

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Establecimiento de condiciones de PCR punto final para la detección de *Bordetella pertussis* en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Marlene Bravo Parra

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de **Marlene Bravo Parra** hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “**Establecimiento de condiciones de PCR punto final para la detección de *Bordetella pertussis* en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora**” y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de **Químico Biólogo Clínico**.

Atentamente:

---

M.C. Magali Avilés Acosta  
Presidente

---

Dr. Enrique Bolado Martínez  
Secretario

---

Dr. Eduardo Ruiz Bustos  
Vocal

---

M.C. Lucía Gpe. Castellón Campaña  
Suplente

## AGRADECIMIENTOS

Al **Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora (LESPSON)** por abrirme las puertas de sus instalaciones primero para realizar mis prácticas profesionales y después por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis y adquirir mi primera experiencia como Químico Biólogo Clínico fuera de la universidad. Por apoyarme con los reactivos, equipo y todo el material necesario para realizar este trabajo.

A mi asesora en este trabajo la **M.C. Magali Avilés Acosta** por todas sus enseñanzas, su apoyo y la oportunidad de realizar este trabajo. Por tratarme como un miembro más de su equipo y siempre estar en la mejor disposición de ayudar. Muchísimas gracias también por todos consejos profesionales y personales.

A todos los **miembros y amigos del departamento de Biología Molecular del LESPSON**, Nidya, Mónica, Cynthia, Genaro, Monserrat, por su gran apoyo, enseñanzas, por su paciencia y confianza. Por hacerme sentir como parte de su equipo de trabajo y toda su disposición para ayudarme. Muchísimas gracias!.

A mis sinodales el **Dr. Enrique Bolado, Dr. Eduardo Ruiz Bustos, M.C. Lucía Castellón Campaña**, por todas sus enseñanzas durante la carrera y sus observaciones para ayudarme a mejorar mi trabajo y por el tiempo dedicado.

## DEDICATORIA

A **mi Mama y a mi Papa** por darme la vida, por todo su esfuerzo para lograr darme estudios, por todo su amor y por enseñarme a luchar por lo que quiero. Los amo.

A **mi Tía Julieta** por quererme como a una hija, por todo su incondicional apoyo como una segunda madre durante mis años universitarios, por inculcarme el espíritu de lucha y la fe en Dios. Siempre te estaré agradecida, te quiero muchísimo.

A **mi novio Pako** por ser mi mejor amigo, por todo su amor y apoyo incondicional.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
OBJETIVOS.....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES.....	14
Tosferina.....	14
Marco Histórico.....	14
Género <i>Bordetella</i> .....	16
Factores de Virulencia.....	19
Factores de Virulencia Regulados por el Sistema BvgAS..	19
Hemaglutinina filamentosa (FHA).....	20
Fimbria (Fim).....	20
Pertactina (Prn).....	20
Toxina adenilato ciclasa (ACT).....	20
Toxina pertussis (PTx).....	21
Toxina dermonecrótica (DNT).....	21
Factores de Virulencia no Regulados por el Sistema BvgAS	22
Citotoxina traqueal (TCT).....	22

Lipopolisacárido (LPS).....	23
Sistemas de captura de hierro.....	23
Sistema de secreción tipo III (TTSS).....	23
Manifestaciones Clínicas.....	24
Diagnóstico por el Laboratorio.....	26
Cultivo.....	26
Serología.....	27
PCR.....	28
Epidemiología.....	30
Incidencia en México.....	32
Reemergencia.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
Selección de las Muestras.....	38
Extracción de ADN.....	38
Lisis Mini Rápida de Colonia.....	38
Extracción por Columna.....	39
PCR Punto Final.....	40
Condiciones de Reacción.....	40
Detección de los Productos Amplificados por PCR punto final.....	42
Restricción con la Enzima <i>AluI</i> .....	42

Detección de los Productos de Restricción.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	58
RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXOS.....	65

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Especies del género <i>Bordetella</i> y relación con su hospedero/hábitat.	18
2.	Secuencias de inserción en el genoma de especies de <i>Bordetella</i> .	29
3.	Iniciadores para la amplificación del elemento de inserción IS481.	40
4.	Mezcla de reacción de PCR punto final para <i>B. pertussis</i> .	41
5.	Condiciones del programa de amplificación BORDETEL.	42
6.	Mezcla de reacción para restricción con enzima <i>AluI</i>	43
7.	Comparación entre concentraciones de trabajo de la enzima AmpliTaq Gold DNA Polymerase y la Go Taq DNA Polymerase.	46
8.	Resultados obtenidos de la técnica de PCR punto final con muestras de AND positivo y negativo de <i>B. pertussis</i> PCR-TR.	54
9.	Tabla de resultados PCR-TR vs PCR punto final.	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Imagen del cocobacilo <i>Bordetella pertussis</i> .	17
2.	Representación del patógeno <i>B. pertussis</i> con sus factores de virulencia y sistema BvgAS.	22
3.	Manifestaciones clínicas de la tosferina clásica.	24
4.	Manifestaciones clínicas de la tosferina en pacientes menores de 3 meses.	25
5.	Ocurrencia anual de casos de tosferina en América en el periodo 2002-2010.	31
6.	Casos e incidencia de tosferina, México 2000 – 2011.	33
7.	Casos e incidencia de tosferina por estado, México 2011.	34
8.	Casos por entidad federativa de enfermedades prevenibles por vacunación hasta la semana epidemiológica 22 de 2013.	33
9.	Productos de PCR a partir de suspensiones bacterianas proporcionadas por el InDRE de <i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> y <i>B. holmesii</i> utilizando el método de extracción por lisis mini rápida.	48
10.	Productos de PCR de la cepa de referencia de <i>B. pertussis</i> ATCC 8467 y aislamientos de <i>B. parapertussis</i> y <i>B. bronchiseptica</i> recuperados en el LESPSON.	50
11.	Productos de PCR de muestras de ADN positivo a <i>B. pertussis</i> por PCR-TR y positivo al elemento de inserción IS481 por PCR punto final.	52
12.	Productos de digestión con la enzima de restricción con <i>AluI</i> de las muestras de ADN amplificado para la secuencia IS481.	53

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Establecer las condiciones de la técnica de PCR punto final para la detección de *Bordetella pertussis* utilizando las muestras analizadas por PCR en tiempo real en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora.

### **Objetivos Particulares**

- Definir las condiciones óptimas de amplificación de la metodología de PCR punto final y electroforesis para *B. pertussis*.
- Correlacionar los resultados obtenidos con PCR punto final con los de PCR en tiempo real.

## RESUMEN

La tosferina es causada por el cocobacilo *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), a pesar de las altas coberturas de vacunación durante varias décadas, continúa siendo una de las principales causas de muerte infantil tanto en países en vías de desarrollo como en los desarrollados, por lo que se ha declarado como una enfermedad reemergente por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Lo anterior lleva a la necesidad de disponer de herramientas rápidas y confiables para establecer un diagnóstico oportuno.

El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final para amplificar y detectar la secuencia de inserción *IS148* repetitiva en el genoma de *B. pertussis* y así utilizar esta técnica de diagnóstico molecular como una alternativa en ausencia de la PCR en tiempo real (PCR-TR) para detectar *B. pertussis* en exudados nasofaríngeos en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora (LESPSON).

Para lograr establecer las condiciones de PCR punto final se trabajó con 181 muestras de ADN positivas a *B. pertussis* y 23 muestras de ADN negativas a *B. pertussis* por la técnica de PCR-TR proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora (LESPSON). En la primera etapa del trabajo se definieron las condiciones para realizar la PCR utilizando una cepa control, posteriormente se buscaron las condiciones óptimas para la realización de la PCR y electroforesis en gel, esperando una banda característica de 424 pb. Las muestras que resultaron positivas por PCR punto final, posteriormente se analizaron con la enzima restricción con la *Alu* I, obteniendo una banda de 124 pb y otra de 120 pb, esto con el objetivo de aumentar la especificidad analítica de la técnica.

En base a los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de Chi cuadrada ( $X^2$ ) en la modalidad de tablas de contingencia de 2x2 con lo que se corroboró que los datos positivos por PCR punto final fueron significativos respecto a los positivos por PCR-TR. Al obtener los resultados esperados, se puede implementar la técnica de PCR punto final para detectar *B. pertussis* en el LESPSON de manera alternativa a la técnica de PCR-TR. Esto repercutirá en un diagnóstico de tosferina oportuno y generará datos para la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

*Bordetella pertussis* el agente etiológico de la tosferina, ha sido protagonista de grandes epidemias a través de los siglos, gracias a su constante evolución y múltiples estrategias de evasión ante la inmunidad conferida por la vacunación anti-pertussis. Ha logrado perpetuarse en el tiempo desde la primera epidemia registrada en París en el año 1578 y esparcirse por todo el planeta donde continúa siendo una de las primeras causas de mortalidad infantil hasta nuestros días. En las últimas dos décadas se han presentado gran cantidad de brotes de tosferina incluso en países desarrollados con altas coberturas de vacunación, por lo que se ha llegado a declarar como una enfermedad reemergente (Quian, 2012; Ehrke, 2013).

*B. pertussis* es un patógeno altamente evolucionado y con un verdadero arsenal de factores de virulencia, los principales son la toxina pertussis, el adenilato ciclasa, toxina dermonecrótica, hemaglutinina filamentosa, factor de secreción tipo III, capacidad de formar biopelículas entre otros, los cuales son controlados por un sistema de expresión de genes en diferentes estadios de la enfermedad y bajo ciertas circunstancias de estrés de la bacteria. Haciendo posible que la bacteria suprima o retarde algunas actuaciones de las células de inmunidad como macrófago y neutrófilos (Carbonetti, 2007; De Gouw y col., 2011).

Décadas atrás se consideraba a la tosferina como una afección específica de los niños. En la actualidad se ha logrado aislar al agente etiológico de la enfermedad del tracto respiratorio superior de jóvenes y adultos, donde la enfermedad cursa con un cuadro clínico parecido al catarro común. Sin embargo, éstos pueden actuar como reservorios del patógeno y transmitirlo a huéspedes más susceptibles como neonatos o niños de menos de 2 años en los que el esquema de vacunación contra tosferina es ausente o incompleto. Se han descrito también casos de infecciones severas parecidas a tosferina por otras especies de *Bordetella* como *B. parapertussis*, *B. holmesii* y *B. bronchiseptica* en huéspedes inmunocomprometidos (Mattoo y Cherry, 2005; Tozzi y col., 2005).

Debido a su importancia la tosferina se encuentra dentro de las enfermedades de vigilancia epidemiológica por la dirección general de epidemiología de México, y todo caso en que se sospeche de tosferina debe ser reportado. El diagnóstico de tosferina por el laboratorio consiste en la implementación de varias técnicas combinadas como cultivo y PCR o serología y cultivo, los cuales difieren en cuanto a sensibilidad y especificidad; la elección del método

depende principalmente de la fase en que se encuentre la enfermedad y la edad del paciente (García y col., 2006; InDRE, 2012).

La tosferina está ampliamente distribuida principalmente en países en vías de desarrollo. En México se ha reportado una alta incidencia de casos de tosferina anualmente, sobresaliendo el estado de Sonora con el mayor número de casos de tosferina reportados en la república mexicana durante el 2012 según la Dirección General de Epidemiología (DGE) de México. Por lo que es importante contar con una técnica alternativa a la PCR-TR para no interrumpir la emisión de resultados que contribuyan a establecer el diagnóstico oportuno de tosferina.

Con el establecimiento de las condiciones óptimas de PCR punto final para detectar *B. pertussis* mediante la utilización de los iniciadores Bp 168 y Bp 169, se tendrá la oportunidad de realizar un diagnóstico confiable, que puede alternarse con PCR-TR en el LESPSON, lo cual constituye una herramienta fundamental para establecer un diagnóstico oportuno, así como continuar la vigilancia epidemiológica de la tosferina.

## ANTECEDENTES

### Tosferina

La tosferina o pertussis es una enfermedad infecciosa, altamente contagiosa del tracto respiratorio humano, caracterizada por accesos de tos paroxística seguido de un estridor inspiratorio y causa alrededor de 300,000 muertes al año en todo el mundo. La bacteria *Bordetella pertussis* es reconocida como el agente etiológico de la tosferina, aunque otras especies del mismo género desarrollan un cuadro clínico similar. Son cuatro especies de *Bordetella*, las que se han asociado con infecciones respiratorias en humanos o mamíferos: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. holmesii*. De las cuatro, *B. pertussis* es la que ocasiona mayor morbilidad y mortalidad. Esta bacteria es un patógeno del cual no se conocen reservorios animales o ambientales, solo humanos (Bergón, 2004; Mattoo y Cherry, 2005; Esteves y col., 2012).

La tosferina es de distribución mundial y una de las principales causas de mortalidad infantil provocada por una enfermedad prevenible por vacunación. La transmisión de la enfermedad se lleva a cabo de forma directa, al inhalar gotículas provenientes del estornudo o tos de una persona infectada (Bart y col., 2010; WHO, 2010; Nosedá, 2011).

### Marco Histórico

El primer reporte conocido de un brote de tosferina en la literatura médica, es el que realizó Guillaume De Baillou, quien describió una epidemia en París en el verano de 1578 y le dio el nombre de *Tussus Quintina* a la enfermedad. Sin embargo dicho reporte fue publicado 62 años mas tarde. La enfermedad causó gran mortalidad, principalmente en niños (Laval, 2010).

Sydenham, en el año de 1679 describió exactamente la enfermedad y la denominó pertussis (*per*, intensa + *tusis*, tos). A partir de entonces, ha recibido varios nombres, siendo más usados los de coqueluche, tosferina, pertussis y *whooping cough* (en países de habla inglesa). El de coqueluche, proviene del francés “*coqueluchon*”, que se refiere a la caperuza con

que solía guarecerse la cabeza de los enfermos. Se cree que la palabra francesa recibió, asimismo, la influencia de *coq* “gallo”, ya que la tosferina se conocía también como “*chant du coq*” que significa “canto del gallo”. En China, la enfermedad se conoce como “la tos de los 100 días”, en alusión a la duración del síntoma fundamental, la tos. En la actualidad, también se le conoce como tos convulsa, en referencia a los violentos episodios de tos característicos de la misma (Bergón, 2004; Mancebo y col., 2005; Laval, 2010; Nosedá, 2011).

La tosferina llegó a América latina a través de los marineros provenientes de Europa hacia el año de 1732 aproximadamente. Desde entonces, la enfermedad se fue esparciendo alrededor de todo el mundo, cobrando miles de muertes y provocando epidemias en varios países americanos y europeos (Laval, 2010).

Fue hasta el año de 1900 cuando Bordet y Gengou observaron en una niña de cinco meses, una sustancia blanquecina, no mezclada con saliva, en el exudado expulsado durante un ataque de tos. La tinción fenólica de esta zona blanquecina, reveló una multitud de leucocitos y una enorme cantidad de pequeñas bacterias ovoides, algunas más elongadas que otras, coloreadas en azul pálido. En 1906, después de una ardua experimentación con técnicas de aislamiento bacteriano, Bordet y Gengou reportaron por primera vez el aislamiento del cocobacilo *Bordetella pertussis*, en un medio elaborado por ellos mismos, que lleva sus nombres y que ha conservado su vigencia hasta la actualidad (Bergón, 2004; Mattoo y Cherry, 2005; Nosedá, 2011).

En 1911 Ferry aisló *B. bronchiseptica* a partir de las vías respiratorias de perros que padecían moquillo, también conocida como “distemper” en la literatura inglesa; *B. parapertussis* fue identificada por Eldering y Kendrich en 1938 en enfermos con tosferina, aunque a diferencia de *pertussis*, su aislamiento y crecimiento puede llevarse a cabo en medios comunes (Bergón, 2004).

Apenas se consiguió cultivar al agente etiológico de la tosferina (*B. pertussis*), se inició el desarrollo de vacunas debido a que seguía causando estragos en la salud de los infantes. Entre los años 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen llevaron a cabo los primeros ensayos de vacunación anti-pertussis. De esta manera la primera vacuna desarrollada contra la enfermedad conteniendo bacterias enteras inactivadas, fue introducida en los Estados Unidos en la década de 1940 generalizándose su uso a partir de la década de 1950 (Mattoo y Cherry, 2005; Nosedá, 2011).

Para 1955 México producía sus propias vacunas anti-pertussis en el entonces Instituto de Higiene, aunque de manera limitada. En los años posteriores a la vacunación, se encontraron problemas asociados a la reactogenicidad de la vacuna con células enteras, lo cual promovió el desarrollo de vacunas acelulares compuestas por antígenos purificados. La primera vacuna anti-pertussis acelular fue introducida en Japón en 1981 y posteriormente adoptada con diferentes modificaciones en su formulación por diversos países industrializados (Santos, 2002; WHO, 2010; Mosiej y col., 2011; Nosedá, 2011; Esteves y col., 2012).

### **Género *Bordetella***

El género *Bordetella* está compuesto por Beta-proteobacterias de la familia *Alcaligenacea*. Son coccobacilos Gram-negativos con un tamaño promedio de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2  $\mu\text{m}$  de longitud, se pueden observar como bacterias aisladas o en pares (Figura 1). El género *Bordetella* está compuesto por 9 especies: *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis<sub>hu</sub>* (adaptada a humanos), *B. parapertussis<sub>ov</sub>* (adaptada en ovejas), *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* y la más recientemente descrita *B. ansorpii*. Todos los integrantes este género son aerobios estrictos, con excepción de *B. petrii*. Algunas de estas bacterias son difíciles de cultivar en el laboratorio (Nosedá, 2011; Quian, 2012).

Algunos estudios genéticos sugieren que *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* son las especies más estrechamente relacionadas e indican que *B. bronchiseptica* es la especie más cercana a nivel evolutivo, a un ancestro común de estas tres especies y que las dos especies adaptadas al ser humano, *B. pertussis* y *B. parapertussis<sub>hu</sub>* evolucionaron independientemente a partir de linajes de *B. bronchiseptica* diferentes. De las especies que integran el género *Bordetella*, *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis<sub>hu</sub>*, *B. parapertussis<sub>ov</sub>*, *B. holmesii* y *B. ansorpii* infectan el tracto respiratorio de mamíferos. *B. parapertussis<sub>hu</sub>* causa infecciones en humanos con sintomatología similar a la tosferina. De igual manera, *B. bronchiseptica*, descrita inicialmente como un patógeno de animales (gatos y perros principalmente), también puede producir enfermedades respiratorias en el humano (Mazengia y col., 2000; Parkhill y col., 2003; Bart y col., 2010; Nosedá, 2011).

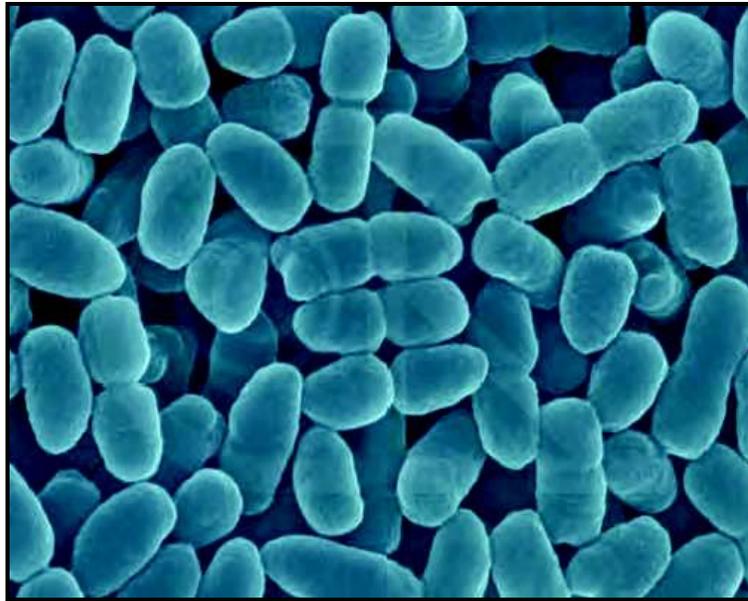


Figura 1. Imagen del cocobacilo *Bordetella pertussis*.

Fuente: Nosedá, 2011.

El miembro del género *Bordetella*, con mayor importancia clínica y epidemiológica es *B. pertussis*, el agente etiológico de la tosferina ya que tiene una afinidad exclusiva por las mucosas de las vías respiratorias del ser humano, es el causante de las más severas manifestaciones clínicas y el que posee una mayor cantidad de factores de virulencia, los cuales ha utilizado a través de los siglos para persistir y adaptarse de manera audaz a una población altamente inmunizada (Bergón, 2004; WHO, 2010).

En la tabla 1 se muestra la relación entre las especies de *Bordetella* y los hospederos o hábitat en los que se desarrollan, así como la enfermedad que causan y algunos de los autores que las han descrito a lo largo de los años (Locht, 2007).

Tabla 1. Especies del género *Bordetella* y relación con su hospedero/hábitat.

<b>Especies</b>	<b>Hospedero/hábitat</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Referencias</b>
<i>B. pertussis</i>	Humano	Pertussis	Bordet y Gengou, 1906
<i>B. parapertussis</i> <sub>HU</sub>	Humano	Pertussis	Eldering y Kendrick, 1938
<i>B. parapertussis</i> <sub>OV</sub>	Oveja	Neumonía	Cullinane y col., 1987; Poter y col., 1996
<i>B. bronchiseptica</i>	Muchos mamíferos	Enfermedad respiratoria	Ferry, 1912
<i>B. holmesii</i>	Humano	Septicemia, tos	Weyant y col., 1995
<i>B. avium</i>	Aves	Rinotraqueítis	Kerstens y col., 1984
<i>B. trematum</i>	Humano	Infecciones en heridas, otitis media	Vandamme y col., 1996
<i>B. hinzii</i>	Humano, aves de criadero	Infecciones oportunistas en humanos	Cookson y col., 1994
<i>B. petrii</i>	Medio ambiente, Humanos	Infecciones oportunistas	Von Wintzingerode y col., 2001
<i>B. ansorpii</i>	Humano	Infecciones oportunistas	Ko y col., 2005

Fuente: Hewlett y col. 2000.

## Factores de Virulencia

*B. pertussis* posee un importante número de factores de virulencia, los cuales están relacionados con su capacidad de infectar al hospedero, e incluso, según varios estudios, *B. pertussis* y otras especies del género tienen la capacidad de alterar su estado fenotípico, según las condiciones del medio ambiente y así poder expresar de diferente manera dichos factores de virulencia. Se ha propuesto un sistema de modulación o regulación de fases de virulencia *in vitro*, a través de transducción de señales sensor/activador denominado BvgAS (Gen de virulencia Activador/Sensor de *Bordetella*). Entre los factores de virulencia cuya expresión es controlada por este sistema se encuentran adhesinas, autotransportadores y toxinas. Asimismo, *B. pertussis* presenta algunos factores cuya expresión es independiente de dicho sistema de regulación (Mattoo y Cherry, 2005; Mooi y col., 2009; Decker y col., 2012).

El sistema BvgAS funciona controlando la expresión de distintos genes asociados con la virulencia a lo largo de tres fases fenotípicas: La fase virulenta o Bvg+, la cual se caracteriza por la expresión de los genes *vag* (genes de virulencia activados), los cuales codifican factores de virulencia. Estos genes se pueden diferenciar de acuerdo con su expresión temporal en *vag* tempranos los cuales codifican algunas adhesinas y *vag* tardíos que codifican toxinas. Este sistema ha sido probado bajo condiciones especiales, explicando eficientemente cómo opera el mecanismo de patogenicidad de la bacteria, factores que favorecen su persistencia en el hospedero y hasta su transmisión, sin embargo, hasta el momento se desconoce el rol de este fenómeno *in vivo* o la fase o fases predominantes durante las distintas etapas de la colonización por parte de este patógeno (Mattoo y Cherry, 2005; Mooi y col., 2009).

### Factores de Virulencia Regulados por el Sistema BvgAS

Entre los factores de virulencia controlados por el sistema BvgAS y que presentan función de adhesina se destacan: hemaglutinina filamentosa, fimbrias y pertactina. Se describen a continuación algunas características éstos:

**Hemaglutinina filamentosa (FHA).** Es una proteína fibrilar que puede estar asociada a la superficie o ser secretada al medio extracelular. Su nombre deriva de la capacidad de aglutinar hematíes y juega un papel fundamental en la adherencia del patógeno a las células del hospedero, además de presentar un gran potencial inmunogénico (Serra y col., 2011).

El gen *fhaB*, que codifica para FHA, pertenece al grupo de genes *vag* tempranos. FHA es sintetizada como un precursor, *fhaB*, el cual sufre varias modificaciones hasta generar la proteína madura FHA. La proteína FHA madura contiene 3 dominios involucrados en la adhesión de *B. pertussis* a las células del hospedador: el dominio RGD (arginina-glicina-aspartico) un ligando de integrinas que promueve la unión a macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y eritrocitos; el de interacción a carbohidratos (dominio CRD) el cual media la adhesión a células epiteliales respiratorias ciliadas y el dominio que presenta afinidad por heparina y otros carbohidratos sulfatados, por el cual ocurre la adhesión a células epiteliales no ciliadas (Carbonetti, 2007; Fennelly y col., 2008; Nosedá, 2011).

**Fimbria (Fim).** Es una proteína de tipo filamentoso que se localiza en la superficie de *B. pertussis*, que participa en la fijación a las células epiteliales y a la mucosa. Existen dos serotipos de subunidad mayor de Fimbria, Fim2 y Fim3, que comparten la subunidad menor denominada FimD. La fimbria se adhiere al epitelio del tracto respiratorio a través de Fim2 y Fim3 y a monocitos por medio de FimD. Su función estaría en promover el primer contacto de la bacteria con los cilios para favorecer el posicionamiento de ésta (Bergón, 2004; Mattoo y Cherry, 2005; Nosedá, 2011).

**Pertactina (Prn).** Es uno de los factores de virulencia de *B. pertussis* que pertenece a la familia de los autotransportadores. Son proteínas asociadas a la superficie de la bacteria o secretadas al medio extracelular y que dirigen su propia exportación. La pertactina posee un dominio RGD, así como regiones ricas en prolina y leucina, involucrados en la adhesión al hospedero. Asimismo, la proteína Prn promueve inmunidad protectora (Bergón, 2004; Nosedá, 2011).

**Toxina adenilato ciclasa (ACT).** Pertenece a la familia de las citotoxinas formadoras de poros y dependientes de  $Ca^{+2}$ . Es una proteína bifuncional, siendo la primera como enzima con un dominio amino-terminal que media la actividad de adenilato ciclasa. La segunda, mediante un dominio carboxilo-terminal media la actividad de hemolisina, promueve la liberación del dominio catalítico en el citoplasma de células eucariotas, es decir, además de tener la actividad enzimática anteriormente descrita, tiene la capacidad de entrar en las células

de los mamíferos y catalizar la reacción utilizando los almacenamientos celulares de adenosin trifosfato (ATP) es la denominada toxina adenilato ciclasa. Dentro de la célula eucariota, la ACT es activada por calmodulina y cataliza la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) en grandes cantidades. El incremento de AMPc interfiere con las funciones de las células fagocíticas del hospedero, favoreciendo la supervivencia de la bacteria en el sitio de infección, por lo que es considerado un factor antifagocítico y antiinflamatorio (Mattoo y Cherry, 2005; Carbonetti, 2007; Nosedá, 2011).

**Toxina pertussis (PTx).** Esta toxina exclusiva de *B. pertussis*, es una proteína de membrana, antigénica y con capacidad hemaglutinante, además de poseer un papel primordial en la adhesión del patógeno. La PTx tiene la estructura clásica tipo A-B de las exotoxinas bacterianas. Está compuesta por cinco polipéptidos designados S1 a S5. Es el factor de virulencia más importante de *B. pertussis* debido a que es el responsable de la mayor parte de la sintomatología producida por la infección. El polipéptido S1 constituye la subunidad A con actividad enzimática ADP ribosiltransferasa NAD-dependiente, mientras la subunidad B, que se compone de los polipéptidos S2, S3, S4 y S5, es la responsable de la interacción con los receptores celulares (Bergón, 2004; Mattoo y Cherry, 2005).

La PTx es secretada al medio extracelular y una vez dentro de la célula eucariota, la subunidad B se intercala con la membrana citoplasmática y une ATP, lo cual provoca la liberación de la subunidad activa S1. Esta subunidad inactiva a la proteína unida al nucleótido de guanina mediante ADP ribosilación, lo cual bloquea la inhibición de la adenilato ciclasa eucariota y la activación de los canales de K<sup>+</sup>. La toxina PTx desencadena efectos supresores en el sistema inmune como la inhibición de la respuesta oxidativa, la quimiotaxis y la liberación de enzimas lisosomales en neutrófilos y macrófagos (Bergón, 2004; Mattoo y Cherry, 2005; Carbonetti, 2007; Mooi y col., 2009; Nosedá, 2011).

**Toxina dermonecrótica (DNT).** También denominada toxina termolábil, fue la primera toxina identificada producida por *B. pertussis*, como su nombre indica, origina una lesión inflamatoria con necrosis de la piel en el ratón tras su inoculación intradérmica a bajas dosis. Es una proteína de tipo A-B compuesta por un dominio amino-terminal de unión a receptor y uno enzimático carboxilo-terminal. La DNT es secretada, internalizada por endocitosis y una vez dentro de la célula del huésped, afecta varios procesos celulares incluyendo la reorganización del citoesqueleto y diferenciación celular entre otros (Bergón, 2004; Carbonetti, 2007; Nosedá, 2011).

En la siguiente imagen se muestra a la bacteria *B. pertussis* con los factores de virulencia anteriormente descritos, que son regulados por el sistema BvgAS y los que son independientes de éste (Figura 2).

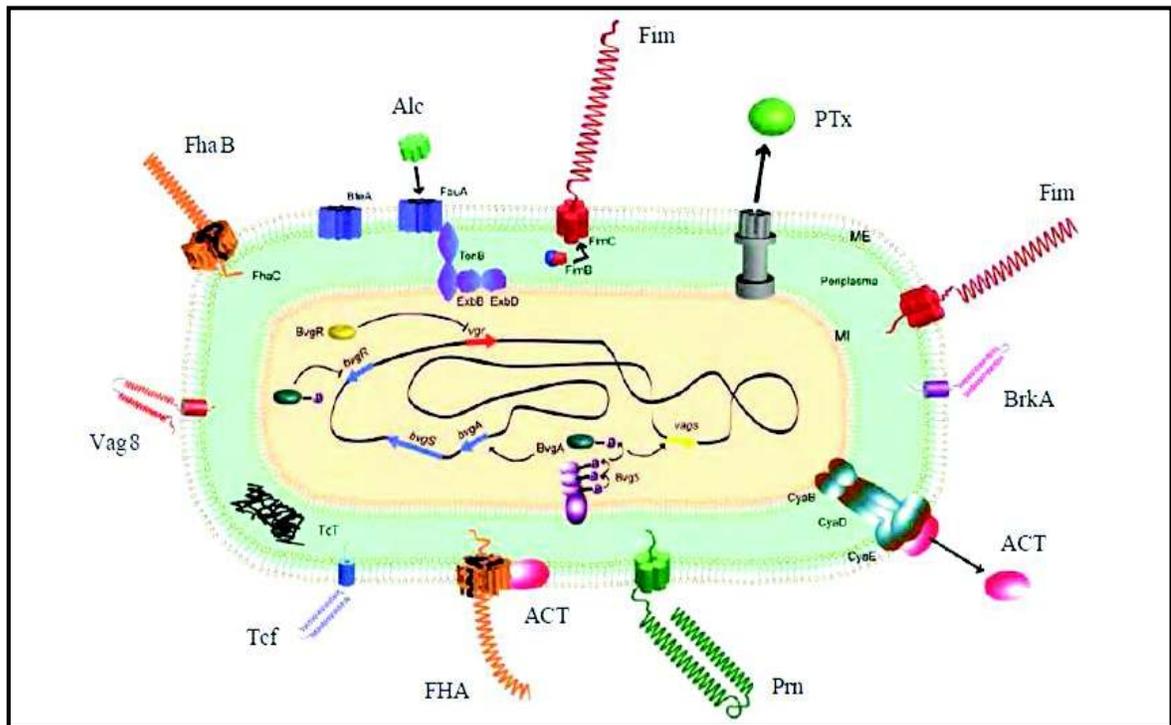


Figura 2. Representación del patógeno *B. pertussis* con sus factores de virulencia y sistema BvgAS.

Fuente: Nosedá, 2011.

### Factores de Virulencia no Regulados por el Sistema BvgAS

Entre los factores de virulencia que no son controlados por el sistema BvgAS se encuentran: citotoxina traqueal, lipopolisacáridos y sistemas de captura de hierro, entre otros que a continuación se describen.

**Citotoxina traqueal (TCT).** Esta toxina es un pequeño glicopéptido producido por la degradación del péptidoglicano que constituye la pared bacteriana y es liberado durante el crecimiento de *B. pertussis*. La TCT interacciona con las células epiteliales ciliadas causando

ciliostasis y muerte celular. La destrucción de las células epiteliales está relacionada con un aumento en la producción de óxido nítrico (ON), debido a que la citotoxina traqueal estimula la expresión de la ON sintetasa. El óxido nítrico provoca la disminución del hierro intracelular lo cual produce la inactivación de enzimas que contienen hierro, las cuales son importantes para la respiración mitocondrial y la síntesis de ADN. Como resultado de esta intoxicación celular, se ve afectada la unión entre células epiteliales y ocurre la extrusión de células ciliadas (Bergón, 2004; Carbonetti, 2007; Nosedá, 2011).

**Lipopolisacárido (LPS).** Como cualquier bacteria Gram-negativa, *B. pertussis* posee LPS en su membrana externa, una potente endotoxina bacteriana. En este patógeno la misma está constituida por una parte lipídica (lípidos A) anclada a la membrana externa y un núcleo oligosacárido. No posee antígeno O (cadena de polisacáridos), característico del LPS de la mayoría de las bacterias Gram-negativas. El LPS de *B. pertussis* es pirogénico, mitogénico e histaminosensibilizante, el lípidos A de esta molécula es la fracción con actividad endotóxica. Por otra parte, el LPS protege a *B. pertussis* de la acción de la proteína surfactante A presente en el epitelio respiratorio, evitando así la eliminación de la bacteria (Bergón, 2004; Nosedá, 2011).

**Sistemas de captura de hierro.** Una de las barreras contra microorganismos invasores que conforman el sistema de inmunidad innato del hospedero es la baja disponibilidad de hierro libre. En mamíferos, el hierro intracelular se encuentra en la forma de hemoproteínas, mientras que el hierro extracelular se encuentra unido a glicoproteínas como la transferrina y lactoferrina. Estas proteínas quelantes determinan que la concentración de hierro libre sea insuficiente para permitir el desarrollo microbiano. Sin embargo, *B. pertussis* produce un sideróforo o quelante de hierro denominado alcalgnina, capaz de extraer el hierro de las glicoproteínas quelantes del hospedero, superando así la restricción de hierro libre (Nosedá, 2011).

**Sistema de secreción tipo III (TTSS).** El TTSS asemeja una jeringa molecular por la cual una bacteria puede inyectar sus toxinas directamente desde el citoplasma bacteriano al citoplasma de las células del hospedero a través del medio extracelular. Se han hecho experimentos para demostrar *in vitro* la actividad de un sistema de secreción tipo III en *B. pertussis*. Con la utilización de cepas virulentas de *B. pertussis*, mediante técnicas moleculares se encontró que posee la maquinaria para producir un TTSS, pero a diferencia de *B. bronchiseptica*, no es posible expresarla *in vitro* debido a que *B. pertussis* no se puede cultivar en animales de experimentación (in vivo), ya que es un patógeno exclusivo del humano. Con esta evidencia se presume que *B. pertussis* utiliza este TTSS para exportar al interior de las

células del hospedero otras toxinas además de PTx, como la ACT u otras sustancias biológicamente activas, pero esto aun no se ha dilucidado por completo (Fennelly y col., 2008).

### Manifestaciones Clínicas

La forma de presentación de los síntomas al igual que muchas otras enfermedades, depende de varios factores, como la edad del paciente, vacunación o antecedentes de enfermedad previa. Sin embargo el progreso de la enfermedad se divide en tres fases, catarral, paroxística y de convalecencia, las cuales pueden durar varios meses. *B. pertussis* tiene un periodo de incubación de 9 a 10 días, a partir de los cuales los pacientes presentan síntomas catarrales, en particular tos seca aunque irritante e insidiosa, parecida a un resfriado común. Es en ésta etapa donde la bacteria puede ser aislada mediante un exudado nasofaríngeo para su detección por el laboratorio (Figura 3) (Tozzi y col., 2005; Koneman y col., 2006).

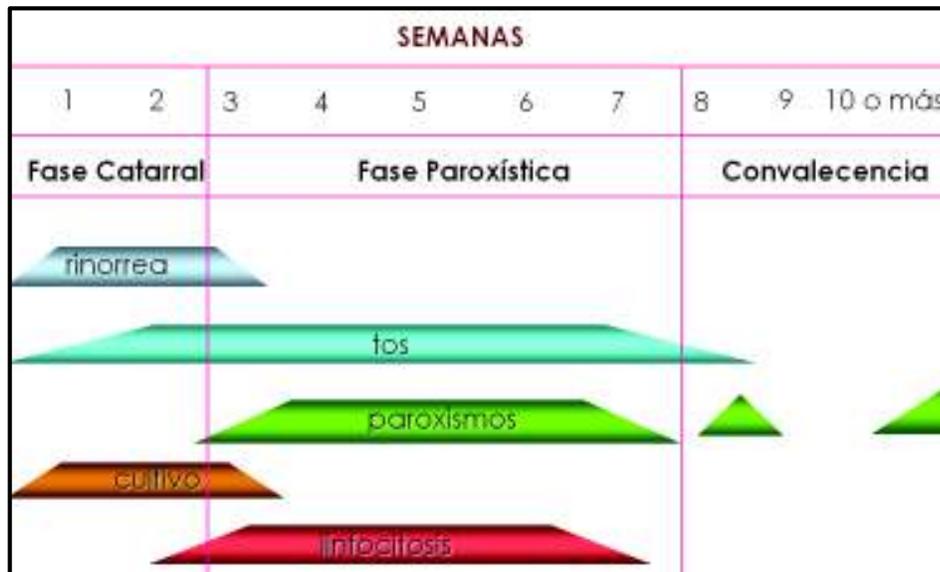


Figura 3. Manifestaciones clínicas de la tosferina clásica.

Fuente: INBRE, 2012.

En la fase paroxística, después de varias semanas de una tos seca no productiva, ésta evoluciona hasta convertirse en tos paroxística con un característico silbido espiratorio, que es

el síntoma clásico de la enfermedad, acompañada de vómito. Esta fase dura al menos 21 días, pero puede durar hasta 60 días. La mayor parte de los casos de tosferina clínicamente manifiesta, se producen en niños de 1 a 5 años de edad donde la afección es mayor, ya que además de la tos paroxística se han notificado otras complicaciones como neumonía, hipoxia, convulsiones, encefalopatía causados por los accesos de tos, infecciones respiratorias secundarias, pérdida de peso, leucocitosis con linfocitosis, algunas veces hipoglucemia y hasta la muerte en las primeras semanas o meses de vida, principalmente en los no vacunados. La tosferina es menos frecuente en adolescentes y adultos, en los cuales los síntomas pueden variar ampliamente. Por lo general cursa como una tos persistente no característica que es la única manifestación, por lo que la patología de tosferina en estos individuos ha sido pobremente estudiada, ya que pasa inadvertida y con frecuencia tiene una evolución atípica (WHO, 2007; InDRE, 2012; Ehrke, 2013).



Figura 4. Manifestaciones clínicas de la tosferina en pacientes menores de 3 meses.

Fuente: InDRE, 2012.

En la fase de convalecencia la frecuencia y severidad de los síntomas van disminuyendo gradualmente hasta que el sistema inmune logra controlar la infección y en el caso de neonatos o menores de dos meses de edad se pueden presentar más complicaciones y la muerte (Figura 4) (Quian, 2012; Carbonetti, 2007; WHO, 2010; Parkhill y col., 2003).

## **Diagnóstico por el Laboratorio**

El aspecto clínico es el primer paso para establecer el diagnóstico. Las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad generalmente son muy obvias en pacientes menores de edad, sin embargo en niños recién nacidos o de pocos meses de edad dichas manifestaciones pueden confundirse principalmente con neumonía por otros agentes patógenos. En adolescentes y adultos el cuadro clínico puede ser muy diferente y pasar desapercibido, por lo que es necesario confirmar el diagnóstico de tosferina por medio de técnicas de laboratorio las cuales pueden ser utilizadas en diferentes estadios de la enfermedad. El diagnóstico por el laboratorio se basa en métodos directos e indirectos. El diagnóstico directo consiste en identificar al microorganismo responsable de la enfermedad ya sea por cultivo o por PCR. El diagnóstico indirecto consiste en detectar anticuerpos específicos contra los componentes de la bacteria en muestras de suero de un paciente infectado (WHO, 2010; Quian, 2012).

### **Cultivo**

El cultivo es considerado por la OMS como el estándar de oro para la confirmación de casos por el laboratorio. Aunque este método es poco sensible desde el punto de vista de recuperación del microorganismo (que no es más alto del 60%), el cultivo en agar Bordet Gengou o agar Regan-Lowe es el diagnóstico más específico y su éxito se basa en la toma de muestra oportuna. Se ha reportado que la mayor recuperación se obtiene en infantes y niños no vacunados. Para lograr el mejor resultado, la toma de muestra para cultivo se debe hacer dentro de las dos a tres primeras semanas de iniciada la tos. El cultivo es una herramienta muy útil para realizar vigilancia eventual de cepas que pudieran ser antigénicamente diferentes de las vacunales (WHO, 2010; InDRE, 2012).

## Serología

La presencia de altos niveles de anticuerpos IgG anti-toxina pertussis en el suero de pacientes no vacunados indica infección. Inicialmente las pruebas serológicas fueron diseñadas para evaluar la respuesta de anticuerpos contra diferentes componentes de las vacunas, pero actualmente estos inmunoensayos son de gran utilidad para confirmar el diagnóstico de la tosferina, especialmente cuando los resultados de PCR y/o cultivos no son definitivos para el diagnóstico, sobre todo cuando se da tratamiento con antibióticos previo a la toma de muestra, lo cual afectaría directamente la recuperación de *B. pertussis* en cultivo, por lo cual la serología puede ser utilizada como método diagnóstico incluso en personas que hayan recibido vacunación recientemente (un año previo), ya que la cantidad de IgG contra toxina pertussis durante la infección por *B. pertussis* tiene un patrón único, alcanzando su máximo nivel rápidamente justo a las dos semanas de iniciada la tos y luego decae, por lo tanto se puede dar un diagnóstico de una infección reciente, pero solo si la toma de muestra se realiza en el momento oportuno. Sin embargo en infantes menores de dos meses, no es ampliamente recomendable debido a que su sistema inmune es inmaduro y existe la interferencia de anticuerpos maternos adquiridos vía transplacentaria (Sanz y De Ory, 2002; Bergón, 2004; WHO, 2010).

Las tinciones de inmunofluorescencia directa con anticuerpos específicos a partir de secreciones nasofaríngeas no son recomendadas a causa de la alta frecuencia de resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con los anticuerpos participantes debido a la naturaleza de la muestra y falsos negativos debido a debido al número de microorganismos necesarios para la visualización microscópica y a la dificultad en la interpretación de los resultados por parte de los laboratoristas (Lingappa y col., 2002; WHO, 2010).

Con el descubrimiento de diversos factores de virulencia de *B. pertussis* entre ellos la hemaglutinina filamentosa, pertactina y toxina pertussis, hoy en día existen diferentes inmunoensayos dirigidos contra éstos; en particular éste último antígeno que ha demostrado ser el inmunógeno más específico comparado con los otros factores de virulencia de la bacteria (WHO, 2010; Beltrán y col., 2011).

## PCR

Existen diferentes variantes de la técnica de PCR, la primera en utilizarse fue la PCR punto final, que emplea un molde de ADN, al menos dos cebadores específicos, dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), tampón de reacción adecuado, ADN polimerasa termoestable y la electroforesis en gel al final del proceso para la detección de los productos de amplificación de manera cualitativa. Después se creó una variante de esta técnica, que se llama PCR-TR y puede ser cuantitativa, ya que utiliza un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre la muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. Dicho fluorocromo puede estar unido a un oligonucleótido y emitir luz cuando sufre un cambio conformacional debido a la degradación de la sonda por acción de la ADN polimerasa. Así al final de cada ciclo de amplificación es cuantificada la intensidad de luz y se traduce en la cantidad exacta de ADN que hay en la solución, por lo cual es llamada también PCR en tiempo real (Pierce, 2010).

La detección específica de los ácidos nucleicos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* presentes en muestras clínicas se describió desde 1985 y desde entonces se han empleado diferentes iniciadores para esta detección. Hoy en día se emplean diferentes oligonucleótidos para la detección de este patógeno, que derivan de cuatro regiones cromosómicas del genoma de *B. pertussis*, estas son: la región promotora que codifica para la toxina pertussis, una región *upstream* (que va de 3' a 5') en el gen porina, las secuencias de inserción repetitiva *IS481* para *B. pertussis* e *IS1001* para *B. parapertussis* y la región que codifica para la producción de la toxina adenilato ciclasa. La amplificación del gen de la adenilato ciclasa no distingue entre *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Los sistemas de PCR anidada sobre la región promotora de la toxina pertussis, permiten la detección simultánea y la diferenciación de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; esta variante de la PCR punto final consiste en realizar una reacción con los llamados iniciadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana, después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica (García y col., 2006; Proberts y col., 2008; Loeffelholz, 2012).

Por el momento no existe una región específica de amplificación que pueda ser universalmente recomendada para *B. pertussis*, dada la carencia de estudios de validación y comparación entre diferentes ensayos de PCR. Aunque en los últimos años, la diana de

amplificación más utilizada ha sido la secuencia de inserción *IS481* de la cual existen 80 copias por célula aproximadamente como se muestra en la tabla 2. Esta región del genoma bacteriano junto con la del promotor de la toxina pertussis se han utilizado más frecuentemente en la detección de *B. pertussis*, con los mejores resultados obtenidos a partir de muestras clínicas. Sin embargo, se han descrito reacciones cruzadas con *B. holmesii* (Reischl y col., 2001; Register y Sanden, 2006).

Tabla 2. Secuencias de inserción en el genoma de especies de *Bordetella*.

<b>Especies (hospedero)</b>	<b>IS481</b>	<b>IS1001</b>	<b>IS1002</b>
<i>B. pertussis</i> <sub>(HUMANO)</sub>	+ (80-100)	-	+ (4-7)
<i>B. parapertussis</i> <sub>(HUMANO)</sub>	-	+ (20-21)	+ (9)
<i>B. parapertussis</i> <sub>(OVEJA)</sub>	-	+ (23-29)	-
<i>B. bronchiseptica</i> <sub>(PUERCOS)</sub>	-	+ (1-7)	-
<i>B. bronchiseptica</i> <sub>(PUERCO DE GUINEA/CABALLO)</sub>	+ (1-2)	-	-
<i>B. bronchiseptica</i> <sub>(KOALA)</sub>	-	-	+ (1)
<i>B. holmesii</i> <sub>(HUMANO)</sub>	+ (8-10)	+	-
<i>B. avium</i> <sub>(AVES)</sub>	-	-	-
<i>B. hinzii</i>	-	-	-
<i>B. trematum</i>	-	-	-

Número de copias, (+) presencia de la secuencia de inserción (IS), (-), ausencia de IS.

Fuente: Gillespie y Hawkey, 2006.

La PCR es más sensible que el cultivo bacteriano ya que tiene la capacidad de y ofrece resultados en menor tiempo, además puede ser realizada a partir de exudados y aspirados nasofaríngeos de la misma muestra que el cultivo. Aunque, cabe mencionar que la PCR es difícil de realizar y requiere reactivos y equipo más costosos (WHO, 2010).

Las técnicas de PCR representan una alternativa muy prometedora. Algunas ventajas que presenta son la mayor posibilidad que el cultivo y la serología en detectar infección en pacientes con sintomatología no definida o asintomáticos, incluso cuando ya han sido

inmunizados; también permite detectar la infección por *B. pertussis* cuando los individuos han recibido terapia antibiótica previamente, aunque la sensibilidad va disminuyendo con el tiempo de evolución de la enfermedad, con la vacunación y con edad del paciente. Su especificidad se estima por algunos autores entre 97.1 y 99.7%, que debe ser teóricamente igual a la del cultivo, pero en la práctica pueden surgir problemas de contaminación. Organizaciones como la OMS y el CDC recomiendan el empleo de esta técnica, sin dejar de realizar el cultivo debido a que la sensibilidad de éste se ve incrementada en un 40% con la PCR. También es de gran importancia un aislamiento ya que representa la posibilidad de realizar pruebas de sensibilidad y la tipificación molecular (García y col., 2006).

En la tosferina como en otras enfermedades infecciosas, conviene establecer el diagnóstico diferencial con otros posibles agentes etiológicos de manera eficaz. El criterio para la elección de la técnica diagnóstica dependerá de la evolución de la enfermedad, la edad del paciente y su estado inmunológico, de tal forma que en menores de 2 meses se recomienda más el cultivo y PCR. En niños mayores de 2 meses con o sin vacunación reciente, se debe hacer cultivo y/o PCR, pero la toma de muestra debe ser dentro los primeros días de iniciada la tos. En los adultos el cultivo se recomienda si la muestra es tomada en la fase catarral o hasta la primera semana de la fase paroxística. La PCR y serología se recomienda para aquellos pacientes que se encuentran ya en fases tardías de la enfermedad (WHO, 2007; Ehrke, 2013;).

## **Epidemiología**

Antes de que se difundiera ampliamente la vacuna celular, en las décadas de 1940 y 1950, la tosferina era una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad infantil en todo el mundo. Estudios realizados en Estados Unidos y Reino Unido sobre la incidencia de casos de tosferina en periodos diferentes (1962-1982 y 1983-2004) señalan la persistencia del patrón endémico con picos epidémicos cada 2 a 5 años y afectando fundamentalmente a niños de entre 1 y 5 años (Beltrán y col., 2011; Quian, 2012).

Después de la vacunación a gran escala durante los años cincuenta y sesenta del siglo pasado, en el mundo industrializado se produjo una extraordinaria disminución (>90%) de la incidencia y la mortalidad. Con la introducción de la vacuna de células enteras DPT (difteria-

pertussis-tétanos) alrededor de 1970, se tenía bajo control la situación de tosferina (WHO, 2010; Esteves y col., 2012).

Sin embargo en las últimas dos décadas se ha observado un notorio aumento en la incidencia de pertussis a nivel mundial, particularmente cada 3 a 4 años a pesar de amplias campañas de vacunación (Figura 5), por lo que la Organización Mundial de la Salud estima que la enfermedad por *B. pertussis* ocupa actualmente el 5° lugar entre las causas de muerte prevenibles por vacunación (Bamberger y Sruog, 2008; Quian, 2012).

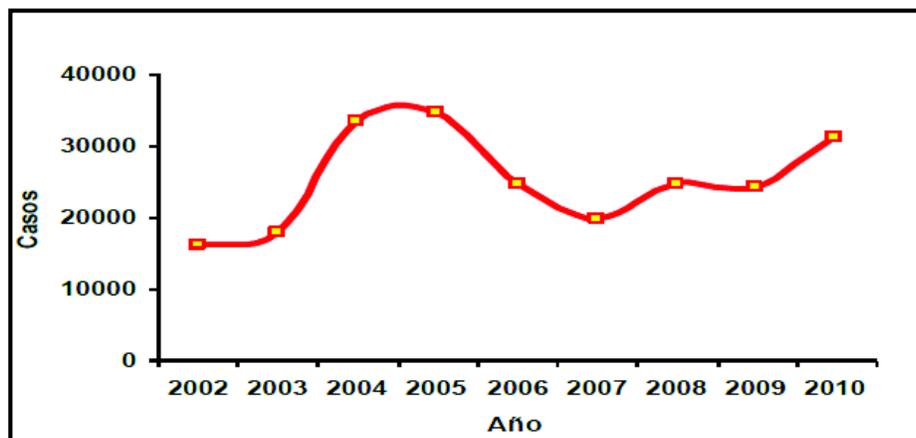


Figura 5. Ocurrencia anual de casos de tosferina en América en el periodo 2002-2010.

Fuente: Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud.

La pertussis tiene tasas de contagio entre los contactos familiares susceptibles de hasta 90%, y entre 50% y 80% en ámbitos escolares. Afecta principalmente a niños menores de 5 años y con potencial gravedad, mayor riesgo de complicaciones y mortalidad a menores de 6 meses (Noseda, 2011).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en el 2012, se ha registrado un aumento en el número de casos de tosferina en Argentina, Brasil, Colombia, Chile, Guatemala, México, Paraguay, Venezuela y los Estados Unidos de América. En marzo de 2012, en una reunión convocada por la OPS, expertos de 12 países concluyeron que la enfermedad continúa presentándose en menores de 5 años sin esquemas de vacunación completos para su edad. El

aumento de la incidencia de pertussis en los últimos años a nivel mundial, ha llevado a la OMS a declarar esta enfermedad como reemergente y reporta en los últimos años entre 30 y 50 millones de casos anuales en todo el mundo, de los cuales entre 200.000 y 400.000 pacientes han tenido un desenlace fatal, el 90% de ellas en países en desarrollo (Noseda, 2011; Quian, 2012).

Con toda esta evidencia en la actualidad, la tosferina aún representa un importante problema de salud pública tanto en los países en vías de desarrollo como los países desarrollados. Este incremento de casos de tosferina en los últimos años no es sólo en los grupos tradicionales (menores de cinco años) sino también en adolescentes y adultos. Sin embargo, la mayoría de las muertes por tosferina ocurren en lactantes de edad muy temprana para haber sido vacunados o que no cuentan con un esquema primario de vacunación contra *Bordetella pertussis* de al menos tres dosis, lo que confiere una protección mayor de 85%. Numerosos estudios recientes indican que los adolescentes y adultos infectados conforman un reservorio importante del patógeno y son una fuente de transmisión de la enfermedad a niños y lactantes, sobre todo a los no inmunizados (WHO, 2010; Beltrán y col., 2011; Esteves y col., 2012).

### **Incidencia en México**

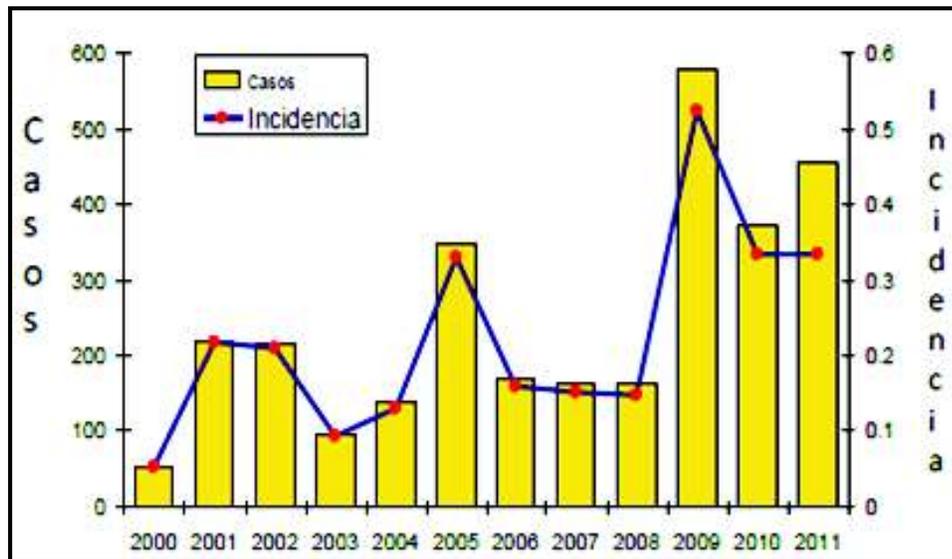
Con la introducción de la vacuna anti-pertussis de células enteras en la década de 1950, se redujo considerablemente la morbilidad y mortalidad por tosferina en México. Para la década de los 70's se creía controlado el problema. Pero a partir de 1990 se empezó a notar un incremento en el número de casos reportados, no solo en México sino en todo el mundo (Mattoo y Cherry, 2005; Bart y col., 2010; Beltrán y col., 2011).

En nuestro país se han realizado al menos cuatro estudios seroepidemiológicos para conocer el estado de inmunidad contra *B. pertussis*, el último hace más de 20 años, por lo que se desconoce cuál sea la seroprevalencia actual de anticuerpos contra *Bordetella pertussis* (Tomé y col., 2008; Esteves y col., 2012).

La encuesta seroepidemiológica realizada en México en 1987 para estimar la prevalencia de anticuerpos contra *Bordetella pertussis* mostró que la prevalencia de éstos era

menor conforme aumentaba la edad. Esto reflejaba una mayor susceptibilidad para la infección sobre todo en aquellos sujetos mayores de 10 años, donde la seroprevalencia fue menor, lo que coincide con lo reportado en otros países (Tomé y col., 2008).

Durante el periodo 2000 a 2011 la tos ferina mostró un patrón oscilatorio similar al observado en otros países, con exacerbaciones cada tres a cinco años, la última de ellas en 2009 con 579 notificados. Para 2010 se presentó un decremento para aumentar a 455 casos en 2011 (incremento de 19%) (Figura 6). Este último aumento debe tomarse con reserva, ya que en 2011 se implementó el diagnóstico mediante PCR que cuenta con una mayor sensibilidad y especificidad que el método tradicional; el 16% de los casos fue identificado mediante dicha técnica. Durante el 2011 los estados más afectados fueron Sonora con 61 casos y tasa de 2.39 por cada 100,000 habitantes, le siguieron los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Chiapas y Jalisco. Estas entidades concentraron 60% de los casos del país y la gran mayoría de los casos ocurrieron en lactantes menores de un año de edad (CoNaVe, 2012).



Sistema de vigilancia de tosferina \*por 100 mil habitantes.

Figura 6. Casos e incidencia de tosferina, México 2000 – 2011.

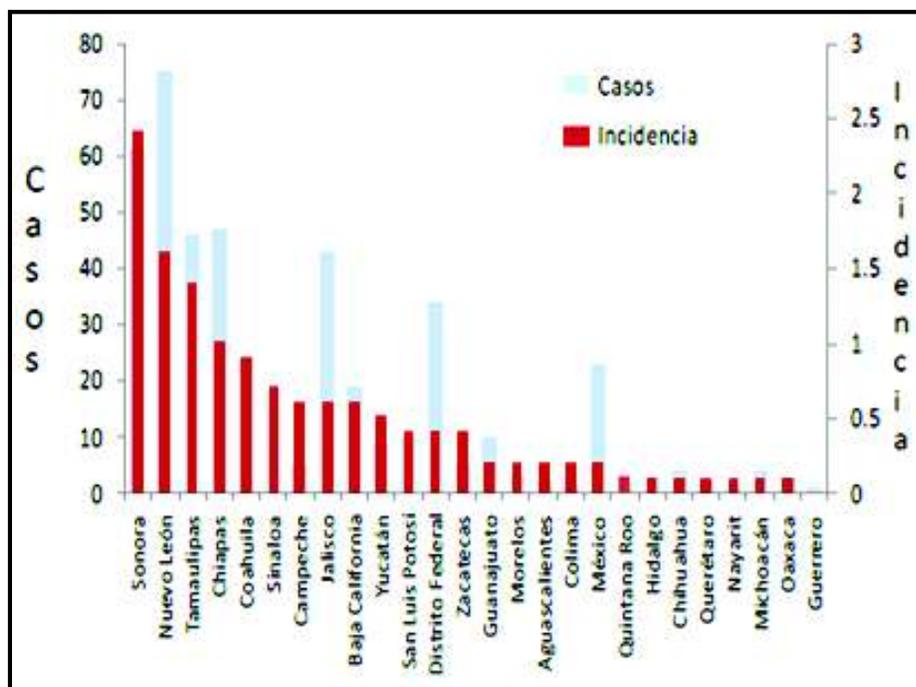
Fuente: SINAVE/DGE/S.S

En relación con la vía de contagio, estudios realizados en México han demostrado que incluso 75% de los casos de niños menores de un año de edad se infectaron en su núcleo

familiar. Al igual que en otros países cada vez existe mayor evidencia de que la inmunidad contra *Bordetella pertussis* entre la población de adolescentes y adultos ha disminuido a pesar de haberse vacunado durante la infancia, y que quizá esto haya contribuido al aumento en la susceptibilidad poblacional para padecer tosferina (Beltrán y col., 2011; Esteves y col., 2012).

En un estudio realizado en nuestro país por Ruiz-Palacios y sus colaboradores encontraron una incidencia de 98 por cada 100,000 personas-año en adolescentes de 11 a 16 años reclutados en escuelas de la Ciudad de México. Todos los casos positivos (identificados mediante PCR en tiempo real) habían recibido tres dosis de la vacuna DPT de células completas, además de las dosis de refuerzo a los 2 y 4 años de edad (Esteves y col., 2012).

En la siguiente gráfica podemos observar la incidencia y casos de tosferina en los estados de México en el año 2011 (Figura 7).



Sistema de vigilancia de tosferina \*por 100 mil habitantes.

Figura 7. Casos e incidencia de tosferina por estado, México 2011.

Fuente: SINAVE/DGE/S.S.

Como es evidente en la figura 8, Sonora continúa estando entre los estados de la república con mayor incidencia de casos de tosferina según la Dirección General de Epidemiología (DGE) de nuestro país.

ENTIDAD FEDERATIVA	Tétanos Neonatal CIE-10 <sup>®</sup> REV. A33				Tos Ferina CIE-10 <sup>®</sup> REV. A37			
	2013		2012	2013		2012		
	Sem.	Acum.		Acum.	Sem.	Acum.		Acum.
	M	F			M	F		
Aguascalientes	-	-	-	-	3	8	7	3
Baja California	-	-	-	-	-	7	16	10
Baja California Sur	-	-	-	-	-	8	5	-
Campeche	-	-	-	-	-	-	1	4
Coahuila	-	-	-	-	-	5	3	-
Colima	-	-	-	-	-	1	1	-
Chiapas	-	-	-	-	-	4	10	3
Chihuahua	-	-	-	-	-	2	2	-
Distrito Federal	-	-	-	-	-	5	8	12
Durango	-	-	-	-	-	9	7	1
Guanajuato	-	-	-	-	7	3	8	-
Guerrero	-	-	-	-	-	-	-	5
Hidalgo	-	-	-	-	-	-	1	1
Jalisco	-	-	-	-	-	7	8	10
México	-	-	-	-	-	2	11	13
Michoacán	-	-	-	-	-	3	4	-
Morelos	-	-	-	-	-	-	1	-
Nayarit	-	-	-	-	1	-	1	3
Nuevo León	-	-	-	-	-	24	26	81
Oaxaca	-	-	-	-	1	1	1	-
Puebla	-	-	-	-	-	-	-	-
Querétaro	-	-	-	-	-	4	5	3
Quintana Roo	-	-	-	-	-	-	-	-
San Luis Potosí	-	-	-	-	-	9	9	8
Sinaloa	-	-	-	-	-	1	1	-
<b>Sonora</b>	-	-	-	-	-	22	31	59
Tabasco	-	-	-	-	-	-	-	-
Tamaulipas	-	-	-	-	-	4	2	10
Tlaxcala	-	-	-	-	4	3	1	-
Veracruz	-	-	-	-	-	4	-	4
Yucatán	-	-	-	-	2	3	2	2
Zacatecas	-	-	-	-	-	4	2	2
<b>TOTAL</b>	-	-	-	-	18	143	174	232

Figura 8. Casos por entidad federativa de enfermedades prevenibles por vacunación hasta la semana epidemiológica 22 de 2013.

Fuente: SINAVE/DGE/SALUD 2013.

## Reemergencia

Después de casi 60 años de uso intensivo de vacunas, se comprueba el creciente carácter persistente de *B. pertussis* por lo que la ha llevado a ser objeto de numerosos estudios en las últimas décadas. Según datos obtenidos por el Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) en 2004 el número de casos aumentó 19 veces en personas entre 10 y 19, años y 16 veces en personas mayores de 20 años respecto del período 1990-1993. Por lo tanto, se especula que la infección con *B. pertussis* es en realidad endémica en adolescentes y adultos, pero no es claro si hay un verdadero incremento o existe un mayor reconocimiento en estos grupos de edad, ya que en ellos la enfermedad cursa como un catarro normal, aunque prolongado, pero por lo general sin mayores complicaciones. Lo que sí es un hecho es que son una potencial fuente de transmisión del patógeno hacia individuos más susceptibles (Noseda, 2011; Quian, 2012).

El resurgimiento de la enfermedad se ha atribuido a diversos factores, como el abandono de los calendarios de vacunación, el corto periodo de inmunidad conferida por la vacuna, la adaptación del patógeno, la disminución de las coberturas de vacunación y en parte por la mayor eficiencia de los laboratorios y mejores métodos para confirmar el diagnóstico en algunos países, así como una mejor capacidad para reconocer la enfermedad en adolescentes y adultos (Bergón, 2004; Mooi y col., 2009; Beltrán y col., 2011; Esteves y col., 2012).

Existe evidencia científica de que *B. pertussis* se ha valido de mutaciones genéticas como estrategia de adaptación. La diversidad antigénica se ha detectado entre aislados clínicos y cepas vacunales, y está asociado con el polimorfismo de genes precursores de sus factores de virulencia y principales inmunógenos, como es el caso de la toxina pertussis, fimbria y pertactina, generalmente mediante mutaciones puntuales. Al cambiar por consiguiente los epítopes para dichos factores de virulencia, el sistema inmunológico no los reconoce fácilmente, ya que la inmunidad adquirida por la vacuna, solo reconoce el epítope de una cepa vacunal de la que se hicieron miles de vacunas, lo cual deja susceptible a la población de desarrollar la enfermedad aún que hayan sido vacunados, lo que se ve reflejado en el incremento de casos de tosferina año con año (Mooi y col., 2009; Noseda, 2011).

Otros estudios realizados han demostrado una marcada plasticidad en algunos aislados de *B. pertussis*, encontrando una significativa reducción en el tamaño del genoma de la

bacteria, el cuál es significativamente más pequeño que los de otras especies de *Bordetella*, sugiriendo otro mecanismo de adaptación del patógeno. Análisis de poblaciones de *B. pertussis* sugieren que están evolucionando con el tiempo, como ha sido demostrado mediante electroforesis en gel en campos pulsados, y secuenciando los genes estructurales de sus factores de virulencia, como pertactina, y la subunidad S1 de la toxina pertussis. Una hipótesis para explicar esta deriva genética consiste en que las cepas circulantes antes de la vacunación son diferentes a las cepas circulantes hoy en día, y que esto ha sido provocado precisamente por la vacunación. Utilizando microarreglos fue demostrado en Francia, que existe un decrecimiento temporal en la densidad genética, con pérdida de pseudogenes o genes que no son importantes para la virulencia de la bacteria (Parkhill y col., 2003; Ehrke, 2013).

## MATERIALES Y METODOS

### Selección de Muestras

En el presente trabajo, inicialmente se utilizó una cepa de referencia de *B. pertussis*. Después de determinar las condiciones óptimas para la estandarización del método, se seleccionaron 181 muestras de ADN congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  provenientes de muestras de exudados nasofaríngeos que fueron procesadas anteriormente por la técnica de PCR-TR y determinadas como positivo a *B. pertussis*. Las cepas utilizadas para estandarizar la PCR fueron *B. pertussis* ATCC 8467 proporcionada por el laboratorio de Control de Medios del LESPSON y las cepas de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* recuperadas por el Laboratorio de Microbiología Epidemiológica del LESPSON. Se seleccionaron también 23 muestras ADN determinadas como negativo a *B. pertussis* por la técnica de PCR-TR. Las muestras de ADN bacteriano fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular del LESPSON.

Para comprobar cuáles de las muestras presentaban ADN desnaturalizado, se procedió a realizar una corrida electroforética con gel de agarosa al 2% con 5  $\mu\text{L}$  de las muestras de ADN, el cual debía correr a través del gel de manera íntegra. Las muestras de ADN que presentaron un barrido en el gel o donde no se observó nada fueron, 34 de las 181 muestras positivas por PCR-TR y se excluyeron de este estudio. A las 23 muestras de ADN negativas utilizados para la estandarización, también se les realizó este procedimiento, pero se observó que todas se encontraban en buen estado (Hernández, 2012).

### Extracción de ADN

#### Lisis Mini Rápida de Colonia

Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de lisis ((agua grado HPLC, 0,0336 g de EDTA (2mM), 0,1211 g de tris base (20mM), 0,25 mL de triton X-100 (0.5%), pH 8)) a 3 tubos eppendorf, después se

tomaron 3 colonias de la placa y se colocaron en el tubo correspondiente, agitando suavemente el asa para asegurarse de dejar todas las colonias disueltas en la solución de lisis. Se colocaron los tubos en el baño maría por 20 minutos a 100 °C, después de este tiempo las muestras se colocaron en una gradilla isofreeze y se almacenaron a -20°C para su uso posterior (García, 2009).

### **Extracción por Columna**

La técnica de extracción por columna QIAamp DNA Mini Kit casa comercial Qiagen (concentración de reactivos, no disponible en el inserto), comprende los siguientes pasos: en un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregaron 20 µL de proteinasa K, 200 µL de muestra (en este caso la suspensiones preparadas con 1 colonia bacteriana en 1 mL de agua grado biología molecular) y 200 µL de buffer AL. Se agitó por vórtex durante 15 segundos y se incubó a 56°C por 10 minutos, posteriormente se dio un pulso centrifuga, después se añadieron al tubo 200 µL de etanol absoluto (96-100%), se agitó por vórtex durante 15 segundos y se dio un pulso centrifuga. Posteriormente se pasaron 620 µL a una columna QIAamp y se centrifugó a 6000 g por 1 minuto y se descartó el tubo con el filtrado. Se colocó la columna en un tubo contenedor limpio y se añadieron 500 µL de buffer AW1. Se centrifugó de nuevo a 6000 g por 1 minuto y se descartó el tubo con el filtrado. Se colocó la columna en un tubo contenedor limpio y se añadieron 500 µL de buffer AW2. Se centrifugó a 10,000 g por 1 minuto y se descartó el tubo con el filtrado. Se colocó la columna en un tubo contenedor limpio de 1.5 mL y se añadieron 100 µL de buffer AE. Se incubó el tubo a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 6000 g por 2 minutos. Por último el filtrado se congeló a -70°C (Hernández, 2012).

## PCR Punto Final

### Condiciones de Reacción

Para determinar las condiciones de reacción se hicieron ensayos variando temperatura de alineación utilizando ADN de la cepa de referencia *B. pertussis* ATCC 8467. Se emplearon los iniciadores que se muestran en la tabla 3.

Para realizar la PCR se desinfectó el gabinete con benzal al 1% o hipoclorito de sodio al 0.1%, se encendía la luz ultravioleta por 15 minutos antes de realizar la mezcla de reacción, además de asegurar la esterilización previa del material a utilizar como microtubos y puntillas. Se utilizó el equipo de protección adecuado como, bata, cofia, guantes de nitrilo y zapatones para evitar contaminación del área de trabajo y los reactivos

Se seleccionaron los iniciadores para realizar la amplificación de la secuencia de inserción *IS481* que se muestra en la tabla 3, se encuentra presente en gran número de copias en el genoma de *B. pertussis*, de la cual posteriormente se detectó una banda de 424 pares de bases (InDRE, 2012).

Tabla 3. Iniciadores para la amplificación del elemento de inserción *IS481*.

Iniciador	Secuencia	Producto
Bp 168	5'-GAC TTC GTC TTC GTG GCC AT-3'	424 pb
Bp 169	5'- TCG TCC AGG TTG AGT CTG GA -3'	

Fuente: InDRE, 2012.

La preparación de la mezcla de reacción (tabla 4), se realizó de acuerdo al número de muestras a procesar, siempre incluyendo como control positivo de PCR la cepa de referencia *B. pertussis* ATCC 8467 y como blanco de PCR la mezcla de reacción solamente. Para el control negativo se utilizaron 23 muestras de ADN negativo a *B. pertussis*, provenientes de exudados nasofaríngeos y validadas por el InDRE como tales.

Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR punto final para *B. pertussis*.

Reactivo	Volumen 20 $\mu$ L	Concentración final
Agua grado BM	13.375 $\mu$ L	-
Buffer 10X PCR	2.5 $\mu$ L	1 X
Iniciador (Bp 168) 100 pmol/mL	0.25 $\mu$ L	20 pmol/mL
Iniciador (Bp 169) 100 pmol/mL	0.25 $\mu$ L	20 pmol/mL
dNTPs mezcla 10 mM	0.5 $\mu$ L	0.25 mM
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3.0 $\mu$ L	3.75 mM
GoTaq DNA polimerasa 5 U/ $\mu$ L	0.125 $\mu$ L	0.03125 U/ $\mu$ L

Fuente: InDRE, 2012.

Se colocaron 20  $\mu$ L de la mezcla de reacción y 5  $\mu$ L de la muestra de ADN, dando un volumen total de 25  $\mu$ L. Para la amplificación del material genético, los tubos se colocaron en un termociclador de tipo eppendorf Mastercycler con el programa de amplificación BORDETEL (tabla 5) para la amplificación de la secuencia de inserción /S481:

Tabla 5. Condiciones del programa de amplificación BORDETEL.

	Tiempo		Temperatura
40 Ciclos	2 minutos	a	94°C
	1 minuto	a	94°C
	1 minuto	a	60°C
	2 minutos	a	72°C
	5 minutos	a	72°C

Fuente: InDRE, 2012.

Una vez finalizada la corrida, los productos de amplificación se guardaron a 4°C para ser sometidas a electroforesis.

### **Detección de los Productos Amplificados por PCR punto final**

Para la detección de los productos amplificados, se prepararon geles de agarosa al 2%, para lo cual se pesaron 0.5 g de agarosa y se mezclaron con 25 mL de regulador TBE 1X, luego se agregaron 2.5 µL Gel Star® con el fin de revelar las bandas.

El gel se colocó sobre una cámara de electroforesis conectada a una fuente de poder. En el primer carril se colocó el marcador de tamaño molecular 100 pb Ladder (4 µL del marcador con 1 µL de azul de bromofenol). Los productos de amplificación obtenidos se colocaron a partir del carril 2 (10 µL del producto con 2 µL azul de bromofenol), y se sometieron a electroforesis con el regulador TBE 1X. Las condiciones de corrimiento fueron a 100 voltios durante 30 minutos, con estas condiciones se observaron los mejores resultados (García, 2009).

### **Restricción con la Enzima *AluI***

La preparación de la mezcla de reacción para la enzima de restricción (tabla 6) se realizó de acuerdo al número de muestras a procesar y siempre incluyeron control positivo, negativo y blanco en cada corrida electroforética.

Tabla 6. Mezcla de reacción para restricción con enzima *A/ul*

Reactivo	Volumen 15 $\mu$ L	Concentración final
Agua grado HPLC	12.13 $\mu$ L	-
Buffer 10X PCR	2 $\mu$ L	1X
BSA acetilado 10 $\mu$ g/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L	0.133 $\mu$ g/ $\mu$ L
Enzima <i>A/ul</i> I 10 U/ $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	0.333 U/ $\mu$ L

Fuente: InDRE, 2012.

En un microtubo de 200  $\mu$ L se dispensaron 15  $\mu$ L de la mezcla de reacción y 5  $\mu$ L de la muestra (producto de amplificación de PCR) dando un volumen total de 20  $\mu$ L. Posteriormente las muestras se colocaban en una incubadora a 37°C por 4 horas, condiciones que le permiten a la enzima *A/ul* hacer los cortes en una secuencia específica del ADN bacteriano, transcurrido este tiempo se guardaban a 4°C para su posterior análisis por electroforesis.

### Detección de los Productos de Restricción

Para la detección de los productos de restricción, se prepararon geles de agarosa NuSieve al 4%, para lo cual se pesaron 1.0 g de agarosa y se mezclaron con 25 mL de regulador TBE 1X, después se agregaron 2.5  $\mu$ L Gel Star® con el fin de revelar las bandas.

El gel se colocó sobre una cámara de electroforesis conectada a una fuente de poder; en el primer carril se colocó el marcador de tamaño molecular 100 pb Ladder (4  $\mu$ L del marcador con 1  $\mu$ L de azul de bromofenol). Los productos de restricción obtenidos se colocaron a partir del carril 2 (10  $\mu$ L del producto con 2  $\mu$ L azul de bromofenol), y se sometieron a electroforesis con el regulador TBE 1X. Los productos de restricción con *A/ul* se corrieron a 80 voltios durante 100 minutos, y después se agregaron 10 minutos más a la corrida para lograr una mejor separación de las bandas (García, 2009).

Los geles fueron analizados en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora mediante el programa TotalLab (Nonlinear, dynamics, USA) el cual es un software que determina el tamaño

de banda de los geles y los resultados que arroja son verificables en una hoja de Excel, proporcionando un dato exacto del número de pares de bases que contiene cada banda presente en un gel de electroforesis (Hernández, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el LESPSON actualmente se emplea la técnica de PCR-TR para la detección de *B. pertussis* y otras especies importantes del género *Bordetella*, para contribuir con el diagnóstico de tosferina. Pero ante la posibilidad de no contar con los reactivos necesarios para realizar dicha técnica de detección, el LESPSON quiere asegurar el diagnóstico de tosferina teniendo una alternativa a esta técnica. Para ello, se definieron las condiciones de PCR punto final óptimas, en base a las empleadas antes de que se utilizara PCR-TR y que proporcionen los resultados de calidad esperados.

El primer paso fue determinar el volumen de trabajo necesario para cada reacción, comparando la enzima anterior y la que se utilizó ahora, y se encontró que ambas enzimas son muy similares y no fue necesario hacer modificaciones en las concentraciones de trabajo para la enzima GoTaq DNA Polymerase y los otros reactivos de la reacción de PCR que se utilizaron en este estudio con respecto a la enzima anterior. En la tabla 7 se muestran las concentraciones de trabajo para las dos enzimas, a manera de comparación.

Para realizar la estandarización de esta técnica, fueron seleccionadas las cepas de *B. pertussis* ATCC 8467 proporcionada por el laboratorio de Control de Medios del LESPSON y los aislamientos bacterianos de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* recuperadas de muestras clínicas por el laboratorio de Microbiología Epidemiológica del LESPSON y confirmadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE).

Para definir las condiciones de la técnica de PCR punto final, el siguiente paso fue la extracción del ADN bacteriano partiendo de la cepa y los aislamientos seleccionados, por medio de la técnica de extracción de lisis mini rápida que es empleada en el LESPSON. Se eligió este método de extracción debido a que las bacterias que comprenden el género *Bordetella* pertenecen al grupo de los Gram negativos por poseer una delgada capa de peptidoglicano, el cual es un constituyente básico de la pared celular en éstas. Es el responsable de la rigidez de la pared celular y proporciona la resistencia frente a la lisis osmótica. Este polímero de azúcares y aminoácidos cuya estructura es N-acetil glucosamina  $\beta$  1, 4 N-acetil murámico-tetrapéptido, se puede romper relativamente fácil por choque osmótico y calor dejando el material genético expuesto. Al contar un una cepa pura y caracterizada, suele ser más sencilla la extracción de

ADN, debido a que se han eliminado sustancias que pudieran interferir en la reacción de PCR (García, 2009).

Tabla 7. Comparación entre concentraciones de trabajo de la enzima AmpliTaq Gold DNA Polymerase y la Go Taq DNA Polymerase.

Reactivo	Concentración final para 50 µL	
	AmpliTaQ Gold	Go Taq
Agua grado BM	-	-
Buffer 10X PCR	1.5 mM	1.5 mM
Iniciador (Bp 168) 20 pmol/mL	0.2 - 1.0 µM	0.1-1.0 µM
Iniciador (Bp 169) 20 pmol/mL	0.2 - 1.0 µM	0.1-1.0 µM
dNTPs mezcla 10 mM	0.2 mM por cada dNTP	0.2 mM por cada dNTP
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.0 - 4.0 mM	3.0 mM
ADN templado	<1µg/50µL de reacción	<0.5µg/50µL de reacción
DNA polimerasa 5 U/µL	1.25 U	1.25 U
Valores obtenidos a partir de los insertos del fabricante. AmpliTaq Gold DNA polymesare Applied Biosystems y Go Taq DNA polymesare Promega.		

Fuente: Método de prueba M-016-BM validado en el LESPSON.

Cuando los productos de esta primera PCR fueron sometidos a electroforesis, no se observó amplificación. Dado que los resultados no fueron los esperados para la enzima a probar, se procedió a determinar en qué parte del proceso de PCR se debían definir las condiciones óptimas para detectar el producto esperado. Se determinó revisar las condiciones de la técnica de extracción de ADN, la mezcla de reacción de PCR y las condiciones de temperatura y tiempo del programa de amplificación BORDETEL.

Se verificaron las condiciones de amplificación, iniciando con la temperatura de alineación (60°C) en función a los iniciadores empleados, ya que cuando dicha temperatura es muy alta o muy baja los iniciadores no logran unirse adecuadamente a la secuencia complementaria del ADN molde, lo cual reduce la posibilidad de amplificación y se traduce en la reducción o ausencia de productos de amplificación en el gel de electroforesis. Revisando el inserto de los iniciadores Bp 168 y Bp 169 ambos compuestos por 20 nucleótidos de los cuales su porcentaje de Guanina-Citosina es de 55.0%, de acuerdo a esto, se sugiere una temperatura de alineación de 62°C para ambos iniciadores, y verificando también el inserto de la enzima GoTaq se sugiere una temperatura de alineación de entre 42°C y 65°C, por lo cual se probaron las diferentes temperaturas (45°C, 55°C y 65°C) esperando la amplificación de la secuencia /S481, pero se obtuvo el mismo resultado negativo, por lo que se descartó la posibilidad de que la temperatura de alineación de 60°C no fuera adecuada para esta amplificación.

Se pensó entonces en la posibilidad de que la amplificación no se detectó, debido a la presencia de inhibidores de la polimerasa provenientes de los medios de cultivo de conservación donde se encontraban las cepas, y se realizó de nuevo la extracción de ADN por la técnica de lisis mini rápida, pero esta vez utilizando 100 µL de la suspensión bacteriana de cada una de las especies de *Bordetella*, (excepto de *B. bronchiseptica* ya que no se contaba con suspensión bacteriana de ésta).

Las suspensiones bacterianas fueron enviadas por el InDRE para ser empleadas durante el proceso de estandarización de la técnica de PCR-TR como control positivo de la técnica de extracción de ADN por columna de afinidad (equipo comercial Qiagen) para detectar *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*. Cuando se procesaron las muestras provenientes de dichas suspensiones por la técnica de PCR punto final, se obtuvieron los resultados esperados, detectándose la banda característica de 424 pb solo de las suspensiones bacterianas de *B. pertussis* y *B. holmesii* (figura 9).

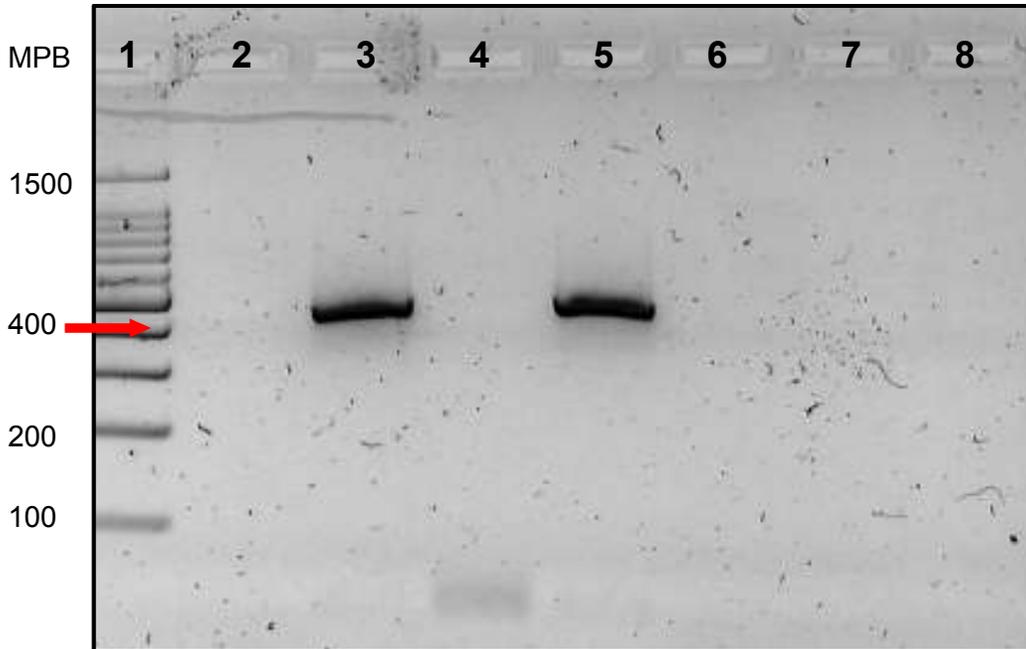


Figura 9. Productos de PCR a partir de suspensiones bacterianas proporcionadas por el InDRE de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* utilizando el método de extracción por lisis mini rápida. Carril 1: Marcador de longitud 100 pb; Carril 3: *B. pertussis*; Carril 4: *B. parapertussis*; Carril 5: *B. holmesii*; Carril 8: Blanco de PCR. A la izquierda del gel se indica el tamaño en pares de bases del Marcador Molecular.

Estos resultados confirman la presencia del elemento de inserción *IS481* en el genoma de *B. pertussis* y *B. holmesii* y no en el de *B. parapertussis*. Al detectarse estos productos de amplificación, se descartan problemas con la mezcla de reacción (concentración de reactivos) principalmente con la concentración del  $MgCl_2$ , ya que la ADN polimerasa utiliza  $Mg^{+2}$  como cofactor, y si éste no se encuentra en una concentración adecuada, puede afectar negativamente la amplificación del ADN molde. De igual manera, con este resultado positivo se descartan problemas con las condiciones de temperatura del programa BORDETEL y se sustenta la probabilidad de que en el primer caso de extracción por la técnica de lisis mini rápida, no se haya detectado amplificación debido a inhibidores de enzima ADN polimerasa, provenientes del medio de cultivo de conservación donde se encontraban la cepa y los aislamientos bacterianos empleados.

A la par se realizó la PCR punto final con muestras de ADN de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* que se utilizan como control positivo en la técnica de PCR-TR y se observó la amplificación de la banda característica de 424 pares de bases en *B. pertussis* y *B. holmesii* lo cual concuerda con los resultados anteriores. También se encontró que debía ajustarse el tiempo y el voltaje en la corrida electroforética, ya que no se observó una separación adecuada entre las bandas del marcador de longitud.

Asimismo, se consideró que el método de extracción de ADN por lisis mini rápida no era el apropiado para procesar las cepas a partir del medio de cultivo de conservación en que se encontraban, debido a contaminantes orgánicos e inorgánicos procedentes del medio, los cuales no son depurados por este método, ya que en la técnica de lisis mini rápida, como su nombre lo indica, solamente se lisa a las bacterias por acción de detergentes que contiene el buffer de lisis y calor, dejando el material genético expuesto, pero no es separado de este medio. El agar Regan-Lowe donde se encontraba las cepas de *B. pertussis* ATCC 8467 y los aislamientos de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, es un medio selectivo y de enriquecimiento, preparado con agar carbón y sangre de caballo desfibrinada, además puede estar adicionado con antibióticos como la cefalexina o anfotericina B opcionalmente (en este caso cefalexina), sobre todo cuando la muestra proviene de exudados nasofaríngeos (aunque éste no es el caso de la cepa de referencia *B. pertussis* 8467) debido a esto, constituye un medio altamente concentrado, cuyos suplementos pudieron llegar hasta la muestra al momento de tomar las colonias y actuar como inhibidores de la *Taq* polimerasa como es el caso de proteínas y carbohidratos, los cuales tienen la capacidad unirse a los iones de magnesio, impidiéndoles estar disponibles para la polimerasa, interfiriendo así con la reacción de amplificación por PCR (Moreira, 1998; Hernández y col., 2004; Koneman y col, 2006).

Debido a lo anterior, elegimos el método de extracción por columna en membranas de sílice-gel, que es uno de los métodos más selectivos y que ofrecen un mayor rendimiento; además permiten seleccionar solo el material genético de la muestra, los cuales se adhieren a la membrana y los contaminantes tales como cationes divalentes y proteínas que pueden actuar como inhibidores en la reacción de PCR, son eliminados en una serie de pasos de lavado, dejando solo el ADN en la membrana para ser eluido en un último paso (UNAM, 2007).

La metodología de extracción de ADN por columna se empleó con las suspensiones bacterianas hechas a partir de la cepa de *B. pertussis*, y los aislamientos bacterianos de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. En este caso si se detectaron los productos de amplificación como se muestra en la figura 10.

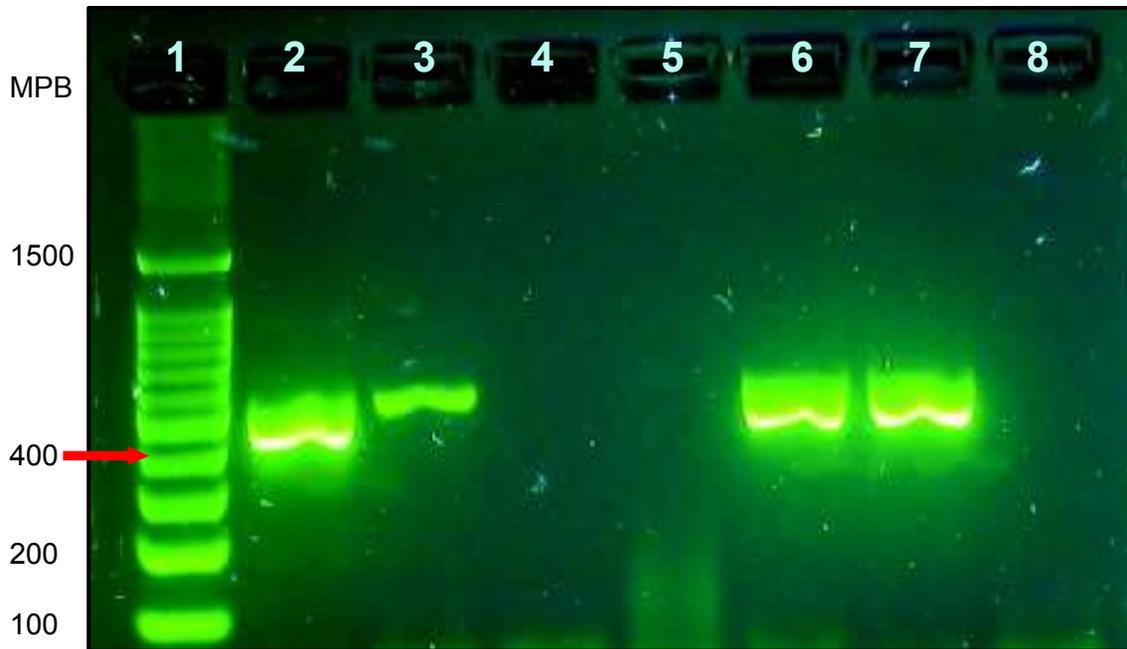


Figura 10. Productos de PCR de la cepa de referencia de *B. pertussis* ATCC 8467 y aislamientos de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* recuperados en el LESPSON (cada una por duplicado). Carril 1: Marcador de longitud 100 pb; Carril 2: *B. pertussis* (1) ATCC 8467; Carril 3: *B. pertussis* (2) ATCC 8467; Carril 4: *B. parapertussis* (1); Carril 5: *B. parapertussis* (2); Carril 6: *B. bronchiseptica* (1); Carril 7: *B. bronchiseptica* (2); Carril 8: Blanco de PCR. A la izquierda del gel se indica el tamaño en pares de bases del Marcador Molecular.

La detección de bandas de aproximadamente 424 pares de bases se corroboró por medio del programa TotalLab, lo que confirma la presencia del elemento de inserción *IS481* en la cepa y el aislamiento bacteriano de *B. bronchiseptica*, y no se encontró amplificación a partir del aislamiento clínico de *B. parapertussis*.

El *IS481* es un elemento de inserción repetitivo en el genoma de la bacteria, es decir, se encuentra en múltiples copias, alrededor de 50 a 238 por cada célula de *B. pertussis*, por lo que se buscaba la amplificación de ADN proveniente de la cepa de *B. pertussis* ATCC 8467 ya que se trata de una secuencia altamente conservada en esta especie. Respecto a *B. holmesii*, a diferencia de lo que se pensaba (que era un elemento exclusivo de *B. pertussis*), diversos estudios han confirmado que el elemento *IS481* si se encuentra en esta especie. El elemento de inserción también se encuentra presente aunque en un menor número de copias en el genoma de *B. bronchiseptica*. Donde no se encontró y tampoco se esperaba amplificación fue en el

aislamiento de *B. parapertussis* ya que ésta especie no presenta dicho elemento de inserción (Diavatopoulos y col., 2005; Register y Sanden, 2006; InDRE, 2012).

La detección de los productos de restricción se realizó en gel de agarosa NuSieve al 4% que es utilizada para detectar fragmentos pequeños de ADN con mayor resolución debido a que polimeriza uniformemente. De igual manera fueron analizadas por el programa TotalLab para corroborar que las dos bandas obtenidas eran de 224 y 200 pb (InDRE, 2012).

Con todos los elementos necesarios para la reacción de PCR, se inició el procesamiento de las 181 muestras de ADN positivo a *B. pertussis* a 100 voltios y 35 minutos, fueron las condiciones donde se obtuvieron mejores resultados. Al realizar la detección de los productos de PCR en geles de agarosa al 2%, se obtuvo una cantidad considerable de resultados negativos, es decir, no hubo amplificación en algunas de las muestras que se esperaba fueran positivas por PCR punto final. Fue necesario entonces determinar si estos resultados se debían a que el ADN de las muestras se encontraba desnaturalizado o por la diferencia de sensibilidad entre ambas técnicas de PCR.

Un factor a considerar es el largo período o inadecuado almacenamiento, ya que el ADN de las muestras puede sufrir cambios como desnaturalización o degradación. Aunque no debería pasar esto, ya que las muestras de ADN seleccionadas para el estudio se encontraban almacenadas a -20°C, lo cual es la temperatura adecuada de preservación de este material genético. Podría haber ocurrido, que después de procesar las muestras por primera vez, quedaran almacenadas más tiempo del correspondiente en una temperatura de 0 a 4°C en el área de templado, propiciando la desnaturalización del ADN (InDRE, 2012).

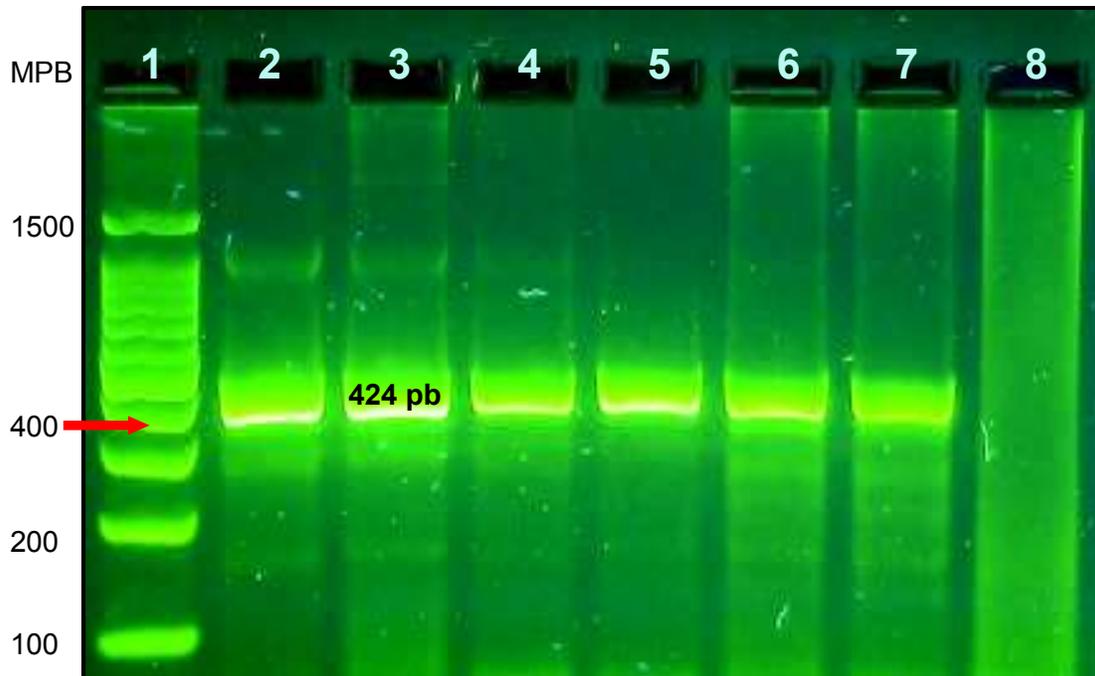


Figura 11. Productos de PCR de muestras de ADN positivo a *B. pertussis* por PCR-TR y positivo al elemento de inserción *IS481* por PCR punto final. Carril 1: Marcador de longitud 100 pb; Carril 2: Control positivo (cepa *B. pertussis* ATCC 8467); Carril 3: muestra 936; Carril 4: muestra 951; Carril 5: muestra 991; Carril 6: muestra 992; Carril 7: muestra 1001; Carril 8: Blanco de PCR. A la izquierda del gel se indica el tamaño en pares de bases de marcador de longitud.

En la última parte del proceso, una vez detectada la amplificación de los productos de PCR punto final, se realizó la digestión de las muestras de ADN positivas por este método con la enzima de restricción y posteriormente electroforesis (80 voltios 110 minutos). En la figura 12 se aprecia el corte de la endonucleasa aproximadamente a la mitad del fragmento de ADN amplificado anteriormente en estas muestras.

La secuencia blanco de esta enzima de restricción es 5'AGCT 3'TCGA, y es muy común en genomas de un gran número de especies, como resultado de la evolución de las bacterias contra bacteriófagos, y para protegerse de ADN exógenos en los intercambios genéticos. Este mecanismo les permite realizar cortes en los ADN exógenos que ingresan a la bacteria, e inactivarlos. Estas enzimas han sido utilizadas en gran cantidad de procedimientos de biología molecular en las últimas décadas. En el LESPSON se ha utilizado esta enzima como parte de

las técnicas moleculares para contribuir al diagnóstico de tosferina debido a que, la secuencia blanco de estas endonucleasas de restricción se encuentra casi a la mitad de la secuencia /S481, por lo cual observamos las dos bandas de 224 y 200 pb, provenientes del corte de una de 424 pb, que es la secuencia de inserción amplificada por la PCR punto final, lo que nos garantiza que el ADN que analizamos, proviene de una especie de *Bordetella* que contiene esta secuencia de inserción (Pierce, 2010; InDRE, 2012).

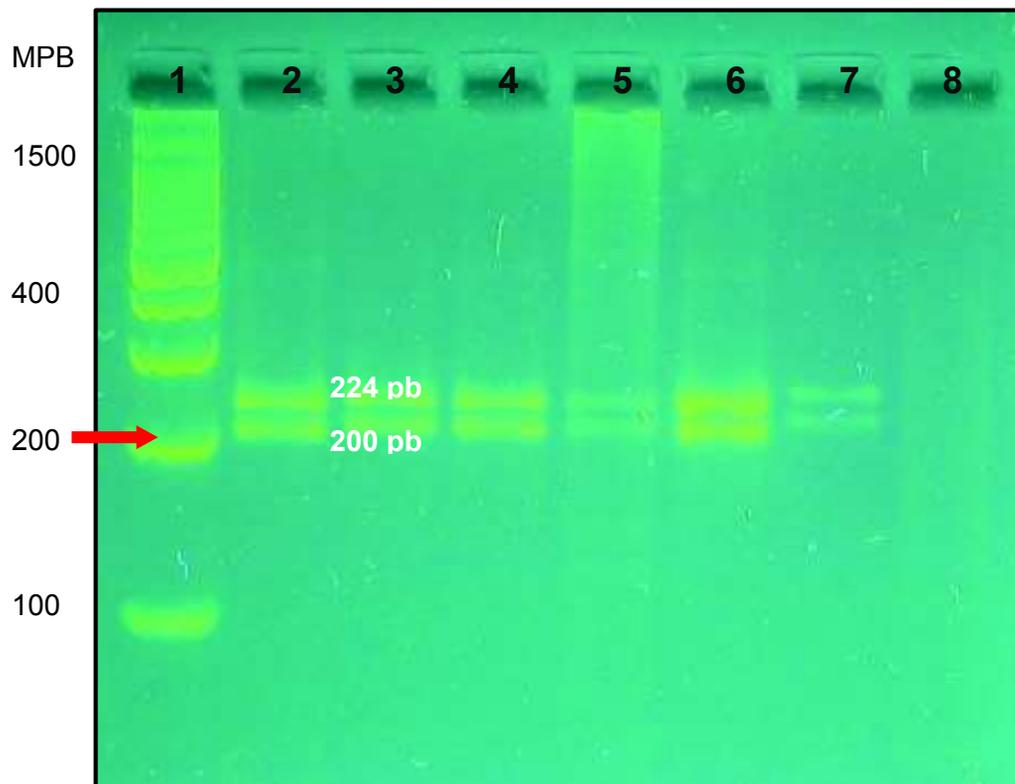


Figura 12. Productos de digestión con la enzima de restricción con *AluI* de las muestras de ADN amplificado para la secuencia /S481. Carril 1: Marcador de longitud 100 pb; Carril 2: Control positivo (cepa *B. pertussis* ATCC 8467); Carril 3: muestra 936; Carril 4: muestra 951; Carril 5: muestra 991; Carril 6: muestra 992; Carril 7: muestra 1001; Carril 8: Blanco de PCR. A la izquierda del gel se indica el tamaño en pares de bases de marcador molecular.

Sin embargo, en el análisis de restricción también se encontraron resultados negativos, de las 101 muestras positivas por PCR punto final, 22 resultaron negativas a la restricción con

la enzima *AluI*, de las cuales 15 provenían de muestras donde el producto de amplificación fue detectado como una banda tenue en el gel de electroforesis, por lo que en el análisis de restricción la concentración del ADN de esas muestras no era suficiente. Sin embargo resultaron siete muestras negativas a *AluI* provenientes de una banda bien definida en la electroforesis primaria de 420 pb, por lo que pudo deberse a un error sistemático en el manejo de las muestras.

Se realizó el procesamiento del total de muestras elegidas para este estudio. Los resultados de PCR punto final y restricción con enzima *AluI* se encuentran ordenados en la tabla siguiente.

Tabla 8. Resultados obtenidos de la técnica de PCR punto final con muestras de AND positivo y negativo de *B. pertussis* PCR-TR.

PCR-TR	PCR punto final		Restricción con enzima <i>AluI</i>	
147 POSITIVO a <i>B. pertussis</i>	POSITIVO	101	POSITIVO	79
			NEGATIVO	22
	NEGATIVO	46	NA	NA
23 NEGATIVO a <i>B. pertussis</i>	POSITIVO	0	POSITIVO	0
	NEGATIVO	23	NEGATIVO	23

Para complementar el presente trabajo, se realizó un análisis estadístico para correlacionar los resultados de PCR-TR con los resultados obtenidos por PCR punto final, utilizando la prueba de  $X^2$  en la modalidad de tablas de contingencia 2 x 2 con intervalo de confianza de 95%, con un grado de libertad, planteando las siguientes hipótesis para la correlación de resultados entre PCR-TR y PCR punto final: Hipótesis nula  $H_0$ = No existe concordancia entre los resultados obtenidos entre PCR-TR y PCR punto final e hipótesis alterna  $H_A$ = Si hay concordancia entre los resultados de PCR-TR y PCR punto final. Se tomaron datos de la Tabla 7 y fueron plasmados en la siguiente tabla de contingencia.

Tabla 9. Tabla de resultados PCR-TR vs PCR punto final.

		PCR-TR		
		Positivo	Negativo	Total
PCR punto final		101	0	101
	Positivo	46	23	79
	Negativo	147	23	181
	Total			

Criterios de aceptación:

Si  $X^2_{cal} < X^2_{(0.05) (1)}$  Se acepta  $H_0$

Si  $X^2_{cal} > X^2_{(0.05) (1)}$  Se acepta  $H_A$

Al realizar las operaciones del Anexo 1 se obtuvo una  $X^2$  calculada de 39.26 la cual al compararse con la  $X^2$  tabulada fue mayor  $X^2_{(0.05) (1)} = 1.96$  por lo tanto la hipótesis nula  $H_0$  se rechaza, aceptando por consiguiente la hipótesis alterna  $H_A$ .

Demostrando con éste estudio la concordancia entre los resultados de PCR-TR y PCR punto final, en el LESPSON se puede utilizar esta técnica de detección para contribuir con el

diagnóstico oportuno de tosferina. Sin embargo, con los resultados obtenidos corroboramos también, que la PCR punto final es menos sensible que la PCR-TR. Algunos estudios reportan la PCR punto final entre un 85-90% de sensibilidad, respecto al 95-98% de sensibilidad de la PCR-TR, en cuanto a la especificidad son similares los dos 95-99% (García y col., 2006; Koneman y col., 2006; Sanz y De Ory, 2002).

A diferencia de la PCR punto final, con la técnica de PCR-TR en el LESPSON se pueden detectar *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*, debido a que utiliza varias sondas específicas en el genoma de cada especie. Con la PCR punto final solo se puede detectar una especie de *Bordetella* que tenga un gran número de secuencias de inserción IS481, tomando en cuenta que *B. pertussis* es la especie que mayor número de copias de ésta secuencia de inserción presenta, en conjunto con las técnicas de cultivo, la PCR punto final para detectar *B. pertussis*, puede ser utilizada en el LESPSON para contribuir con el diagnóstico de tosferina (Loeffelholz y col., 2000; Diavatopoulos y col., 2005).

En el LESPSON se cuenta con la técnica de cultivo de *Bordetella*, haciendo posible el aislamiento e identificación de las especies: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* y *B. bronchiseptica*, por medios selectivos y pruebas bioquímicas, por lo que el diagnóstico de estas especies, siempre se hace de manera conjunta. Por lo tanto, los resultados de PCR punto final, estarán respaldados por esta importante herramienta diagnóstica. El cultivo mantiene su vigencia como forma definitiva de confirmación o estándar de oro y es el único procedimiento de detección de organismos viables, pese a su baja sensibilidad es muy importante utilizarlo alternativamente ya que en conjunto con una técnica molecular se puede proporcionar un resultado más completo y satisfactorio (García y col., 2006; Koneman y col., 2006; Tozzi y col., 2005).

Algo destacable es que, aunque se utilice la PCR-TR u otras técnicas más sensibles y específicas, el diagnóstico de la tosferina y muchas otras enfermedades, debe establecerse a partir de una serie de pruebas distintas, como microbiológicas, serológicas, y moleculares, dependiendo del estado de la evolución de la enfermedad. Ya que ninguna técnica de laboratorio ha probado hasta el momento, ser cien por ciento sensible y específica a la vez (Sanz y De Ory, 2002; Lingappa y col., 2002; García y col., 2006).

La problemática de no disponer de un diagnóstico oportuno, es que muchos de los casos que pudieran tratarse de tosferina, podrían estar recibiendo una terapia antibiótica equivocada, principalmente en infantes que suelen ser la mayoría de los casos, o no estar recibiendo

ninguna terapia como por ejemplo, los contactos de los casos de tosferina que pudieran ser portadores de la bacteria, principalmente adolescentes y adultos donde los síntomas clásicos de la enfermedad no se presentan, lo cual promueve la diseminación del patógeno y se fomenta la resistencia antibiótica (Mattoo y Cherry, 2005; Ehrke, 2013; Mooi y col., 2009).

Es ahí donde radica la importancia en el control y la prevención de la tosferina, que requiere un diagnóstico rápido, junto con el aislamiento y tratamiento de los casos confirmados y la profilaxis antibiótica de los contactos. Otra especie que no debemos dejar pasar inadvertida es *B. holmesii* ya que no es asociada a casos virulentos de tosferina, solamente en casos de pacientes inmunodeprimidos donde puede ser capaz de expresar genes de virulencia. Sin embargo, estudios anatómicos de la bacteria, sugieren la oportunidad de transferir horizontalmente el gen promotor de la toxina pertussis, por lo cual se ha tomado más atención a esta bacteria, dejando de estimarla como una especie inofensiva (Mattoo y Cherry, 2005; Calugar y col., 2006; WHO, 2010).

## CONCLUSIONES

Se logró definir las condiciones óptimas de amplificación de la técnica de PCR punto final y electroforesis para *B. pertussis* y posteriormente se aplicó con éxito la metodología de análisis de restricción con la enzima *AluI* para el espacio muestral seleccionado.

Se correlacionaron los resultados obtenidos de PCR punto final con los de PCR-TR, por lo que se puede utilizar ésta técnica para contribuir con el diagnóstico de tosferina en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora.

## RECOMENDACIONES

Sería muy útil incrementar la especificidad de esta técnica de PCR punto final, utilizando una sonda específica para la secuencia promotora de la toxina pertussis, de esta manera podría diferenciarse entre las especies de *B. pertussis* y *B. parapertussis* que son las principales asociadas con cuadros virulentos de la enfermedad; aunque depende de que tan rentable sea para el LESPSON, considerando que ya cuenta con la técnica de PCR-TR (Reischl y col., 2001; Tozzi y col., 2005; García y col., 2006; Loeffelholz, 2012; Pianciola y col., 2012).

Considerando que Sonora es el estado de México con mayor incidencia de tosferina, también sería de utilidad realizar estudios más profundos en nuestra población, para conocer las clonas de esta especie que circulan en nuestras comunidades y si el estado de inmunidad adquirido por la vacunación anti-pertussis es efectiva contra éstas (Tomé y col., 2008; Beltrán y col., 2011).

## BIBLIOGRAFÍA

Beltrán S, Cervantes Y, Cherry JD, Conde C, Gentile A. 2011. Grupo de expertos en vacunación contra tos ferina 2011. Consenso para el diagnóstico clínico y microbiológico y la prevención de la infección por *Bordetella pertussis*. Expert group on pertussis vaccination. Salud Pública Mex. 53(1):57-65.

Bamberger ES, Srugo I. 2008. What's new in pertussis?. Eur J Pediatr. 167(2): 133–139.

Bart MJ, Van Gent M, Van Der Heide HGJ, Boekhorst J, Hermans P, Parkhill J, Mooi FR. 2010. Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. BMC Genomics. 11(11):627.

Bergón E. 2004. Utilidad de la serología en el diagnóstico de las infecciones causadas por *Bordetella pertussis*. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina. <http://eprints.ucm.es/tesis/19911996/D/0/AD0015301.pdf>.

Calugar A, Ortega IO, Tiwari T, Oakes L, Jahre JA, Murphy T. 2006. Nosocomial pertussis: costs of an outbreak and benefits of vaccinating health care workers. Pertussis. Clin Infect Dis. 42(7):981-8.

Carbonetti NH. 2007. Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease. Curr Opin Pharmacol. 7(3):272-8.

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/pertussis/lab.html>.

[CoNaVe] Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2012. Aviso epidemiológico de Tos ferina: Incremento de casos de Tos ferina en América CoNaVe/2012/02/TOS FERINA. [http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/vigilanciaepidem/alerta\\_tosferina\\_060712.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/vigilanciaepidem/alerta_tosferina_060712.pdf)

Decker KB, James TD, Hinton DM. 2012. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. Microbiology. 158(7): 1665–1676.

De Gouw D, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, Hermans PWM, Mooi FR. 2011. Pertussis: a matter of immune modulation. FEMS Microbiol Rev. 35(3):441-74.

[DGE] Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/intd\\_informacion.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/intd_informacion.html).

Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR. 2005. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. PLoS Pathog. 1(4):e45.

Ehrke HK. 2013. Pertussis resurgence: perspectives from the working group meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge. J Infect Dis. doi: 10.1093/infdis/jit491.

Esteves A, Gómez CM., Esparza M, Richardson VL. 2012. Vacunación de refuerzo contra *Bordetella pertussis* en mujeres embarazadas. Ginecol Obstet Mex. 80(5):341-347.

Fennelly NK, Sisti F, Higgins SC, Ross PJ, Van Der Heide H, Mooi FR, Boyd A, Mills KHG. 2008. *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. Infection and Immunity. 76(3):1257-1266.

García J, Chavez F, Salto E, Otero J. 2006. PCR en tiempo real, inmunofluorescencia y cultivo para la detección de *Bordetella pertussis*: evaluación prospectiva y epidemiología molecular. Enferm Infecc Microbiol Clin. 24(8):500-4.

García CY. 2009. Estandarización de una PCR multiplex para la identificación simultánea de cuatro grupos de *Escherichia coli* productoras de diarrea en niños menores de cinco años del hospital infantil del estado de Sonora. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad de Sonora. 69 p.

Gillespie SH, Hawkey PM. 2006. Principles and practice of clinical bacteriology. John Wiley & Sons. 2da edición. 605 p

Hernández C, Durán C, Ulloa MT, Prado V. 2004. Evaluación pre-analítica de dos métodos de extracción de ADN para la amplificación del gen de la pneumolisina (*PLY*) de *Streptococcus pneumoniae*, en muestras de hemocultivo. Rev Med Chil. 132(5):533-8.

Hernandez SG. 2012. Comparación entre tres procedimientos para la extracción y purificación de ADN de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de cultivo en medio sólido. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad de Sonora. 81p.

Hewlett EL, Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. 2000. *Bordetella* species. Principles and practice of infectious diseases. 5ª edición. Philadelphia. Churchill Livingstone. 2242p.

[InDRE] Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 2012. Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de Tosferina y Síndrome Coqueluchoide, InDRE-RNLSP. México, DF.

Koneman EW, Woods AS. 2006. Koneman, Diagnóstico microbiológico: texto y atlas a color. 6ta edición. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana. 1696 p.

Laval E. 2010. Contribución a la historia de la coqueluche en Chile, Siglo XIX pontificia universidad católica de Chile. Facultad de medicina. Programa de estudios médicos humanísticos. Rev Chil Infect. 27(4):351-355.

Lingappa JR, Lawrence W, West-Keefe S, Gautom R, Cookson BT. 2002. Diagnosis of community acquired pertussis infection. Comparison of both culture and fluorescent anti body assays with PCR detection using electrophoresis or dot blot hybridization. J Clin Microbiol. 40(8):2908-12.

Litt DJ, Neal SE, Fry NK. 2009. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. Clin Microbiol. 47(3):680-8.

Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. 2000. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. J Clin Microbiol. 38(1):467.

Loeffelholz MJ. 2012. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. J Clin Microbiol. 50(7):2186-90.

Mancebo A, González A, Lombardo E, Chico P, Serrano A. 2005. Síndrome coqueluchoide y tos ferina: situación actual de la vigilancia epidemiológica. Acta Pediatr Méx. 26(5):257-269.

Mattoo S, Cherry JD. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev. 18(2):326-82.

Mazengia E, Silva EA, Peppe JA., Timperi R, George H. 2000. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. J Clin Microbiol. 38(6):2330-3.

Mooi FR, Van Loo IHM, Van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, De Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N, Mertsola J. 2009. *Bordetella pertussis* strains with

increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 15(8):1206-13.

Moreira D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.* 26(13):3309-10.

Mosiej E, Augustynowicz E, Zawadka M, Da Browski W, Lutynska A. 2011. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use. *J Clin Microbiol.* 49(4):1452-7.

Murphy TV, Slade BA, Broder KR, Kretsinger K, Tiwari T, Joyce PM, Iskander JK, Brown K, Moran JS. 2008. Prevention of pertussis, tetanus, and diphtheria among pregnant and postpartum women and their infants recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 57(RR-4):1-51.

Nosedá DG. 2011. Biofilm como forma de vida de *Bordetella pertussis* en su hospedador. Tesis Doctoral. Buenos Aires Argentina. Universidad Nacional de la Plata. 254 p.

Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MTG., Churcher CR, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeno-Tarraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 35(1):32-40.

Pianciola LA, Mazzeo ML, Flores D, Hozbor DL. 2012. Desarrollo y validación de una PCR para el diagnóstico de *Bordetella spp.* *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 46(4):667-676.

Pierce BA. 2010. Genética: un enfoque conceptual. 3ra edición. España. Ed. Médica Panamericana. 726 p.

Proberts WS, Ely J, Schrader K, Atwell J, Nossoff A, Kwan S. 2008. Identification and evaluation of new target sequences for specific detection of *Bordetella pertussis* by realtime PCR. *J Clin Microbiol.* 46(10):3228-31.

- Quián J. 2012. Tos ferina: vieja enfermedad, nuevos desafíos. *Biomedicina*. 7(3):22-27.
- Register KB, Sanden GN. 2006. Prevalence and sequence variants of *IS481* in *Bordetella bronchiseptica*: implications for *IS481*-based detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol*. 44(12):4577-83.
- Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MK. 2001. Real-time PCR assay targeting *IS481* of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol*. 39(5):1963-6.
- Santos JI. 2002. El programa nacional de vacunación: orgullo de México. *Rev Fac Med UNAM*. 45(3):142-153.
- Sanz JC, De Ory F. 2005. Diagnóstico de laboratorio de tos ferina. Papel de la serología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 20(5):212-8.
- Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodríguez ME, Yantorno OM, Deora R. 2011. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 6(12):e28811.
- [SINAVE] SINAVE/DGE/SALUD 2013.  
[http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/vigilanciaepidem/alerta\\_tosferina\\_060712.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/vigilanciaepidem/alerta_tosferina_060712.pdf)
- Tomé P, Torres LP, Romero G, Guiscafré H. 2008. *Bordetella pertussis* en estudiantes adolescentes de la Ciudad de México. *Rev Saúde Pública*. 42(4):679-83.
- Tozzi AE, Celentano LP, Ciofi Degli Atti ML, Salmaso S. 2005. Diagnosis and management of pertussis. *CMAJ*. 172(4):509-15.
- [UNAM] Universidad Nacional Autónoma de México. 2007. Facultad de Química. Química Analítica Instrumental II. Técnicas Cromatográficas.  
[depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- [WHO] World Health Organization. 2007. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/ *Bordetella parapertussis*. WHO/IVB/04.14.  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO\\_IVB\\_04.14\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_IVB_04.14_eng.pdf)
- [WHO] World Health Organization. 2010. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 85(40):385-400.

## ANEXOS

### Cálculo de $X^2$

Prueba de $X^2$ PCR-TR vs PCR punto final.				
PCR punto final	PCR-TR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	101	0	101
	Negativo	46	23	79
	Total	147	23	181

$$X^2 \text{ cal} = \sum (\mathbf{Fo} - \mathbf{Fe})^2$$

**Fe**

Donde:

**$X^2 \text{ cal}$** = Chi- cuadrada calculada

**Fo**= Frecuencia obtenida

**Fe**= Frecuencia esperada

**Grados de Libertad**

$$(R-1) \times (C-1) = \text{gl}$$

Donde:

**R** = número de columnas

**C** = número de filas

$$gl = (R-1) \times (C-1)$$

$$gl = (2-1) (2-1) = 1$$

**Frecuencia esperada**

$$Fe = N \times \underline{N1}$$

**NT**

$$F_{11} := \frac{147 \times 101}{181} = 82.0$$

$$F_{21} := \frac{147 \times 79}{181} = 64.2$$

$$F_{12} := \frac{23 \times 101}{181} = 12.8$$

$$F_{22} := \frac{23 \times 79}{181} = 10.0$$

$$X^2_{cal} = \frac{(101 - 82.0)^2}{82.0} + \frac{(0 - 12.8)^2}{12.8} + \frac{(46 - 64.2)^2}{64.2} + \frac{(23 - 10.0)^2}{10.0}$$

$$X^2_{cal} = 4.40 + 12.8 + 5.16 + 16.9$$

$$X^2_{cal} = 39.26$$

Valor de  $X^2$  en la tabla de contingencia con 1 grado de libertad  $\alpha = .05$  es **1.96**.