

**Diagnóstico molecular de coqueluche en niños y adultos. Paraguay.
2011-2015**
**Molecular diagnosis of whooping cough in children and adults,
Paraguay . 2011-2015**

M León., A Kawabata., M Nagai., L. Rojas ., G. Chamorro.
Laboratorio Central de Salud Pública
maruleonayala@hotmail.com

Recibido: 09.11.2015

Aceptado: 01.02.2016

Resumen : Coqueluche o tos convulsa es una infección respiratoria aguda muy contagiosa causada por *Bordetella pertussis* y particularmente grave en niños menores de 1 año, que luego de más de 60 años de haberse implementado la vacuna, aun produce en el mundo 30 millones de casos por año con más de 300.000 muertes. El trabajo busca determinar la frecuencia de infección por *Bordetella pertussis* en pacientes niños y adultos, mediante PCR en tiempo real en muestras nasofaríngeas remitidas al Laboratorio Central de Salud Pública durante el periodo 2011 a noviembre 2015. Es un estudio observacional descriptivo de carácter retrospectivo y corte transversal en una población comprendida por niños y adultos que acudieron a los diferentes servicios públicos y privados de Paraguay con sospecha clínica de coqueluche o tos convulsa y síntomas respiratorios, durante el periodo comprendido entre el año 2011 al 2015 y cuyas muestras fueron remitidas al Laboratorio Central de Salud Pública. Se recibieron un total de 2351 muestras de aspirados o hisopados nasofaríngeos de pacientes provenientes de las diferentes regiones sanitarias del país, con el fin de obtener diagnóstico de esta enfermedad. La frecuencia de esta enfermedad es del 11% (N=265/2351) en Paraguay, durante este periodo de estudio, predominando en niños de menores de 6 meses del sexo femenino.

Palabras claves: *Bordetella pertussis*, coqueluche, tos convulsa, PCR en tiempo real.

Abstract: Pertussis or whooping cough is a highly contagious acute respiratory infection caused by *Bordetella pertussis* and particularly severe in children under 1 year, after 60 years of the vaccine have been implemented, although the world produces 30 million cases year with more than 300,000 deaths. It is the third leading cause of death from vaccine-preventable diseases, after measles and neonatal tetanus. To determine the frequency of infection by *Bordetella pertussis* in children and adults patients by real-time PCR nasopharyngeal samples sent to the Central Laboratory of Public Health for the period 2011 to November 2015.

This is a descriptive study of character retrospective and cross-sectional. The population is comprised of all persons, children and adults who attended the various public and private services in Paraguay with clinical suspicion of pertussis or whooping cough and respiratory symptoms during the period from 2011 to 2015 and whose samples were sent to Central Public Health Laboratory. The data analysis is conducted by Epi Info version 3.5.3. and Microsoft Office Excel 2007.

A total of 2351 samples of nasopharyngeal aspirates or swabs from patients from different health regions, *Bordetella pertussis* detection by real-time PCR, in order to obtain diagnosis were received this disease. The frequency of this disease is 11% (N = 265/2351) in Paraguay, during this study period, predominantly in children under 6 months old female. That the cases predominate in children younger than 6 months (68.3%) suggests that they have not yet received the pentavalent vaccine or who have not yet completed all three doses of the vaccine. Apart from the ten years the effectiveness of the vaccine begins to decay according to the literature and carrying cases are observed.

Key words: *Bordetella pertussis*, pertussis , whooping cough, real-time PCR.

1. Introducción

Bordetella pertussis, patógeno exclusivamente humano, es el agente etiológico de la coqueluche o tos convulsa, enfermedad endémica con ciclos epidémicos cada tres o cuatro años, de distribución universal. Produce una infección respiratoria aguda, grave, altamente contagiosa, cuyas manifestaciones clínicas dependen de la edad del paciente, el estado inmunológico, nutricional y que afecta mayoritariamente a los niños menores de un año de edad^(1,2).

Cada año, *B. pertussis* produce entre 200.000 a 400.000 muertes en todo el mundo, principalmente en niños no vacunados o que no han completado el esquema de vacunación^(3,4), siendo considerada como una de las 10 principales causas de muerte en la infancia. Es la tercera causa de muerte por enfermedades inmunoprevenibles, después del sarampión y tétanos neonatal. Se trata de una enfermedad inmunoprevenible mediante DPT, vacuna incluida en el calendario oficial⁽⁵⁾. Al grupo de alto riesgo constituido por niños menores de 1 año se le han sumado, en las últimas dos décadas, niños en edad escolar y adolescentes que actuarían como reservorio y transmisores de la enfermedad^(6,7). La transmisión de la enfermedad ocurre de persona a persona a través de aerosoles o gotas de secreción de un individuo infectado. Luego de un período de incubación en general de siete días comienza la fase catarral que es la etapa más contagiosa, la misma dura de una a dos semanas y cuya sintomatología puede confundirse con otras infecciones respiratorias. La siguiente fase es la paroxística que dura entre tres y seis semanas, presentándose con accesos de tos, estridor inspiratorio y vómitos después de la tos. En los pacientes adolescentes o adultos los síntomas pueden ser atípicos o más leves: tos prolongada (más de 2 semanas) y sin síntomas sistémicos. Esto ocurre por la pérdida habitual de la inmunidad adquirida por las vacunas lo que ocurre entre 5 y 10 años después de la última dosis. En niños pequeños pueden no desarrollarse paroxismos ni estridor pero pueden

presentar cianosis, apnea y muerte súbita. El último período es el de convalecencia que puede llegar a durar varios meses ⁽⁸⁾.

En Paraguay la infección por *B. pertussis* es un problema de salud pública siendo una enfermedad de notificación obligatoria por ser de morbilidad elevada e inmunoprevenible. La vacunación en Paraguay se implementa según el carnet de vacunación del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPyBS) y el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI). El esquema de vacunación que se utiliza es el siguiente ⁽⁹⁾: Pentavalente (contra difteria, tos convulsa, tétanos, hepatitis B y meningitis), se aplica a los 2, 4 y 6 meses de vida. La cobertura de vacunación pentavalente, según el MSPyBS (septiembre 2009) es del 75% ⁽¹⁰⁾.

Tiene una eficacia del 70-90% luego de 3 dosis, con una protección aproximada de 5-10 años. La cuarta dosis (refuerzo) administrada a los 6-12 meses luego de la tercera dosis, mantiene adecuada inmunidad durante los años preescolares. La quinta dosis (segundo refuerzo) aplicada antes del ingreso escolar, aumenta el nivel de anticuerpos protectores, y puede disminuir el riesgo de transmisión de la enfermedad de escolares a hermanos pequeños que tienen el esquema incompleto, debido a su edad. Por otra parte *B. pertussis* continúa circulando aún en países con alta cobertura debido a que la protección natural es de aproximadamente de 10 a 15 años y la protección debido a la vacunación es de 6 a 10 años. La transmisión de esta enfermedad a los niños ocurre principalmente desde los adolescentes y adultos ⁽¹¹⁾.

El tratamiento con antibióticos es efectivo para la erradicación nasofaríngea de este patógeno y eficaz para disminución de los síntomas clínicos y reducir rápidamente la contagiosidad, solo si se inicia en la fase catarral. Los tratamientos acortados (5-7 días) versus el clásico de 14 días han demostrado ser igualmente efectivos ⁽¹²⁾. La eritromicina es el macrólido más usado y de mejor respuesta terapéutica ⁽¹³⁾. Sin embargo, numerosos reportes han demostrado igual efectividad usando otros macrólidos de buena penetración intracelular como claritromicina y azitromicina.

El cultivo de *B. pertussis* es el gold standard ^(14,15) del diagnóstico de coqueluche el cual tiene una alta especificidad, pero muy baja sensibilidad (<25%). Es de lento desarrollo y su rendimiento depende del tratamiento antibiótico previo, periodo evolutivo de la enfermedad, la edad y la vacunación del paciente, las condiciones de transporte y recogida de la muestra, así como de los medios especiales empleados; sin embargo es menos sensible que la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) pero 100% específica. Es importante comprender que un cultivo negativo no descarta la infección ⁽¹⁶⁾.

Técnicas moleculares basadas en la PCR se emplean en el diagnóstico de coqueluche o tos convulsa ⁽¹⁷⁾. Los resultados se obtienen en un menor tiempo que el cultivo y a diferencia de este no es necesario que el microorganismo esté vivo pues detecta un componente del mismo, la secuencia de ADN. La PCR es más sensible que el cultivo por ello los falsos negativos son infrecuentes ⁽¹⁸⁾.

La vigilancia epidemiológica de esta enfermedad inmunoprevenible, requiere realizar un análisis situacional del evento y contribuir a la orientación de las intervenciones en salud pública.

Materiales y métodos

Diseño de estudio: Observacional descriptivo de carácter retrospectivo y corte transversal. Aceptado por el comité de Ética Institucional del Laboratorio Central de Salud Pública del MSPBS

Población: Se ha investigado en 2351 niños y adultos con sospecha clínica de coqueluche o tos convulsa que acudieron a los diferentes servicios públicos y privados de Paraguay desde el año 2011 al 2015.

Criterios de inclusión según Dirección General de Vigilancia de la Salud (DGVS):

Caso sospechoso según criterio clínico:

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 (REF)

Diagnóstico molecular

Todos los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron utilizando un instrumento LightCycler (Roche Ciencias Aplicadas, Indianapolis, IN). Se realizó la detección de *B. pertussis* a partir de muestras de aspirado o hisopado nasofaríngeo. La extracción de ADN se realizó con MagnaPure DNA Isolation Kit (Roche, Alemania) con equipo de extracción automatizado MagnaPure. (Roche. Alemania). La PCR se efectuó utilizando un kit comercial: LightMix Kit B. pertussis y para (TIB MILBIOL, LLC).

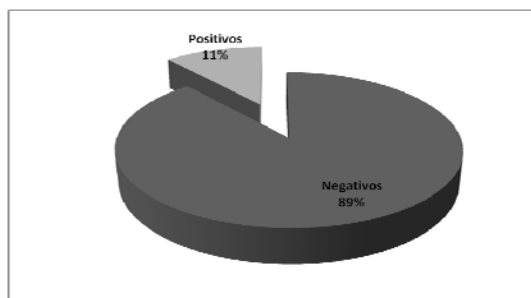
Análisis de datos

Los datos fueron cargados a una planilla electrónica (Microsoft Office Excel 2007) y analizados por Epi-Info Versión 3.5.3.

Resultados

Desde el año 2011 al 2015 se recibieron en el Laboratorio Central de Salud Pública, un total de 2351 muestras de aspirado y/o hisopado nasofaríngeo de pacientes con sospecha de coqueluche o tos convulsa. La frecuencia de la infección es del 11% con predominio en pacientes del sexo femenino (61%). Gráfico 1.

Gráfico 1. Frecuencia de coqueluche en Paraguay, durante el periodo 2011 a 2015



Se observa un número mayor de casos confirmados en menores de 6 meses, seguido del grupo etario de 1 a 5 años y 21 a 25 años. Ver tabla 1.

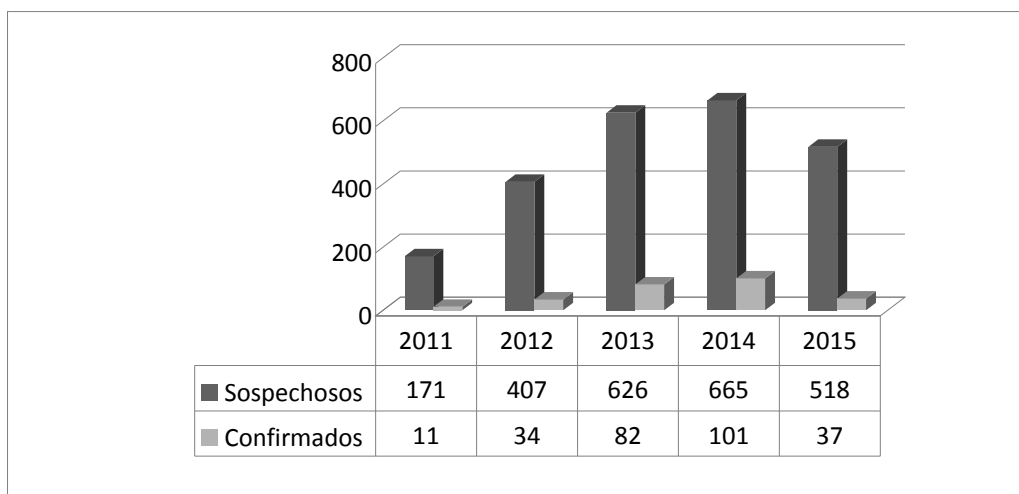
Tabla 1. Distribución de casos confirmados de infección por *B. pertussis* según grupo etario.

Edad	N	%
< 6 meses	181	68.3
6 - 11 meses	7	2.6
1 - 5 años	15	5.7
6 - 10 años	2	0.8
11 - 15 años	4	1.5
16 - 20 años	14	5.3
21 - 25 años	15	5.7
26 - 30 años	8	3

31-35 años	8	3
36-40 años	3	1.1
41-45 años	2	0.8
46-50 años	0	0
> 50 años	2	0.7
s/d	4	1.5
Total	265	100

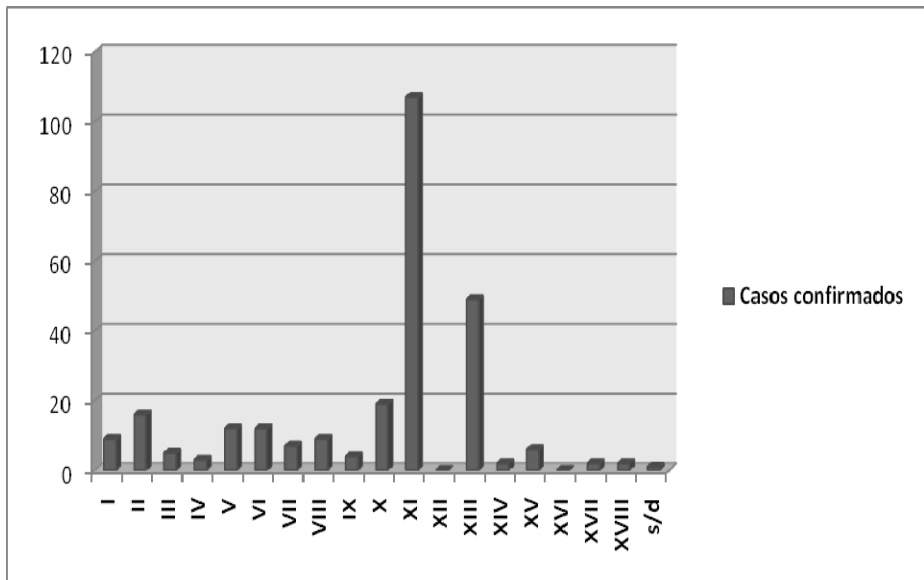
En el año 2011 fueron diagnosticados once casos (6.4%), en el 2012 treinta y cuatro (8.3%), en el 2013 ochenta y dos (12.3%) y en el 2015 treinta y siete (7.1%). Gráfico 2.

Gráfico 2. Distribución de casos de coqueluche en Paraguay. 2011-2015



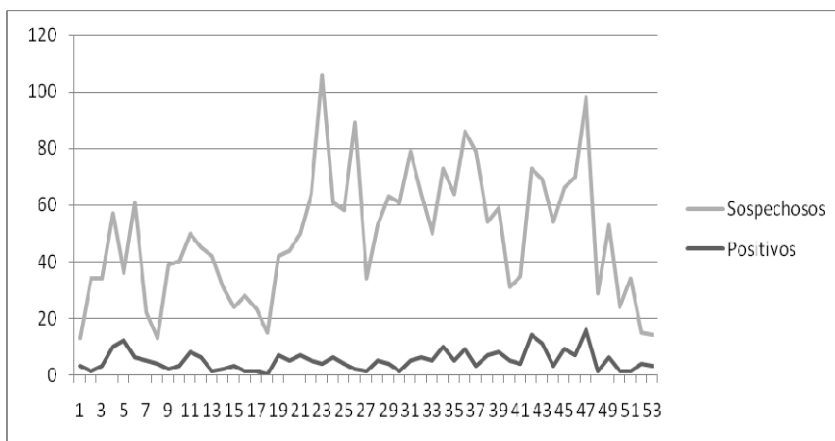
Durante este periodo de estudio 265 casos fueron confirmados por PCR en tiempo real un total de 265 casos de coqueluche. Se observa una alta frecuencia de la enfermedad en el XI departamento (N=107), seguido del XVIII departamento (N=49). Gráfico 3.

Gráfico 3. Distribución de la enfermedad por departamentos. 2011-2015.



El corredor endémico semanal de esta enfermedad, muestra que, en prácticamente todas las semanas se han registrado número de casos notificados como sospechosos. Se observaron picos de casos confirmados de coqueluche en la semana epidemiológica 5 (SE 5) con doce casos, seguido de la semana epidemiológica 42 (SE 42) con catorce casos y en la semana epidemiológica 47 (SE 47), dieciséis casos confirmados. Se observa que en la SE 23 se presentaron 102 casos sospechosos de la enfermedad siendo confirmados tan solo 4 casos. Gráfico 4.

Grafico 4. Curva epidémica de coqueluche. Periodo 2011 a 2015.



Discusión

El aumento de las notificaciones podría reflejar una mejora en la búsqueda activa de casos sospechosos de coqueluche por parte del equipo de salud, especialmente en los años con mayor número de casos de la enfermedad, pero los porcentajes muy bajos de confirmación hacen pensar que se están incluyendo casos que no cumplen la definición de caso sospechoso. Es importante que se envíen al laboratorio muestras de los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión; es decir, la observación clínica es fundamental para obtener los mejores resultados de un método de laboratorio como la PCR.

La frecuencia de infección por *B. pertussis* durante este periodo de estudio comprendido entre 2011 y 2015 resultó ser de un 11% (N=265). Los casos predominan en niños menores de 6 meses. Lo que supone que aun no han recibido la vacuna pentavalente o no han completado las tres dosis de la vacuna, le sigue del grupo etario de 1 a 5 años y de 20 a 25 años. A partir de los diez años de edad se observa un declive de la protección

vacunal que puede influir, además de la pérdida de memoria inmunitaria, las variaciones antigénicas de las cepas salvajes.

El manejo efectivo de los casos de coqueluche o tos convulsa requiere un diagnóstico ágil que permita adoptar las medidas necesarias para su resolución. Estas medidas comprenden el tratamiento de los casos, la quimioprofilaxis de los contactos y la vacunación de los susceptibles. La aparición de las nuevas vacunas acelulares posiblemente genere cambios en los programas y las dianas poblacionales de vacunación. No obstante, previamente es preciso disponer de métodos diagnósticos lo suficientemente sensibles y específicos para perfilar la situación real de la enfermedad en un determinado entorno.

La mayor rapidez y sensibilidad de la técnica PCR en tiempo real respecto al cultivo ayudan drásticamente en la toma precoz de decisiones terapéuticas y preventivas. Sin embargo, presenta como desventaja su mayor costo. A pesar de la limitada sensibilidad del cultivo, la posibilidad de testar la sensibilidad antibiótica y la necesaria vigilancia epidemiológica de las cepas circulantes hacen que mantener esta técnica sea muy conveniente¹⁹

La dinámica de la serie mostró una estacionalidad en primavera-verano, similar a lo informado en otros países^(20,21)

Referencias bibliográficas

- [1] Bergfors E, Trollfors B, Taranger J, Lagergård T, Sundh B, Zackrisson G. 1999-Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int J Infect Dis*; 3: 140-6.
- [2] *Bordetella pertussis* en Latinoamérica: R. Ulloa-Gutiérrez, M. Hernández de Mezervillea y M.L. Ávila-Agüero. *An. Pediatr.* 69(3):19-79.
- [3] Cherry J D. 1984-The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study. *Curr. Probl. Pediatr*; 14: 1-78.
- [4] Stojanov S, Liese J, Belohradsky B H. 2000-Hospitalization and complications in children under 2 years of age with *Bordetella pertussis* infection. *Infection*; 28: 106-10.
- [5] Enfermedades infecciosas, principios y prácticas. Mandell / Douglas / Bennett. Sexta ed. 2006-Vol. 2; pág.: 2701-10.
- [6] Hoey J. 2003- Pertussis in adults. *CMAJ*; 168:453–454.
- [7]Guris D, Strebel PM, Bardenheier B, et al. 1990- Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults,– 1996. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28:1230–1237.

- [8] Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Benenson, A. 1997-Tos ferina por *Bordetella pertussis*: OPS. Publicación científica; 564., 446-451.
- [9] Normas Técnico Administrativas y Vigilancia del Programa Ampliado de Inmunizaciones. MSP y BS OPS/OMS. Pag 40-46. 2003.
- [10] Organización Panamericana de la Salud. Evaluación Internacional del Programa Ampliado de Inmunizaciones en Paraguay. 1999Asunción. Paraguay: MSP y BS – OPS/OMS..
- [11] Trenaghi M, López P, Rocha C, Rivera L, Davis MP, Ruttimann R et al. 2006-A new DTPw-HB/Hib combination vaccine for primary and booster vaccination of infants in Latin America. Rev. Panam. Salud Pública. 19(3):179-188.
- [12] Bazan M, Carlos; Batistini M, German y Patiflo Martínez, German. 1953-Tratamiento de la tos ferina con Eritromicina. Rev. chil. pediatr. [online]., vol. 24, no. 8 [citado 2009-03-12], pp. 280-284.
- [13] Bass, J.W.; Klenk, E.; Kotheimer, J.; Linnemann, CO.; Smith, M.; Mitchell, I.; Coner, E.; Leidermann, D. 1969.-Antimicrobial treatment of pertussis, The J. of Ped. 75: 768-781.
- [14] Diagnóstico Microbiológico. Koneman, E.W.; Allen S.D.; Janda W.M. Año 1999; Editorial Médica Panamericana. Quinta edición.. Bs. As. –Argentina. 416-424).
- [15] Diagnóstico Microbiológico. Bailey Scott; Finegold S. M.; Martin W.J. 1983-Editorial Médica Panamericana. Sexta Edición.. Bs. Argentina.
- [16] Grimprel E, Bégué P, Anjak L, Betsou F, Guiso N. 1993- Comparison of polymerase chain reaction, culture, and Western Immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol; 31: 2745-50.
- [17] Glare EM, Paton JC, Premier RR, Lawrence AJ, Nisbet LT. 1990;- Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 28: 1982-7.
- [18] Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N -2005-for the Pertussis PCR Consensus Group. Nucleic acid amplification test for diagnosis of *Bordetella infections*. J Clin Microbiol; 43: 4925-9.
- [19] McGowan K.L. . 2002-Diagnostic test for pertussis: Culture vs DFA vs PCR. Clin Microbiol News; 24: 679-83.
- [20] Gentile A, Romanin V. 2012;-¿Podemos controlar la infección por *Bordetella pertussis* en Argentina? Nuevas estrategias. Rev Hosp Niños B Aires 52(236):297-303.
- [21] Canals LM, Labra SF. 1999-Análisis no-lineal de la dinámica de enfermedades infecciosas en Chile. Rev Méd Chile;127(9):1086-92.