

Tos ferina confirmada por cultivo en un hospital terciario

A. Ferrer Marcellés^a, F.A. Moraga Llop^b, M. Olsina Tebar^a,
M. Campins Martí^c e I. Planells Romeu^a

Servicios de ^aMicrobiología y Parasitología, ^bPediatría y ^cMedicina Preventiva y Epidemiología.
Hospital Universitario Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Objetivo

Estudiar las características de los pacientes diagnosticados de tos ferina en un hospital terciario de Barcelona.

Material y métodos

Estudio retrospectivo de los pacientes menores de 18 años que han consultado por tos pertusoides o por sospecha clínica de tos ferina, durante un período de 12 años (1989-2000). Sólo se han incluido en el estudio los casos con aislamiento de *Bordetella* spp. Se han analizado las siguientes variables: edad, sexo, estado vacunal, hospitalización, manifestaciones clínicas, gravedad y letalidad.

Resultados

Se identificaron 161 pacientes con cultivo positivo a *Bordetella* spp., pero sólo se dispone de información completa de 149 casos. Todas las cepas aisladas correspondieron a *B. pertussis*, excepto tres a *B. parapertussis*. Se observaron 3 ciclos epidémicos durante el período del estudio, correspondiendo a los años 1989, 1992 y 2000. El 72,5 % de los casos se presentaron entre los meses de mayo y septiembre. *Bordetella* spp. se asoció a otras bacterias en el 28,2 % de los pacientes, a virus en el 13,4 % y a una bacteria y a un virus en el 4,7 %. Los 149 pacientes, 79 varones y 70 mujeres, tenían una mediana de edad de 3 meses (límites, 13 días-17 años) y el 77,2 % una edad igual o inferior a 6 meses. Requirieron hospitalización 121 enfermos, de los que el 14,9 % ingresaron en la unidad de cuidados intensivos. La edad fue el único factor asociado al riesgo de hospitalización, superior en los lactantes más pequeños ($p < 0,0001$). Se presentó tos paroxística acompañada de cianosis en el 53,4 % de los pacientes y leucocitosis con linfocitosis en el 67,5 %; en el 21,5 % se produjeron apneas. En la radiografía de tórax había imágenes de atelectasia en el 34,1 % de los enfermos. La media de la estancia hospitalaria fue de 11 días (límites, 1-70 días). Fallecieron 3 varones menores de 3 meses de edad con un síndrome de tos ferina maligna (letalidad, 2 %). El 59,7 % de los pacientes no estaban vacunados

(55,4 % porque eran menores de 3 meses) y sólo el 16 % habían recibido tres o más dosis de vacuna.

Conclusiones

La tos ferina continúa siendo una enfermedad grave en el lactante y con un porcentaje elevado de hospitalización durante el primer semestre de la vida. Es necesario desarrollar nuevas estrategias preventivas para proteger a los lactantes que aún no han desarrollado inmunidad completa frente a esta infección.

Palabras clave:

Tos ferina. Síndrome pertusoides. Bordetella. Hospitalización. Síndrome de tos ferina maligna. Vacunas antipertussis.

CULTURE-CONFIRMED WHOOPING COUGH IN A TERTIARY CENTER OVER A TWELVE-YEAR PERIOD

Objective

To study the characteristics of patients diagnosed with whooping cough at a tertiary center in Barcelona, Spain.

Material and methods

We performed a retrospective study of patients aged less than 18 years treated for pertussis-like cough or clinically-suspected whooping cough over a 12-year period (1989-2000). Only patients with isolated *Bordetella* spp. were included. The variables of age, sex, vaccination status, hospitalization, clinical manifestations, severity, and lethality were analyzed.

Results

One hundred sixty-one patients with positive *Bordetella* spp. culture were identified. Of these, complete information was available in 149 (79 boys and 70 girls) with a median age of 3 months (range: 13 days-17 years); 77.2 % were aged 6 months or less. All the isolated strains corres-

Correspondencia: Dr. F.A. Moraga Llop.
Doctor Roux, 103, ático. 08017 Barcelona. España.
Correo electrónico: fmoraga@acmcb.es

Recibido en septiembre de 2002.
Aceptado para su publicación en diciembre de 2002.

ponded to *B. pertussis* except three that corresponded to *B. parapertussis*. Three epidemic cycles (in 1989, 1992 and 2000) were observed during the study period. A total of 72.5 % of cases occurred between May and September. *Bordetella* spp. was associated with other bacteria in 28.2 % of the patients, viruses in 13.4 % and a bacterium and a virus in 4.7 %. One hundred twenty-one patients required hospitalization, of which 14.9 % were admitted to the intensive care unit. Age was the only factor associated with risk for hospitalization, which was more frequent in younger infants ($p < 0.0001$). Paroxysmal cough with cyanosis was present in 53.4 % of the patients, leucocytosis with lymphocytosis occurred in 67.5 % and apnea were present in 21.5 %. Chest X-ray revealed atelectasis in 34.1 %. The mean length of hospital stay was 11 days (range: 1-70 days). Three boys aged less than 3 months with malignant pertussis syndrome died (lethality: 2 %). More than half the patients (59.7 %) were not vaccinated (55.4 % for being under the age of 3 months) and only 16 % had received three or more vaccination doses.

Conclusions

Whooping cough continues to be a severe disease in infants, with a high admission rate during the first 6 months of life. New preventive strategies are required to protect infants who have not yet developed full immunity to this infection.

Key words:

Whooping cough. Pertussis-like syndrome. Bordetella. Hospitalization. Malignant pertussis syndrome. Pertussis vaccines.

INTRODUCCIÓN

La tos ferina continúa siendo un problema importante de salud pública, a pesar de que se dispone de vacunas eficaces desde hace más de 50 años. La comercialización de vacunas acelulares en los últimos años, menos reactógenas y de similar eficacia que las de célula entera o pared completa, ha contribuido en muchos países a aumentar las coberturas vacunales y la edad de inmunización sistemática hasta los 6 años.

A pesar de que en España la incidencia de tos ferina se ha reducido de forma marcada gracias a los programas de vacunación¹, la circulación de *Bordetella pertussis* es todavía elevada, como demuestran los estudios de seroprevalencia^{2,3}. En los últimos años se observa, al igual que en otros países, un aumento del número de casos en adolescentes y adultos⁴, debido a la pérdida de la inmunidad vacunal o natural con el tiempo, que se asocia a un mayor riesgo de contagio en el lactante en los primeros 6 meses de vida, cuando no ha iniciado o no ha completado la primovacunación.

El diagnóstico de la tos ferina es a veces difícil en el lactante y en el adulto, debido a la mayor frecuencia de formas atípicas, por lo que es muy importante un alto índice de sospecha clínica y la disponibilidad de técnicas adecuadas de diagnóstico microbiológico. La existencia

de otras bacterias y de virus que pueden causar un cuadro clínico similar a la tos ferina, es decir, un síndrome pertusoide, por lo general de intensidad más leve y de duración más corta, dificulta el diagnóstico clínico⁵⁻⁸.

Se ha realizado un estudio retrospectivo de los pacientes atendidos en nuestro centro con tos ferina confirmada por aislamiento de *Bordetella* spp., para valorar el patrón de presentación de esta enfermedad en un hospital de tercer nivel.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante un período de 12 años (1989-2000) se procesaron un total de 1.671 muestras respiratorias, correspondientes a 1.375 pacientes con sospecha clínica de tos ferina o con tos pertusoide; se aisló *Bordetella* spp. en 173 muestras correspondientes a 161 pacientes. En todos los especímenes se investigaron los siguientes microorganismos:

1. *Bordetella* spp. (agar charcoal con 10 % de sangre de caballo y 40 mg/l de cefalexina).
2. *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* (caldo U9B y agar A7B).
3. Bacterias potencialmente patógenas (agar sangre, agar chocolate y agar McConkey).
4. Virus: adenovirus, citomegalovirus, enterovirus, reovirus, virus del herpes simple, virus varicela-zóster y virus respiratorio sincitial (cultivos celulares Vero, Hep2 y fibroblastos de pulmón de embrión humano e inmunofluorescencia directa para virus respiratorio sincitial).

Los medios de cultivo se incubaron a una temperatura de 37 °C en aerobiosis durante los períodos de tiempo habitualmente recomendados. Todos los microorganismos se identificaron por el sistema AMS-Vitek y/o métodos microscópicos, bioquímicos y serológicos convencionales.

Se han revisado las historias clínicas de 149 de los 161 pacientes con cultivo positivo a *Bordetella* spp., ya que en los 12 casos restantes la información de las historias clínicas era incompleta. De los pacientes revisados se procesaron 173 muestras positivas a *Bordetella* spp. correspondientes a 156 aspirados nasofaríngeos, 12 aspirados traqueales, 3 frotis faríngeos, un esputo y un lavado broncoalveolar.

RESULTADOS

Aislamientos microbiológicos

En los 12 años del estudio se observaron tres agrupaciones de casos que correspondían a tres ciclos epidémicos de tos ferina durante 1989, 1992 y 2000, en los que se aisló *Bordetella* spp. en una media de 34 pacientes/año (límites, 18-47), mientras que en los otros años la media fue de 5 casos/año (límites, 1-10). Todas las cepas

aisladas correspondieron a *B. pertussis*, excepto tres a *B. parapertussis*. En 80 pacientes (53,7%) *Bordetella* spp. se aisló en una o más muestras en cultivo puro y en 69 (46,3%) se asoció a otros microorganismos. En 50 pacientes se aisló *Bordetella* spp. junto a un microorganismo, en 16 pacientes con dos y en tres con tres. La asociación más frecuente fue con otras bacterias en el 28,2% de los pacientes, con virus en el 13,4% y con una bacteria y un virus en el 4,7%. Entre las bacterias *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* fueron las más frecuentes, aunque hay que señalar también la presencia de otros bacilos gramnegativos; se asoció a *Mycoplasma* en 9 enfermos y a virus en 27 pacientes (tabla 1).

Distribución estacional

El 72,5% de los aislamientos de *Bordetella* spp. se produjo entre los meses de mayo y septiembre sin diferencias entre los años epidémicos y los no epidémicos (fig. 1).

Sintomatología

Los 149 pacientes correspondían a 79 varones y 70 mujeres con una mediana de edad de 3 meses (límites, 13 días-17 años). En la figura 2 se aprecia que la mayoría de enfermos eran lactantes de 6 meses o menos de edad (77,2%) y el 58,4%, menores de 3 meses. Se hospitalizaron 121 enfermos, de los que 18 (14,9%) ingresaron en la unidad de cuidados intensivos. Los 28 pacientes que no requirieron hospitalización se habían atendido en el servicio de urgencias, y sólo 9 (32,1%) eran lactantes menores de 6 meses de edad. La media de edad de los enfermos hospitalizados (3,8 meses; límites, 1 mes-6 años) fue significativamente inferior que la de los que no requirieron

TABLA 1. Microorganismos asociados a *Bordetella* spp. aislados en los pacientes con tos ferina

Microorganismo	Número	Porcentaje de pacientes
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	19	12,7
<i>Haemophilus influenzae</i>	13	8,7
Enterobacterias	12	8
<i>Moraxella catarrhalis</i>	4	2,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1,3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	1,3
<i>H. parainfluenzae</i>	1	0,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,7
<i>S. pyogenes</i>	1	0,7
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	7	4,7
<i>Mycoplasma hominis</i>	2	1,3
Adenovirus	10	6,7
Enterovirus	5	3,3
Virus respiratorio sincitial	4	2,7
Citomegalovirus	3	2
Herpes simple	1	0,7
Virus no identificado	4	2,7

ingreso en el hospital (66,4 meses; límites, 2 meses-17 años) ($p < 0,0001$); además, los que ingresaron en la unidad de cuidados intensivos eran lactantes más pequeños (media de edad, 1,7 meses; límites, 1-3 meses) que los que lo hicieron en otras plantas (media de edad, 4,0 meses; límites, 1 mes-6 años), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,008$).

Todos los pacientes presentaron tos pertusoides (paroxística o "convulsa") de más de una semana de evolución,

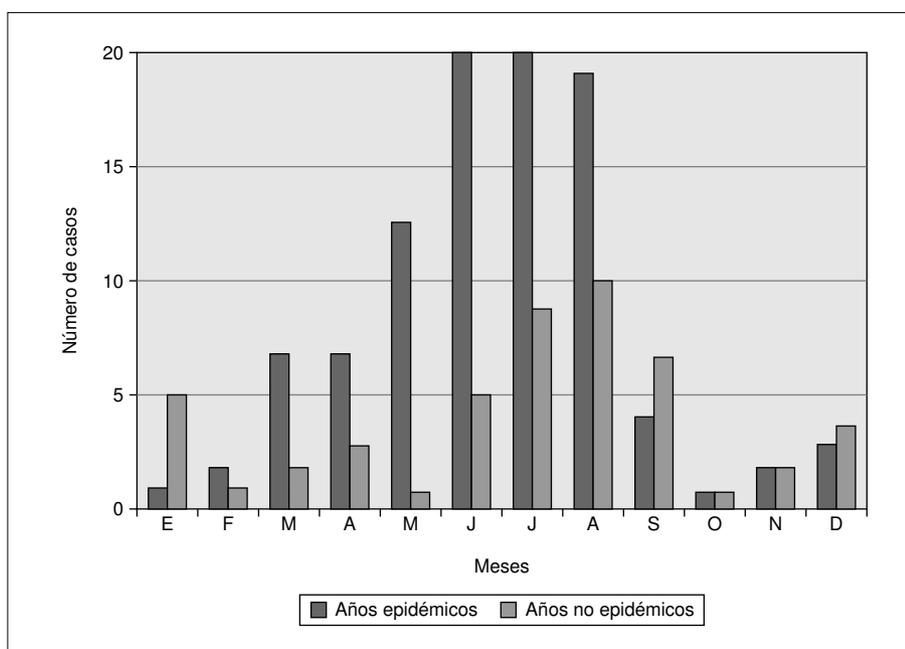


Figura 1. Distribución mensual de los casos de tos ferina.

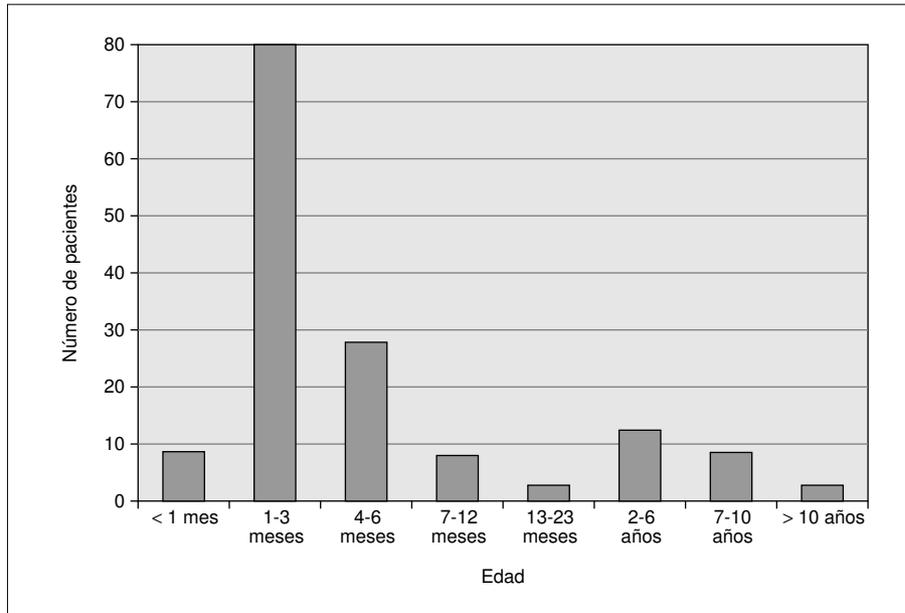


Figura 2. Edad de los pacientes con tos ferina.

TABLA 2. Manifestaciones clínicas de los enfermos con tos ferina

Manifestación clínica	Número	Porcentaje
Tos pertusoides	149	100
Cianosis	80	53,4
Vómitos	52	34,9
Estridor ("gallo")	48	32,2
Fiebre	35	23,5
Apnea	32	21,5
Dificultad respiratoria	31	20,8
Convulsiones	6	4

que se acompañó de cianosis en la mitad de ellos (tabla 2). La fiebre estuvo presente en 35 pacientes (23,5%). Seis casos cursaron con convulsiones, cinco atribuidas a la tos ferina y en un caso se valoró como una convulsión febril simple; el electroencefalograma de control realizado en el momento de dar el alta fue normal en todos los casos.

En el hemograma se observó leucocitosis con linfocitosis en el 67,5% y monocitosis en el 56% de los pacientes. En 4 casos existía una reacción leucemoide. La radiografía de tórax, que se realizó en 123 pacientes, fue normal en 79 (64,2%) y en 42 (34,1%) existían imágenes de atelectasia.

Antes del ingreso 9 pacientes habían recibido tratamiento con macrólidos y 23 con betalactámicos. Todos los pacientes fueron tratados posteriormente con macrólidos. Además se prescribió tratamiento inhalatorio con salbutamol en 96 pacientes (64,4%) y en 50 casos se asoció a corticoides inhalados.

La media de la estancia hospitalaria fue de 11 días (límites, 1-70). En 3 casos la evolución fue fatal (letalidad, 2%): 2 varones de 27 días y 2 meses de edad, respectivamente, presentaron un síndrome de tos ferina maligna, que cursó con bronquiolitis y progresivo empeoramiento del cuadro respiratorio, lo que determinó su traslado a la unidad de cuidados intensivos, desarrollando una reacción leucemoide importante (109.600 y 97.000 leucocitos/ μ l, respectivamente) y una grave hipertensión pulmonar, y fallecieron a los 5 y 9 días del ingreso, respectivamente. *B. pertussis* se aisló en los aspirados nasofaríngeos y traqueales, y en un caso se acompañó de un adenovirus en el nasofaríngeo. El tercer caso era un varón de 2 meses de edad, que había presentado también un síndrome de tos ferina maligna y falleció a los 40 días del ingreso por un distrés respiratorio secundario a una neumonía bilateral con neumotórax; se aisló *B. pertussis* en las muestras de lavado broncoalveolar y aspirado traqueal, y presentó posteriormente una infección nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa*, que se aisló en el líquido pleural y el hemocultivo.

Estado vacunal

Se conocía la historia vacunal en 139 pacientes (93,3%). El 55,4% (77 casos) no estaban inmunizados, porque no tenían la edad para el inicio de la primovacunación; el 40,3% (56 casos) habían recibido las dosis correspondientes a su edad, pero sólo el 16% habían recibido tres o más dosis. Seis pacientes (4,3%) no estaban vacunados.

Fuente de contagio

En el 52,3% de los pacientes (78 casos) se conocía la existencia de una posible fuente de contagio, ya que te-

nían contacto con personas que presentaban síntomas respiratorios con tos antes del inicio del cuadro clínico del paciente. El foco era domiciliario en 76 enfermos (97,4%), de los que 28 eran adultos y 23 niños; en los 25 restantes no constaba esta información en la historia clínica. Solamente en 2 pacientes se refería un contacto en la guardería o en el colegio.

DISCUSIÓN

La tos ferina es todavía un problema sanitario importante y su hospitalización afecta sobre todo a un grupo de población, los lactantes en los primeros de 6 meses de vida, con una alta tasa de morbilidad y una no insignificante letalidad⁹.

Esta revisión, basada en las características de los pacientes en los que se aisló *Bordetella* spp., presenta resultados similares a los obtenidos en otras series¹⁰⁻¹³. La tos ferina se confirmó por cultivo en el 11,7% de los pacientes que consultaron por tos pertusoide, porcentaje comparable al de otras revisiones realizadas en España que, durante un período de tiempo similar, investigan *Bordetella* spp. y utilizan solamente el cultivo como método diagnóstico^{14,15}. Este porcentaje es inferior al comunicado por Francis et al¹⁶ (38,7%), aunque en su estudio se incluyeron 144 pacientes seleccionados, todos ellos ingresados en un servicio de enfermedades infecciosas, de características diferentes a los 1.375 enfermos con tos pertusoide atendidos en nuestro hospital, la mayoría en el servicio de urgencias.

El cultivo del aspirado nasofaríngeo o de las secreciones respiratorias presenta una baja sensibilidad, ya que está sometido a numerosas variables; es importante la recogida correcta y el transporte inmediato de la muestra al laboratorio. Además existe una clara interferencia de la flora saprofita, que en muchas ocasiones no puede ser inhibida por la cefalexina que contiene el medio de agar charcoal. Otros aspectos como el período evolutivo de la enfermedad, el tratamiento antimicrobiano previo a la toma de la muestra y el estado vacunal son parámetros clínicos que influyen de manera especial en el número de unidades formadoras de colonias de *Bordetella* spp. presentes en las secreciones respiratorias analizadas¹⁷.

El uso de otras técnicas diagnósticas como la inmunofluorescencia directa y la serología, aunque tienen mayor sensibilidad que el cultivo, plantean problemas de especificidad. En los últimos años la aparición de nuevas técnicas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹⁸⁻²², de mayor sensibilidad, ha llevado a plantear la necesidad de su aplicación sistemática en combinación con el cultivo en los laboratorios de microbiología en los que el volumen de muestras y los medios disponibles lo permitan.

Durante los 12 años de este estudio se produjeron 3 ciclos epidémicos con una periodicidad de 3 y 8 años entre ellos, aspecto ya descrito en la literatura médica^{5,23}. Como

es característico de la tos ferina, la mayoría de aislamientos se produjeron entre primavera y verano^{15,16,24,25}. En la mayoría de series publicadas se describe un predominio del sexo femenino^{14,26,27}, hecho no corroborado en este estudio; sin embargo, en Estados Unidos, según una revisión de 27.826 casos, Farizo et al²⁸ encuentran un número similar de casos en ambos sexos en niños menores de 15 años, con un predominio del sexo femenino en edades superiores.

H. influenzae y *S. pneumoniae* fueron los microorganismos que se encontraron con más frecuencia asociados a *B. pertussis*, ya que forman parte de la flora normal de las vías respiratorias altas, aunque también las enterobacterias y *Pseudomonas* spp., microorganismos más virulentos y con patrones de resistencia variables, pueden producir cuadros de sobreinfección respiratoria, sobre todo en niños pequeños, en la evolución de la tos ferina^{29,30}.

B. pertussis se encontró junto a micoplasmas en 9 enfermos, de los que seis tenían menos de 3 meses de edad, por lo que es probable que se tratara de una colonización faríngea por transmisión en el canal del parto, que se ha comprobado que puede persistir hasta en el 68% de casos en el primer trimestre de la vida³¹.

La coexistencia de *B. pertussis* con un virus es un tema debatido en la literatura médica³²⁻³⁴. En nuestro estudio, el adenovirus fue el virus predominante y se aisló en uno de los enfermos fallecidos por un cuadro de tos ferina maligna.

En niños que presentan tos pertusoide es importante no excluir una infección por el virus respiratorio sincitial, ya que, según un estudio previo publicado por nuestro grupo⁸, su frecuencia de aislamiento en el síndrome pertusoide es igual a la de *B. pertussis*, dato ya reseñado en otros trabajos^{33,35-37}. El significado clínico de la infección simultánea por ambos microorganismos, así como con otros virus a los que se asoció *B. pertussis*, requiere más estudios.

La tos ferina presenta complicaciones graves que requieren ingreso hospitalario³⁷⁻³⁹. En nuestra serie se produjeron episodios de apnea en el 21,5% de los pacientes, de los que el 54,8% eran menores de 3 meses, y convulsiones que en su mayoría afectaron a niños menores de 3 meses. Dos pacientes presentaron una neumonía por una sobreinfección por *Stenotrophomonas maltophilia* y *P. aeruginosa*. El porcentaje de complicaciones es más elevado que el obtenido en otros estudios realizados en España en esta última década^{16,25}, pero inferior que en series de otros países, en los que la incidencia de neumonía es mucho más elevada y se describen casos de encefalopatía^{12,24,28}, que no se produjeron en nuestros pacientes.

En revisiones realizadas en las décadas de 1960 y 1970, la letalidad fue del 5%^{11,26}, pero en los últimos años esta cifra ha disminuido, desde valores nulos^{16,25,38} a porcentajes similares al de nuestro estudio^{12,24,28,39}.

Debido a que la tos ferina no se considera a menudo en el diagnóstico diferencial de los casos de neumonía grave en el lactante y que además, cuando se sospecha, tanto el cultivo como la inmunofluorescencia tienen una baja sensibilidad, es probable que el número de fallecimientos relacionado con la tos ferina pueda ser mayor.

El aumento de la incidencia de la tos ferina en el adolescente y en el adulto se asocia a un incremento de esta infección en lactantes durante los primeros 6 meses de vida, todavía susceptibles porque no han iniciado o completado la primovacunación^{4,13}. La tos ferina es más frecuente y grave en este grupo de niños; en nuestro estudio, el 90,1 % de los enfermos que fueron hospitalizados pertenecían a él⁴⁰ y en los casos en que se conoce el foco de contagio, el 54,9 % era un adulto de su entorno familiar. Para proteger a estos lactantes es necesario disminuir la infección en adolescentes y adultos, con lo que se reducirá el riesgo de transmisión de *B. pertussis*.

La inmunidad vacunal frente a la tos ferina disminuye de forma importante con el tiempo; a los 7 años de la última dosis de vacuna sólo el 46 % de la población inmunizada permanece protegida⁴¹. En España, hasta 1999, la última dosis de vacuna de la tos ferina (en forma de la vacuna triple bacteriana o DTP) se administraba a los 18 meses de edad en la mayoría de las comunidades autónomas. A partir de esta fecha, y gracias a la comercialización de la primera vacuna acelular, se incorporó una nueva dosis de vacuna anti-*pertussis* en el calendario de inmunizaciones sistemáticas a los 3-6 años, con la cual se espera mantener la inmunidad hasta la adolescencia^{1,4,42}.

La reciente comercialización de la primera vacuna acelular de la tos ferina con carga o componente antigénico reducido (pa), combinada con los toxoides diftérico tipo adulto (d) y el tetánico (T), constituyendo la vacuna dTpa, permite continuar revacunando de la tos ferina a adolescentes y adultos en lugar de hacerlo sólo con la vacuna dT. Los estudios de inmunogenicidad, seguridad y eficacia realizados con la vacuna dTpa demuestran resultados favorables^{4,42-44}.

La estrategia más idónea para continuar la inmunización anti-*pertussis* es la sustitución de la vacuna dT por la dTpa en el calendario de inmunizaciones sistemáticas, a los 13-16 años. El Comité Asesor de Vacunas (CAV) de la Asociación Española de Pediatría ya la ha incluido en el calendario vacunal⁴² y esta recomendación también la ha realizado recientemente el Grupo Internacional de Consenso sobre Inmunización de la tos ferina⁴³. Además se debe continuar con la vacunación en la edad adulta. La inmunización universal, a los 13-16 años y a los adultos, es la mejor estrategia para conseguir la protección individual y la de los lactantes susceptibles. Sin embargo, esta estrategia vacunal puede ser de difícil implementación por problemas logísticos y económicos. Por esto, en una primera fase parece lógico priorizar su uso en los adul-

tos que tengan más probabilidades de contactar con estos lactantes, como los padres y otros contactos familiares, los cuidadores de guarderías y los trabajadores de la salud, sobre todo los que pertenecen a áreas pediátricas^{1,43,44}.

BIBLIOGRAFÍA

- Moraga Llop FA, Campins Martí M. Estado actual de la inmunización frente a la tos ferina ¿Una nueva vacuna sistémica para el adolescente y el adulto? En: Campins M, Moraga FA, editores. Vacunas 2000. Barcelona: Prout Science, 2000; p. 143-61.
- García-Corbeira P, Dal-Ré R, Aguilar L, García-de-Lomas J. Seroepidemiology of *Bordetella pertussis* in the Spanish population: A cross-sectional study. *Vaccine* 2000;18:2173-6.
- Domínguez A, Vidal J, Plans P, Salleras L. The seroepidemiology of *B. pertussis* infection in Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect* 2001;126:205-10.
- Campins M, Moraga FA. La tos ferina en el adolescente y el adulto. *Epidemiología e implicaciones para la vacunación. Med Clin (Barc)* 2000;114:661-4.
- Moraga F, Rodrigo C. Tos ferina y síndrome pertusoide. Tratamiento y profilaxis de la tos ferina. *Medicine* 1986;75:3135-40.
- Hallender 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.
- Hagjwara 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.
- Ferrer A, Calicó I, Manresa JM, Andreu A, Moraga F, Valle I. Microorganismos aislados en casos de síndrome pertusoide. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2000;18:433-8.
- Gil A, Oyagüez I, Carrasco P, González A. Hospital admissions for pertussis in Spain, 1995-1998. *Vaccine* 2001;19:4791-4.
- Heininger U, Cherry JD, Eckhardt T, Lorenz C, Cristenson 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.
- Miller CL, Fletcher WB. Severity of notified whooping cough. *BMJ* 1976;1:117-9.
- Melker HE, Conyn-Van MAE, Rümke HC, Van Wijngaarden JK, Mooi FR, Schellekens JFP. Pertussis in the Netherlands: An outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis* 1997;3:175-8.
- Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis – United States 1997-2000. *MMWR* 2002;51:73-6.
- Gómez V, Grasa M, Feliz J, García P, Carboné A, De Juan F. Tos ferina. Revisión de 245 casos en edad pediátrica. *Acta Pediatr Esp* 1991;49:678-82.
- Moles B, Esteban A, Villuendas MC, López C, Capasús MJ, Fortuño B, et al. ¿Fracaso de la vacuna contra la tos ferina? Estudio de seis años (1984-1989) en Zaragoza. *Rev Esp Microbiol Clin* 1990;5:424-8.
- Francis M, Borque C, Del Castillo F, Díez J, García J. Tos ferina: estudio retrospectivo de los casos diagnosticados en un período de 15 años. *An Esp Pediatr* 1998;49:280-3.
- Hoppe JE. *Bordetella*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1999; p. 614-24.

18. Müller FMC, Hoppe JE, Von König CHW. Laboratory diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. *J Clin Microbiol* 1997;35:2435-43.
19. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Comparison of PCR, culture and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1999;37:2872-6.
20. Hallender HO. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):99-106.
21. 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.
22. Kusters K, Riffelmann M, Wirsing-von-Koning CH. Evaluation of a real time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in clinical samples. *J Med Microbiol* 2001;50:436-40.
23. Cherry JD. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):112-7.
24. Gordon M, Davies HO, Gold R. Clinical and microbiological features of children presenting with pertussis to a Canadian pediatric hospital during an eleven-year period. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:617-22.
25. Montiano JI, Lazcoz A, Amiana C, Mendia M, Benito J, Santiago M, et al. Tos ferina. Estudio de una epidemia. *An Esp Pediatr* 1992;3:184-6.
26. Brooksaler F, Nelson JD. Pertussis. A reappraisal and report of 190 confirmed cases. *Am J Dis Child* 1967;114:389-96.
27. Jenkinson D. Natural course of 500 consecutive cases of whooping cough: A general practice population study. *BMJ* 1995;310:299-302.
28. Farizo KM, Cochi SL, Zell ER, Brink EW, Wassilak SG, Patriarca PA. Epidemiological features of pertussis in the United States 1980-1989. *Clin Infect Dis* 1992;14:708-19.
29. Jackson LA, Cherry JD, Wang SP, Grayston JT. Frequency of serological evidence of *Bordetella* infections and mixed infections with other respiratory pathogens in university students with cough illnesses. *Clin Infect Dis* 2000;31:3-6.
30. Hoppe JE. Neonatal pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:244-7.
31. Syrogiannopoulos GA, Kapatais-Zoumbos K, Decabalas GO, Markantes CG, Katsarou VA, Beratis MG. *Ureaplasma urealyticum* colonization of full term infants perinatal acquisition and persistence during early infancy. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:236-40.
32. Nelson KE, Gavitt F, Batt MD, Kallick ChA, Reddi KT, Lenin S. The role of adenoviruses in the pertussis syndrome. *J Pediatr* 1975;86:335-41.
33. Gallés C, Ferrer A, Moraga FA, Calicó I, Fernández F. Síndrome pertuosoide: estudio de 74 casos. *An Esp Pediatr* 1989;31:549-53.
34. Severien C, Teig N, Riedel F, Hohendahl J, Rieger C. Severe pneumonia and chronic lung disease in a young child with adenovirus and *Bordetella pertussis* infection. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:400-1.
35. Vernacchio L, Kahn J. A 6-week-old girl with persistent apnea and worsening pulmonary disease. *Curr Opin Pediatr* 1996;8:459-66.
36. Nelson WL, Hopkins RS, Roe MH, Glode MP. Simultaneous infection with *Bordetella pertussis* and respiratory syncytial virus in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:540-4.
37. Aoyama T, Ide Y, Watanabe J, Takenchi Y, Imaizumi A. Respiratory failure caused by dual infection with *Bordetella pertussis* and respiratory syncytial virus. *Acta Pediatr Jpn* 1996;38:282-5.
38. Stojanov S, Liese J, Belohradsky BH. Hospitalization and complications in children under 2 years of age with *Bordetella pertussis* infection. *Infection* 2000;28:106-10.
39. Gan VN, Murphy TV. Pertussis in hospitalized children. *Am J Dis Child* 1990;144:1130-4.
40. Moraga Llop FA, Ferrer A, Planells I, Campins M. Stressing the effects of pertussis in the first 6 months of life. Hospital-based study in Spain (1989-2000). 20th Annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases. Lituania: Vilnius, 2002; p. 88.
41. Jenkinson D. Duration of effectiveness of pertussis vaccine. *BMJ* 1988;286:612-4.
42. Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría. Calendario vacunal de la Asociación Española de Pediatría 2003. *An Pediatr* 2003;58:257-62.
43. Campins M, Cheng HK, Forsyth K, Guiso N, Halperin S, Huang LM, et al. Recommendations are needed for adolescent and adult pertussis immunization: Rationals and strategies for consideration. *Vaccine* 2001;20:641-6.
44. Campins Martí M, Moraga Llop FA. Tos ferina. Situación epidemiológica y nuevas estrategias de vacunación. *Vacunas Invest Pract* 2002;3:108-13.