



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA

*TITULO*

**“VALIDEZ DE LA REACCION EN CADENA DE POLIMERASA (PCR) EN EL  
DIAGNOSTICO DE TOSFERINA EN EL HOSPITAL INFANTIL DE SONORA DEL 1 ro DE  
ENERO DEL 2011 A 30 DE ABRIL DEL 2013”.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA:**

**ESPECIALIDAD DE PEDIATRIA**

**PRESENTA:**

***DR ERICK RAMIREZ RAMIREZ.***

HERMOSILLO, SONORA

AGOSTO 2013.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA

*TITULO*

“VALIDEZ DE LA REACCION EN CADENA DE POLIMERASA (PCR) EN EL DIAGNOSTICO DE TOSFERINA EN EL HOSPITAL INFANTIL DE SONORA DEL 1 ro DE ENERO DEL 2011 AL 30 DE ABRIL DEL 2013.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA: ESPECIALIDAD DE PEDIATRIA

PRESENTA: *DR. ERICK RAMIREZ RAMIREZ.*

Dra. Elba Vázquez Pizaña  
Director de la División de enseñanza,  
Investigación y calidad HIES

Dr. Luis Antonio González Ramos  
Director General del Hospital Infantil  
del Estado de Sonora

**DR. RAMIRO GARCÍA ÁLVAREZ**

Profesor Titular Curso Universitario

Dra. María de los Ángeles Durazo Arvizu

Director De Tesis

Médico Adscrito a infectología pediátrica

Dr. Manuel Alberto Cano Rangel

Adscrito a Infectología pediátrica.

Profesor Adjunto al Curso Universitario

Dr. Roberto Dórame castillo

Medico Adscrito de Infectología pediátrica.

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a mi familia, a mis padres por el apoyo incondicional brindado siempre y por su gran ejemplo, a mis hermanos por estar siempre conmigo.

A mi directora y asesores a los cuales estimo, respeto y admiro profundamente, gracias a ellos ha salido adelante este proyecto. Gracias por su confianza, apoyo y sobre todo por su gran paciencia.

Y sobre todo a una gran persona a la Dra. Maricela Galicia Hernández, a quien dedico especialmente este trabajo, por su fuerza, por su amor y por ser tal y como es.

## INDICE.

INTRODUCCION.	5
RESUMEN	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
MARCO TEORICO	10
OBJETIVOS	21
HIPOTESIS	22
JUSTIFICACION	23
METODOLOGIA	24
RESULTADOS	26
ANALISIS	35
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	38
ANEXOS	39
BIBLIOGRAFIA	43

## INTRODUCCION

La tosferina es responsable de una carga de enfermedad importante en el mundo, siendo una de las enfermedades prevenibles por vacunación más antigua de la infancia, que causa brotes importantes principalmente en niños. El control de la enfermedad sigue siendo un problema de salud pública tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, es una enfermedad endémica con brotes epidémicos, en promedio se presentan cíclicamente cada 3-5 años, se ha producido un desplazamiento epidemiológico en la edad de presentación, siendo adolescentes y adultos los sujetos afectados, generalmente con un cuadro leve de infección que pasa desapercibido, que a su vez constituyen una fuente de infección mayor en lactantes.<sup>3,11</sup>

En México es un problema de salud vigente y su control presenta obstáculos como la falta de sospecha clínica, la confirmación del diagnóstico, los esquemas de vacunación incompletos o tardíos.<sup>17</sup>

Los métodos de diagnóstico más comunes para detección de *Bordetella pertussis* son el cultivo, serología y PCR. Históricamente el cultivo ha sido considerado como el estándar de oro en niños, pero la implementación de nuevas técnicas de biología molecular y su estandarización en los laboratorios ha llevado al uso más cotidiano de técnicas como PCR.<sup>12, 13</sup>

## RESUMEN

**Introducción:** La tosferina es responsable de una carga de enfermedad importante en el mundo, siendo una de las enfermedades prevenibles por vacunación más antigua de la infancia. En México es un problema de salud vigente y su control presenta obstáculos como la falta de sospecha clínica, la confirmación del diagnóstico, los esquemas de vacunación incompletos o tardíos. El avance en técnicas de biología molecular ha permitido la implementación de técnicas de PCR lo cual la convierte en la herramienta actual mayor recomendada por sus ventajas y su alta sensibilidad.

**Objetivo:** Conocer la validez de la Reacción en cadena de Polimerasa para el diagnóstico de tosferina, en el Hospital Infantil del Estado de Sonora.

**Material y métodos:** Es un estudio transversal, se estudiaron los casos sospechosos de Tosferina /Síndrome coqueluchoide, se incluyeron aquellos con estudio epidemiológico y reporte de resultado de cultivo y/o PCR. Se realizó una tabla de 2 x 2, para el cálculo de sensibilidad y especificidad.

**Discusión:** En el estado de Sonora al igual que en el resto del mundo se reporta un incremento en el número de casos de tosferina, observándose un cambio en la epidemiología, siendo lactantes los más afectados con esquemas de vacunación incompletos o tardíos, se confirmaron 39 casos , con una sensibilidad para PCR de 46 % y una especificidad de 99%.

**Palabras clave:** tosferina, diagnóstico de tosferina, Reacción en cadena de polimerasa.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La infección por *Bordetella pertussis* continua siendo un problema de salud pública, incluso en países desarrollados, es una enfermedad reemergente, con aumento de su incidencia a nivel mundial, México no es la excepción observándose desde el 2005 aumento en la incidencia reportándose 3 casos/100 000 habitantes, incrementándose en el 2009 a 5 casos/100 000 habitantes, siendo la zona norte del país con mayor número de casos sospechosos(1,959 casos) y confirmados(579), lo que corresponde al 62% del total de casos confirmados.<sup>17</sup>

Desde el 2009 se reporta incremento del número de casos sospechosos y confirmados en Sonora, con una tasa de incidencia para este año de 42.6/millón de habitantes, siendo la mayoría lactantes y los adolescentes la principal fuente de reservorio e infección.<sup>9, 17,18</sup>

El diagnóstico clínico es complicado por la heterogeneidad en la expresión de la enfermedad, modificación de la enfermedad por inmunización, infecciones mixtas y baja sospecha, por lo cual se requiere conocimiento y experiencia por personal médico.<sup>3</sup>

La carga real de la enfermedad esta subestimada, tanto por la baja sospecha como por el bajo porcentaje de confirmación, en México se diagnostican 2 casos de tosferina por cada 10 casos de síndrome coqueluchoide (tasa de confirmación 20%). En Sonora de acuerdo a una revisión realizada por Gómez y colaboradores se reporta una tasa de cultivos positivos de 38%.<sup>9,17</sup>

El cultivo históricamente a sido el estándar de oro para el diagnóstico de tosferina, sin embargo es un método con baja sensibilidad, presenta desventajas para el diagnóstico entre ellas la toma de muestra inadecuada, la toma de muestra posterior al inicio de antibiótico y la toma de muestra tardía, con lo que se ve afectado el resultado.<sup>1, 2, 11</sup>

El avance en técnicas de biología molecular ha permitido la implementación de técnicas de PCR lo cual la convierte en la herramienta actual mayor recomendada por sus ventajas y su alta sensibilidad. Lo cual nos lleva a estimar la validez de esta prueba para el diagnóstico de tosferina en el Hospital Infantil del Estado de Sonora.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACION.**

¿Tiene la PCR mayor validez que el cultivo nasofaríngeo para el diagnóstico de Bordetella pertussis?

## MARCO TEORICO.

### INTRODUCCION:

La tosferina es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Bordetella pertussis* que es un bacilo aerobio gran negativo, pleomórfico, no móvil, que afecta exclusivamente al ser humano y se trasmite por partículas de secreciones respiratorias de personas infectadas.<sup>4, 11</sup>

La tosferina continua como problema de salud publica, incluso en países desarrollados con buena cobertura de vacunación.la evidencia actual confirma que la infección por *Bordetella pertussis* como causa de enfermedad fatal en neonatos vulnerables e infantes con esquema de vacunación incompleto. Asociado al incremento de tosferina reportado ocurrió un cambio en la frecuencia reportada por grupo de edad, siendo un gran porcentaje de casos el de adolescentes y adultos, y ellos representan la mayor fuente de infección para neonatos e infantes.<sup>3, 4,18</sup>

### ANTECEDENTES:

La primera mención de la enfermedad fue encontrada en el texto: la ventana de la salud de Moultons en 1540, sin embargo Nils rosen von Rosenstein sugiere el inicio de la enfermedad en Francia en 1414. La primera epidemia es descrita en París, Francia en 1578 por Guillaume de Baillou. En 1679, Sydenham nombra a la enfermedad pertussis (tos violenta), en Francia es denominada coqueluche y en España tos ferina.<sup>4, 14</sup>

En 1900 J.J Baptiste vincent Bordet y Octave Gengou, observan al patógeno microscópico en el esputo de un paciente con tosferina. En 1906 se reporta el aislamiento de *B. pertussis*. El desarrollo de las vacunas inicia después del crecimiento de la bacteria en el

laboratorio, desde 1940 se inicia la aplicación masiva de vacuna celular de pertusis y en la ultima década con el uso de la vacuna acelular componente del DPT.<sup>4</sup>

Globalmente cada año ocurren 20-40 millones de casos de tosferina, 90% ocurre en países en desarrollo, así mismo se reportan hasta 400 000 defunciones por año, la mayoría en lactantes. La OMS recomienda mantener una incidencia menor de 1 caso/100 000 habitantes, siendo solo Japón el único en mantener dicha incidencia, otros países con incidencias bajas incluyen a España (2.3/100 000), USA (2.7/ 100 000) Francia (3.4/ 100 000) y reino unido (4/ 100 000), mientras las mas altas incidencias son reportadas en Australia (22-58/100 000) y Suecia (180/100 000).<sup>3</sup>

Debido a las amplias coberturas de vacunación, la tosferina permanece endémica con brotes epidémicos cada 2-5 años, probablemente causado por la trasmisión continua de adolescentes y adultos a infantes susceptibles.<sup>3</sup> Se ha observado en las ultimas 3 décadas un desplazamiento en la edad de los pacientes susceptibles, con lo cual el comportamiento ha variado considerablemente, tradicionalmente niños preescolares y escolares eran los sujetos afectados, actualmente son los adolescentes y adultos, que generalmente presentan una infección leve que incluso pasa desapercibida, constituyendo la fuente de infección mayor en lactantes con esquemas de vacunación incompletos.<sup>10, 11</sup>

En México se reporta una incidencia de 1-2/100 000 casos confirmados, los periodos con mayor incidencia en los últimos 10 años han sido 2005(3/100 000) y 2009(5/100 000). Durante el 2009 se reportaron 1959 casos sospechosos y se confirmaron 579 casos de tosferina, siendo la zona norte la más afectada con el 62% del total de casos confirmados. Los

estados de Nuevo León, Sonora y Tamaulipas presentaron las tasas mas altas de incidencia: 44.5, 42.6 y 16.6 respectivamente.<sup>17</sup>

La tosferina es muy contagiosa, es transmitida obligatoriamente de humano a humano a través del contacto directo de secreciones respiratorias de personas infectadas. La mayoría de las infecciones ocurren después del contacto directo con personas enfermas específicamente por inhalación de gotitas de flügge. Las personas son más infectantes durante el inicio de la fase catarral, cuando los síntomas son leves y no característicos.<sup>19</sup>

En cuanto a la microbiología esta bacteria pertenece al genero *Bordetella* que contiene especies de bacterias relacionadas con morfología similar, tamaño, al momento se conocen 9 especies. El agente causal de la tosferina es *Bordetella pertussis*, un cocobacilo gram negativo aerobio, pleomórfico y no móvil. Las otras especies son: *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petri* y *B. ansorpii*.<sup>1,6,19</sup>

*B. pertussis* afecta exclusivamente al humano, *B. parapertussis* afecta al humano y ocasionalmente a las ovejas, *B. bronchiseptica* afecta animales como conejos, gatos y perros, *B. avium* y *B. hinzii* son importantes en aves, *B. holmensii*, *B. trematum* y *B. petrii* rara vez causan enfermedad en el humano.<sup>1</sup>

Desde el punto de vista biomolecular, *B. Pertussis* tiene un sistema de control de virulencia codificada en su genoma en el locus *bvgAS*. La infección resulta de la colonización y rápida multiplicación de la bacteria en la mucosa del tracto respiratorio, entonces se producen factores de virulencia entre ellos la toxina pertussis, la toxina adenilato ciclasa, la hemaglutinina filamentosa, la fimbrias, la citotoxina traqueal, la pertactina y la toxina dermonecrótica(tabla 1).<sup>7</sup>

Tabla 1.- Principales factores de virulencia de *Bordetella pertussis*

Adhesinas	
Hemaglutinina Filamentosa (HFA)	Proteína de superficie y de secreción, adhesina principal, gran potencial inmunogénico.
Fimbria (FIM)	Proteína filamentosa de superficie, requerida para colonización traqueal persistente.
Pertactina (PRN)	Proteína de superficie, mediación en la unión a células epiteliales.
Factor de Colonización Traqueal (FCT)	Proteína de secreción, rol en la colonización traqueal.
Toxinas	
Toxina Pertussis (TP)	Toxina A-B, con actividad ADP-ribosiladora de proteínas G; Factor promotor de linfocitosis.
Toxina Adenilato Ciclasa (CyaA)	Toxina termolábil con actividad dual adenilato ciclasa/hemolisina; fundamental en el daño celular; actúa como anti-inflamatorio y antifagocítico.
Toxina dermonecrótica (TDN)	Produce necrosis tisular (in vitro)
Citotoxina Traqueal (CTT)	Producto monomérico de la síntesis de peptidoglicanos. Disrupción de tight junctions, edema mitocondrial, extrusión de células epiteliales. Estimula producción de IL-1 y NO

En humanos, inicialmente ocurre una hiperplasia linfoide peribronquial local acompañada o seguida por inflamación necrotizante e infiltración de leucocitos en partes de la laringe, tráquea y bronquios.<sup>19</sup>

La infección y vacunación de *B. pertussis* induce inmunidad, la cual usualmente dura años. La toxina pertussis es un inmunógeno esencial, pero otros componentes como la hemaglutinina filamentosa y la adenilato ciclasa pueden también contribuir a la inmunidad después de infección o vacunación. Los mecanismos de defensa del organismo son no específicos (inflamación local, incremento de la actividad de los macrófagos, y producción de interferón) y específicos (proliferación de células B y T específicas). La inmunidad mediada por células es considerada crucial en la duración de la inmunidad.<sup>19</sup>

La inmunidad después de una infección no es de por vida, pero puede durar de 7-20 años, mientras la duración de la inmunidad después de inmunización con vacunas celular y acelular no difiere y protege hasta 4-12 años en niños.<sup>20</sup>

Varios factores afectan las manifestaciones clínicas de *B pertussis* incluyendo: la edad del paciente, inmunización previa o infección, presencia de anticuerpos adquiridos pasivamente y tratamiento con antibióticos, factores adicionales juegan un papel en las manifestaciones clínicas estos incluyen factores genéticos y adquiridos del huésped y el genotipo del organismo.<sup>1, 2, 4</sup>

El periodo de incubación es de 7-10 días, aunque se reporta con un límite de hasta 21-28 días. La enfermedad clásica mas frecuentemente ocurre como infección primaria en niños no vacunados, la duración de la enfermedad es de 6-12 semanas y se divide en 3 estadios: catarral, paroxística y convalecencia.

**Periodo catarral:** es la primera fase, dura desde pocos días hasta 1 semana. Las manifestaciones clínicas son indistinguibles a las de una infección leve del tracto respiratorio alto y son: rinorrea, lagrimeo y tos seca moderada, la cual incrementa en frecuencia y gravedad.<sup>11</sup>

**Periodo paroxístico:** esta segunda fase dura entre 2 y 6 semanas y se caracteriza por episodios de tos forzada durante una sola fase espiratoria (paroxismo). Al final del paroxismo hay una inspiración masiva forzada (estridor), estos paroxismos se presentan varias veces al día (12-15) y son mas graves durante la noche. Durante los episodios de paroxismos es común la cianosis, abultamiento de los ojos, protrusión de la lengua, salivación, lagrimeo. El vomito postusivo es común.<sup>11, 19</sup>

**Periodo convaleciente:** En esta fase la tos disminuye en frecuencia y gravedad, dura alrededor de 2-8 semanas, es común exacerbaciones durante infecciones respiratorias virales subsecuentes.

Las complicaciones comunes incluyen neumonía, otitis media, convulsiones y encefalopatía. La neumonía puede ser primaria en respuesta a *B. pertussis* o ser secundaria a infección con otros patógenos, las convulsiones y la encefalopatía son relacionadas a la hipoxia severa en los paroxismos. Otras complicaciones incluyen hemorragia subaracnoidea y hemorragia interventricular, epistaxis, melena, hemorragia subconjuntival, hernia inguinal, apnea, fractura costal, alcalosis severa y deshidratación. En USA, se reporta un porcentaje alto de hospitalización en menores de 6 meses de 72.2%.<sup>19</sup>

El diagnóstico de la tosferina considera aspectos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio.

La sospecha de tosferina es sugerida por signos y síntomas clínicos o por el antecedente de exposición con un caso confirmado. El diagnóstico clínico es difícil debido al amplio espectro de manifestaciones de la enfermedad y a la baja sospecha.<sup>20</sup>

Las definiciones de caso clínico más usadas son las establecidas por la organización mundial de la salud (OMS 2000) y los Centers for disease control prevention (CDC 2010), ambas consideran tos de 2 o más semanas, con uno de los siguientes síntomas: tos paroxística, estridor laríngeo y tos emetizante.<sup>5</sup>

Tabla 2. Definiciones de caso clínico.

	<b>Criterios clínicos</b>	<b>Criterios de lab y epidemiológicos</b>	
WHO, 2000	<p>Tos de 2 semanas con uno de los siguientes síntomas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tos paroxística.</li> <li>• Estridor laríngeo inspiratorio.</li> <li>• Tos emetizante</li> </ul>	<p>Aislamiento de <i>B. pertussis</i> o detección de secuencias genómicas por PCR, o serología positiva</p>	<p>Caso clínico.  Caso confirmado por laboratorio</p>
CDC, 2010	<p>Tos de 2 semanas con uno de los siguientes síntomas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tos paroxística.</li> <li>• Estridor laríngeo.</li> <li>• Tos emetizante</li> </ul>	<p>Aislamiento de <i>B. pertussis</i>, PCR positiva.</p>	<p>Probable.  Confirmado.</p>

En México la definición de caso se establece de acuerdo a las definiciones operacionales establecidas por la secretaria de salud.

Tabla 3. Definiciones operacionales tosferina y Síndrome Coqueluchoide.

Caso probable	Persona de cualquier edad, con tos de 14 o más días de evolución y con dos o más de las siguientes características: paroxística, en accesos, espasmódica o estridor laríngeo inspiratorio y uno o más de los siguientes datos: cianosis, hemorragia (conjuntival, petequias, epistaxis), biometría hemática con leucocitosis con predominio de linfocitos o haber estado en contacto con casos similares en las últimas 2 a 4 semanas previas al inicio del padecimiento. Los menores de 3 meses pueden manifestarse sólo como episodios de apnea o cianosis
Caso confirmado	Todo caso probable que tenga aislamiento de <i>B. pertussis</i> (Bp) ya sea por cultivo o PCR, o si el contacto, conviviente o persona con asociación epidemiológica presenta aislamiento de Bp
Caso de tos ferina clínica	Todo caso probable que no cuenta con muestra, independientemente de sus cinco contactos
Portador asintomático	Toda persona sin signos o síntomas de enfermedad respiratoria a quien se tomó muestras por tener AE con un caso probable o confirmado y su resultado sea positivo a Bp

Epidemiológico. Toma en consideración el estudio de la asociación de las variables epidemiológicas de tiempo, lugar y contactos, así como las coberturas de vacunación específicas por grupo de edad.<sup>1,19</sup>

Los datos de laboratorio pueden apoyar el diagnóstico clínico al encontrar leucocitosis con predominio de linfocitosis. La confirmación por laboratorio requiere de acuerdo a la OMS y CDC: el aislamiento de *Bordetella pertussis* o detección de secuencias genómicas por reacción en cadena de la polimerasa y serología positiva.

Los métodos de diagnóstico más comunes para la detección de *B. pertussis* son: el cultivo, la PCR, y serología. Factores como la exposición previa a la bacteria, edad, administración de antibiótico, inmunización, tiempo de toma de la muestra, estadio de la enfermedad, pobre muestra, problemas en el transporte de la muestra, pueden afectar la sensibilidad y especificidad de las pruebas individuales.<sup>1,2</sup>

A continuación se describen los métodos de diagnóstico:

Cultivo: Tradicionalmente el cultivo se ha considerado el estándar de oro para el diagnóstico de tosferina. Es un método altamente específico, pero con pobre sensibilidad, su principal limitante es que el aislamiento depende del momento de la toma de la muestra, (tabla 3) siendo útil solo en el periodo catarral. Se estima una sensibilidad de 15-45% si se toma en dicho periodo.<sup>1, 2, 11, 19</sup>

La muestra se obtiene por medio de un hisopo, se toma exudado nasofaríngeo, los 2 medios de cultivo más usados son: el medio de Bordet-Gengou y el agar Regan-Lowe. Este último permite mayor porcentaje de aislamientos y tiene una vida media más larga. Generalmente se requiere de 7-10 días para el crecimiento, aislamiento e identificación del germen, siendo una de sus limitantes obvias.<sup>1, 2</sup>

PCR: Es una de las pruebas moleculares más utilizada, ha demostrado ser 2-4 veces más sensible que el cultivo. Se reporta una sensibilidad alta del 70-99% y especificidad entre 86-100%. Esto depende del formato utilizado y del blanco genómico, los más estudiados y usados son los IS481, BP283, BP485, ptx S1. Generalmente se utilizan 2 o más blancos genómicos que garantizan una buena sensibilidad y especificidad.<sup>1, 4, 8</sup>

La ventaja de utilizar PCR para el diagnóstico etiológico de tosferina radica en que es una prueba con resultados rápidos, además de ser mucho más sensible, es capaz de detectar desde el periodo catarral y en las primeras 3 semanas del paroxístico e incluso después de tratamiento específico con antibiótico.<sup>1, 11</sup>

Es importante tener en cuenta, factores importantes que pueden alterar el resultado, entre ellos la toma adecuada de la muestra y la preparación. Es de vital importancia que los hisopos utilizados sean de dacron o rayón y evitar los de alginato de calcio ya que pueden inhibir la PCR. La muestra se puede obtener por aspirado o por hisopado nasofaríngeo, una vez obtenida la muestra se usa un medio de transporte con solución salina o el medio de transporte Regan-low. Los resultados falsos-positivos son un problema potencial asociado con PCR en el diagnóstico de tosferina y otras enfermedades respiratorias. La PCR es una herramienta invaluable en el diagnóstico de tosferina en infantes y lactantes, por lo cual ya se refiere en la literatura como el nuevo estándar de oro para el diagnóstico de tosferina.<sup>1, 12,13</sup>

Serología: La infección por *B pertussis* es seguida por un incremento de niveles séricos de IgA, IgM e IgG, mientras la inmunización primaria induce principalmente IgM e IgG. La prueba mediante ELISA constituye la principal prueba para diagnóstico serológico. Entre los antígenos contra los cuales se generan anticuerpos están: la toxina pertussis, la hemaglutinina filamentosa, la pertactina, las fimbrias y la toxina adenilato ciclasa, siendo el mas específico y mas utilizado la toxina pertussis.<sup>1</sup>

El uso de antibióticos es principalmente para la erradicación de *B. pertussis* de la vía aérea, puede tener efectos en la limitación de la severidad si se utilizan tempranamente en el curso de la enfermedad en la fase catarral, después de establecida la tos los antibióticos no tienen efecto discernible en el curso de la enfermedad, pero son recomendados para limitar la transmisión de *B. pertussis* a otros individuos.<sup>2</sup>

Los macrólidos (eritromicina, claritromicina y azitromicina) son los antibióticos de primera línea para el tratamiento y profilaxis de tosferina en lactantes mayores de 6 meses,

para menores de esta edad se recomienda la azitromicina ante el riesgo de estenosis hipertrófica pilórica asociada a eritromicina.

Se recomienda un esquema de 14 días con eritromicina (40-50mg.kg.día), claritromicina (15mg.kg.día c/12) por 7-10 días y con azitromicina (10mg.kg.día) durante 5 días.

## **OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Conocer la validez de la Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para diagnóstico de tosferina en el Hospital Infantil del Estado de Sonora del 01 de Enero del 2011 al 30 de Abril del 2013.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar número de casos sospechosos y confirmados.
- Conocer la validez de la PCR para el diagnóstico de tosferina.
- Conocer el panorama clínico epidemiológico de la tosferina.

## **HIPOTESIS.**

### **Hipótesis alterna:**

- La PCR es una herramienta diagnóstica con mayor validez para el diagnóstico de tosferina.

### **Hipótesis nula:**

- La PCR no es una herramienta diagnóstica con mayor validez para el diagnóstico de tosferina.

## **JUSTIFICACION.**

El resurgimiento de *B. pertussis*, causando enfermedad y muerte en población vulnerable es una realidad. Por lo cual en esta nueva era se requiere una alta sospecha clínica de la infección y la implementación de adecuados métodos diagnósticos.<sup>1</sup>

Si bien es cierto que la PCR no es una técnica reciente pues su uso data desde la década de los 80, la mejor implementación de laboratorios modernos y la estandarización de la técnica la convierte actualmente en una de las herramientas de primera línea para el diagnóstico de tosferina.<sup>1,2</sup>

La justificación de este estudio se basa siendo Sonora un estado con alta presencia de casos sospechosos y confirmados de tosferina, por lo cual se requiere el diagnóstico oportuno y adecuado para el inicio de un tratamiento temprano, siendo la PCR una herramienta diagnóstica que permite dichos objetivos.

## **MATERIAL Y METODOS.**

Se llevo a cabo un estudio trasversal en el que se revisaron los casos sospechosos de Tosferina/ Síndrome coqueluchoide, y los casos notificados a los cuales se le realizo estudio epidemiológico y toma de muestra para cultivo y/o PCR, con un total de 290 estudios epidemiológicos, excluyéndose 45 por no contar con resultado de reporte del cultivo y/o PCR

Se incluyeron todos los pacientes pediátricos con sospecha diagnostica de tosferina/ Síndrome coqueluchoide atendidos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora en el periodo comprendido del 1 de enero del 2011 hasta el 31 de abril del 2013.

### **CRITERIOS DE INCLUSION.**

Pacientes que presentaron un cuadro clínico sugestivo de tosferina, a los cuales se les realizo estudio epidemiológico y toma de muestra para PCR y/o cultivo.

### **CRITERIOS DE EXCLUSION.**

Pacientes que no cuenten con reporte de resultado de PCR o cultivo.

La recolección de datos se hará del formato de estudio epidemiológico de reporte de caso.

La base de datos se realizo en hoja de cálculo Excel que se utilizo posteriormente para el análisis estadístico mediante una tabla de 2 x 2. Se incluyeron las siguientes variables

## VARIABLES:

Independientes: edad, sexo.

Independientes: esquema de vacunación, días de evolución, cuadro clínico, tratamiento antibiótico previo, leucocitos y linfocitos. resultado de cultivo, resultado de PCR, edad del contacto, condición al egreso

## MATERIALES:

Para la toma de muestra de pacientes sospechosos se realizo toma de exudado nasofaríngeo con los siguientes materiales:

- Hisopos de dacron o rayón.
- Medio de transporte Rewan Lowe (cultivo).
- Medio de transporte solución salina con cefalexina (PCR).

Ya obtenida la muestra se enviaron al laboratorio estatal con estudio epidemiológico elaborado, donde se realizo el cultivo y PCR, mediante:

- Agar Bordet Gengou.
- PCR TR Multiplex secuencia IS481 y PtX1.

## RESULTADOS.

Se incluyeron 245 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, se excluyeron 45 que no contaban con resultado.

En la Tabla 1, se analizan los casos confirmados, de los cuales 20 fueron por aislamiento positivo por cultivo y 19 por PCR positivas, siendo en ambos casos sin predilección de género, En los cultivos positivos fue 50% femenino y 50% masculino, mientras en los pacientes con PCR positivas fueron 57.9% femeninos y 42.1 % masculinos.

Se descartaron 206 casos de los cuales 110 fueron por cultivo y 96 por PCR negativas. Sin embargo 48 del total fueron clasificados por criterios clínico epidemiológicos como positivos. (tabla2).

Tabla 1. Casos confirmados de tosferina

	<b>MASCULINO</b>	<b>%</b>	<b>FEMENINO</b>	<b>%</b>	<b>TOTAL</b>
<b>PCR</b>	8	42.1	11	57.9	19
<b>CULTIVO</b>	10	50	10	50	20

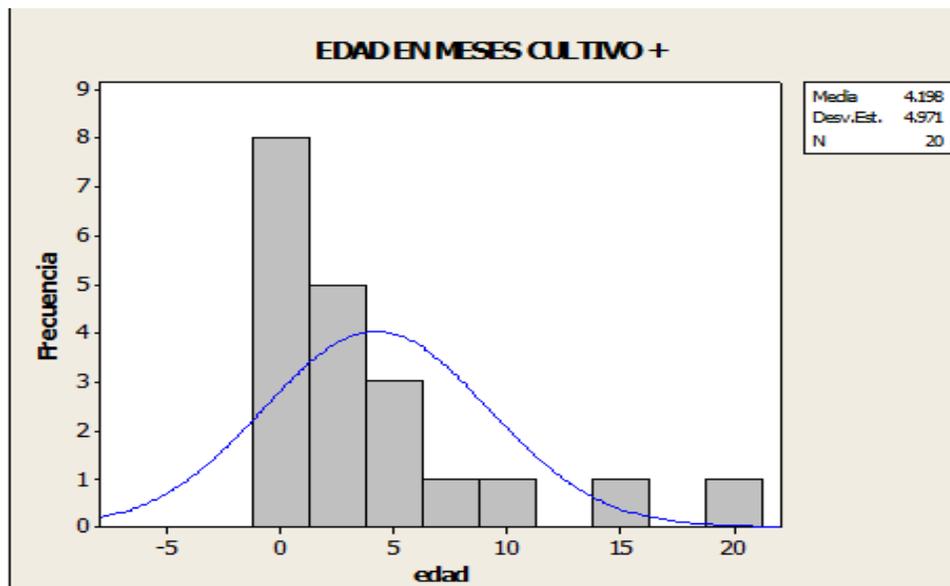
Fuente: Archivo clínico del HIES

Tabla 2. Casos descartados.

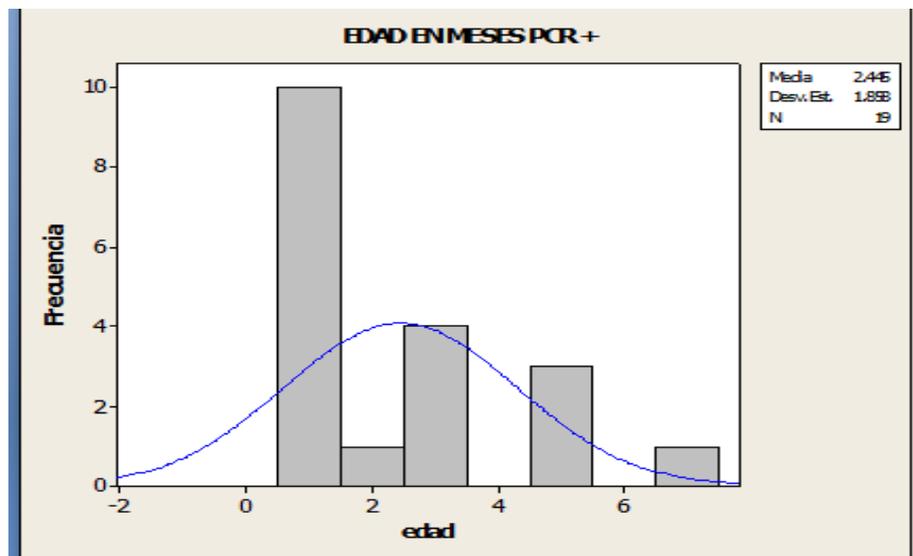
	MASCULINO	%	FEMENINO	%	TOTAL
<b>PCR -</b>	51	53.2	45	46.8	96
<b>CULTIVO -</b>	55	50	55	50.	110

Fuente: archivo clínico del HIES

De acuerdo a la edad el grupo mas afectado fueron los lactantes menores de 6 meses, principalmente los de 1 mes de edad, la media de edad para los pacientes con cultivo positivo fue de 4.1 meses mientras para los PCR positiva fue de 2.4 meses. (Grafica 1,2).



Grafica1. Edad en meses en casos confirmados por cultivo.



Grafica 2. Edad en meses en casos confirmados por PCR.

Tabla 3. Esquema de vacunación en casos confirmados.

		Vacunación tosferina	frecuencia	%
<b>PCR +</b>	Si		7	36.9
	no		12	63.1
	<b>total</b>		<b>19</b>	<b>100</b>
<b>Cultivo +</b>	Si		8	40
	no		12	60
	<b>total</b>		<b>20</b>	<b>100</b>

Fuente: Archivo clínico del HIES.

En cuanto al esquema de vacunación de los casos confirmados 24 casos (61.5%) no contaba con esquema de vacunación, el resto tenía esquema incompleto: 7 con 1 sola dosis, 6 con 2 dosis y tan solo 2 con esquema completo de 3 dosis. (Tablas 3 y 4).

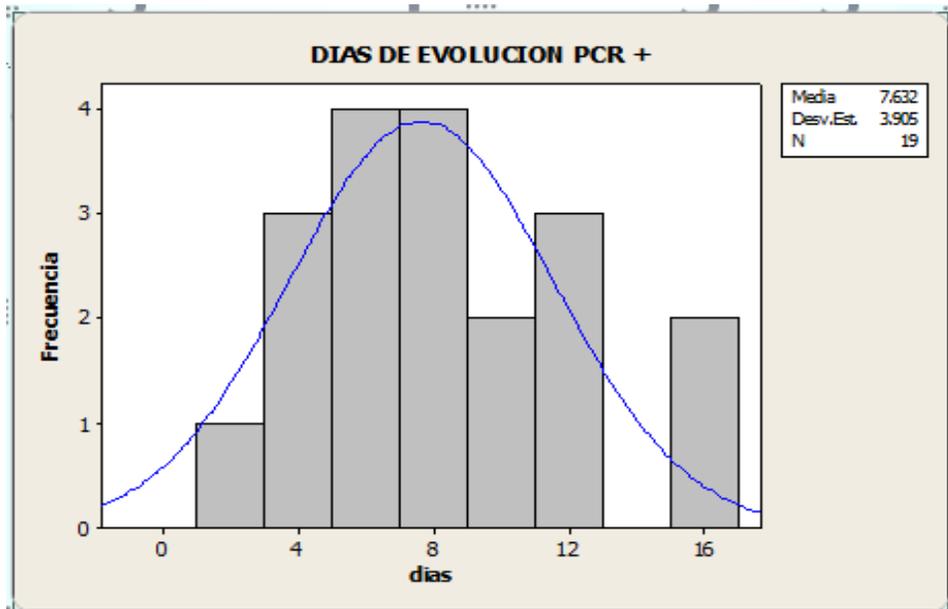
Tabla 4. Esquema de vacunación de tosferina en casos confirmados.

<b>ESQUEMA DE VACUNACION.</b>			
	<b>Dosis</b>	<b>frecuencia</b>	<b>%</b>
	0	12	63.2
<b>PCR +</b>	1	2	10.5
	2	5	26.3
	<b>total</b>	<b>19</b>	<b>100</b>
	0	12	60
<b>Cultivo</b>	1	5	25
	2	1	5
	3	2	10
	<b>total</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

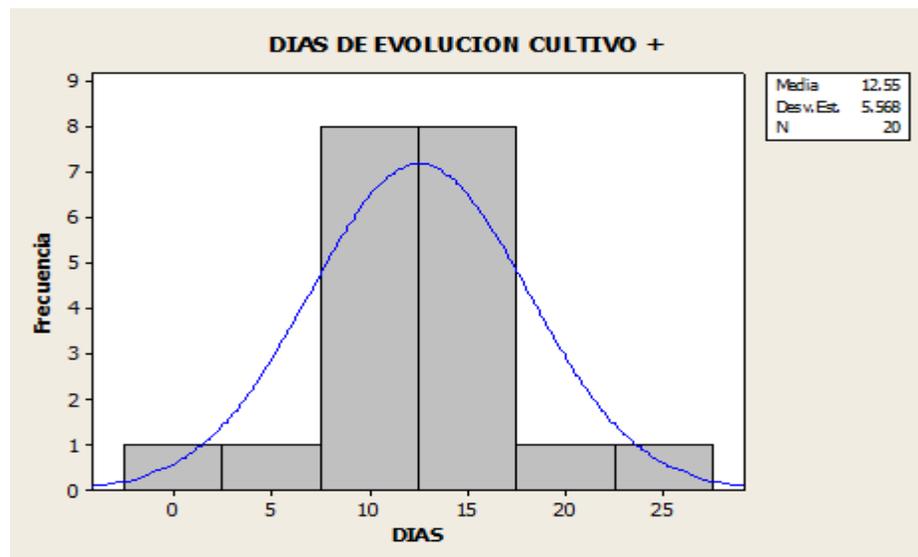
Fuente: Archivo clínico del HIES.

En cuanto a los días de evolución desde el inicio de los síntomas, se encontró una media de 7.6 días en los pacientes con PCR positiva y de 12.5 en los cultivos positivos (grafica 3 y 4).

Grafica 3. Días de evolución en casos confirmados por PCR



Grafica 4. Días de evolución en casos confirmados por Cultivo.



En cuanto al cuadro clínico se encontró como síntomas predominantes la tos en accesos, paroxística, con estridor y emesis. En los 2 grupos no se encontró diferencias en los hallazgos clínicos.

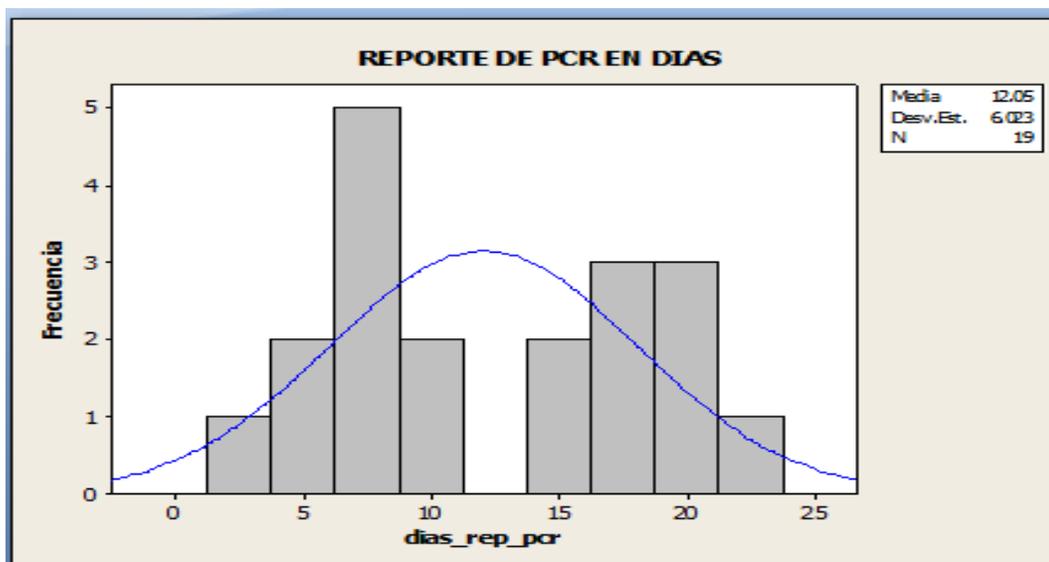
En los exámenes de laboratorio se encontró predominantemente leucocitosis con predominio de linfocitosis, en los pacientes con PCR positiva la media de leucocitos fue de 32896 con linfocitos media de 58.5%, mientras en los pacientes con cultivo positivo fue de 24 988 la media de leucocitos y 57.5 la de linfocitos.

De los datos radiograficos sobresale el infiltrado intersticial el cual se describe en 10 pacientes y la sobredistencion pulmonar en 16 pacientes respectivamente, solo en 2 pacientes se describe la imagen característica de corazon peludo.

El antibiótico usado en todos los casos sospechosos y confirmados fue un macrólido, principalmente claritromicina en todos los casos confirmados, en algunos casos con antibióticos asociados, entre ellos principalmente beta-lactamicos como ampicilina, cefuroxima.

En cuanto al reporte del resultado no hubo diferencia significativa, quizás asociado a varios factores externos como en ocasiones a la falta de reactivos y medios de transporte entre otros. La media fue de 12 días tanto para el cultivo como la PCR. (Grafica 5 y 6).

Grafica 5. Entrega de resultados en días en casos confirmados con PCR.



Grafica 6. Entrega de resultados en días en casos confirmados con cultivo.



De los casos confirmados, la mayoría tenía como contacto a familiares, de los cuales se encontró a 29 con familiares con síntomas respiratorios (74.3%), siendo la madre el principal contacto, se encontró como media la edad de 22 y 24 años respectivamente. Se confirmaron 4 casos en familiares (10%).

Del total de casos confirmados 38 se egresaron por mejoría, solo se reporto una defunción.

Tabla 5. Condición al egreso de casos confirmados.

<b>Condición al egreso</b>	<b>PCR +</b>		<b>CULTIVO -</b>	
<b>Alta por mejoría</b>	18	94.7 %	20	100 %
<b>defunción</b>	1	5.3 %	0	0 %
<b>TOTAL</b>	19	100 %	20	100%

Fuente: Archivo clínico del HIES.

Se realizo tabla de 2 x 2 para conocer la validez de la PCR, siendo ambas pruebas altamente especificas, teniendo el cultivo una sensibilidad de 42% y la PCR de 49%

Tabla 6. Resultados de sensibilidad y especificidad.

	<b>PCR</b>	<b>CULTIVO</b>
<b>Sensibilidad</b>	49%	42%
<b>Especificidad</b>	99%	99%
<b>Valor predictivo positivo</b>	97.4%	98%
<b>Valor predictivo negativo</b>	79%	74.5%
<b>Falsos positivos</b>	.65%	.60%
<b>Falsos negativos.</b>	51.2%	58%.
<b>precisión</b>	82.2%	78.1%

Fuente: Archivo clínico del HIES.

## **ANALISIS.**

La tosferina es una enfermedad con morbilidad importante en el estado, como se observa es una enfermedad que afecta a lactantes menores de 6 meses, principalmente aquellos en los que no se ha iniciado la vacunación o esquemas incompletos, es en ellos donde los padres son la principal fuente de infección. El diagnóstico de tosferina requiere conocimientos y sobre todo la sospecha clínica, el cultivo es el estándar de oro para el diagnóstico pero es un método con alta especificidad y baja sensibilidad, además tiene varios factores que afectan el resultado entre ellos la toma de muestra tardía, el uso previo de antibióticos, y la toma inadecuada. Las nuevas técnicas de biología molecular ofrecen ventajas sobre el cultivo, actualmente la implementación de la técnica de PCR en el estado ha permitido compararlas, en este estudio encontramos 39 casos confirmados siendo 19 por PCR y 20 por cultivo, siendo en ambos el porcentaje de géneros equitativos, en cuanto a la edad, se observa que la media de edad fue de 2.4 meses mientras para el cultivo fue de 4 meses, en cuanto al reporte de resultados no se encontró diferencias significativas, tal vez por factores externos, en cuanto a la validez si se encontró mayor sensibilidad de la PCR en comparación con el cultivo, aunque no fue lo esperado según la literatura.

## DISCUSIÓN.

El Estado de Sonora tiene un significativo número de casos sospechosos y confirmados de tosferina, por lo cual la implementación de la técnica de PCR para el diagnóstico de tosferina en el estado, la convierte en una herramienta de primera línea.

Al igual a lo que se reporta a nivel mundial, el cambio epidemiológico es notable, observándose principalmente en lactantes menores de 6 meses y sobre todo en aquellos que tienen un mes y por lo tanto esquemas nulos o incompletos de vacunación(61.5%), además es importante señalar que esto es asociado por la presencia de padres adolescentes o jóvenes quienes son la principal fuente de contagio a este grupo, esto se corrobora por la presencia de síntomas respiratorios en el 74.3% de los familiares de los casos confirmados, confirmándose el diagnóstico en 4 familiares con tosferina(10%). Como se menciona existen factores que pueden alterar los resultados como son toma de muestra inadecuada, el uso de antibióticos previos a la toma de muestra, etapa de la enfermedad en la que se encuentra, esto es importante saber ya que el cultivo tiene mayor sensibilidad en el periodo catarral y casi nulo en el paroxístico, mientras la PCR puede resultar positiva tanto en el periodo catarral y todo el periodo paroxístico, lo cual puede influir claramente en los resultados si se toma una muestra tardíamente en el curso de la enfermedad, así mismo es también importante saber la utilización de antibióticos previos, dado que al inicio del cuadro es muy inespecífico, se suelen usar antibióticos pensando en otra etiología. El cuadro clínico se caracterizó predominante por la presencia de tos paroxística, emesis y apneas predominantemente lactantes, el estridor fue el síntoma menos frecuente. Los hallazgos por laboratorio fueron semejantes a lo descrito en la

literatura se encontró leucocitosis, de hasta 120 000 con predominio de linfocitosis, en la radiografía el dato más predominante fue el infiltrado intersticial con sobredistención pulmonar, solo 3 casos se describen como la imagen característica a la tosferina descrita como corazón peludo. Sobresale que no se encontró diferencia en cuanto a los días de reporte de resultado esto por varios factores como el retraso en el envío, falta de personal, falta de material entre otras,, ya que la literatura se reporta como principal ventaja el resultado rápido de la PCR, mientras el cultivo toma de 5-10 días el reporte. La mayoría curso con evolución favorable, recibiendo esquema de antibiótico con macrólidos, 38 pacientes fueron egresados y solo se reporta 1 defunción debido a su ingreso presentaba datos de hipertensión pulmonar.

Uno de los objetivos primordiales fue darle validez a los resultados demostrando que el estudio de PCR mostro mayor sensibilidad cuando fue comparada con el cultivo (49% vs 42%), sin embargo esta no fue tan marcada como esta descrita en la literatura, ambas pruebas son altamente específicas (99%).

## CONCLUSIONES:

Al igual a lo que se reporta a nivel mundial, se encontró aumento en la incidencia de casos de tosferina en el Estado de Sonora, presentándose principalmente en lactantes menores de 6 meses, con esquemas incompletos de vacunación, siendo padres adolescentes o jóvenes la principal fuente de contagio, esto debido a la pérdida de inmunidad con el paso del tiempo, uno de los principales problemas que enfrentamos actualmente es el bajo índice de sospecha y la baja tasa de confirmación de casos en México. Es importante reconocer las ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico de tosferina ya que existen factores que pueden alterar el resultado, el más importante de ellos es la etapa de la enfermedad en la que se toma la muestra y el método empleado, La PCR es la técnica más sensible para el diagnóstico de *B. pertussis*, sin embargo es recomendable continuar usando en nuestro medio tanto el cultivo y la PCR, para posteriormente continuar evaluando ambos métodos.

ANEXOS.

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE TOSFERINA E IRA'S BACTERIANAS**

(*Bordetella pertussis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis*)

<b>I. IDENTIFICACION</b>						
Número de caso en:	Entidad _____ DGE _____	Lab. Estatal _____	InDRE _____ IMSS _____			
Nombre	_____		Edad _____ Sexo _____			
Domicilio Completo	_____		Teléfono _____			
Localidad	Municipio _____	Estado _____				
<b>II. DATOS DE LA NOTIFICACIÓN-ESTUDIO</b>						
Fuente de notificación _____	Fuente para la DGE _____	Brote _____				
	Fecha _____	Responsable _____	Teléfono _____			
Primer contacto con los servicios de salud	_____	_____	_____			
Notificación a la Jurisdicción	_____	_____	_____			
Notificación a la DGE	_____	_____	_____			
Estudio por la Jurisdicción	_____	_____	_____			
<b>III. UNIDAD TRATANTE</b>						
Nombre	Hospital Infantil del Estado de Sonora	Institución	Secretaría de Salud			
Domicilio	Reforma 355, col. Ley 57	Teléfono	2-89-0600			
Derechohabiente	_____	No. Exp.	_____			
Diagnóstico	_____	Médico	_____			
<b>IV. ANTECEDENTES</b>						
Vacunación con DTP:	<input type="text"/>	Dosis	<input type="text"/> Fecha de última dosis _____			
Fuente de información:	<input type="text" value="3"/>	<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">1. Cartilla</td> <td style="padding: 2px;">2. Otro registro</td> <td style="padding: 2px;">3. Verbal</td> </tr> </table>		1. Cartilla	2. Otro registro	3. Verbal
1. Cartilla	2. Otro registro	3. Verbal				
¿Ha tenido contacto con casos similares en las últimas _____						

6 semanas?

¿Ha viajado o recibido visitas en las últimas 6 semanas?

**V. CUADRO CLÍNICO**

	SI	NO		Duración
Tos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fecha de inicio _____	n _____
Tos paroxística	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fecha de inicio _____	n _____
Tos espasmódica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tos en accesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tos emetizante	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tos cianozante	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Estridor laríngeo inspiratorio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Hemorragias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Episodios de apnea o cianosis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Fiebre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Otros datos clínicos				
Complicaciones				

Cuantificación: \_\_\_\_\_

Tratamiento:

Antibióticos:	Amoxicilina	a) Cefazidima	b) Dicloxacilina	c) Claritromicina	d) Cefuroxima
Fechas:	a) _____	b) _____	c) _____	d) _____	

Evolución:

1. Sano	2. Delicado	3. Defunción	4. Alta por mejoría
---------	-------------	--------------	---------------------

Fechas:

4) \_\_\_\_\_



**X.  
OBSERVACIONES**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**XI. ESTUDIO DE CONTACTOS**

**XIa.  
IDENTIFICACION**

Nombre del contacto: \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Domicilio Completo \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

Localidad \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Relación con el caso probable (Madre, padre, hermano, etc. Otro, especifique): \_\_\_\_\_ Hija

**XIb.  
ANTECEDENTES**

Vacunación con DTP:  Dosis  SE IGN. Fecha de última dosis \_\_\_\_\_

Fuente de información: 

1. Cartilla	2. Otro registro	3. Verbal
-------------	------------------	-----------

¿Ha tenido contacto con casos similares en las últimas 6 semanas? \_\_\_\_\_

¿Ha viajado o recibido visitas en las últimas 6 semanas? \_\_\_\_\_

**XIc.  
CLASIFICACIÓN INICIAL**

Sin síntomas respiratorios	<input type="checkbox"/>	Fecha de inicio _____
Con síntomas respiratorios	<input type="checkbox"/>	Fecha de inicio _____

**XId. ESTUDIOS DE LABORATORIO Y GABINETE:**

<i>Bordetella pertussis</i>	Toma	Envío	Llegada	Resultado
Cultivo	_____	_____	_____	_____
PCR:	_____	_____	_____	_____

Llenó el formulario \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_  
Cargo \_\_\_\_\_ Institución \_\_\_\_\_ Tel. \_\_\_\_\_

## **BIBLIOGRAFIA.**

1. Aquino AA, Martínez LG, de colza RA. Aspectos genómicos de bordetella pertusis y el camino hacia el nuevo estándar de oro en el diagnostico de tosferina. Revista de enfermedades infecciosas ped. 2011; 24(96):139-148.
2. Bamberger et al. What is new in pertussis? Eur J pediatr. 2008 167:133-139.
3. Cherry JD, Grimpel E. Defining pertussis epidemiology clinical, microbiologic and serologic perspectives. Pediatr Infect Dis J. 2005; 24:225-s34.
4. Cherry JD, Matto S. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due bordetella pertussis. Clin microbial Rev. 2005; 18(2):326-382.
5. Cherry et al. Clinical definitions of pertussis.clinical infectious diseases 2012; 54(12)1756-64.
6. Codina GG, Marcelles FA. Diagnostico de laboratorio de las infecciones por Bordetella pertussis. Vacunas. 2009; 10(2)56-8.
7. Donoso et al. coqueluche grave: estado del arte. Rev. Chilena Infectol. 2012; 29(3):290-306.
8. Fry NK et al. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection. Journal of medical Microbiology. 2009; 58: 1023-1029.
9. Gómez RN, Álvarez HG, Cano MA. Tos ferina y síndrome coqueluchoide en niños menores de 1 año de edad: factores de riesgo asociados a mortalidad. Estudio descriptivo de 48 casos. Bol clin Hosp Infante de Son. 2011; 28(1)2-6.

10. Gutiérrez et al. Bordetella pertussis en latinoamerica: estamos reconociendo el problema? An pediater. 2008; 69(3):197-9.
11. Grupo de expertos en vacunación contra tosferina. Consenso para el diagnóstico clínico y la prevención de la infección por bordetella pertussis. Salud publica mex 2011; 53:57-65.
12. Heininger et al. clinical validation of PCR assay for diagnosis of pertussis. Pediatrics 2000; 150 (3); 1-6.
13. Knorr L et al. Evaluation of real-time PCR for diagnosis of Bordetella pertussis. BMC infectious Disease. 2006; 6(62):103-112.
14. Lederman DW. Breve historia de la bordetella pertussis, una elusiva damisela. Rev chil Infec 2004; 21(3):241-246.
15. Martínez-garcía et al. PCR en tiempo real, inmunofluorescencia y cultivo para la detección de bordetella pertussis. Enferm Infecc Microbiol clin. 2006; 24(8):500-4.
16. Romero-quechol et al. identificación de un caso de tosferina y estudio e sus contactos, utilidad de la PCR y del cultivo Rev. Med Inst Mex seguro soc 2007; 45(6) 623-627.
17. Suárez et al. tos ferina, un problema vigente de salud pública en México, planteamiento de la necesidad para introducir una nueva vacuna. Bol med hosp infan mex 2012; 69(4):314-320.
18. Tóme-sandoval p et al. Bordetella pertussis en estudiantes adolescentes de la ciudad de México. Revsaude publica 2008; 42(4):679-83.
19. Versteegh et al. Pertussis: a concise historical review including diagnosis, incidence, clinical manifestations and the role of treatment and vaccination. Reviews in clinical microbiology. 2005; 16:79-89.

20. Wood N, McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatric Respiratory Reviews* 2008; 9:201-212.