



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN
EN INVESTIGACIÓN EN SALUD HUMANA**

**Caracterización de la infección por *Bordetella* spp. y
Coqueluche en la provincia de Córdoba**

**Maestrando: Víctor O. Giayetto
Directora: Dra. Sandra V. Gallego**

2015



El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Magister de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba ha sido realizado en el Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba, dependencia del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Sandra Verónica Gallego.

*A mis viejos, mamá y papá:
A Ella por acompañarme en todos estos años de trabajo, de tristezas, alegrías, encuentros y
desencuentros, de amor.
A Él por inculcarme la pasión por la ciencia médica, el reconocimiento en el otro, el sentido del
humor, los “ires y venires” de la vida, la pasión por la vida.
A mis tres hermanos: María Eugenia, Alejandro y Gabriel por ser mis compañeros inseparables
en la vida, desde los juegos de la infancia hasta los desafíos de la adultez.
A mis sobrinos: Lucas, Octavio y Sofía por ser esos hijos que no tengo.*

Reconocimientos y Agradecimientos

Me quedo tranquilo y me siento feliz por el trabajo cumplido y acabado. Siento que culmino una etapa pero que vendrán otras. En ese camino recorrido me he encontrado con la generosidad y el acompañamiento de seres humanos que, amigos o no amigos, han contribuido a formarme como persona y como profesional; en el amor, la amistad, la transparencia, la seriedad en el trabajo, el compromiso y la honestidad. Para todos ellos no tengo más que palabras de agradecimiento. El orden de los factores no altera el producto final:

| | | |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Adolfo Giayetto | Gabriela Veglia | María Julieta Berduc |
| Adrián Betroni | Germán Parada | María Victoria Suayter |
| Adrián Sánchez | Gisela Bertoldi | Marina Bianco |
| Alberto Genaro Vilanova | Graciela Sotomayor | Marina Juárez |
| Alejandro L. Giayetto | Griselda Menardi | Marina T. Bottiglieri |
| Alicia Pérez Montalvo | Irene Pons | Martín Torres |
| Amparito del C. Bruera | Jacinta García de Gómez | Nylda del Carmen Gómez |
| Analía Cudolá | Javier Pons | Norma Saavedra |
| Analía Moretto | Jorge Mariojous | Octavio Giayetto |
| Andrea Loza | Jorge V. Pavan | Olga Silvia Barella |
| Ariadna Navarro | Juan Sileoni | Patricia Biganzoli |
| Ariel Odorizzi | Julio Toledo | Patricia Ferragut |
| Ariel Rampoldi | Leandro Ledesma | Patricia Rodríguez |
| Arnaldo Mangeaud | Leonardo González | Ramiro García |
| Beatriz Restrepo Cúneo | Leticia Saavedra | Raúl Armando |
| Cecilia Tamarit | Lidia Wolff | Roxana E. Cannistraci |
| César Marcelo Falappa | Lucas Giayetto | Rubén Sambuelli |
| Claudia Travella | Luis A. Pérez | Sandra V. Gallego |
| Cristina Remondegui | Luis O. Cabrera | Sebastián Blanco |
| Daniel Oregioni | Marcelo Ferreyra | Silvia González |
| Darío Gigena Parker | Marcos Balangero | Silvia Nates |
| Delia R. Yurcich | Marcos Vaira | Silvia Zamory |
| Eduardo Reales Páez | María Cecilia Cremer | Silvina Vittone |
| Elena Márquez | María Celia Frutos | Sofía Giayetto |
| Emilia Cimatti de Giayetto | María Eugenia Barile | Susana B. Moreno |
| Emilia Giayetto | María Eugenia Giayetto | Susana Pomar |
| Enrique Barale | María Fernanda Abarca | Teresa López |
| Esteban Temporini | María Fernanda Salazar | Víctor Antonio Giayetto |
| Gabriel O. Giayetto | María Gabriela Peirotti | Víctor Olegario Gómez |
| | María Isabel Morales | Viviana Piergentili |

“Un niño está en medio de sus juegos: algunos minutos antes que la crisis llegue, Él se detiene; su alegría deja lugar a la tristeza; si se encontraba en compañía de sus camaradas, se aparta de ellos y busca evitarlos. Es entonces, permitanme, señores, esta expresión, es entonces cuando medita su crisis, la siente venir...

Primero trata de hacer abortar la quinta; en lugar de respirar naturalmente, a pleno pulmón, como respiraba hasta ahora, retiene su respiración; parece comprender que el aire, llegando de lleno a su laringe, va a provocar esa tos fatigante, de la cual tiene triste experiencia...

De inmediato verán al enfermo buscar a su alrededor un punto de apoyo: si es un niño al pecho, se precipita en los brazos de su madre o de la nodriza...

Pero, lo repito, cualquier cosa que haga nada impedirá, no podrá más que retardar la explosión.”

Armand Trousseau, 1865⁵².

Índice general

| | |
|-----------------------------|----|
| Índice de Figuras..... | 1 |
| Índice de Tablas..... | 2 |
| Índice de Abreviaturas..... | 3 |
| | |
| Resumen..... | 5 |
| Introducción..... | 7 |
| Materiales y Métodos..... | 13 |
| Resultados | 17 |
| Discusión..... | 28 |
| Referencias..... | 34 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Corrida electroforética de producto de PCR para <i>Bordetella</i> spp..... | 11 |
| Figura 2: Ficha epidemiológica..... | 15 |
| Figura 3: Distribución de muestras clínicas positivas y negativas..... | 20 |
| Figura 4: Distribución de la infección por departamentos provinciales..... | 21 |
| Figura 5: Casos positivos de infección en el período 2011-2012-2013..... | 26 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Frecuencia de pacientes según lugar de origen..... | 17 |
| Tabla 2. Frecuencia de los grupos etarios..... | 17 |
| Tabla 3. Frecuencia de <i>Bordetella</i> spp..... | 18 |
| Tabla 4. Frecuencia de <i>Bordetella pertussis</i> | 18 |
| Tabla 5. Relación entre la infección y género, lugar de origen y edad..... | 19 |
| Tabla 6. Relación entre <i>Bordetella pertussis</i> y género, lugar de origen y edad..... | 19 |
| Tabla 7. Frecuencia de signos y síntomas..... | 22 |
| Tabla 8. Relación entre la infección con <i>Bordetella</i> spp. y signos y síntomas..... | 22 |
| Tabla 9. Relación entre la infección con <i>Bordetella pertussis</i> y signos y síntomas..... | 23 |
| Tabla 10. Infección por virus con tropismo por el tracto respiratorio..... | 25 |
| Tabla 11. Incidencia en los años 2011-2012 y 2012-2013..... | 25 |
| Tabla 12. Distribución mensual en el período 2011-2013..... | 26 |

Índice de abreviaturas

| | |
|-----------------|---|
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| DTP | Vacuna triple bacteriana |
| DTP-Hib | Vacuna cuádruple |
| DTP-Hib-HB | Vacuna quintuple |
| FITC-labeled | Isotiocianato de fluoresceína conjugado-marcado |
| IF | inmunofluorescencia |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| IS | Secuencia de inserción |
| ml | mililitro/s |
| mM | miliMolar |
| Mounting Medium | Medio de montaje |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización Panamericana de La Salud |
| PCR | Polimerasa Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa) |
| PTp1 | primer |
| PTp2 | primer |
| SC | síndrome coqueluchoide |
| seg. | segundos |
| SIVILA | Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por Laboratorios de Argentina |
| spp. | del latín especie (especies del género) |
| Tdap | Vacuna triple bacteriana acelular |

| | |
|-----|------------------------------|
| TP | toxina pertussis o pertusina |
| ul | microlitro/s |
| uM | microMolar |
| VRS | Virus Respiratorio Sincial |

Resumen

Las enfermedades respiratorias, entre las que se encuentra coqueluche producida por *Bordetella pertussis* (Bp), son consideradas como la primera causa de mortalidad infantil en el mundo. Si bien la introducción de la vacuna produjo un marcado descenso en el número de casos en nuestro país, coqueluche continúa siendo un problema en Salud Pública, ya que han aumentado los casos entre adolescentes y adultos a pesar de décadas de coberturas vacunales adecuadas. Los individuos de estos grupos etarios son considerados el reservorio actual del agente, y a partir de ellos, la infección se transmitiría a los menores de un año, quienes son los individuos más susceptibles a la infección. Existe una enfermedad clínicamente similar a coqueluche, denominada Síndrome Coqueluchoide (SC) asociada a infecciones por Virus Respiratorio Sincicial (VRS), Adenovirus, Influenza A o B, Parainfluenza y Metapneumovirus, *Chlamydia* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*.

Debido a la importancia sanitaria actual de las infecciones producidas por *Bordetella* spp. como agente etiológico de infecciones respiratorias emergentes en Argentina y en el mundo, el objetivo de este estudio fue caracterizar el perfil clínico y epidemiológico de esta infección en Córdoba, evaluando además, en un porcentaje de la población estudiada, la prevalencia de infecciones respiratorias de etiología viral que pueden cursar con un cuadro clínico similar como es el SC. La totalidad de las muestras de secreciones respiratorias obtenidas por aspirado nasofaríngeo y/o hisopado nasofaríngeo entre el 1º de marzo de 2011 y el 28 de febrero de 2013 se derivaron al Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba para el diagnóstico molecular de coqueluche. Se estudió para Bp y *Bordetella* spp. 2.588 casos sospechosos de coqueluche de pacientes de la provincia de Córdoba y se realizó diagnóstico diferencial para infecciones respiratorias virales utilizando Inmunofluorescencia Directa. Se reportó infección por *Bordetella* spp. en 11,59% de los casos sospechosos estudiados (300/2.588) y en el 9,16% del total de muestras estudiadas (237/2.588) se confirmó infección por *Bordetella pertussis*. La información clínica y epidemiológica (edad, sexo, lugar de procedencia y vacunación) se obtuvo de las fichas clínico-epidemiológicas, que fueron remitidas al laboratorio junto con la muestra.

La infección por *Bordetella* spp. en la provincia de Córdoba presentó una tendencia estacional en los meses de primavera, verano y comienzos del otoño.

La infección por *Bordetella* spp. se concentró principalmente en el grupo de niños entre 13 y 24 meses, y si bien la ciudad de Córdoba presentó el mayor número de casos sospechosos y

confirmados, un importante número de los casos eran originarios de otras ciudades del interior provincial (11,57%) y también de otras provincias.

Se analizaron síntomas y signos como: tos (84,64%), tos paroxística (49,60%), síntoma catarral (69,21%), apnea (15,58%), cianosis (41,50%), vómitos (29,28%) y estridor (11,00%) y no se encontró asociación significativa entre esta infección y la presencia de tos y/o síntoma catarral. Se identificó como predictores independientes a la tos paroxística, la cianosis y los vómitos asociados a la infección por *Bordetella* spp. y a la tos paroxística y la cianosis asociados a la infección por *Bordetella pertussis*.

En el 31,29% de las muestras enviadas al Laboratorio Central con diagnóstico presuntivo de coqueluche (810/2.588) se realizó el diagnóstico para virus respiratorios (VRS, Adenovirus, Parainfluenza 1, 2 y 3; y Virus Influenza A y B). La coinfección entre *Bordetella* spp. y VRS fue del 1,7%, mientras que se diagnosticó Virus Parainfluenza 3 en 3 casos (15%). Estas coinfecciones no fueron asociadas en forma significativa, lo cual indicaría que sendos agentes infectarían en períodos de tiempo diferentes durante el año y que es poco frecuente en nuestro medio encontrar dichas coinfecciones en niños entre 1 y 24 meses de vida.

La epidemiología de coqueluche sigue siendo un misterio y su reemergencia un problema de Salud Pública y un gran desafío para las políticas sanitarias. Los pilares a tener en cuenta para combatir este problema se basan en estrategias de vacunación más inclusivas y sistemáticas que permitan no sólo eliminar al agente de los posibles contactos sino también la transmisión del microorganismo entre los individuos, especialmente adolescentes y adultos y aunar los esfuerzos para el diagnóstico clínico y de laboratorio de estos últimos.

Palabras clave: coqueluche, *Bordetella pertussis*, *Bordetella* spp., Síndrome Coqueluchoide.

Introducción

Las infecciones respiratorias bajas corresponden a una de las primeras causas de atención médica en todo el mundo, tanto en la consulta ambulatoria como en la internación. Una proporción importante de las consultas, hospitalizaciones y muertes por enfermedades del sistema respiratorio es de origen infeccioso y, entre ellas, se encuentra la infección por *Bordetella* spp. denominada coqueluche^{30,31}.

Coqueluche, también denominada tos ferina, pertussis y comúnmente en nuestro país, tos convulsa, es una enfermedad bacteriana aguda de las vías respiratorias. Es endemo-epidémica, tiene distribución universal y es inmunoprevenible^{29,30,51}. Afecta principalmente a niños menores de 5 años y con potencial gravedad, mayor riesgo de complicaciones y mortalidad, a menores de 6 meses^{19,30,31,42}.

Coqueluche es una enfermedad humana cosmopolita y no se conoce ningún animal o insecto que sea foco o vector. Los adolescentes y adultos son un reservorio importante del agente etiológico y son frecuentemente el foco de infección para los niños. La transmisión normalmente ocurre a través de las vías respiratorias, a través del contacto con las gotas respiratorias (aerosoles) y menos frecuentemente por contacto con objetos recientemente contaminados por un individuo infectado^{1,19,42}. La infección no tiene un modelo estacional particular y es altamente contagiosa^{1,19,42}. En este sentido, las tasas de ataques secundarios llegan al 80% entre los contactos domésticos susceptibles¹.

Clínicamente coqueluche evoluciona en dos fases. El período de incubación se extiende entre 7 y 10 días^{6,50}. La primera fase denominada “fase catarral” es la de mayor contagio y se presenta en los niños y en cerca del 6% de los adultos, con un cuadro típico de tos seca, especialmente nocturna. Luego, en 1 a 2 semanas, progresa a la segunda fase denominada “fase paroxística” caracterizada por tos constante y repetitiva: “tos quintosa”, concluyendo cada episodio con un estridor inspiratorio característico, seguido por vómitos. Si bien el paciente aparece comprometido durante las crisis, generalmente no tiene fiebre. En lactantes menores de 3 meses, son comunes las crisis de apnea, cianosis y/o convulsiones, en tanto que los adolescentes y adultos cursan sólo con tos seca persistente, no característica^{31,50}.

El agente etiológico de la coqueluche, *Bordetella pertussis*, aislado y descrito en 1906, pertenece al género *Bordetella* y éste a la familia *Alcaligenaceae*. Es un cocobacilo Gram negativo pequeño, aerobio estricto y de difícil aislamiento^{27,28,40}.

Las especies que infectan a los humanos son: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella holmesii*^{27,28,40}. Aunque *Bordetella pertussis* es el agente etiológico principal de la patología, *Bordetella parapertussis* también causa la enfermedad, pero con menor frecuencia y, generalmente, produce cuadros más leves⁴. En los últimos años se ha aislado *Bordetella hinzii* de muestras clínicas humanas^{7,8,40}.

La bacteria posee múltiples factores de virulencia responsables de la clínica de la enfermedad incluyendo toxina pertussis (TP), hemaglutinina filamentosa, fimbrias (aglutinógenos 2 y 3), adenilciclasa, pertactina y ciclotoxina traqueal. La toxina pertussis es excluyente para la especie pertussis. Estos productos son responsables de las características clínicas de la enfermedad y una respuesta inmune a los mismos produce inmunidad luego de la infección, aunque la inmunidad no sería permanente^{6,27}.

La bacteria se adhiere a los cilios de las células epiteliales respiratorias, produce toxinas que paralizan a los cilios y causan la inflamación del tracto respiratorio, lo que interfiere con la eliminación de las secreciones pulmonares. Los antígenos del agente infeccioso parecen permitir al organismo evadir las defensas del hospedador, de modo que la linfocitosis es estimulada y la quimiotaxis es reducida^{6,27}.

En el siglo XX coqueluche era una de las enfermedades más comunes de la infancia^{20,21}. Globalmente, ocurren entre 20 a 40 millones de casos anuales de coqueluche, de los cuales el 90% corresponde a los países en desarrollo y se registran 400.000 muertes anuales, principalmente en niños menores de 1 año⁵¹. En los últimos años, varios países con altos niveles de vacunación (Australia, Canadá, Italia, Japón, Países Bajos, Suiza y Estados Unidos) han comunicado un aumento en la incidencia de la enfermedad^{19,51}.

En Estados Unidos entre 1940 y 1945, se reportaron más de 1 millón de casos de coqueluche^{6,10}. Luego de la presentación de la vacuna con células enteras de coqueluche en la década del 40, la incidencia disminuyó gradualmente. Para 1970, la incidencia anual era menor a 5.000 casos por año, y durante 1980-1990, se reportaron un promedio de 2.900 casos por año⁶. La incidencia de la patología ha crecido gradualmente desde comienzos de 1980⁶. Durante 2001-2003, la incidencia anual más grande de coqueluche se encontraba entre los niños menores a 1 año (55,2 casos cada 100.000 habitantes) y particularmente entre niños menores a 6 meses (98,2 cada 100.000 habitantes). En 2002, el 24% de todos los casos reportados pertenecían a este grupo. Sin embargo, en años recientes, la proporción de casos aumentó en el grupo de adolescentes (11 a 18 años) y adultos jóvenes (19 años en adelante)^{6,10,11,12}.

Durante 2001-2003, la incidencia anual aumentó entre las personas entre 10 y 19 años de edad y en 2004 y 2005, aproximadamente el 60% de los casos reportados se observaron en personas de 11 años de edad en adelante^{22,59}. Actualmente, California enfrenta la mayor epidemia de tos ferina de los últimos setenta años⁶⁵.

En países de Latinoamérica se presenta una situación epidemiológica similar²⁰. En Chile, en 1995 la tasa de incidencia era de 2,5 por 100.000 habitantes alcanzando en 2000 a 23,4 por 100.000 habitantes⁹. Luego se observó una disminución progresiva en la última década. Sin embargo, en el año 2011 la tasa acumulada correspondió a 12,6 por 100.000 habitantes, cifra que triplica a la del año 2010^{9,16,17,26}. Brasil ha reportado 17.349 casos, con una tasa de incidencia que varía regionalmente, siendo en el norte de 10 por 100.000 habitantes. Han sido reportados brotes epidémicos en San Pablo y en el Estado de Río Grande del Sur. Panamá registra una tasa de incidencia muy alta de 233 por 100.000 en algunas regiones^{3,25,54}.

Argentina no es ajena a esta situación y viene registrando desde el año 2002 un aumento sostenido del número de casos. Varios brotes se han registrado en distintas localidades y provincias de nuestro país^{26,32-36}. La enfermedad se presenta con ciclos epidémicos cada 3 a 5 años. En el año 2011, se notificaron por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por Laboratorios de Argentina (SIVILA) 7.778 casos sospechosos, con un total de 1.653 casos positivos para *Bordetella pertussis* (1.498 confirmados por laboratorio y 155 casos probables por la clínica)^{20,24,46,47}.

En nuestro país se introdujo la vacuna en la década del '60 y a partir de allí se ha ido modificando el esquema de vacunación original y actualmente consiste de tres dosis primarias con vacuna pentavalente DTP-Hib-HB (Difteria, Tétanos, Pertussis, *Haemophilus influenzae* tipo b y Hepatitis B) a los 2, 4, 6 meses, dos refuerzos: uno a los 18 meses con vacuna cuádruple bacteriana DTP-Hib y el otro a los 6 años con vacuna triple bacteriana DTP y recientemente, un nuevo refuerzo a los 11 años con una vacuna triple bacteriana acelular Tdap^{31,32,33} como así también se recomienda vacunar a las embarazadas a partir de la 20ª semana de gestación, al equipo de salud en contacto con niños y a los convivientes de pacientes prematuros con peso inferior de 1.500 gramos²¹. Sin embargo, coqueluche continúa siendo un problema para la salud pública, a pesar de décadas de coberturas vacunales adecuadas²⁹. En los últimos 20 años, junto con un aumento del número de casos, se produjo una ampliación del grupo etario afectado, aumentando los casos entre los adolescentes y los adultos, quienes son considerados el reservorio actual del agente⁴⁰.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) fue responsable de 16 millones de casos y de aproximadamente 195.000 muertes infantiles en 2008 en el mundo. Si bien el uso de vacunas en los esquemas regulares de vacunación ha reducido la carga global de la enfermedad un 90% respecto de la etapa de prevacunación, ha habido una reemergencia de la enfermedad, con brotes en todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. La reemergencia de coqueluche y la aparición de casos en la adolescencia y en adultos jóvenes es compleja y parece ser el resultado de varios factores: las coberturas de vacunación no son siempre las adecuadas, la disminución en la eficacia de la vacuna luego de la tercera dosis, la pérdida de la inmunidad 5 a 8 años después del último refuerzo y el surgimiento de nuevas variantes de *Bordetella pertussis*^{38,47,50,59,62-65}.

El diagnóstico de coqueluche está basado en la clínica (menores de 6 meses: toda infección respiratoria aguda, con al menos uno de los siguientes síntomas: apnea, cianosis, estridor inspiratorio, vómitos después de toser o tos paroxística; mayores de 6 meses hasta 11 años: tos de 14 o más días de duración acompañado de uno o más de los siguientes síntomas: tos paroxística, estridor inspiratorio o vómitos después de la tos, sin otra causa aparente y mayores de 11 años: tos persistente de 14 o más días de duración sin otra sintomatología acompañante) así como también en una variedad de pruebas de laboratorio^{33,47,53,61}.

El diagnóstico de laboratorio puede realizarse mediante pruebas microbiológicas (cultivo), moleculares (reacción en cadena de la polimerasa: PCR) o serológicas (detección de anticuerpos totales anti-*Bordetella* spp.). Cada una de estas metodologías tiene distinta sensibilidad y especificidad, y la detección de la infección se ve también afectada por una variedad de factores, entre los que se pueden mencionar: período de la enfermedad en la cual se toma la muestra, edad del paciente, tratamiento antibiótico previo, estado de inmunidad del paciente, etc.

El cultivo es considerado la prueba “gold standard” para el diagnóstico de la infección por *Bordetella*. Sin embargo, los fastidiosos requisitos de crecimiento hacen a *Bordetella pertussis* difícil de cultivar. La efectividad del cultivo es variable (30%-50%) y puede ser afectada por las técnicas de recolección y las condiciones de transporte y conservación de las muestras clínicas. La probabilidad de éxito del aislamiento por la técnica de cultivo decrece, si las pruebas diagnósticas se realizan más tarde en la evolución de la enfermedad (más de 2 semanas después de la aparición de la tos) o en muestras clínicas de personas que recibieron antibióticos o fueron vacunados.

Los resultados pueden tardar hasta 2 semanas por lo cual su utilidad clínica es limitada^{41,57,61}.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utiliza en la actualidad en niños y adolescentes como una de las principales metodologías para el diagnóstico de *Bordetella* spp. debido a su alta sensibilidad y rapidez en la obtención del resultado. La OMS recomienda utilizarla en recién nacidos y en niños entre la primera y la onceava semana de la evolución clínica de la enfermedad. Se debe utilizar como complementaria y no como un reemplazo del cultivo. En este sentido, el uso de la PCR en el diagnóstico de coqueluche como técnica complementaria puede incrementar la sensibilidad del cultivo en casi un 40%. Debe tenerse en cuenta que el resultado de esta metodología depende entre otros factores del tiempo de evolución de la enfermedad, del estado de la vacunación, de la edad del paciente, y la conservación y transporte de la muestra clínica^{41,61} (Figura 1).

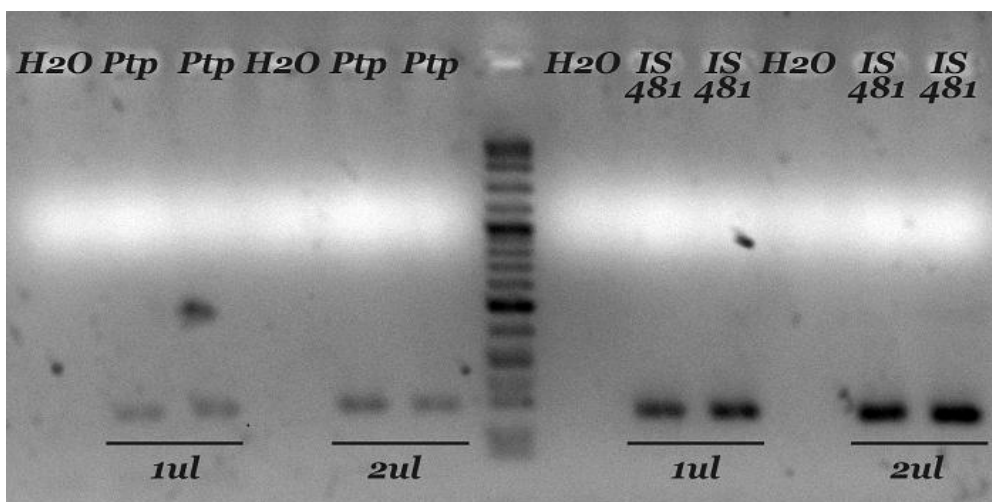


Figura 1. Corrida electroforética de producto de PCR para *Bordetella* spp. Control positivo para coqueluche (*Bordetella pertussis*). Fotografía Laboratorio Central. Ministerio de Salud. Provincia de Córdoba. 14 de abril de 2014.

Las pruebas serológicas pueden ser útiles para el diagnóstico en adolescentes y adultos que presentan una evolución avanzada de la enfermedad, cuando tanto el cultivo y la PCR probablemente resulten negativos. Las pruebas serológicas disponibles actualmente detectan los anticuerpos que pueden resultar tanto de la infección como de la vacunación, por lo que una respuesta serológica positiva simplemente indica que la persona ha sido expuesta a la bacteria ya sea por una infección reciente o por una vacunación reciente o remota. Ya que la vacunación puede inducir tantos anticuerpos IgM e IgA (además de anticuerpos IgG), el uso de estos ensayos serológicos tienen la limitación de no poder diferenciar la infección de la respuesta a la vacuna^{41,61}.

Existe una enfermedad clínicamente similar a la coqueluche, denominada Síndrome Coqueluchoide (SC), la que ha sido asociada principalmente a infecciones por Virus Respiratorio Sincicial (VRS) y Adenovirus^{2-5,10,45,51,56,57}. Otros virus, como Influenza A o B, Parainfluenza y Metapneumovirus, están también relacionados con este cuadro clínico, como así también las bacterias *Chlamydia* spp., *Mycoplasma pneumoniae* y *Bordetella bronchiseptica*^{13,23,58,66,67}. El SC tiene distribución mundial y se produce periódicamente en epidemias^{45,51,56,57}. Este término se ha empleado para denotar los signos y síntomas indistinguibles de la tos ferina, cuando no se puede demostrar la presencia de *Bordetella pertussis* o *Bordetella parapertussis*, al mismo tiempo que se sospecha una infección por otras causas^{10,13,23,56,57}.

Debido a la importancia sanitaria actual de la infección producida por *Bordetella* spp. como agente etiológico de infecciones respiratorias emergentes en Argentina y en el mundo, resulta de interés caracterizar el perfil clínico y epidemiológico de esta infección en la provincia de Córdoba, evaluando además, en un porcentaje de la población correspondiente al grupo etario más susceptible, la prevalencia de infecciones de etiología viral que pueden cursar con Síndrome Coqueluchoide (SC).

Objetivo general

- Caracterizar la infección por *Bordetella* spp. y coqueluche en la provincia de Córdoba.

Objetivos específicos

- Establecer la incidencia de infección por *Bordetella* spp. y *Bordetella pertussis* en casos sospechosos de coqueluche en la provincia de Córdoba, en el período comprendido entre marzo de 2011 y febrero de 2013.
- Caracterizar la presentación clínica de coqueluche asociada a la infección por *Bordetella* spp. y de Síndrome Coqueluchoide en la provincia de Córdoba.
- Establecer la distribución anual de la infección por *Bordetella pertussis* en la provincia de Córdoba.
- Caracterizar el perfil epidemiológico: género, lugar de origen y edad de la población de pacientes infectados.
- Establecer la prevalencia de infección por VRS, Adenovirus, Virus Influenza A, Virus influenza B, Virus Parainfluenza 1, 2 y 3 en aproximadamente el 30% de la población infantil con diagnóstico clínico presuntivo de coqueluche.

Materiales y Métodos

Muestras Clínicas.

Se estudió para *Bordetella* spp. y *Bordetella pertussis* la totalidad de las muestras de secreciones respiratorias (2.649), obtenidas por aspirado nasofaríngeo y/o hisopado nasofaríngeo que se derivaron al Laboratorio Central del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba para el diagnóstico molecular de coqueluche entre marzo de 2011 y febrero de 2013.

Al 31,29% de las muestras de aspirados y/o hisopados nasofaríngeos se les realizó, por decisión y solicitud médica, el diagnóstico diferencial para infecciones respiratorias virales. Se estudió en estas muestras la presencia de antígenos virales de: Virus Respiratorio Sincicial (VRS), Adenovirus, Influenza A, Influenza B y Parainfluenza 1, 2 y 3.

Diagnóstico Molecular de *Bordetella* spp. y *Bordetella pertussis*.

La extracción del ácido nucleico bacteriano se realizó a partir de 200 ul de muestra de aspirado nasofaríngeo utilizando el equipo QIAamp DNA Minikit Qiagen, siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante⁴⁴. El diagnóstico molecular de *Bordetella* spp. y *Bordetella pertussis* se realizó mediante la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de dos secuencias diferentes del genoma bacteriano: la región promotora del gen que codifica para la toxina pertussis (TP) y la secuencia repetida de inserción (IS) 481.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un volumen final de 20 ul de mezcla de reacción conteniendo: 1 uM de los “primers sense y antisense” (Primer PTp1: CCA ACG CGC ATG CGT GCA GAT TCG TC, Primer PTp2: CCC TCT GCG TTT TGA TGG TGC CTA TTT TA, Primer IS 481 F: GAT TCA ATA GGT TGT ATG CAT GGT T, Primer IS 481 R: TTC AGG CAC ACA AAC TTG ATG GGC G, 0,5 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 1 U taq polimerasa y cantidad suficiente de agua para un volumen final de 27 ul. Tres microlitros del DNA extraído de las muestras o 2 ul del control positivo se agregó al tubo de reacción. Luego de la desnaturalización inicial a 94°C durante 45 segundos, el DNA fue amplificado en sucesivos 25 ciclos de: 94°C 20 s, 60°C 30 s, 72°C 20 s. Posteriormente se realizó una extensión final de 45 s a 72°C. Los productos de la amplificación se visualizaron por corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% teñido con 1x de SYBR Safe DNA Gel Stain (10000x).

Detección por Inmunofluorescencia (IF) de antígenos virales.

Las muestras fueron tratadas previo a la reacción de IF de la siguiente manera: 0,2 a 0,4 ml de la muestra se trató con 1 ml de PBS para reducir la viscosidad, se homogenizó y se agitó usando

un “agitador tipo Vórtex” para separar las células de las secreciones. Se tomaron 500 ul del homogeneizado y se centrifugó a 2000–3000 rpm durante 3 a 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se repitió el lavado del sedimento celular hasta disgregar todo el material. Se descartó el sobrenadante dejando aproximadamente un volumen similar al ocupado por el pellet celular. Se resuspendieron las células y se utilizó el “agitador tipo Vórtex” para disgregarlas completamente.

Una alícuota del sedimento (10 ul) se observó en microscopio óptico a 40x para asegurar la calidad de la muestra. Los portaobjetos debían contener al menos entre 5 - 7 células por campo a 40x para que las muestras fueran consideradas aptas para la detección.

Se sembraron 10 ul de la suspensión en el pocillo del portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente o durante 5 minutos a 37°C. Se fijaron las células al pocillo cubriendo los portaobjetos con acetona fría (2 a 8°C) durante 20 minutos.

Para la detección de antígenos virales por IF (VRS, Adenovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1, 2 y 3) se utilizó el equipo comercial Respiratory Panel 1, Viral Screening & Identification, IFA Kit, Millipore Light Diagnostic, siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. Brevemente, se agregó 10 ul del anticuerpo monoclonal correspondiente a cada virus sobre el pocillo. Se incubó a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda. Se enjuagó el portaobjetos con PBS/Tween 20, 2 a 3 veces durante 5 minutos, agitando manualmente o con agitador magnético. Luego se secó a temperatura ambiente o durante 5 minutos a 37°C. Se agregaron 10 ul de FITC-labeled Anti-Mouse IgG Conjugate y se incubó el portaobjetos a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda, luego se enjuagó con PBS/Tween 20, dos a tres veces durante 5 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente.

La observación de la reacción de IF se realizó en microscopio de fluorescencia 40x utilizando los portaobjetos previamente montados en Mounting Medium acuoso pH 8,5²⁹.

Análisis Clínico y Epidemiológico.

La información de los signos y síntomas presentes en los pacientes como así también la información epidemiológica (datos de género, lugar de origen y edad) fue obtenida de las fichas clínico-epidemiológicas que son remitidas al Laboratorio Central acompañando a la muestra clínica (Figura 2).



FICHA DE INVESTIGACION DE CASOS DE COQUELUCHE (TOS CONVULSA) TC

Definición de Caso sospechoso:

Menores de 6 meses: toda infección respiratoria aguda, con al menos uno de los siguientes síntomas: Apnea, cianosis, estridor inspiratorio, vómitos después de toser o tos paroxística.

Mayores de 6 meses hasta 11 años: tos de 14 o más días de duración acompañado de uno o más de los siguientes síntomas: tos, paroxística, estridor inspiratorio o vómitos después de la tos, sin otra causa aparente.

Mayores de 11 años: tos persistente de 14 o más días de duración, sin otra sintomatología acompañante.

DATOS DE NOTIFICADOR

Establecimiento al que pertenece el Notificador:
 Localidad: Departamento: Provincia:
 Apellido y Nombre:
 Correo electrónico:
 Tel/Fax: Celular:

DATOS DEL PACIENTE

Apellido: Nombre: DNI:
 Fecha de nacimiento: Edad (años): En menores de 2 años (meses):
 Sexo: Domicilio:
 Localidad: Provincia:
 Teléfono:

DATOS CLINICOS

Centro de Salud donde se atiende:
 Servicio: Domicilio: Teléfono:
 Fecha de consulta: Fecha de inicio síntomas:
 Indicar si se trata de paciente: AMBULATORIO HOSPITALIZADO

Descripción Clínica:

| Signos/Síntomas | SI | NO |
|-----------------|----|----|
| Tos | | |
| Tos paroxística | | |
| Estridor | | |
| Apnea | | |

| Signos/Síntomas | SI | NO |
|---------------------|----|----|
| Cianosis | | |
| Vómitos | | |
| Síntomas catarrales | | |

Otros Síntomas:
 Hoy tiene tos? SI NO

Otras (ESPECIFICAR):

| Complicaciones | SI | NO |
|---------------------|----|----|
| Neumonía | | |
| Convulsiones | | |
| Encefalopatía aguda | | |

| Tratamiento | SI | NO | Fármacos usados | Duración |
|--------------|----|----|-----------------|----------|
| Antibióticos | | | | |
| Previo: | | | | |
| Actual: | | | | |

DATOS DE LABORATORIO

| Tipo de Muestra | | Fecha extracción 1º muestra | Fecha extracción 2º muestra | Hemograma | | |
|-----------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|---------------|------------|--|
| | | | | Glób. blancos | Linfocitos | |
| Aspirado nasofaríngeo | | | | | | |
| Hisopado nasofaríngeo | | | | | | |
| Suero | | | | | | |

Figura 2. Ficha epidemiológica para el envío de muestras clínicas para el estudio de infección por *Bordetella* spp.

Análisis estadístico.

Se trabajó con una base de 2.649 registros. Los datos fueron organizados en una base de datos y analizados utilizando el programa InfoStat, Software Estadístico, versión 2008¹⁴. Se realizaron descripciones generales de las variables tomadas. Además, mediante la prueba X₂ (Chi cuadrado) se realizaron test de independencia entre variables.

A los fines de estimar la predicción de signos y síntomas en función de la presencia de infección por *Bordetella* spp. e infección por *Bordetella pertussis* se realizaron análisis de regresiones logísticas múltiples con el método paso a paso, que incorpora sólo a los signos y síntomas significativos. Luego se confeccionaron tablas con los porcentajes de predicción de dichas variables¹⁴.

Resultados

Epidemiología de la población estudiada.

De los 2.649 pacientes derivados para diagnóstico de *Bordetella* spp. se analizaron las variables consignadas en las fichas clínico-epidemiológicas: género, lugar de origen y edad.

La población estudiada correspondió a 48,58% de pacientes masculinos y 51,42% de pacientes femeninos, siendo esta diferencia no significativa (Chi: 2,05; p= 0,1521).

Se presentaron significativamente más pacientes originarios de la ciudad de Córdoba que de otros departamentos provinciales u otras provincias (Chi: 1564,51; p<0,0001) (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de pacientes según lugar de origen.

| Lugar de origen | Total | Porcentaje |
|-----------------|-------------|------------|
| Córdoba Capital | 1635 | 61,72 |
| Otra Ciudad | 890 | 33,60 |
| Otra Provincia | 16 | 0,60 |
| Sin datos | 108 | 5 |
| Total | 2649 | 100 |

El grupo etario más representado fue el de pacientes entre 1 a 6 meses de vida (65,94%), seguido por los pacientes menores a un mes de vida (12,11%) (Chi: 7756,38; p<0,0001) (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de los grupos etarios en la población evaluada.

| Edad | Total | Porcentaje |
|-------------------|-------------|------------|
| <1 mes | 321 | 12,11 |
| 1 a 6 meses | 1747 | 65,94 |
| 7 a 12 meses | 255 | 9,62 |
| 13 a 24 meses | 107 | 4,03 |
| 25 meses a 5 años | 40 | 1,51 |
| 5 a 10 años | 22 | 0,83 |
| 11 a 15 años | 13 | 0,49 |
| adulto | 33 | 1,30 |
| Sin datos | 111 | 4,19 |
| Total | 2649 | 100 |

Infección por *Bordetella* spp. y *Bordetella pertussis*.

De los 2.649 pacientes derivados fue posible estudiar por PCR a 2.588, ya que las muestras de 61 de los pacientes derivados no eran aptas para su procesamiento. Trescientas muestras resultaron positivas para la secuencia repetida de inserción (IS) 481 y, de éstas, 237 fueron además positivas para la región promotora del gen que codifica para la toxina pertussis (TP). Así, la frecuencia de infección por *Bordetella* spp. fue de 11,59%, correspondiendo un 9,16% del total de muestras estudiadas a una infección confirmada por *Bordetella pertussis*. Esto significa que 63 casos (2,43%) fueron causados por otras especies del género *Bordetella* (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Frecuencia de *Bordetella* spp. en los pacientes evaluados.

| <i>Bordetella</i> spp. | Total | Porcentaje |
|------------------------|-------------|------------|
| Negativo | 2288 | 88,41 |
| Positivo | 300 | 11,59 |
| Total | 2588 | 100 |

Tabla 4. Frecuencia de *Bordetella pertussis* en los pacientes evaluados.

| <i>Bordetella pertussis</i> | Total | Porcentaje |
|-----------------------------|-------------|------------|
| Negativo | 2351 | 90,84 |
| Positivo | 237 | 9,16 |
| Total | 2588 | 100 |

Perfil epidemiológico de la población infectada.

Se correlacionaron las variables: género, lugar de origen y edad con los resultados obtenidos por PCR para la infección por *Bordetella* spp.

Se observó una relación significativa entre la incidencia de infección por *Bordetella* spp. y los pacientes que eran originarios de otras provincias (Chi: 23,83 $p < 0,0001$), así como también en aquellos pacientes con edades entre 13 y 24 meses de vida (Chi: 17,77 $p < 0,013$) (Tabla 5).

Tabla 5. Relación entre la infección por *Bordetella* spp. y género, lugar de origen y edad de los pacientes estudiados.

| | | Infección por <i>Bordetella</i> spp. | | Chi ² | p |
|------------------------|-------------------|--------------------------------------|----------------------|------------------|---------|
| | | n totales | % de Casos positivos | | |
| Género | Femenino | 1288 | 12,10 (n= 156) | 0,25 | 0,62 |
| | Masculino | 1212 | 11,50 (n=139) | | |
| Lugar de Origen | Córdoba Capital | 1635 | 9,66 (n=158) | 23,83 | <0,0001 |
| | Otra Ciudad | 890 | 14,50 (n=129) | | |
| | Otra Provincia | 16 | 37,50 (n=6) | | |
| Edad | <1 mes | 321 | 7,48 (n=24) | 17,77 | 0,013 |
| | 1 a 6 meses | 1747 | 12,10 (n=211) | | |
| | 7 a 12 meses | 255 | 11,40 (n=29) | | |
| | 13 a 24 meses | 107 | 20,60 (n=22) | | |
| | 25 meses a 5 años | 40 | 2,50 (n=1) | | |
| | 5 a 10 años | 22 | 13,60 (n=3) | | |
| | 11 a 15 años | 13 | 15,40 (n=2) | | |
| | adulto | 33 | 9,09 (n=3) | | |

En negrita se indican los porcentajes observados que difieren significativamente de los porcentajes de casos esperados.

Al analizar sólo las infecciones por *Bordetella pertussis* se encontró una asociación significativa con el lugar de origen pero no con la edad de los pacientes (Chi: 15,6 p0,0004) (Tabla 6). No se observó relación con el género de los pacientes.

Tabla 6. Relación entre la infección por *Bordetella pertussis* y género, lugar de origen y edad de los pacientes estudiados.

| | | Infección por <i>Bordetella pertussis</i> | | Chi ² | p |
|------------------------|-------------------|---|----------------------|------------------|--------|
| | | n totales | % de Casos positivos | | |
| Género | Femenino | 1288 | 9,63 (n=124) | 0,38 | 0,5372 |
| | Masculino | 1212 | 8,91(n=108) | | |
| Lugar de Origen | Córdoba Capital | 1635 | 7,65 (n=125) | 15,6 | 0,0004 |
| | Otra Ciudad | 890 | 11,57 (n=103) | | |
| | Otra Provincia | 16 | 25,00 (n=4) | | |
| Edad | <1 mes | 321 | 5,92 (n=199) | 10,84 | 0,1456 |
| | 1 a 6 meses | 1747 | 9,96 (n= 174) | | |
| | 7 a 12 meses | 255 | 9,41 (n=24) | | |
| | 13 a 24 meses | 107 | 11,2 (n=12) | | |
| | 25 meses a 5 años | 40 | 0 (n=0) | | |
| | 5 a 10 años | 22 | 9,09 (n=2) | | |
| | 11 a 15 años | 13 | 15,4 (n=2) | | |
| | adulto | 33 | 6,06 (n=2) | | |

En negrita se indican los porcentajes observados que difieren significativamente de los porcentajes de casos esperados.

De las 16 muestras correspondientes a pacientes originarios de otras provincias, 6 fueron positivas para *Bordetella* spp. De ellas, 2 correspondieron a la provincia de Santa Fe, 2 a Santiago del Estero, 1 a San Luis y 1 a La Rioja; y 4 de estas 6 fueron positivas para *Bordetella pertussis* (una muestra de cada provincia mencionada). Cuando se analizó el lugar de origen de los pacientes del interior de la provincia de Córdoba se observó que 24 de los 26 departamentos provinciales derivaron al Laboratorio Central 890 muestras clínicas con sospecha de coqueluche para su diagnóstico molecular. Los departamentos Río Cuarto, Colón, San Justo, Unión, Presidente Roque Sáenz Peña, Punilla, General San Martín y Río Primero derivaron el mayor número de muestras clínicas (Figura 3). Los departamentos Minas y Pocho no derivaron muestras al Laboratorio para su estudio.

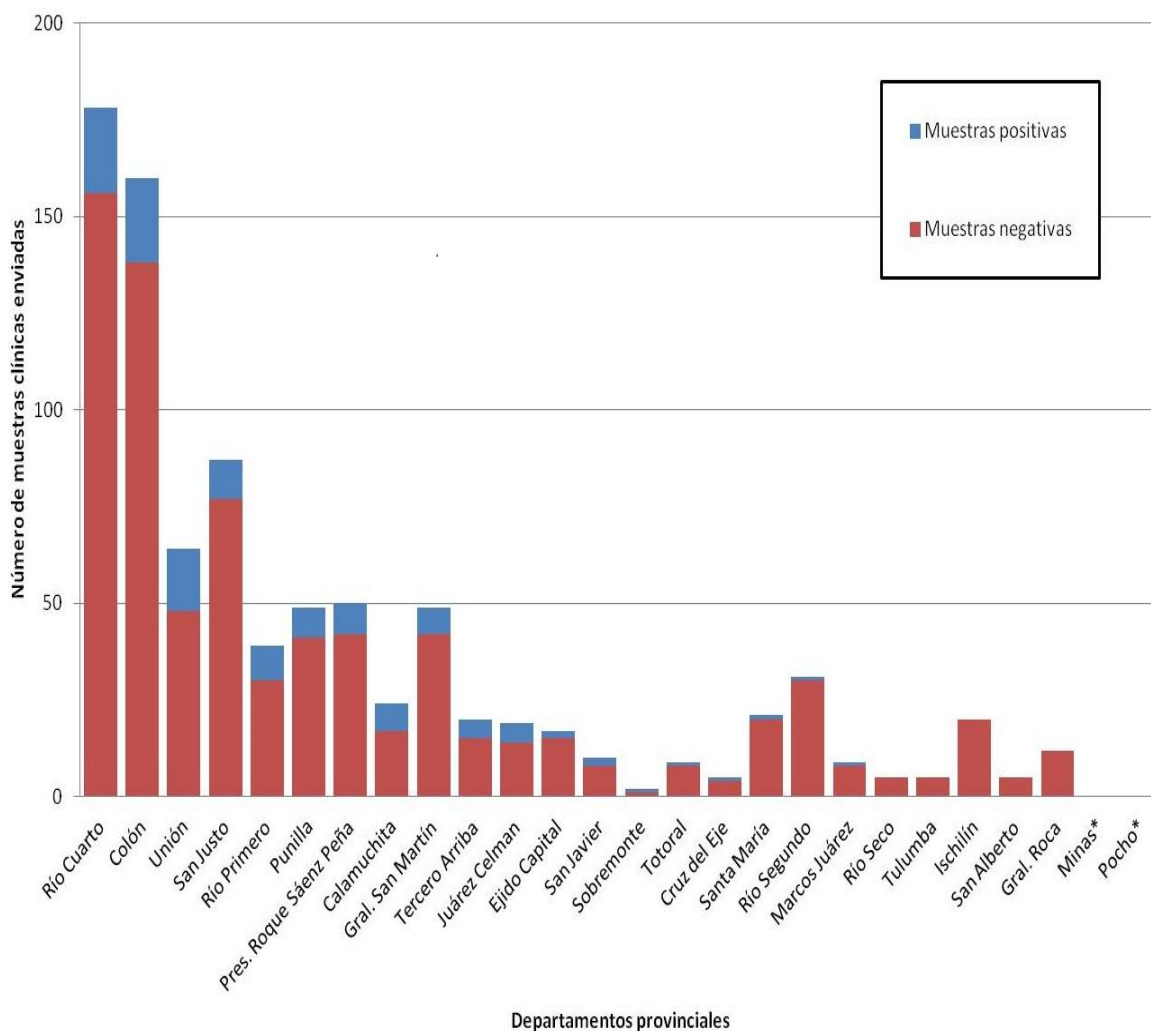


Figura 3. Distribución de muestras clínicas positivas y negativas para *Bordetella* spp. por departamentos provinciales.

De las 890 muestras derivadas del interior provincial 129 (14,49%) fueron positivas para *Bordetella* spp. De esas 129 muestras positivas para *Bordetella* spp., 103 fueron positivas para *Bordetella pertussis* (79,84%). Las muestras positivas procedían principalmente de los departamentos Río Cuarto, Colón, Unión, San Justo y Río Primero (Figura 4).

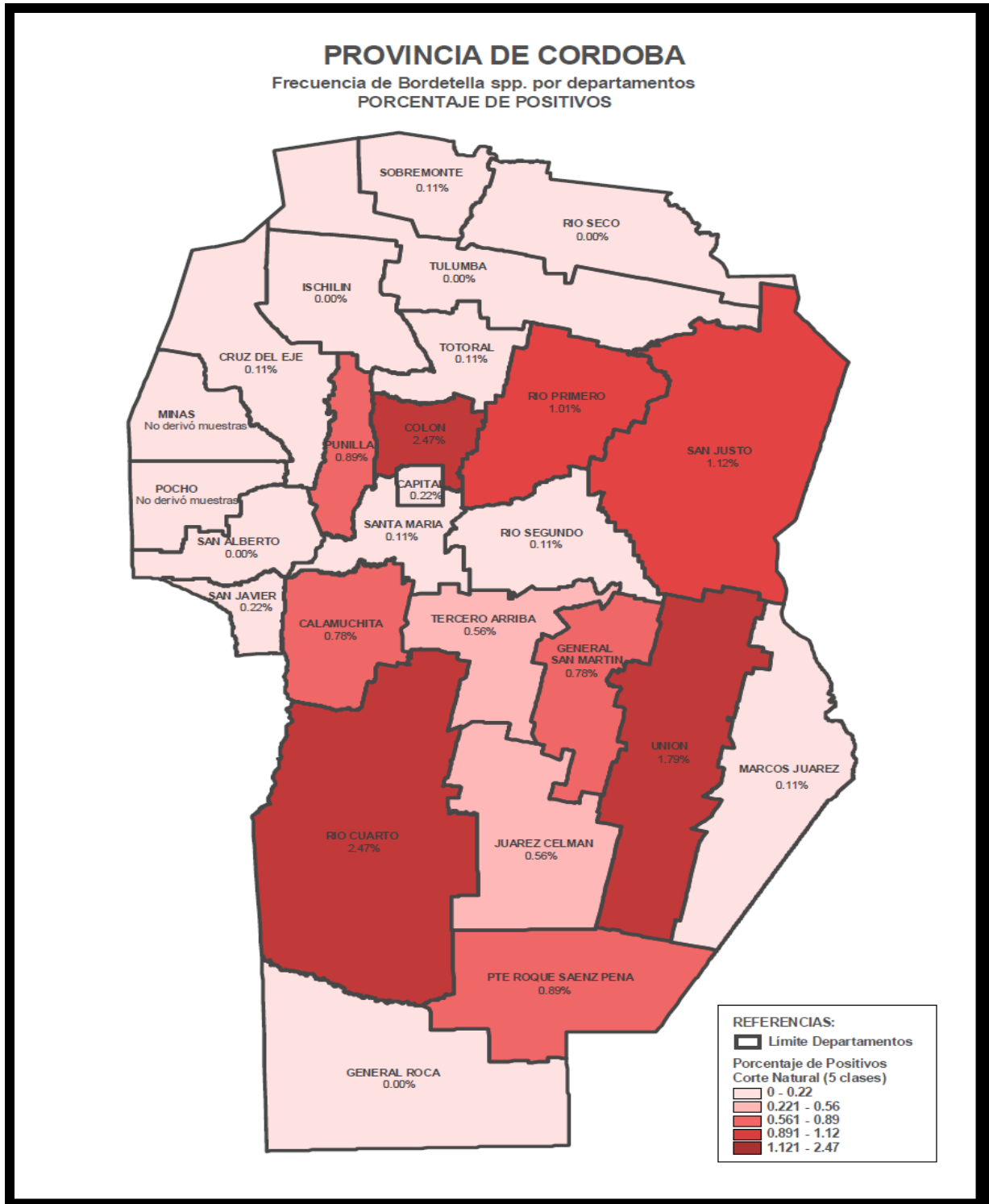


Figura 4. Distribución de la frecuencia de infección con *Bordetella* spp. por departamentos provinciales.

Perfil clínico de la población estudiada.

Se analizó la presencia de signos y síntomas en la población en estudio, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: tos (84,64%), tos paroxística (49,60%), síntoma catarral (69,21%), apnea (15,58%), cianosis (41,50%), vómitos (29,28%) y estridor (11%) (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de signos y síntomas en la población estudiada.

| Signo y/o Síntoma | Número de Pacientes | % |
|-------------------|---------------------|-------|
| Tos | 2216 | 84,64 |
| Tos paroxística | 1298 | 49,57 |
| Síntoma catarral | 1812 | 69,21 |
| Apnea | 408 | 15,58 |
| Cianosis | 1086 | 41,48 |
| Vómitos | 766 | 29,25 |
| Estridor | 288 | 11,00 |

Perfil clínico de la población infectada.

Se correlacionaron los signos y síntomas presentes en la población estudiada con la infección por *Bordetella* spp. y *Bordetella pertussis*.

Se observó una asociación significativa entre la infección por *Bordetella* spp. y *Bordetella pertussis* con tos paroxística, cianosis, vómito y estridor. La asociación con la tos y el síntoma catarral no resultó significativa. Se observó una relación significativa entre la infección por *Bordetella pertussis* y el síntoma apnea; sin embargo este síntoma no tuvo una relación significativa con la infección por *Bordetella* spp. (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Relación entre la infección con *Bordetella* spp. y signos y síntomas en los pacientes evaluados.

| Signo y/o Síntoma | | Infección por <i>Bordetella</i> spp. | | Chi ² | p |
|-------------------|----------|--------------------------------------|----------------------|------------------|--------|
| | | n totales | % de Casos positivos | | |
| TOS | Ausente | 397 | 13,3 (n=53) | 1,41 | 0,23 |
| | Presente | 2191 | 11,3 (n=247) | | |
| TOS PAROXÍSTICA | Ausente | 1302 | 7,76 (n=101) | 37,7 | <0,001 |
| | Presente | 1285 | 15,5 (n=199) | | |
| SÍNTOMA CATARRAL | Ausente | 795 | 14,3 (n=114) | 8,45 | 0,004 |
| | Presente | 1793 | 10,4 (n=186) | | |
| APNEA | Ausente | 2191 | 11,2 (n=245) | 2,34 | 0,13 |
| | Presente | 397 | 13,9 (n=55) | | |
| CIANOSIS | Ausente | 1513 | 7,9 (n=120) | 47,8 | <0,001 |
| | Presente | 1074 | 16,8 (n=180) | | |
| VOMITOS | Ausente | 1829 | 10,3 (n=188) | 10,7 | <0,001 |
| | Presente | 757 | 14,8 (n=112) | | |
| ESTRIDOR | Ausente | 2303 | 11,0 (n=253) | 7,5 | 0,006 |

| | | |
|----------|------------|--------------------|
| Presente | 285 | 16,5 (n=47) |
|----------|------------|--------------------|

En negrita se indican los porcentajes observados que difieren significativamente de los casos esperados.

Tabla 9. Relación entre la infección con *Bordetella pertussis* y signos y síntomas en los pacientes evaluados.

| Signo y/o Síntoma | | Infección por <i>Bordetella pertussis</i> | | Chi ² | p |
|-------------------|----------|---|----------------------|------------------|--------|
| | | n totales | % de Casos positivos | | |
| TOS | Ausente | 397 | 10,08 (n=40) | 0,47 | 0,49 |
| | Presente | 2191 | 8,99 (n=197) | | |
| TOS PAROXÍSTICA | Ausente | 1302 | 4,92 (n=64) | 56,8 | <0,001 |
| | Presente | 1285 | 13,46 (n=173) | | |
| SÍNTOMA CATARRAL | Ausente | 795 | 11,19 (n=89) | 5,73 | 0,017 |
| | Presente | 1793 | 8,20 (n=148) | | |
| APNEA | Ausente | 2191 | 8,67 (n=190) | 4,05 | 0,044 |
| | Presente | 397 | 11,84 (n=47) | | |
| CIANOSIS | Ausente | 1513 | 5,68 (n=86) | 53 | <0,001 |
| | Presente | 1074 | 14,06 (n=151) | | |
| VOMITOS | Ausente | 1829 | 7,98 (n=146) | 10,5 | 0,001 |
| | Presente | 757 | 12,02 (n=91) | | |
| ESTRIDOR | Ausente | 2303 | 8,70 (n=201) | 4,65 | 0,031 |
| | Presente | 285 | 12,63 (n=36) | | |

En negrita se indican los porcentajes observados que difieren significativamente de los porcentajes de casos esperados.

Se utilizó también un modelo de asociación multivariada para analizar los signos y los síntomas en relación con la infección por *Bordetella* spp. No se muestran estos resultados en tablas.

El modelo de regresión paso a paso incorporó a las variables: tos paroxística, cianosis, vómitos y síntoma catarral, en ese orden. Se observó que, por un lado, tanto la tos paroxística, la cianosis y los vómitos representan factores de riesgo (pendientes positivas) para la infección por *Bordetella* spp., mientras que por el otro, el síntoma catarral representa un factor de protección (con pendiente negativa). A su vez, sólo a los fines de establecer probabilidades condicionadas de los cuatro signos y síntomas y teniendo en cuenta que las cuatro variables poseen efectos significativos sobre la presencia de infección por *Bordetella* spp., se pudo observar que un paciente con ausencia de tos paroxística, de cianosis y de vómitos con presencia de síntoma catarral tiene una probabilidad de 0,0522 (5,22%) de estar infectado con *Bordetella* spp., mientras que un paciente con presencia de tos paroxística, cianosis y vómitos en ausencia de síntoma catarral posee una probabilidad de 0,3607 (36,07%) de estar infectado con *Bordetella* spp.

El mismo análisis se hizo para la infección con *Bordetella pertussis*, incorporándose las variables tos paroxística, cianosis y síntoma catarral, conociendo que estos signos y síntomas poseen efectos significativos sobre esta infección. Se pudo observar así que, la presencia de tos paroxística como de cianosis representan factores de riesgo para la infección por *Bordetella pertussis*, mientras que la presencia de síntoma catarral podría ser un factor de protección de la infección. Con el fin de establecer probabilidades condicionadas de los tres signos y síntomas se observó que un paciente con ausencia de tos paroxística y cianosis y presencia de síntoma catarral tiene una probabilidad de 0,0261 (2,61%) de estar infectado por *Bordetella pertussis*, mientras que un paciente con presencia de tos paroxística y cianosis en ausencia de síntoma catarral tiene una probabilidad de 0,2567 (25,67%) de estar infectado por el agente.

Infecciones virales en la población estudiada.

De las 2.588 muestras procesadas para diagnóstico de coqueluche, 810 muestras (31,29%) fueron estudiadas para Virus Respiratorio Sincicial (VRS), Adenovirus, Virus Influenza A, Virus Influenza B, Virus Parainfluenza 1, 2 y 3, resultando 43,58% (353/810) positivas para VRS, 0,49% (4/810) para Adenovirus, 0,49% (4/810) para virus Parainfluenza 1, 2,46% (20/810) para virus Parainfluenza 3, 0,12% (1/810) para Virus Influenza A y 0,12% (1/810) para Virus Influenza B. Ninguna muestra fue positiva para Virus Parainfluenza 2.

En el período 2011-2013 se presentó coinfección entre *Bordetella pertussis* y VRS en el 1,7% de los pacientes (6/353), sin embargo no se encontró asociación significativa entre ambas infecciones (Chi: 21,6 <0,0001). Si bien se encontró coinfección entre *Bordetella pertussis* y Virus Parainfluenza 3 en el 15% (3/20) de los pacientes en el año 2011, dicha asociación tampoco fue significativa. No se observó coinfección entre *Bordetella pertussis* y Virus Parainfluenza 3 en el año 2012 (Tabla 10).

Tabla 10. Infección por virus con tropismo por el tracto respiratorio en los pacientes con y sin infección por *Bordetella pertussis*.

| | | Infección por <i>Bordetella pertussis</i> | | Chi ² | p |
|------------------------|----------|---|----------------------|------------------|--------|
| | | n totales | % de Casos positivos | | |
| VRS | Ausente | 457 | 9,63 (n=44) | 21,6 | <0,001 |
| | Presente | 353 | 1,7 (n=6) | | |
| ADENOVIRUS | Ausente | 806 | 6,2 (n=50) | 0,26 | 0,61 |
| | Presente | 4 | 0 (n=0) | | |
| PARAINFLUENZA 1 | Ausente | 806 | 6,2 (n=50) | 0,26 | 0,61 |
| | Presente | 4 | 0 (n=0) | | |
| PARAINFLUENZA 2 | Ausente | 810 | 6,17 (n=50) | --- | --- |
| | Presente | 0 | --- | | |
| PARAINFLUENZA 3 | Ausente | 790 | 5,95 (n=47) | 2,76 | 0,10 |
| | Presente | 20 | 15 (n=3) | | |
| INFLUENZA A | Ausente | 809 | 6,2 (n=50) | 0,07 | 0,80 |
| | Presente | 1 | 0 (n=0) | | |
| INFLUENZA B | Ausente | 809 | 6,2 (n=50) | 0,07 | 0,80 |
| | Presente | 1 | 0 (n=0) | | |

En negrita se indican los porcentajes observados que difieren significativamente de los porcentajes de casos esperados.

Incidencia anual de infección por *Bordetella* spp. en el período 2011-2013.

Al compararse las incidencias de infección anual por *Bordetella* spp. se observó que la incidencia fue significativamente mayor en el período 2011-2012 que en el año período 2012-2013 (Tabla 11 y Figura 5).

Tabla 11. Incidencia de infección por *Bordetella* spp. en los años 2011-2012 y 2012-2013.

| | Infección por <i>Bordetella</i> spp. | | Chi ² | p |
|------------------|--------------------------------------|----------------------|------------------|---------|
| | n totales | % de Casos positivos | | |
| 2011-2012 | 1067 | 22,40 (n=239) | 206,91 | <0,0001 |
| 2012-2013 | 1521 | 4,01 (n=61) | | |

En negrita se indican los porcentajes observados que difieren significativamente de los porcentajes de casos esperados.

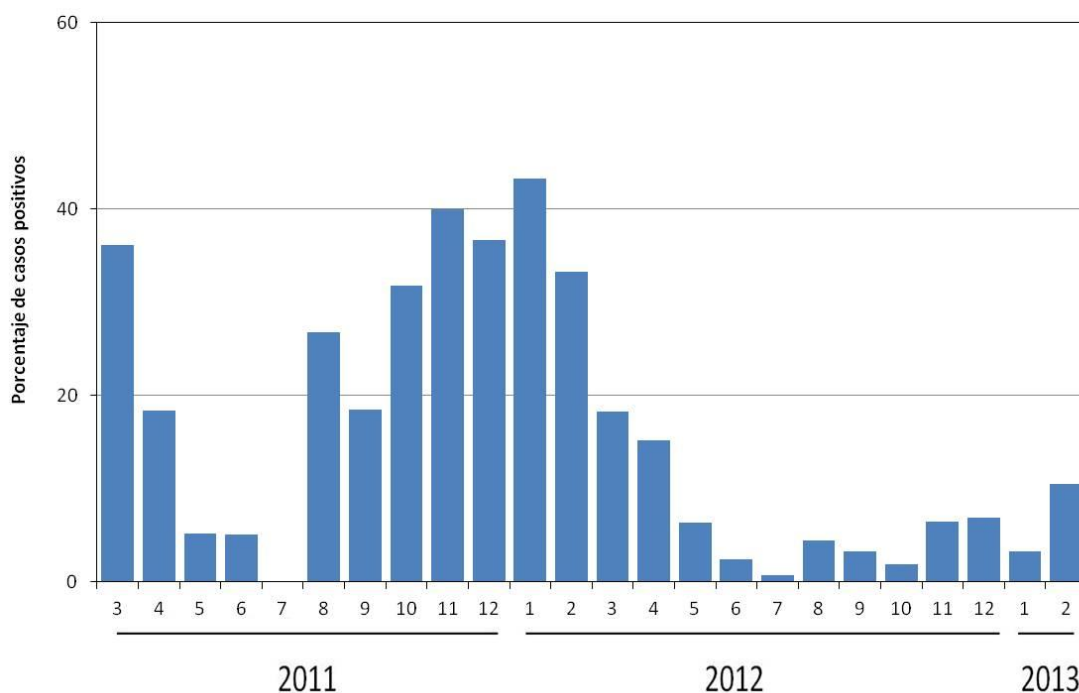


Figura 5. Porcentaje de casos positivos de infección por *Bordetella* spp. en el período 2011-2012-2013.

Distribución Mensual de la infección por *Bordetella* spp. en el período 2011-2013.

La distribución mensual de la infección por *Bordetella* spp. se muestra en la tabla 12.

Se destaca un significativo incremento de la incidencia en los meses de marzo de 2011 y desde agosto de 2011 a febrero de 2012.

Tabla 12. Distribución mensual de la infección por *Bordetella* spp. en el período 2011-2013.

| | Infección por <i>Bordetella</i> spp. | | Chi ² | p |
|-------------|--------------------------------------|----------------------|------------------|---------|
| | n totales | % de Casos positivos | | |
| | | | 419,98 | <0,0001 |
| 2011 | | | | |
| Marzo | 47 | 36,17 (n=17) | | |
| Abril | 49 | 18,37 (n=9) | | |
| Mayo | 134 | 5,22 (n=7) | | |
| Junio | 158 | 5,06 (n=8) | | |
| Julio | 23 | 0 (n=0) | | |
| Agosto | 179 | 26,82 (n=48) | | |
| Septiembre | 146 | 18,49 (n=27) | | |
| Octubre | 85 | 31,76 (n=27) | | |
| Noviembre | 95 | 40,00 (n=38) | | |
| Diciembre | 49 | 36,73 (n=18) | | |
| 2012 | | | | |
| Enero | 60 | 43,33 (n=26) | | |
| Febrero | 42 | 33,33 (n=14) | | |
| Marzo | 60 | 18,33 (n=11) | | |
| Abril | 46 | 15,22 (n=7) | | |
| Mayo | 126 | 6,35 (n=8) | | |
| Junio | 293 | 2,39 (n=7) | | |
| Julio | 414 | 0,72 (n=3) | | |
| Agosto | 201 | 4,48 (n=9) | | |

| | | |
|-------------------|-----|-------------|
| Septiembre | 123 | 3,25 (n=4) |
| Octubre | 103 | 1,94 (n=2) |
| Noviembre | 77 | 6,49 (n=5) |
| Diciembre | 29 | 6,90 (n=2) |
| 2013 | | |
| Enero | 30 | 3,33 (n=1) |
| Febrero | 19 | 10,53 (n=2) |

En negrita se indican los porcentajes observados que difieren significativamente de los porcentajes de casos esperados.

Discusión

Coqueluche es una enfermedad inmunoprevenible y, no obstante, es hoy uno de los principales problemas de Salud Pública a nivel mundial. Se estima que ocurren en el mundo 16 millones de casos y 195.000 muertes anuales por *Bordetella pertussis* y ningún país está exento de este flagelo^{19,20}.

Desde la implementación de las vacunas acelulares (Tdap) en varios países del mundo se produjeron dos cambios importantes y sin precedentes: la emergencia de la enfermedad en adolescentes vacunados a comienzos de siglo y más recientemente la emergencia de la enfermedad en niños en edad escolar, adolescentes y adultos¹⁰. La mayor incidencia, sin embargo, se observa en niños menores de 1 año. Argentina no es ajena a estos fenómenos^{10,11,19,20}. Desde 2008 a 2012 los casos sospechosos de coqueluche notificados en nuestro país fueron: 1.189 casos (2008), 2.469 casos (2009), 4.975 casos (2010), 7.748 casos (2011) y 11.146 casos (2012)³⁰⁻³⁶.

En Argentina, coqueluche es una enfermedad de notificación obligatoria (Ley 15.465) y es así que desde hace varios años se realiza, tanto a nivel nacional como provincial, la vigilancia de la enfermedad y el reporte de los casos de infección por *Bordetella* spp. y *Bordetella pertussis*. Esta actividad es coordinada por la Dirección de Epidemiología y los Laboratorios de Referencia a nivel nacional y provincial^{48,49}. De esta manera, todos los casos sospechosos de coqueluche son notificados al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud de Argentina (SNVS). El SNVS está conformado por dos módulos: clínico (C2) y de laboratorio (SIVILA), que recogen información de distintas fuentes: C2, la procedente de la consulta médica, a través de esta fuente se le da sensibilidad al sistema, y SIVILA, procede de los resultados de laboratorio, otorgándole especificidad al mismo. En la provincia de Córdoba, la vigilancia de coqueluche se realiza de manera coordinada entre la Dirección de Epidemiología y el Laboratorio de Referencia de la provincia, Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba, que es donde se realiza de manera centralizada el diagnóstico molecular de coqueluche, derivándose al mismo todas las muestras sospechosas de los centros de salud de Córdoba Capital e interior provincial.

Según estimaciones de la OMS, la región de las Américas fue responsable de aproximadamente 7% de los casos de coqueluche en el mundo a partir del año 2005. En Estados Unidos, han reportado brotes el estado de California (2010) y el estado de Washington (2012) y, en Sudamérica, Chile y Uruguay, también han informado aumento de casos de coqueluche en 2011^{9,54,55,60,62,63,64}.

En Argentina, se notificaron 10.935 casos sospechosos y se confirmaron por pruebas de laboratorio 1.498 (13,69%) durante el año 2011^{19,20,26}. En otros estudios realizados en nuestro país, se confirmó la detección de *Bordetella pertussis* en 38% de los casos sospechosos y en los países desarrollados, más del 50% de los casos se confirman como positivos^{19,20}.

El análisis, evaluación y comunicación de los datos que surgen del diagnóstico de coqueluche resulta de interés para aportar al conocimiento de la emergencia de estas infecciones en nuestro medio y al diseño de políticas de salud. En este estudio, se presentan los datos clínicos y epidemiológicos resultantes de la evaluación de 2.588 casos sospechosos de coqueluche de pacientes de la provincia de Córdoba entre el 1° de marzo de 2011 y el 28 de febrero de 2013.

En este trabajo se reporta la infección por *Bordetella* spp. en 11,59% de los casos sospechosos estudiados (300/2.588) y se confirmó infección por *Bordetella pertussis* en el 9,16% del total de muestras estudiadas (237/2.588).

Si bien, la mayoría de las infecciones por *Bordetella* spp. fueron producidas por *Bordetella pertussis*, hay un porcentaje de esas infecciones que estarían originadas por otras especies del género (2,43% del total de casos estudiados). A los fines de completar el conocimiento de la epidemiología de coqueluche en nuestro medio, sería interesante investigar si estos casos fueron producidos por *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella hinzii*, especies que se han relacionado con infecciones respiratorias en el ser humano^{5,56,57,58,66}.

La población estudiada estaba constituida por 48,58 % de pacientes masculinos y 51,42 % de pacientes femeninos. No hubo diferencias de género.

Del 95% de los casos sospechosos había registro de la edad: 65,94% eran niños entre 1 a 6 meses y 12,11% niños menores de 1 mes. Estos datos son coincidentes con las casuísticas presentadas por otros autores a nivel nacional e internacional en niños menores de 1 año (Estados Unidos: 72%, México: 85% Panamá: 86%, Chile: 51%, Argentina: 84% en 2011)^{16,17,18,47,53,54}.

Si bien, pese a que el grupo etario más numeroso entre los casos sospechosos correspondió a niños menores de 6 meses, la infección por *Bordetella* spp. se concentró principalmente en el grupo de niños entre 13 y 24 meses, encontrándose diferencias significativas con los otros grupos etarios. Este hallazgo podría deberse a un fenómeno dado principalmente por la vigilancia sostenida que se viene realizando en los últimos años en Argentina, la cual permite el mayor acceso al diagnóstico en casos que probablemente permanecían sin diagnóstico etiológico, y a la posibilidad de reinfección con el microorganismo, ya que ni la primoinfección ni

la vacuna dejan inmunidad de por vida^{10,11,18,24,25}. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que este grupo etario no haya recibido la cobertura de vacunación adecuada, ya que en un 50% no fue posible consignar el estado vacunal de estos niños, debido a que las fichas epidemiológicas estaban incompletas.

En el año 2011 todas las provincias tuvieron casos confirmados de coqueluche a excepción de la provincia de La Rioja⁴⁹. La distribución de la enfermedad en las provincias argentinas fue asimétrica, registrándose mayores tasas de incidencia en las provincias de Neuquén, Chaco, Santa Fe y Buenos Aires, alguna de las cuales emitieron alertas de brote^{26,47}. Entre los años 2005 y 2008 en la provincia de Córdoba se registraron 1.471 casos sospechosos de coqueluche de los cuales 477 (32,42%) provenían de otros departamentos provinciales¹⁵.

Si bien, en este estudio, la ciudad de Córdoba presentó el mayor número de casos sospechosos y confirmados, es destacable que un importante número de los casos eran originarios de otras ciudades del interior provincial (11,57%) y también de otras provincias. Las muestras positivas procedían principalmente de los departamentos Río Cuarto, Colón, Unión, San Justo y Río Primero (Figuras 3 y 4).

En este estudio se observó un mayor número de muestras derivadas del interior provincial en el período estudiado de 2 años (2011-2012) comparado al período 2005-2008¹⁵, esto muestra claramente que ha mejorado el reporte de casos, gracias a la vigilancia epidemiológica realizada en la provincia.

Las tasas de infección por *Bordetella* spp. a nivel nacional pueden obtenerse de los reportes de SIVILA. En este sentido, se registraron 1.498 casos positivos durante el año 2011 y 1.135 durante el año 2012 en todo el territorio nacional^{20,24,46,47,48,49}. La tasa de incidencia fue de 7 por 100.000 habitantes en nuestro país para el año 2011^{48,49,63}. Los resultados de este trabajo muestran tendencias coincidentes para Córdoba con el resto del país. Así, basados en estos resultados, se pudo demostrar que la tasa de incidencia para los casos de coqueluche en Córdoba en el 2011 fue de 7,22 por 100.000 habitantes y para el 2012 de 1,84 por 100.000 habitantes (población de la provincia de Córdoba en el censo 2010:3.308.876 habitantes).

A partir del año 2003 Argentina registró un aumento de las tasas de incidencia y la ocurrencia de brotes de la enfermedad⁴⁸. En nuestra región esa tendencia se observó a partir del año 2005 y continuó hasta el año 2007 coincidente con lo ocurrido en el país^{48,49}. Es de destacar el aumento de casos ocurrido en el año 2007 y la disminución de los mismos durante el período 2009-2010^{48,49}.

La frecuencia de casos disminuyó en esta casuística de 22,40% casos de infección por *Bordetella* spp. en el año 2011 a 4,01% en el año 2012 (Tabla 11). Esto último, concuerda con lo que ocurrió en nuestro país como consecuencia de los períodos inter-epidémicos esperados para coqueluche cada 3-5 años, y probablemente a esto se sumó la disminución de casos como consecuencia de la implementación del refuerzo de vacuna, que a partir del año 2011 se implementó a niños mayores de 11 años^{31-36,42,43}.

En este trabajo se analizaron los signos y síntomas de la población estudiada en forma univariada y multivariada. La distribución de los signos y síntomas de los casos sospechosos fue: tos (84,64%), tos paroxística (49,60%), síntoma catarral (69,21%), apnea (15,58%), cianosis (41,50%), vómitos (29,28%) y estridor (11%). Del análisis de los signos y síntomas de los pacientes en forma univariada pudimos observar que la mayoría de los pacientes con infección por *Bordetella* spp. presentaron tos paroxística, cianosis, vómitos y/o estridor, sin embargo, no hubo asociación significativa entre esta infección y la presencia de tos y/o síntoma catarral.

En tal sentido, estos resultados indican que tanto la presencia de la tos como la del síntoma catarral podrían no ser datos clínicos de relevancia para definir un caso como sospechoso de infección por *Bordetella* spp., cuando los mismos no se asocian a otro síntoma como tos paroxística, vómitos, cianosis y/o estridor. El escaso valor predictivo de estos dos últimos síntomas para coqueluche en estos pacientes podría deberse a que un alto porcentaje de los individuos estudiados con Síndrome Coqueluchoide (SC) pero sin infección por *Bordetella* spp., presentó también estos síntomas.

Es importante destacar que la presencia de síntoma catarral en la población estudiada podría tener un valor predictivo negativo para infección por *Bordetella* spp., es decir que frente a la presencia única de este síntoma es poco probable una infección por *Bordetella* spp. El mismo análisis corresponde hacer para la infección con *Bordetella pertussis* en este grupo de pacientes.

En estudios similares, la variable tos no mostró asociación con los casos confirmados de *Bordetella pertussis*^{19,20,25,26,37,38,39}. Este hallazgo podría explicarse por la corta edad de los pacientes (menores de 6 meses) y la dificultad para detectar clínicamente este síntoma⁶. Sin embargo, hay resultados discrepantes con respecto a este síntoma ya que en otros trabajos publicados en pacientes de Argentina y de otros países, la presencia de tos durante 4 semanas asociada a los otros síntomas característicos, tuvo un valor predictivo importante en los casos confirmados de coqueluche^{23,37,38}.

El análisis de nuestros casos identificó como predictores independientes a la tos paroxística, la cianosis y los vómitos asociados a la infección por *Bordetella* spp. y a la tos paroxística y la cianosis asociados a la infección por *Bordetella pertussis*. En trabajos similares, la tos paroxística fue el signo más registrado seguido de crisis de cianosis y/o cianosis posteriores a los accesos de tos, presentándose vómitos con menor frecuencia^{19,20,25,26,47}.

Se conoce que la infección por *Bordetella* spp. puede aumentar en verano y otoño y es altamente contagiosa^{1,19,26,42}. Los resultados de este estudio muestran que la infección por *Bordetella* spp. en la provincia de Córdoba presentó, en el período estudiado, un modelo estacional. Así, la mayor incidencia de casos sospechosos y confirmados de coqueluche se presentaron en el mes de marzo de 2011 y luego entre agosto de 2011 y febrero de 2012, lo que marca una tendencia estacional en los meses de primavera, verano y comienzos del otoño, al contrario de lo que ocurre en otros estudios donde se considera que los casos de coqueluche se registran durante todo el año^{1,19,42}. Probablemente esto coincida con la época de alta circulación viral y la dificultad de diferenciar la enfermedad coqueluche de otros cuadros respiratorios invernales, aunque en nuestra casuística no hubo casos confirmados de coqueluche durante el mes de julio. En un análisis realizado en un hospital de niños de Buenos Aires, desde diciembre del año 2003 a diciembre del año 2011, la curva epidémica demostró la presencia de casos durante todo el año pero se detectaron picos de coqueluche en el mes de diciembre de todos los años estudiados²⁰.

La coinfección de *Bordetella pertussis* con otros agentes respiratorios ya fue descrita en varios estudios^{5,23,39,45,57,58,67}. Se describió que la toxina pertussis (TP) puede suprimir la respuesta inmune innata y sensibilizar al hospedero a una infección por un patógeno respiratorio secundario^{3,37}. Aunque la forma clásica de la infección por *Bordetella pertussis* presente tos en accesos (tos quintosa con “estridor” o ruido inspiratorio), vómitos, cianosis y, eventualmente, apnea, muchas veces puede manifestarse como una infección respiratoria aguda indistinguible de la ocasionada por infecciones virales. Entre estos últimos, el VRS es el de mayor prevalencia y el más relacionado a cuadros de apnea en los niños menores de 6 meses. Durante los meses fríos con alta prevalencia de infecciones por VRS, sería muy difícil establecer, simplemente por la clínica, si se trata de coqueluche o de síndrome coqueluchoide^{3,37,45}.

En este estudio, además de la infección por *Bordetella* spp. y la infección por *Bordetella pertussis*, se realizó el diagnóstico para virus respiratorios al 31,29% de las muestras enviadas al Laboratorio Central con diagnóstico presuntivo de coqueluche (810/2.588) por solicitud médica.

Se estudiaron en estos pacientes la posible infección por VRS, Adenovirus, Parainfluenza 1, 2 y 3; y Virus Influenza A y B. La coinfección entre *Bordetella* spp. y VRS fue del 1,7%, mientras que se diagnosticó Virus Parainfluenza 3 en 3 casos (15%). Estas coinfecciones no fueron asociadas en forma significativa, lo cual indicaría que sendos agentes infectarían en períodos de tiempo diferentes durante el año y que es poco frecuente en nuestro medio encontrar dichas coinfecciones en niños entre 1 y 24 meses de vida. Este porcentaje de asociación mixta entre infección por *Bordetella pertussis* y virus respiratorios es bajo respecto a los porcentajes presentados en otros estudios^{3,37,45}.

La epidemiología de coqueluche sigue siendo un misterio y su reemergencia un problema de salud pública y un gran desafío para las políticas sanitarias. En este sentido, podríamos decir que el paso importante a dar para disminuir la morbilidad y la mortalidad de esta enfermedad en niños entre 1 y 24 meses de vida sería identificar las fuentes y reservorios de *Bordetella pertussis*, aún cuando se haya aumentado la vigilancia epidemiológica y las técnicas diagnósticas sean cada vez más sensibles y específicas. Los pilares a tener en cuenta para combatir este problema se basan en estrategias de vacunación más inclusivas y sistemáticas que permitan no sólo eliminar al agente de los posibles contactos sino también la transmisión del microorganismo entre los individuos, especialmente adolescentes y adultos y aunar los esfuerzos para el diagnóstico clínico y de laboratorio de estos últimos. Además, se está trabajando a nivel mundial para caracterizar las variantes de la bacteria que están circulando en los diferentes países, con el objetivo de incluir en una nueva formulación vacunal antígenos suficientes que generen una respuesta protectora duradera, y obtener así, una vacuna efectiva para ser aplicada universalmente.

En este trabajo se ha mostrado el perfil de comportamiento clínico y epidemiológico de la infección por *Bordetella* spp. y coqueluche en nuestra provincia. Si bien, las bases de datos de los sistemas de vigilancia provincial y nacional exhiben estos datos, entendemos que este trabajo aporta conocimientos que ayudan a entender cómo y dónde se debe intervenir para lograr un diagnóstico clínico presuntivo y diferencial seguro y certero, aumentar la vigilancia epidemiológica y utilizar las técnicas de diagnóstico adecuadas para asegurar la disminución de la morbilidad y la mortalidad de la infección en nuestro medio. También creemos que este estudio hace un análisis detallado de los aspectos epidemiológicos en nuestra región, especialmente haciendo referencia a la distribución departamental de la infección, lo que aporta una mirada aún más profunda de coqueluche e invita a reflexionar sobre las políticas sanitarias a implementar en los próximos años.

Referencias

1. American Academy of Pediatrics. Pertussis. In: Pickering L, Baker CJ, Kimberlin D, Long SS, eds Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 28th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2009:504–519.
2. Ayala VI, Teijaro JR, Farber DL *et al.* *Bordetella pertussis* infection exacerbates influenza virus infection through pertussis toxin-mediated suppression of innate immunity. PLoS One 2011; 6:e190161.
3. Bellettini C, Welter de Oliveira A, Tusset C, *et al.* Preditores clínicos, laboratoriais e radiográficos para infecção por *Bordetella pertussis*. Rev Paul Pediatr. 2014; 32(4): 292-298.
4. Bergfors E, Trollfors B, Taranger J, *et al.* Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. Int J Infect Dis 1999; 3: 140-146.
5. Bottero D, Griffith C, Lara D, *et al.* *Bordetella holmesii* in children suspected of pertussis in Argentina. Epidemiol Infect 2012; 141: 714-717.
6. CDC. Pertussis. Chapter 6. Centers for Disease Control and Prevention. Control and Prevention Guidelines for the control of Pertussis outbreak. 2009.
7. Cherry H. Pertussis and other Bordetella infections, p. 1588–1608. In: 2004 Feigin JDC, Demmler GJ and Kaplan S (ed.), Textbook of pediatric infectious diseases, 5th ed., Philadelphia.
8. Cherry J. D. The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. Pediatrics 2005; 115:1422-1427.
9. Chile. Ministerio de Salud. Departamento de Epidemiología. Informe de coqueluche año 2011. Santiago de Chile, 2011. Disponible en: http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Coqueluche/Tos_Final_2011.pdf. [Acceso: noviembre de 2015].
10. Clark TA. Changing Pertussis Epidemiology: Everything Old is New Again. The Journal of Infectious Diseases 2014; 209:978–981.
11. Cofré G. Coqueluche en adultos y adolescentes. Rev Chilena Infect 2003; 20 (Supl 1): S52-S58.
12. Comité Nacional de Infectología. Coqueluche, Tos convulsa o Pertussis. 2008. Disponible en:<http://www.sap.org.ar/staticfiles/organizacion/comitesnacionales/infecto/coqueluche.pdf>. (Acceso: noviembre de 2015)
13. Cosnes-Lambe C, Raymond J, Chalumeau M, *et al.* Pertussis and respiratory syncytial virus infections. Eur J Pediatr 2008; 167: 1017-1019.
14. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, *et al.* InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
15. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba. Distribución geográfica por departamentos de los casos confirmados y compatibles de coqueluche. Provincia de Córdoba. Años 2005 a 2008.
16. Donoso A y F Díaz. Coqueluche grave: puesta al día. Neumonología Pediátrica. Disponible en: <http://www.neumologia-pediatica.cl> (Acceso: noviembre de 2015)
17. Donoso A, Arriagada D, Cruces P, *et al.* Coqueluche grave: estado del arte. Rev Chilena Infectol 2012; 29 (3): 290-306.

18. Fidela Pérez-Pérez G, Rojas-Mendoza T, *et al.* Panorama epidemiológico de la tos ferina: 19 años de estudio epidemiológico en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015; 53(2):164-170.
19. Gentile A. Infección por *Bordetella pertussis*. *Arch Argent Pediatr* 2010; 108 (1):78-81.
20. Gentile A, Romanin V, Juárez MV, *et al.* Epidemiología de *Bordetella pertussis* en un hospital pediátrico. *Arch Argent Pediatr* 2014; 112(1):26-32.
21. Grupo Técnico Asesor sobre enfermedades prevenibles por vacunación. Informe final de la XVIII Reunión del Grupo Técnico Asesor (GTA) sobre Enfermedades Prevenibles por Vacunación de la Organización Panamericana de la Salud, julio de 2011. Buenos Aires, Argentina. 2011.
22. He Q, and J Mertsola. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* 2008; 3:329-339.
23. Heininger U, Cosnes-Lambe C, Raymond J, *et al.* Pertussis and respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 1017-1019.
24. Hewlett E and K Edwards. Clinical Practice. Pertussis-Not Just for Kids. *N Engl J Med* 2005; 352:1215-1222.
25. Hozbor D, Mooi F, Flores D, *et al.* 2009. Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect* 59:225-231.
26. Kuszniarz G, Schmeling F, Cocigliop R, *et al.* Características Clínicas y epidemiológicas de niños con enfermedad por *Bordetella pertussis* en Santa Fe, Argentina. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31 (4) 385-392.
27. Madan Babu M, Bhargavi J, Singh Saund R, *et al.* Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Current Science* 2001; 80 (12): 1512-1522.
28. Mejía Salas H. Actualización: Coqueluche en niños. *Rev Soc Bol Ped* 2013; 52 (1): 24 – 26.
29. Millipore Light Diagnostics. Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit. An Indirect Immunofluorescence Assay for the Qualitative Identification of Adenovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza Type 1, Parainfluenza Type 2, Parainfluenza Type 3, and Respiratory Syncytial Virus. Cat. N° 3105. 20017, Millipore (UK) Ltd.
30. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Parte de Prensa. Actualización situación de enfermedades respiratorias 2011 Semana Epidemiológica 28 (del 11 al 15 de julio). 2011.
31. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Recomendaciones para la vigilancia, prevención y atención de las Infecciones Respiratorias Agudas en Argentina. Actualización Marzo de 2014. Disponible en: www.msal.gov.ar. (Acceso: noviembre de 2015)
32. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Vacunas. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar> (Acceso: noviembre de 2015)
33. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. 2013. Boletines Epidemiológicos. Disponible en: http://www.msaludsgo.gov.ar/web2/files//epidemiologia//2013/boletines/BOLET%3%8DN_EPIDEMIOL%3%93GICO_2013%20N%C2%BA6.pdf (Acceso: noviembre de 2015)
34. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles. Alerta epidemiológico 25/1/2012. Tos convulsa: Aumento de casos y muertes. 2012. Disponible en http://www.msal.gov.ar/images/stories/alertas_epidemiologia/2012/alerta-1-tos-convulsa-2012.pdf (Acceso: noviembre de 2015)

35. Ministerio de Salud de la Nación. Vigilancia de Coqueluche. Boletín Integrado de Vigilancia. 2012; SE 16 (116):15 - 7. Disponible en http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/BoletinIntegradoDeVigilanciaVersion_N116-SE16.pdf (Acceso: noviembre de 2015)
36. Ministerio de Salud de la Nación. Situación coqueluche: Aumento de casos y muertes. Boletín integrado de vigilancia. 2012; SE 4 (106):7-20. Disponible en http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/BoletinIntegradoDeVigilanciaVersion_N106-SE04.pdf (Acceso: noviembre de 2015)
37. Moreno L, Montanaro P, Bujedo E, *et al.* Predictores de coqueluche al ingreso en lactantes hospitalizados con infección respiratoria aguda baja. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas* 2013; 70(2): 63-69.
38. Muñoz FM. Pertussis in infant, children, and adolescents: diagnosis, treatment, and prevention. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006; 17: 14-19.
39. Nuolivirta K, Koponen P, He Q, *et al.* *Bordetella pertussis* infection is common in nonvaccinated infants admitted for bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29:1013-1015.
40. Parton R. Review of the Biology of *Bordetella pertussis*. *Biologicals* 1999; 27, 71–76. Article No. biol. 1999.0182.
41. Pianciola L, Mazzeo M, Hozbor D, *et al.* Optimización del procesamiento y la conservación de muestras clínicas destinadas al diagnóstico molecular de coqueluche. *Revista Argentina de Microbiología* 2010; 42: 108-113.
42. Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles. Tos convulsa. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud de la Nación. Enero de 2012. Disponible en: <https://www.dropbox.com/s/sq859tknsuwwkr8/alerta-tos-convulsa25ene2012.pdf> (Acceso: noviembre de 2015)
43. Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles. Fundamentos de la Vacunación de Mujeres Embarazadas con Vacuna Triple Bacteriana Acelular (Dtpa) Argentina 2012. 2012, p. 1-23. Disponible en http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/inmunizaciones/lineamientos_vacuna_dTpa_%20en_embarazadas.pdf (Acceso: noviembre de 2015)
44. Qiagen. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2012. For updated license terms, see www.qiagen.com. 1999–2012 QIAGEN. (Acceso: noviembre de 2015)
45. Quian, J, Cerisola A, Fernández A, *et al.* Infecciones respiratorias bajas mixtas por *Bordetella pertussis* y virus: análisis de dos casos clínicos. *Arch pediatr Urug* 2007; 74 (4): 278-281.
46. Riva Posse C e I Miceli. Evolución de la coqueluche en la Argentina a finales del siglo XX. *Medicina (Buenos Aires)* 2005; 65: 7-16.
47. Romanin V, Agostinho V, Califano G, *et al.* Situación epidemiológica de coqueluche y estrategias para su control. Argentina, 2002-2011. *Arch Argent Pediatr* 2014; 112(5):413-420.
48. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Boletines de Vigilancia Epidemiológica Dirección Nacional de Epidemiología. Ministerio de Salud y Acción Social. Años 2003-2006.
49. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Boletines de Vigilancia Epidemiológica Dirección Nacional de Epidemiología. Ministerio de Salud y Acción Social. Año 2012.
50. Sturmberg JP, Watt P. Could it be whooping cough? *Aust Fam Physician* 1999; 28: 129-131.

51. Tonetto I, Marcó del Pont J. Situación Actual de Coqueluche. Noticias infectológicas 2008; 1 (2): 1-2.
52. Trousseau A. Clinique Médicale de l'Hotel Dieu de Paris. Deuxième éd. J-B. Baillière et fils, Libraires de l'Academie Impériale de Médecine, Paris 1865; II: 413-433.
53. Ulloa-Gutiérrez R, Hozbor D, Avila-Agüero M, *et al.* The global pertussis initiative meeting report from the Regional Latin American Meeting. Costa Rica, 5-6 december, 2008. Human Vaccines 2010; 6 (11): 876-880.
54. Ulloa-Gutiérrez R and M Avila-Agüero. Pertussis in Latin America: current situation and future vaccination challenges. Export Review Vaccines 2008; 7 (10), 1569-1580.
55. Uruguay. Ministerio de Salud Pública. Dirección General de la Salud, División de Epidemiología. Informe de actualización. Situación tos convulsa (a la semana epidemiológica 37 de 2012). Montevideo: Ministerio de Salud Pública; 2012. Disponible en: [http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Informe_tos_convulsa_SETIEMBRE_2012%20\(4\).pdf](http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Informe_tos_convulsa_SETIEMBRE_2012%20(4).pdf). (Acceso: noviembre de 2015)
56. Valladares-Carranza B, Ortega-Santana C, Velazquez-Ordoñez V, *et al.* *Bordetella bronchiseptica* como un riesgo importante de salud pública. Estudio clínico patológico en conejos. REDVET Rev. Electrón. Vet. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> 2011 Volumen 12 Nº 10 – Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101011.html> (Acceso: noviembre de 2015)
57. Van Kruijssen AM, Templeton KE, van der Plas RN, *et al.* Detection of respiratory pathogens by real-time PCR in children with clinical suspicion of pertussis. Eur J Pediatr 2007; 166:1189-1191.
58. Weyant, RS, Hollis DG, Weaver RE, *et al.* *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. J Clin Microbiol 1995; 33:1-7.
59. Winter K, Harriman K, Zipprich J, Schechter R, *et al.* California pertussis epidemic, 2010. J Pediatr 2012; 161(6):1091-6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis epidemic-Washington, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2012; 61(28):517-522.
60. Wirsing von Konig CH and M. Riffelman. Pertussis: an old disease in new clothes. Euro Surveill 2007; 12: E1-2.
61. World Health Organization. WHO/IVB/0.4.14. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*. 1-14
62. World Health Organization. Immunization surveillance, assessment and monitoring Pertussis. World Health Organization; 2012. Disponible en: http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/pertussis/en/index.html. (Acceso: noviembre de 2015)
63. World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals Pertussis. World Health Organization; 2014. Disponible en: http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1_Pertussis_background_FINAL4_web.pdf?ua=1 (Acceso: noviembre de 2015)
64. World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals Pertussis. Disponible en: <http://www.who.int/gho/immunization/dtp3/en/> (Acceso: noviembre de 2015)
65. World Health Organization. Country communications, EPI Tables 1999-2003 and Country reports using PAHO-WHO/UNICEF Joint Reporting Forms (JRF) since 2004. Updated 2010. Disponible

en: http://www.amro.who.int/english/ad/fch/im/Pertussis_NumberCases.pdf (Acceso: noviembre de 2015)

66. Yih WK, Silva EA, Ida J, *et al.* *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:441-443.
67. Zouari A, Touati A, Smaoui H, *et al.* Dual infection with *Bordetella pertussis* and *Mycoplasma pneumoniae* in three infants: case reports. *Infection* 2012; 40:213-217.