar, sólo la primera es productora de toxina *pertussis* (TP) y las vacunas disponibles únicamente son activas frente a ella<sup>20</sup>. Otras especies de *Bordetella* como *B. bronchiseptica* también pueden comportarse como patógenos humanos, aunque poseen una menor relevancia clínica.

## Inmunofluorescencia directa

La detección en muestras clínicas de *B. pertussis* y *B. parapertussis* mediante inmunofluorescencia directa puede proporcionar, teóricamente, un diagnóstico inmediato y económico<sup>12,20,30</sup>. Este método presenta como principal ventaja su sencillez y rapidez. Sin embargo, está sujeto a algunos inconvenientes similares a los expuestos previamente en el caso del cultivo (retraso en la toma de muestras, tratamiento antibiótico previo, etc.). Además, se trata de un procedimiento subjetivo en el que influye el adiestramiento técnico del observador. Algunos de los reactivos comerciales, basados en el uso de sueros polivalentes, carecen de una adecuada sensibilidad y especificidad<sup>19,39-41</sup>. El empleo de anticuerpos monoclonales específicos frente al lipooligosacárido de *B. pertussis* como el BL-5 incrementa marcadamente la especificidad de la técnica<sup>42</sup>. Sin embargo, la sensibilidad respecto al cultivo sigue manteniéndose pobre<sup>13,30,31,40,42</sup>. En caso de optar por



## Serología

Aunque existen distintos métodos serológicos aplicados a la detección de anticuerpos frente a *Bordetella* sp. (entre los que se incluyen aglutinación, microaglutinación, inmunofluorescencia indirecta e inmunoblot) los procedimientos de enzoinmunoanálisis (ELISA) constituyen las técnicas más aceptadas<sup>62</sup>. La interpretación de los resultados obtenidos mediante estos procedimientos debe ser cautelosa y siempre respaldada por la historia clínica del paciente. Su rendimiento puede variar en función del tipo de antígeno utilizado, la clase de inmunoglobulina investigada y el estado de vacunación de la población estudiada. Un inconveniente no resuelto por el momento de todos los métodos serológicos aplicados al diagnóstico de tos ferina radica en la dificultad para comparar los resultados aportados por diferentes ensayos (aún en caso de utilizar el mismo antígeno)<sup>12</sup>. Esto resulta muy evidente en estudios de seroprevalencia en los que se ha observado una pobre correlación mediante el uso de diferentes kits<sup>63</sup>. Además, no se dispone de un estándar de referencia de la OMS para cuantificar el título de anticuerpos. En ciertos casos se ha utilizado el suero de referencia del Laboratorio de Pertussis del Centro de Evaluación e Investigación Biológica de la FDA (Bethesda Md.)<sup>64-66</sup>. Tampoco se ha definido un marcador serológico que distinga absolutamente entre la respuesta a la vacunación de la respuesta a la infección y, a diferencia de lo que sucede en otras enfermedades vacunables como tétanos o difteria, en las que existe un consenso sobre cuál es el título de anticuerpos que confiere protección, en el caso de tos ferina no se conoce el nivel de anticuerpos circulantes relacionado claramente con el estado de inmunidad<sup>12,67</sup>.

El diagnóstico serológico de la infección por *B. pertussis* se basa en la detección de anticuerpos aglutinantes<sup>68,69</sup>, anticuerpos frente a lisados bacterianos de células completas<sup>70</sup> o anticuerpos frente a antígenos altamente purificados<sup>70-72</sup>. En la actualidad parece preferible el uso de técnicas de ELISA que incluyan estos últimos tipos de antígenos. Entre los antígenos altamente purificados destacan varios factores de virulencia de *B. pertussis* como la TP, la hemaglutinina filamentosa (HAF), una proteína de membrana externa de 69 kDa denominada pertactina, las fimbrias tipo 2 y 3, la toxina adenilatociclase, el lipooligosacárido y ciertas porinas y chaperoninas<sup>12</sup>. Para obtener una máxima sensibilidad se precisan al menos dos preparaciones antigénicas<sup>73</sup>. De todas ellas, las usadas con más frecuencia han sido la TP y la HAF<sup>70-72</sup>. La respuesta serológica tras la inmunización activa depende del tipo de vacuna empleada. Mientras que después de la infección la producción de inmunoglobulina G (IgG) va dirigida fundamentalmente frente a TP y HAF, cuando se administra la vacuna clásica de células completas la actividad se dirige principalmente hacia a fimbrias y proteínas de membrana externa<sup>12</sup>. Aunque tanto en estudios de inmunogenicidad posvacunal como de brotes se ha demostrado que existe una correlación significativa entre la presencia de IgG frente a pertactina, fimbrias tipo 2 y 3, TP y HAF y protección<sup>74,75</sup>, la existencia de anticuerpos séricos previos a la exposición no protege absolutamente de la enfermedad<sup>76</sup>. La respuesta inmunitaria a *Bordetella* sp. parece ser multifactorial y

otros aspectos como la inmunidad mediada por células pueden estar relacionados con el estado de protección<sup>77,78</sup>. Para el diagnóstico serológico de la infección natural se recomienda el uso como antígenos de TP y HAF<sup>20</sup>. Los anticuerpos IgG-TP e IgG-FHA son detectables después de la infección y tienden a desaparecer en un período de aproximadamente 5 años<sup>78</sup>. La presencia de títulos residuales de estos anticuerpos en la población general no vacunada puede indicar reinfecciones frecuentes<sup>78</sup>. Considerando la presencia de anticuerpos anti-TP como referencia, menos de la mitad de los expuestos a casos de tos ferina confirmados por cultivo muestran anticuerpos antipertactina o antifimbrias<sup>20</sup>. No obstante, algunos autores han sugerido que si bien la detección de anticuerpos frente a TP es el marcador de elección de la infección en niños, la determinación de IgG frente a fimbrias tipo 2 y 3 puede ser muy útil para el diagnóstico en adultos<sup>76</sup>. La detección de anticuerpos anti-TP y anti-HAF es muy sensible en pacientes con enfermedad clásica, en particular en infecciones primarias; sin embargo, en cuadros menos característicos registrados en sujetos vacunados resulta menos útil<sup>20</sup>. De acuerdo con los estudios de secuenciación de ADN y caracterización *in vitro*, la TP parece ser un antígeno exclusivo de *B. pertussis*<sup>76</sup>. Los anticuerpos dirigidos a TP son específicos para *B. pertussis* y se consideran un marcador serológico de la enfermedad<sup>79</sup>; sin embargo, la IgG-HAF se puede generar en respuesta a infecciones causadas por otras especies como *B. parapertussis*<sup>12,66</sup> o incluso otros géneros bacterianos (cepas no encapsuladas de *H. influenzae*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*)<sup>20,76,80-83</sup>. Por este motivo, la seroconversión frente a este antígeno no se suele considerar diagnóstica a menos que se dé en casos con una sintomatología muy definida<sup>20</sup>. Estos anticuerpos anti-HAF persisten durante más tiempo, tanto después de la infección natural por *B. pertussis*<sup>84</sup> como tras la vacunación<sup>85</sup>. En el caso de los anticuerpos antipertactina y antifimbrias, no se ha demostrado reactividad cruzada con otras bacterias. No obstante, estos antígenos poseen secuencias de aminoácidos homólogas con otras especies<sup>86</sup>.

Los anticuerpos de la clase IgA dirigidos para los diferentes antígenos de *B. pertussis* raramente aparecen tras la vacunación y se han empleado como indicadores de infección<sup>12</sup>. La presencia de estos anticuerpos en un paciente con historia clínica compatible con tos ferina conforma la definición de caso establecida en algunos países como Australia<sup>87</sup>. Su utilidad es mayor en niños mayores y adultos<sup>59</sup>, ya que en niños muy pequeños es posible que la IgA específica no sea detectable debido a una demora en su producción por inmadurez inmunológica<sup>59</sup>. Sin embargo, dado que en casi la totalidad de los casos en los que se registra una elevación en los títulos de esta clase de anticuerpos también aparece un incremento en los niveles de IgG, la detección de IgA parece no contribuir en gran medida a mejorar el rendimiento del diagnóstico serológico<sup>20</sup>. La detección de IgM frente a *Bordetella* sp. parece carecer de una adecuada especificidad y su empleo como elemento de diagnóstico debe ser revisado<sup>59</sup>.

La confirmación tradicional del diagnóstico serológico se lleva a cabo mediante la demostración de una seroconversión clara (aumento de dos o preferiblemente cuatro veces del nivel de anticuerpos en una muestra

TABLA 4. Criterios de diagnóstico serológico de tos ferina

Criterio	Características	Ventajas	Inconvenientes
Seroconversión clásica	Detección de un aumento de 2-4 veces en el título de anticuerpos entre sueros de fase aguda y fase convaleciente	Criterio más fiable Posibilidad de establecer niveles de certeza (caso confirmado, caso probable, caso posible)	Requerimiento de muestra convaleciente Posibilidad de fallo por la detección de títulos muy elevados en la muestra de fase aguda
Seroconversión inversa o serorreversión	Detección de un descenso de 2-4 veces en el título de anticuerpos entre un suero de fase aguda y/o convaleciente y un suero de fase tardía	Evita la posibilidad de fallo por la detección de títulos muy elevados en la muestra de fase aguda	Clínicamente no operativo Requerimiento de muestra tardía
Seroconversión preexposición	Detección de un aumento de 2-4 veces en el título de anticuerpos entre un suero preexposición y un suero de fase aguda y/o convaleciente	Evita la posibilidad de fallo por la detección de títulos muy elevados en la muestra de fase aguda	Clínicamente no operativo Requerimiento de muestra preexposición
Seroconversión horizontal	Detección de un aumento de 2-4 veces en el título de anticuerpos entre el suero de fase aguda del lactante y un suero materno apareado	Diagnóstico rápido Evita la obtención de la muestra de fase convaleciente en lactantes	Sólo aplicable a lactantes Requerimiento de muestras materno-filiales apareadas Posibilidad de fallo por no-detección de títulos elevados en la muestra del lactante (inmadurez inmunológica)
Diagnóstico sobre muestra única	Basado en puntos de corte respecto a la población general (criterio de especificidad)	Diagnóstico rápido Evita la posibilidad de fallo por la detección de títulos muy elevados en la muestra de fase aguda Evita la obtención de la muestra de fase convaleciente	Necesidad de datos sobre grupos control local y temporalmente relacionados Problemas de interpretación en casos sospechosos vacunados recientemente

convaleciente respecto a una muestra inicial)<sup>9,76</sup>. No obstante, esta confirmación se encuentra entorpecida en la mayoría de las ocasiones por la dificultad para obtener una segunda muestra de suero una vez que se ha conseguido la resolución clínica tras el tratamiento específico<sup>9</sup>. Por otra parte, a pesar de que se llegue a obtener una segunda muestra, con mucha frecuencia la demora en la obtención de la primera hace que el nivel de anticuerpos detectables en esta muestra inicial sea tan alto que imposibilite establecer una seroconversión. Además, en individuos vacunados, la cinética de la producción de anticuerpos es la típica de una respuesta inmunitaria de tipo secundario, con un rápido incremento de IgG tras la infección<sup>20</sup>, lo cual puede producir una marcada elevación de los títulos antes de la toma de la muestra de suero de fase aguda. En países como Holanda, donde la confirmación por laboratorio de tos ferina se suele realizar por serología, en más del 50% de las sospechas o bien sólo es posible obtener una única muestra de suero o en caso de intentar estudios de seroconversión los títulos en las muestras de fase aguda y fase convaleciente son tan elevados que no es posible detectar aumentos significativos<sup>79</sup>.

Con el fin de evitar los problemas derivados de la existencia de títulos muy elevados en la muestra inicial (que impedirían los estudios de seroconversión), algunos autores han empleado una forma de seroconversión inversa o serorreversión consistente en obtener otra muestra muy tardía (60 semanas tras la infección) y

estudiar la disminución de los títulos<sup>9</sup>. Esta confirmación retrospectiva de la infección, aunque puede ser de interés con fines epidemiológicos, carece de utilidad para el diagnóstico clínico. Otra estrategia adoptada para detectar seroconversiones a partir de una muestra de suero (fase aguda o convaleciente) obtenida tras el desarrollo de la enfermedad consiste en estudiarla junto con otra muestra del mismo paciente tomada previamente a la exposición. Este recurso puede incrementar la sensibilidad de la serología en el 10%<sup>20</sup>. Esto ha podido llevarse a cabo en grupos poblacionales muy determinados (militares) de los que se disponía una seroteca reciente<sup>76</sup>. Sin embargo, debido a la excepcionalidad de la posibilidad de disponer de muestras previas, esta opción no resulta en la práctica operativa. Por todo ello, en la actualidad se viene intentando la realización de diagnósticos serológicos basados en la titulación (cuantificación) en una única muestra de suero<sup>79</sup>. Para ello es preciso disponer de datos de grupos control representativos de la población general que permitan establecer criterios de especificidad<sup>79</sup>. Dado que la TP se expresa sólo en *B. pertussis*, y ya que no se han descrito antígenos de reactividad cruzada en otras especies, los anticuerpos del tipo IgG-TP son los más adecuados para este propósito<sup>79</sup>. Como este tipo de anticuerpos se genera tras la vacunación, la interpretación de los resultados puede ser problemática en niños recientemente vacunados (en particular inmediatamente después de una cuarta dosis)<sup>79</sup>. No obstante, la alternativa del estudio cuantitativo de IgG-TP en muestras únicas

puede aportar una sensibilidad del 76% manteniendo una especificidad del 99% (respecto a la población general) e incrementando más de 4 veces el número de pacientes en los que se llega a obtener una confirmación del diagnóstico serológico<sup>79</sup>. En lactantes, la detección de títulos altos de IgG-TP en una sola muestra de fase aguda y en ausencia de anticuerpos maternos se ha considerado diagnóstica<sup>88</sup>. Este criterio sería una forma de seroconversión horizontal. Algunos autores<sup>76</sup> han propuesto una clasificación de los criterios de diagnóstico serológico basada en el grado de certeza. Un caso confirmado se definiría como una seroconversión entre los sueros de fase aguda y convaleciente con aumento de cuatro veces el título de IgG-TP o IgA-TP. Un caso probable vendría dado por una seroconversión con aumento de cuatro veces el título de anticuerpos frente al menos otros dos antígenos diferentes (HAF, fimbrias, pertactina o aglutininas). Un caso posible se establecería ante una seroconversión con aumento de 4 veces el título frente a un antígeno diferente de TP o una seroconversión con aumento de sólo 2 veces el título frente al menos 2 antígenos distintos. En la tabla 4 se muestra un resumen de los criterios de diagnóstico serológico de tos ferina.

## Conclusiones

La confirmación de los casos sospechosos de tos ferina no debe contemplarse como una mera curiosidad académica de escasa repercusión clínica. La eficacia de las medidas de tratamiento individual y de las actuaciones preventivas en la población dependen de la fiabilidad del diagnóstico de los posibles casos y brotes. En estas situaciones, como en otras enfermedades infecciosas, conviene establecer el diagnóstico diferencial con otros posibles agentes etiológicos. En la actualidad existen diferentes formas de abordar este diagnóstico. Los métodos directos como el cultivo y la PCR se muestran más eficaces en las etapas tempranas de la enfermedad. El cultivo, pese a su baja sensibilidad, sigue manteniendo su vigencia como forma definitiva de confirmación y único procedimiento de detección de organismos viables. Su utilidad puede ser mayor para la confirmación de brotes que para el diagnóstico de casos esporádicos. Las técnicas de PCR representan una alternativa muy prometedora. Su elevada sensibilidad y especificidad las convierten en el método de elección para el diagnóstico precoz durante la fase inicial de enfermedad. Los métodos serológicos constituyen la principal herramienta en los casos en los que el diagnóstico se ve demorado. Al igual que ocurre con las técnicas de PCR se precisa una mejor estandarización de estos procedimientos con el fin de poder comparar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios. En cualquier caso, el diagnóstico de los síndromes pertusoides idealmente debe residir en el uso combinado de varios métodos distintos.

## Bibliografía

- De Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conyn-van Spaendonck MA. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: Observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis* 2000;6:348-57.
- O'Brien E, D'Souza R, Gilroy N, Burgess M, Lister S, McIntyre P, et al. Australia's notifiable diseases status, 1997. Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Commun Dis Intell* 1999;23:1-27.
- MMWR. Pertussis outbreak – Vermont, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;5:46:822-6.
- Yaari E, Yafe-Zimmerman Y, Schwartz SB, Slater PE, Shvartzman P, Andoren N, et al. Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* 1999;115:1254-8.
- Scott PT, Clark JB, Miser WF. Pertussis: An update on primary prevention and outbreak control. *Am Fam Physician* 1997;56:1121-8.
- Fletcher MA, Saliou P, Etchevenaux C, Plotkin SA. The efficacy of whole cell pertussis immunisation: Collected data on a vaccine produced in France. *Public Health* 2001;115:119-29.
- Van Boven M, De Melker HE, Schellekens JF, Kretzschmar M. Waning immunity and sub-clinical infection in an epidemic model: Implications for pertussis in The Netherlands. *Math Biosci* 2000;164:161-82.
- Ferrer A, Calico I, Manresa JM, Andreu A, Moranga F, Valle I. Microorganismos aislados en casos de síndrome pertusoide. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2000;18:433-8.
- Mertens PLJM, Stals FS, Cvhelelens JFP, Houben AW, Huisman J. An epidemic of pertussis among elderly people in a religious institution in Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:242-7.
- Hallander HO, Gnarp J, Gnarp H, Olin P. *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and persistent cough in children. *Scand J Infect Dis* 1999;31:281-6.
- Hagiwara K, Ouchi K, Tashiro N, Azuma M, Kobayashi K. An epidemic of a pertussis-like illness caused by *Chlamydia pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:271-5.
- Müller FMC, Hoppe JE, Wirsing von König CH. Laboratory diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. *J Clin Microbiol* 1997;35:2435-43.
- Strebel PM, Cochi SL, Farizo KM, Payne BJ, Hanauer SD, Baughman AL. Pertussis in Missouri: Evaluation of nasopharyngeal culture, direct fluorescence antibody testing and clinical case definitions in the diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* 1993;16:276-85.
- Kuantes W, Joyson DHM, Williams WO. *Bordetella pertussis* isolation in general practice: 1977-79 whooping cough epidemic in west Glamorgan. *J Hyg Camb* 1983;90:149-58.
- Hoppe JE. Update on epidemiology, diagnosis, and treatment of pertussis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:189-93.
- Heininger U, Chery JD, Eckhardt T, Lorenz C, Christenson P, Stehr K. Clinical and laboratory diagnosis of pertussis in the regions of a large vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:504-9.
- Granström G, Wretling B, Granström M. Diagnostic value of clinical and bacteriological findings in pertussis. *J Infect* 1991;22:17-26.
- Bejuk J, Begovac J, Bace A, Kuzamanovic-Sterk N, Aleraj B. Culture of *Bordetella pertussis* from three upper respiratory tract specimens. *Pediatr Infect Dis* 1995;14:64-5.
- Halperin SA, Bortolusi R, Wort AJ. Evaluation of culture, immunofluorescence and serology for diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 1989;27:752-7.
- Hallander HO. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* 1999;28:S99-106.
- Hallander HO, Reizenstein E, Renemar B, Rasmussen G, Mardin L, Olin P. Comparison of nasopharyngeal aspirates with swabs for culture of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:50-2.
- Wirsing von König CH, Hoppe JE, Tacke A, Finger H. Detection of *Bordetella pertussis* in clinical specimens. En: Manclark, ed. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Pertussis. DHS no (FDA) 1990:90-1164.
- Marcon MJ. *Bordetella*. En: Murray PF, Baron EJ, Pfaller MJ, Tenover FC, Tenover RH, eds. Manual of clinical laboratory microbiology. 6<sup>th</sup> edition Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995:566-73.
- Hallander HO. Diagnosis pertussis serology in the recent clinical efficacy studies of acellular vaccines. *Dev Biol Stand* 1997;89:205-12.
- Hoppe JE, Weiss A. Recovery of *Bordetella pertussis* from four kinds of swabs. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:203-5.
- Schlapfer G, Cherry JD, Heininger U, Uberall M, Schmitt-Grohe S, Laussucq S, et al. Polymerase chain reaction identification of *Bordetella pertussis* infections in vaccinees and family members in a pertussis vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:209-14.
- Kurzynski TA, Boehm DM, Rott-Petri JA, Schell RF, Allison PE. Comparison of modified Bordet-Gengou and Regan-Lowe media for the isolation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* 1988;26: 2661-3.
- Hoppe JE, Schwaderer J. Direct plating versus use of transport medium for detection of *Bordetella* species from nasopharyngeal swabs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:264-5.
- Friedman RL. Pertussis: The disease and new diagnostic methods. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:365-76.
- Tilley PA, Kanchana MV, Knight I, Blondeau J, Antonishyn N, Deneer H. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, polymerase chain reaction, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:17-23.



31. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. J Clin Microbiol 1977;6:303-9.
32. Hoppe JE, Wörz S, Botzenhart K. Comparison of specimen transport system for *Bordetella pertussis*. Eur J Clin Microbiol 1986;5:671-3.
33. Wirsing von König CH, Rott H, Bogaerts H, Schmitt HJ. A serological study of organisms possibly associated with pertussis-like coughing. Pediatr Infect Dis J 1998;17:645-9.
34. Hoppe JE, Vogl R. Comparison of three media for culture of *Bordetella pertussis*. Eur J Clin Microbiol 1986;5:361-2.
35. Hoppe JE, Schwaderer J. Comparison of four charcoal media for the isolation of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1989;27:1097-8.
36. Aoyama T, Murase Y, Iwata T, Imaizumi A, Suzuki Y, Sato Y. Comparison of blood-free medium (cyclodextrin solid medium) with Bordet-Gengou and charcoal agar media. J Clin Pathol 1986;37:1071-2.
37. 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 1989;27:2115-7.
38. Douglas E, Coole JG, 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.
39. Ewanowich CA, Chui LWL, Paranchych MG, Pepler MS, Marusyk RG, Albrittons WL. Major outbreak of pertussis in northern Alberta, Canada: analysis of discrepant direct fluorescent-antibody and culture results by using polymerase chain reaction methodology. J Clin Microbiol 1993;31:1715-25.
40. Gilligan PH, Fisher MC. Importance of culture in the laboratory diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J Clin Microbiol 1984;20:891-3.
41. Preston NW. Technical problems in the laboratory diagnosis and prevention of whooping cough. Lab Pract 1970;19:482-6.
42. McNicol P, Giercke SM, Gray M, Martín D, Brodeur B, Pepler SM, et al. Evaluation and validation of a monoclonal immunofluorescence reagent for direct detection of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1995;33:2868-71.
43. Erlandsson A, Bäckman A, Törnqvist E, Olcen P. PCR assay or culture for diagnosis of *Bordetella pertussis* in routine diagnostic laboratory? J Infect 1997;35:221-4.
44. He Q, Mertsola J, Soini H, Skurnik M, Ruuskanen O, Viljanen MK. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol 1993;31:642-5.
45. Van der Zee A, Agtenberg C, Peeters M, Mooi F, Schellenkens J. A clinical validation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* polymerase chain reaction: Comparison with culture and serology using samples of patients with suspected whooping cough from a highly immunized population. J Infect Dis 1996;174:89-96.
46. Lind-Brandberg L, Welinder-Olson C, Lagergard T, Taranger J, Trollfors B, Zackrisson G. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. J Clin Microbiol 1998;36:679-83.
47. Reizenstein E. Diagnostic polymerase chain reaction. Dev Biol Stand 1997;89:247-54.
48. Grimpel E, Begue P, Anjak I, Betsou F, Guiso N. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol 1993;31:2745-50.
49. Wadowsky RM, Michaels RH, Libert T, Kingsley LA, Ehrlich GD. Multiplex PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab specimens. J Clin Microbiol 1996;34:2645-9.
50. Loeffenholz M, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescence-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1999;37:2872-6.
51. Taranger J, Trollfors B, Lind L, Zackrisson G, Beling-Holmquist K. Environmental contamination leading to false-positive polymerase chain reaction for pertussis. Pediatr Infect Dis J 1994;13:936-7.
52. Prevel A, Zambardi G, Cagnin S, Floret D, Freney J, Fleurette J. Biological diagnosis of whooping cough: contribution of gene amplification. Presse Med 1997;17:26761-3.
53. He Q, Mertsola J, Soini H, Viljanen MK. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal specimens. J Pediatr 1994;124:421-6.
54. Hovard S, Hackel C, Herzog A, Bollen A. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the polymerase chain reaction. Res Microbiol 1989;140:477-87.
55. Nygren M, Reizenstein E, Ronaghi M, Lunderberg J. Polymorphism in the pertussis toxin promoter region affecting the DNA-based diagnosis of *Bordetella* infection. J Clin Microbiol 2000;38:55-60.
56. Heining U, Schmidt-Schlapfer G, Cherry JD, Stehr K. Clinical validation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pertussis by comparison with serology, culture, and symptoms during a large pertussis vaccine efficacy trial. Pediatrics 2000;105:E31.
57. Stark M, Reizenstein E, Uhlen M, Lundberg J. Immunomagnetic separation and solid-phase detection of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1996;34:778-84.
58. Glare EM, Paton JC, Premier RR, Lawrence AJ, Nisbet IT. 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;28:1982-7.
59. Farrell DJ, Dagard G, Mukkur TKS. Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its application in diagnosis of pertussis in nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia. J Clin Microbiol 1999;37:606-10.
60. Li ZM, Jansen DL, Finn TM, Halperin SA, Kasina A, O'Connor SP, et al. Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR. J Clin Microbiol 1994;32:783-9.
61. Reinzenstein E, Linberg L, Möllby R, Hallander HO. Validation of nested *Bordetella* PCR in pertussis vaccine trial. J Clin Microbiol 1996;34:810-5.
62. Meade BD, Deforest A, Edwards KM, Romani TA, Lynn F, O'Brien CH, et al. Description and evaluation of serologic assays used in a multicenter trial of acellular pertussis vaccines. Pediatrics 1995;96:570-5.
63. Sanz JC, Fernández M, Sagüés MJ, Ramírez R, Castañeda R, Barranco D, et al. F. Comparación de tres técnicas ELISA para evaluar la seroprevalencia de IgG frente a *Bordetella pertussis* en niños vacunados con tres dosis de DTPe. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002;20:10-5.
64. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, et al, and The Progetto Pertosse Working Group. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. N Engl J Med 1996;334:341-7.
65. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reinzenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. N Engl J Med 1996;334:349-55.
66. Wirsing von König CH, Schmitt HJ. Epidemiologic aspects and diagnostic criteria for protective efficacy field trial of a pertussis vaccine. J Infect Dis 1996;174(Suppl 3):281-6.
67. Manclark CR, Meade BD, Burstyn DG. Serological response to *Bordetella pertussis*. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. Manual of clinical laboratory immunology, 3<sup>rd</sup> ed Washington, DC: Am Soc Microbiol, 1986;388-94.
68. Takayama N, Watanabe H, Fujita I, Minamitani M. Seroepidemiology of pertussis in the Japanese population. Med Microbiol Immunol 1989;178:1-8.
69. Sapián-Lopez LA, Valdespino JL, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Gutierrez G, Macedo J, et al. Seroepidemiology of whooping cough in México. Salud Publica Mex 1992;34:177-85.
70. Arav-Boger R, Ashkenazi S, Gdalevich M, Cohen D, Danon YL. Sero-prevalence of pertussis antibodies among adolescents in Israel. Isr Med Assoc J 2000;2:174-7.
71. 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;173:1256-9.
72. Chiu TF, Lee CY, Lee PI, Lu CY, Lin HC, Huang LM. Pertussis seroepidemiology in Taipei. J Formos Med Assoc 2000;99:224-8.
73. He Q, Mertsola J, Himanen JP, Ruuskanen O, Viljanen MK. Evaluation of pooled and individual components of *Bordetella pertussis* as antigens in an enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12:690-5.
74. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of antipertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. Vaccine 1998;16:1907-16.
75. He Q, Viljanen MK, Olander RM, Bogaerts H, De Grave D, Ruuskanen O, et al. Antibodies to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* and protection against whooping cough in schoolchildren. J Infect Dis 1994;170:705-8.
76. Jansen DL, Gray GC, Putnam SD, Lynn F, Meade BD. Evaluation of pertussis in U.S. marine corps trainees. Clin Infect Dis 1997;25:1099-107.
77. Tran Minh NN, He Q, Edelman K, Olander RM, Viljanen MK, Arvilommi H, et al. Cell-mediated immune responses to antigens of *Bordetella pertussis* and protection against pertussis in school children. Pediatr Infect Dis J 1999;18:366-70.
78. Tomoda T, Ogura H, Kurashige T. The longevity of the immune response to filamentous hemagglutinin and pertussis toxin in patients with pertussis in a semiclosed community. J Infect Dis 1992;166:908-10.
79. De Melker HE, Versteegh FGA, Conyn van Spaendonck MAE, Elvers LH, Berbers GAM, Van der Zee A, et al. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 2000;38:800-6.
80. Hallander HO, Storsaeter J, Molby R. Evaluation of serology and nasopharyngeal cultures for diagnosis of pertussis in a vaccine efficacy trial. J Infect Dis 1991;163:1046-54.
81. Barenkamp SJ, Leininger E. Cloning, expression and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1992;60:1302-13.
82. Sperandio V, Giron JA, Silveira WD, Kaper JB. The OmpU outer membrane protein a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. Infect Immun 1995;63:4433-8.
83. Trollfors B, Burman L, Lagergard T, Leinonen M, Taranger J. No cross-reactivity with filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* in sera from patients with nontypable *Haemophilus influenzae* pneumonia. Pediatr Infect Dis J 1996;15:558-9.
84. Isacson J, Trollfors B, Hedvall G, Taranger J, Zackrisson G. Response and decline of serum IgG antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and pertactin in children with pertussis. Scand J Infect Dis 1995;27: 273-7.
85. Grimpel E, Begué P, Anjak I, Njamkepo E, Francois P, Guiso N. Long-term human serum antibody responses after immunization with whole-cell pertussis vaccine in France. Clin Diag Lab Immunol 1996;3:93-7.
86. Brennan MJ, Li Zm, Shahin RD, Burns DL, Nguyen NY, Liu TY. Structural and functional properties of a 69-kilodalton outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. Tokai J Exp Clin Med 1988;13:211-5.
87. National Health and Medical Research Council. Surveillance case definitions. National Health and Medical Research Council, Canberra, Australia, 1994.
88. Grimpel E, Njamkepo E, Begue P, Guiso N. Rapid diagnosis of pertussis in young infants: Comparison of culture, PCR, and infant's and mother's serology. Clin Diagn Lab Immunol 1997;4:723-6.