

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE  
COQUELUCHE EN NEUQUÉN:  
IMPLEMENTACIÓN,  
OPTIMIZACIÓN Y RESULTADOS**

**MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN Y  
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS E  
INSTITUTOS DE SALUD "DR. CARLOS G. MALBRÁN"

**Tesista: Bioq. Luis Piaciola**

**Directora de tesis: Dra. Daniela  
Hozbor**

**LABORATORIO CENTRAL – SUBSECRETARÍA DE  
SALUD DE NEUQUÉN**

**2009**

**Dedicatoria:**

**A mis padres**

**A mi esposa**

**A mis hijos**

## **Agradecimientos:**

A mi familia, por el estímulo, apoyo y comprensión incondicionales, que hicieron más fácil mi trabajo.

A mis compañeros que me cubrieron durante todo este tiempo para que yo pudiera dedicarme a la tesis.

A Melina Mazzeo, por su colaboración en la parte experimental, sin ella me hubiera sido imposible completar la tarea.

A las Direcciones de Epidemiología e Inmunizaciones de la Subsecretaría de Salud de Neuquén por su buena predisposición para facilitarme todos los datos que les solicité.

A mi Directora de Tesis, por su generosidad al compartir conocimientos, su excelente guía a lo largo de todo el trabajo y por el enorme esfuerzo adicional que le significó dirigirme a la distancia.

A la Dra. Mirta Carlomagno por su apoyo y estímulo para terminar este trabajo.



## INDICE

<b>Introducción</b>		<b>6</b>
<b>Capítulo 1</b>	<b>Implementación del diagnóstico molecular de Coqueluche en la Provincia de Neuquén</b>	<b>37</b>
<b>Capítulo 2</b>	<b>Optimización del procesamiento de las muestras clínicas</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo 3</b>	<b>Análisis de las condiciones de conservación de las muestras clínicas</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo 4</b>	<b>Optimización del diagnóstico molecular de Coqueluche</b>	<b>81</b>
<b>Conclusiones</b>		<b>104</b>
<b>Bibliografía</b>		<b>109</b>

# INTRODUCCIÓN

Pertussis, coqueluche, tos ferina y tos convulsa: todos sinónimos para nombrar una enfermedad que luego de más de 60 años de vacunación aún produce en el mundo 30 millones de casos por año con más de 300 000 muertes (316).

Esta enfermedad, la única de las “pestes” de la infancia que sobrevive al avance de las ciencias médicas; no tiene, a diferencia de éstas, una larga historia en la humanidad. La primera mención de coqueluche se encuentra en *Moulton's The Mirror of Health* en 1540. También se hace referencia frecuentemente a un escrito de Nils Rosen van Rosenstein que sugiere que la enfermedad empezó en Francia en 1414 (273). La primera descripción completa corresponde a Leo Schenk y Roger Baillon en el siglo XVI (372). Willis, Sydenham y Ettmüller la complementaron en el siglo XVII. Un siglo después se describen grandes epidemias de la enfermedad en toda Europa. Hirsch declaraba que “*casi todos los países de la tierra han tenido epidemias de esta enfermedad y, en Europa, solo es rara en las islas Feroe y en Islandia*” (248).

Hasta el advenimiento del siglo XX se creía fuertemente que el causante de la enfermedad era un hongo. En 1870 Letzerich describió la existencia de hongos en los niños que tosían en quintas: “*unos esporos pequeños, redondeados o elípticos, de color pardo rojizo, que germinaban parcialmente para formar filamentos*”. Posteriormente Tschamer los cultivó y los inoculó en conejos, describiendo un micelio filamentososo que denominó *Ustilago maidis var Capnodium citri*. En 1883 ambos serían rebatidos por Burger, quien publicó el hallazgo en la expectoración de los coqueluchosos de un bacilo pequeño y elipsoidal. De todas maneras la etiología fúngica de coqueluche persistiría hasta el aislamiento del patógeno por Bordet y Gengou en 1906:

“*La pululación, dijeron Jules Bordet y Octave Gengou al describir su hallazgo, era de una abundancia tal y de una pureza tan perfecta, que era imposible rehusarse a admitir una relación de causalidad directa entre esta infección y la aparición de la coqueluche*”.

Bordet y Gengou tuvieron precursores, además de Burger: en 1887 Afanassjew describió al agente causal como un bacilo pero no pudo cultivarlo, tarea en la que también fracasaron Czaplewski y Hensel. Diez años después Koplik cultivó en agar ascitis colonias perladas de *Bordetella pertussis*. Por la misma época, Spengler cultivó una bacteria parecida. En 1901, Jochmann y Krause aislaron en agar sangre, del esputo de un pequeño paciente, un bacilo que llamaron *Bacillus pertussis Eppendorf*, en honor del sector de Hamburgo donde estaba su Hospital. Si bien todos estos antecedentes existieron, el mérito de Bordet y Gengou no radica solo en haber diseñado el medio de agar sangre-papa-glicerol que lleva sus nombres, sino, y fundamentalmente, haber logrado relacionar la sintomatología de la enfermedad con la presencia del bacilo. Finalmente, el ya confirmado agente etiológico de la enfermedad conservó el nombre puesto por los alemanes pero sin el agregado de Eppendorf. No obstante, el decenio que siguió al descubrimiento estuvo pleno de discusiones que solo culminaron con los trabajos de Chievitz y Meyer en 1915, reafirmando las conclusiones de Bordet y Gengou.

Se han suscitado siempre grandes dudas respecto al nombre de la enfermedad. Los norteamericanos han adoptado el término latino *per* (intensa) *tussis* (tos), los españoles prefieren la denominación de *tos ferina* ("tos de las fieras"). Un poco más oscuro es el origen del término usado por los franceses, *coqueluche*. Existen 2 teorías respecto a este último: una es onomatopéyica y lo hace derivar del vocablo *coq* (gallo) refiriéndose al sonido con que culminan las quintas de tos. La otra hace derivar a *coqueluche* de *coqueluchon*, que habría designado una caperuza aislante que se ponía a los niños tosedores o quizá la que usaban los primitivos infectólogos. En 1865 el profesor Trousseau durante su clase magistral en el Hotel-Dieu de París, se refiere a la enfermedad como la *toux qui houpe*, de donde los ingleses hicieron derivar el término "*whooping cough*" (248).

## LA ENFERMEDAD

Más allá de los orígenes del nombre, esta enfermedad puede describirse como una infección respiratoria aguda cuyo principal agente etiológico es la bacteria

gran negativa *Bordetella pertussis*. Pertussis es particularmente grave en menores de 1 año de edad (34). La enfermedad se transmite de persona a persona a partir de aerosoles o gotas de secreción del individuo infectado. La transmisión requiere contacto estrecho con secreciones o permanencia en el mismo lugar que el enfermo por más de una hora (32, 44, 192, 426). El **período de incubación** puede variar entre seis y veintiún días, generalmente es de nueve a diez días. Luego de este período, comienza la **fase catarral** que dura entre una y dos semanas y cuya sintomatología puede confundirse con otras infecciones respiratorias. El cuadro más usual es similar a un resfrío común con tos seca. Durante esta fase las posibilidades de recuperación del agente etiológico son máximas, lamentablemente en ausencia de sintomatología específica la enfermedad es difícilmente sospechada salvo que se trate de contactos de casos confirmados. Esta es la etapa más contagiosa de la enfermedad. La fase siguiente es la **paroxística** que dura entre tres y seis semanas y se caracteriza por la presentación de accesos o paroxismos de tos que son propios de la enfermedad, vómitos después de toser, cianosis y apnea. Los paroxismos están caracterizados por accesos repetidos de tos en forma violenta, sin inhalaciones intermedias, seguidos de un estridor inspiratorio marcado y característico. Al finalizar el paroxismo es frecuente la eliminación de mucosidad clara y blanquecina seguida de vómitos. Los pacientes en general presentan leucocitosis marcada con linfocitosis absoluta, pierden peso, a veces presentan hipoglucemia pero raramente fiebre. Prácticamente nunca hay bacteriemia. Los síntomas de la enfermedad van decreciendo en severidad durante el período de **convalecencia** que puede durar varios meses (Tabla 1).

Las manifestaciones clínicas antes descritas son las clásicas de pertussis; sin embargo existen distintos factores que condicionan la presentación clínica de la enfermedad (53). Entre estos factores podemos mencionar el estado de vacunación, tratamiento con antibióticos, sexo, y edad del paciente (35). La enfermedad en niños mayores, adolescentes y adultos jóvenes previamente inmunizados se presenta frecuentemente en forma atípica; los pacientes manifiestan tos persistente y prolongada (durante semanas o meses). En estos

pacientes, los tres estadios típicos de pertussis así como la linfocitosis típica están ausentes (7, 22, 25, 68, 69, 82, 86, 91, 94, 106, 117, 188, 196, 259, 298, 306, 318, 339, 357, 407, 424, 431).

**Tabla 1. Evolución de los síntomas típicos de pertussis**

	Fase catarral	Fase paroxística	Fase convaleciente
<b>Tos</b>	++	+++	++
<b>Tos paroxística</b>	-/+	+++	-/+
<b>Vómitos</b>	-	+++	-/+
<b>Cianosis</b>	-	+++	-
<b>Apnea</b>	-	+++	-

La enfermedad es muy severa y pone en riesgo la vida de los lactantes menores de 6 meses. Este es el grupo más susceptibles de sufrir complicaciones, infecciones secundarias y muerte. Las complicaciones más frecuentes incluyen neumonía, atelectasias, convulsiones, encefalopatía, pérdida de peso, hernias y finalmente muerte. Las neumonías son la principal causa de muerte, la encefalopatía es de probable origen hipóxico y la disminución de peso es debida a inanición secundaria a vómitos repetidos (9, 19, 45, 94, 109, 115, 225, 266, 284, 305, 315, 329, 364, 365, 369, 387, 424, 427).

### **AGENTES ETIOLÓGICOS**

La enfermedad es causada principalmente por *Bordetella pertussis*, una bacteria Gram negativa (Tabla 2). *B. parapertussis* causa también la enfermedad aunque generalmente en forma más leve, al igual que *B. pertussis* carece de reservorio ambiental (39, 43, 46, 79, 108, 118, 119, 185, 199, 226, 246, 252, 270, 280, 321, 422,

433). *B. bronchiseptica* (Tabla 2), otra de las especies dentro del género con relevancia epidemiológica, infecta a una gran variedad de animales y en el hombre causa ocasionalmente una infección respiratoria que cursa con tos, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (141).

**Tabla 2. Especies de *Bordetella***

<b>Especie</b>	<b>Huésped/Fuente</b>	<b>Patologías</b>	<b>Referencias</b>
<i>B. pertussis</i>	Humanos	Pertussis	(Bordet y Gengou, 1906)
<i>B. parapertussis</i> <sub>HU</sub>	Humanos	Pertussis	(Eldering y Kendrick, 1938)
<i>B. parapertussis</i> <sub>OV</sub>	Ovejas	Neumonía	(Cullinane et al, 1967) (Porte et al, 1996)
<i>B. bronchiseptica</i>	Varios mamíferos	Respiratorias	(Ferry, 1912)
<i>B. holmesei</i>	Humanos	Sepsis, tos	(Weyant et al, 1995)
<i>B. avium</i>	Aves	Rinotraqueítis	(Kerstens et al, 1984)
<i>B. trematum</i>	Humanos	Infecciones de herida, otitis media	(Vandamme et al, 1996)
<i>B. hinzii</i>	Aves de corral, humanos	Infecciones oportunistas	(Coobson et al, 1994)
<i>B. petrii</i>	Medio ambiente, humanos	Infecciones oportunistas	(Von Wintzingerode, 2001)
<i>B. ansorpii</i>	Humanos	Infecciones oportunistas	(Ko et al, 2005)

*B. holmesei*, la última especie descrita asociada a infecciones respiratorias, se ha encontrado en sangre de adultos jóvenes y ocasionalmente en el tracto respiratorio (14, 274, 301, 344, 441). Las otras especies del género: *B. parapertussis* (ovina), *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii*, *B. avium* y *B. ansorpii*, no son patógenos humanos o lo son muy raramente y no se consideran con potencialidad de patógenos respiratorios (96, 169, 178, 273, 367).

Todas las especies del género (Tabla 2) son microorganismos cuyos tamaños varían entre 0.2 a 0.5 por 0.5 a 2.0  $\mu$ , cocobacilos, con tinción gram negativa, casi todas son aerobios estrictos, no fermentadores, con crecimiento óptimo a 35° C.

Se ha propuesto a *B. petrii*, la única anaerobia facultativa, como el progenitor ambiental de las *Bordetella* patógenas (165). Se ha demostrado una muy limitada diversidad genética entre las especies *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* (307). Se ha propuesto considerarlas como subespecies de una única especie, con adaptaciones a distintos huéspedes (401). De estas subespecies, *B. bronchiseptica* es el probable progenitor evolutivo y *B. pertussis* y *B. parapertussis* se consideran dos linajes separados adaptados al ser humano. Muchas veces se denominan conjuntamente a estas tres especies/subespecies como el "cluster *B. bronchiseptica*" (33, 105, 141, 148, 179, 321). Casi todas las especies del género y en particular las pertenecientes al cluster *B. bronchiseptica* sintetizan una serie de factores de virulencia entre los que se encuentran diferentes adhesinas y toxinas (Tabla 3 y Figura 1).

**Tabla 3: Genes de virulencia expresados en el cluster *B. bronchiseptica*.**

	<i>B.pertussis</i>	<i>B.parapertussis</i>	<i>B.bronchiseptica</i>
Toxina Pertussis (PTX)	+	-	-
Toxina Adenilato Ciclasa (AC-Hly)	+	+	+
Hemaglutinina Filamentosa (FHA)	+	+	+
Fimbria	+	+	+
Pertactina (PRN)	+	+	+
Citotoxina Traqueal (TCT)	+	+	+
Lipopolisacárido (LPS)	+	+	+
Toxina dermonecrótica (DNT)	+	+	+
Factor de Colonización Traqueal (TcF)	+	-	-
BrkA	+	+	+/-
+: Expresa el producto del gen. - : No expresa el producto del gen o el mismo está ausente. +/- : Expresa el producto del gen en algunas cepas			

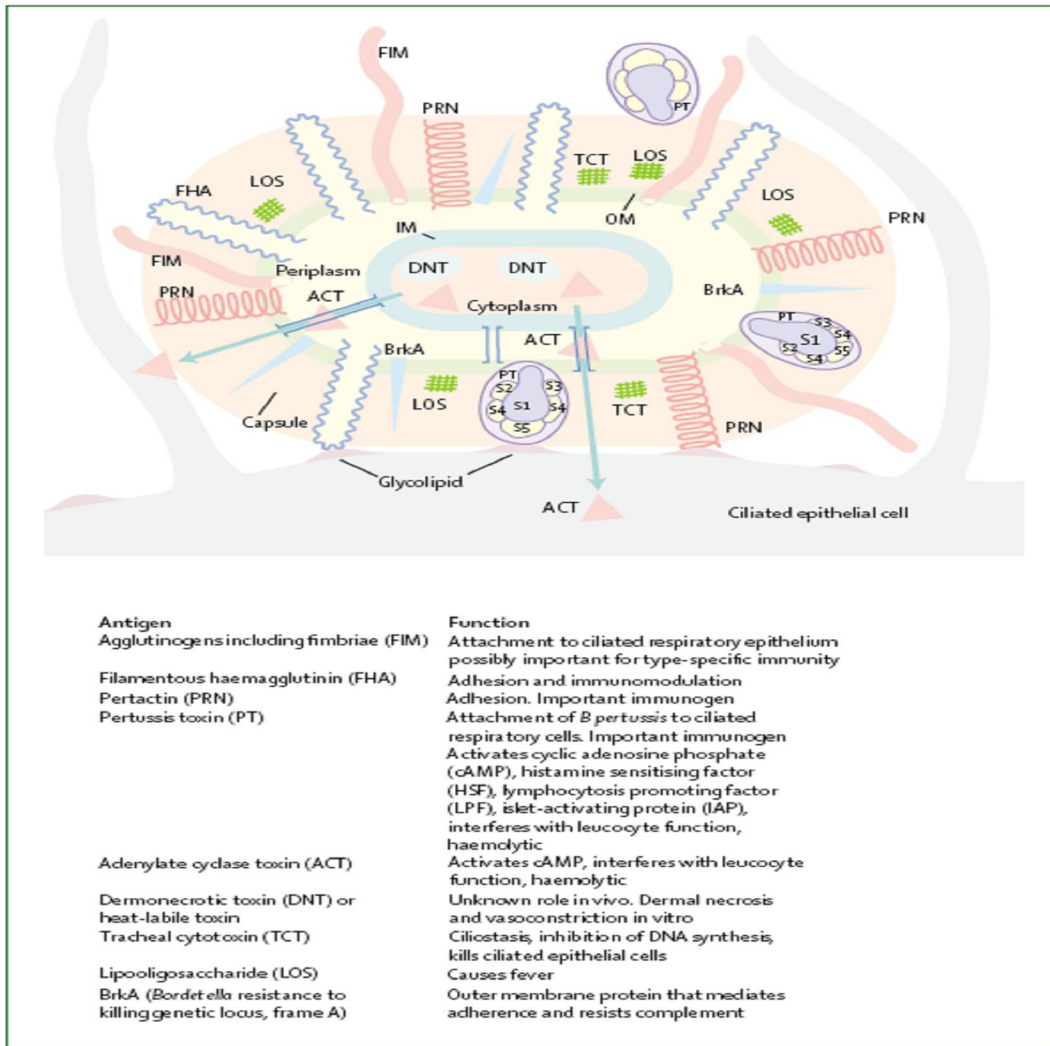


Fig. 1. Representación esquemática de los principales factores de virulencia de *Bordetella pertussis* (95).

**Adhesinas:** la más importante es la hemaglutinina filamentososa (FHA), una proteína de 220kDa que le permite a *B. pertussis* adherirse a una variedad de estructuras celulares y extracelulares en el epitelio respiratorio y en los macrófagos (260, 261). Esta proteína tiene al menos cuatro dominios involucrados en la adhesión (273). Se ha demostrado que FHA es un factor necesario pero no suficiente para la colonización traqueal. Aparentemente no es necesario para la colonización inicial sino posteriormente para evitar el barrido del epitelio ciliado. También produce una fimbria que está compuesta de una subunidad mayor Fim2 o Fim3 (dependiendo del serotipo 2 o 3) y una subunidad menor FimD. Esta última se une a la integrina VLA-5 de los macrófagos y a residuos de azúcares sulfatados, distribuidos ampliamente en el



tracto respiratorio. La unión de FimD a VLA-5 activa el CR3, el receptor de FHA, lo que asegura la cooperación entre fimbrias y FHA (149). Estudios recientes usando líneas celulares derivadas de tracto respiratorio humano demostraron que las fimbrias juegan un papel importante en la infección de la mucosa laríngea, mientras que FHA es importante para la colonización de todo el árbol respiratorio (399). Existe otra clase de proteínas asociadas a la superficie bacteriana pertenecientes a la familia de proteínas autotransportadoras que dirigen su propia exportación. Entre las principales moléculas de esta clase podemos destacar a la pertactina (PRN) y el factor de colonización traqueal (TCF), ambas proteínas tienen regiones ricas en prolina y secuencias RGD involucradas en la adherencia (123, 132). PRN está presente en las tres especies del cluster *B. bronchiseptica*. Algunos estudios sugieren que podría ser la adhesina más importante de *B. pertussis*. También se ha demostrado que los anticuerpos generados contra esta proteína son de gran importancia para la protección (273, 363).

**Toxinas:** la mayoría de ellas son proteínas, excepto el lipopolisacárido (LPS) y la citotoxina traqueal (TCT), un glicopéptido de bajo peso molecular que es un fragmento del peptidoglicano de *Bordetella*. Esta toxina destruye las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio, probablemente por inhibición de la síntesis de DNA. LPS actúa sinérgicamente con la citotoxina traqueal u otras toxinas. El LPS desempeña un papel importante en las funciones de la membrana externa y en la resistencia de *Bordetella* a los antibióticos (261, 273, 363). *B. pertussis* no expresa antígeno O como si lo hacen las otras *Bordetella* del cluster (50, 155).

Dentro de las toxinas proteicas, se encuentra la toxina pertussis (PT) que es sólo expresada por *B. pertussis*. En cambio, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* poseen los genes estructurales que codifican el polipéptido, pero no son expresados debido a mutaciones en la región del promotor (164, 166, 181, 182, 429). Esta toxina está compuesta de cinco subunidades diferentes (S1 a S5), formando una estructura del tipo AB. La parte B, formada por las unidades S2 a S5, es la responsable de la unión de la toxina al receptor en la célula blanco. La parte A,

formada por S1, tiene actividad ADP-ribosiltransferasa. Luego de la unión al receptor celular por la parte B de la toxina, la subunidad S1 se transloca al citosol donde ejerce su actividad ADP-ribosiltransferasa, que constituye la base molecular de la acción de la toxina. Se han descrito numerosos efectos biológicos de la PT, entre los más trascendentes se puede mencionar: aumento de la sensibilidad a histamina, aumento de la secreción de insulina con la correspondiente disminución de la glucemia, marcada leucocitosis con linfocitosis tanto de células B como T, también actúa como potente adyuvante, inhibe la quimiotaxis, la respuesta oxidativa y la liberación de enzimas lisosomales de neutrófilos y macrófagos (13, 261, 363). A pesar de todos los efectos biológicos descritos, todavía falta evidencia para adjudicarle un rol específico en la inducción de determinados signos y síntomas propios de la enfermedad.

Una segunda toxina proteica importante es la toxina Adenilato Ciclasa-Hemolisina (AC-Hly), una proteína bifuncional compuesta por 1706 aminoácidos: expresa actividad hemolítica y actividad de adenilato ciclasa. Ambas actividades de esta toxina son importantes en los primeros estadios de la infección, probablemente por inducción de apoptosis de los macrófagos alveolares (245).

La toxina dermonecrótica (DNT) es otra toxina cuyo rol en la patogénesis de coqueluche no está claro pero, en su forma purificada, es altamente letal cuando se inyecta por vía endovenosa a ratones (415).

Existen otros determinantes de virulencia menos estudiados o de descripción más reciente: algunos otros autotransportadores como BrK y Vag8, un sistema de secreción de tipo III, etc (127, 273, 321, 363).

Como otras bacterias patógenas, *Bordetella* puede regular la expresión de sus factores de virulencia en respuesta a cambios en el medio ambiente (186, 278). Dicha regulación está mediada por un único locus denominado *bvg* por *bordetella virulence genes* que codifica para un sistema de dos componentes denominado BvgAS. Es a través de este sistema que *Bordetella* puede alternar

entre diferentes fases fenotípicas, virulenta o Bvg<sup>+</sup>/avirulenta o Bvg<sup>-</sup>, en respuesta a distintas señales del medio. En fase Bvg<sup>+</sup> o virulenta, *Bordetella* expresa las adhesinas y toxinas indispensables para colonizar e infectar al huésped. Mientras tanto, en la fase Bvg<sup>-</sup> o avirulenta se detiene dicha expresión y comienza a expresarse otras proteínas codificadas por genes denominados *vrg* por *v*irulence *r*epr*e*sse*d* genes. No se conoce cual es el rol de estos factores Bvg<sup>-</sup> *in vivo*. Se ha sugerido que pueden ser necesarios para sobrevivir en el medio ambiente en el caso de *B. bronchiseptica*, o para evadir la respuesta inmune del huésped en el caso de *B. pertussis* (90, 156, 363, 390).

## **PATOGENIA**

Existen cuatro pasos importantes en el proceso de infección y enfermedad en general y específicamente en aquellos que involucran a *B. pertussis*: 1) adhesión, 2) evasión de la respuesta inmune, 3) daño local, 4) manifestaciones sistémicas. (195, 347)

La infección causada por *B. pertussis* se inicia con la adhesión de las bacterias a las ciliadas de las células del aparato respiratorio superior del hospedador. Varios factores: FHA, FIM, PT, LPS, Tcf, BrkA, Vag8 y PRN han sido implicados en este proceso (24, 55, 215, 273, 363). La redundancia de factores de adhesión marca la importancia de este paso de la infección. Como consecuencia de esta redundancia es difícil adjudicarle a alguno de ellos un rol protagónico. De todas formas, varios ensayos *in vitro* permiten establecer que FHA se comporta como una adhesina muy fuerte, al menos en condiciones de laboratorio. Por otra parte, de algunos estudios de eficacia de vacunas se desprende que PRN puede ser una importante adhesina pero que en ausencia de ella, otras proteínas pueden asumir esa función. Se ha demostrado también una relación sinérgica entre PRN y altas concentraciones de PT (195, 261, 320).

Una vez adheridas, las bacterias se multiplican y tanto en esta etapa como en el inicio de la infección deben evadir la respuesta inmune del hospedador. AC-Hly parece contribuir a este fin catalizando el aumento de la producción de cAMP, que intoxica las células del hospedador donde estas proteínas han ingresado y queda afectada su actividad fagocítica. La toxina pertussis, a través

de un mecanismo diferente al de AC-Hly, afecta también negativamente la fagocitosis inhibiendo la migración de linfocitos y macrófagos hacia los sitios de infección (273).

El daño local a los tejidos es causado principalmente por las toxinas TCT, DNT y probablemente AC-Hly. Es probable que, al menos en parte, los daños al tejido local sean los responsables del síntoma característico de la enfermedad: la tos paroxística. Sin embargo, la duración total de la tos en la coqueluche clásica es mayor que lo que sería de esperar por el daño local. Por lo tanto, es posible que exista otra toxina, aún no identificada, que contribuya a la duración de este síntoma (348).

En contraste con otras infecciones bacterianas que cursan con importantes manifestaciones sistémicas, pertussis prácticamente no las presenta (216). Puede ocurrir encefalopatía pero es secundaria a la anoxia asociada con los paroxismos de tos. Debe destacarse únicamente la leucocitosis con linfocitosis, asociada a PT y la hipoglucemia en niños pequeños causada por hiperinsulinemia. (9, 19, 315, 364, 365, 431).

La toxina pertussis se ha descrito como la principal responsable de los síntomas de la enfermedad, especialmente la tos paroxística. De hecho, muchos investigadores sostienen que pertussis es una enfermedad mediada casi exclusivamente por PT (273). Sin embargo, esto parecería no ser tan así ya que en las infecciones causadas por *B. parapertussis*, que no produce PT, este síntoma está presente y con idénticas características (195, 261).

## **INMUNIDAD**

Hoy está claro que la inmunidad contra *B. pertussis* es un proceso sumamente complejo. La mayoría de los datos que nos permiten entender la respuesta inmune a *B. pertussis* se han basado en observaciones experimentales en modelos murinos (283, 353).

Se ha informado que la infección natural o la vacunación pueden inducir respuesta de células T y anticuerpos contra PT, FHA, PRN, FIM, AC-Hly y LPS y algunos otros antígenos no identificados. Varias experiencias en animales han

provisto evidencia suficiente de que esta respuesta inmune contribuye a la protección contra *B. pertussis* y que para su óptimo desempeño se requiere tanto de la respuesta celular como de la humoral (434).

Existe amplia evidencia que confirma que los anticuerpos tienen un papel importante en la protección contra este patógeno, fundamentalmente neutralizando toxinas, inhibiendo la adhesión bacteriana o facilitando la acción de macrófagos y neutrófilos (49, 73, 406). A pesar de esto, no ha sido posible definir un nivel de anticuerpos contra determinado antígeno o grupo de ellos que sea capaz de predecir el grado de protección. No se conocen totalmente los mecanismos efectores de la inmunidad humoral anti *B. pertussis*. Por esta razón, los niveles de IgG específica detectados en ciertos ensayos no se correlacionan con la protección. Sería interesante poder encontrar un test que mida adecuadamente la actividad funcional de estos anticuerpos (75, 370, 379). La infección natural con *B. pertussis* induce la producción de IgA secretoria en el tracto respiratorio y ésta parece ser capaz de inhibir la adherencia a las células epiteliales ciliadas. De esta forma, una rápida inducción de IgA luego de un desafío con *B. pertussis* podría contribuir a la protección contra el patógeno (18). Se ha podido demostrar que la infección natural, así como la vacunación con vacunas celulares o acelulares, inducen células T específicas para PT, FHA, PRN y otros antígenos menos estudiados de *B. pertussis*. Muchas experiencias de respuesta de células T en niños con infección aguda o en etapa convaleciente han demostrado respuesta selectiva Th1 durante la infección con este microorganismo. La respuesta inmune celular, especialmente mecanismos efectores mediados por IFN- $\gamma$ , es necesaria para evitar la diseminación de *B. pertussis* desde el tracto respiratorio durante la infección primaria en ratones (186, 189, 229, 330). La temprana secreción de IFN- $\gamma$  por las células de la inmunidad natural, parecería ser suficiente para contener la infección antes del desarrollo de la respuesta Th1 cuyo rol es crítico en la eliminación del patógeno (273, 283).

Después de haber eliminado una infección primaria, la inmunidad adquirida es muy efectiva ante exposiciones posteriores a *B. pertussis*.

La inmunidad celular, junto con los anticuerpos de la subclase adecuada, estimulada por las células Th1, son los mecanismos efectores involucrados en la respuesta a la infección primaria y los que confieren protección contra exposiciones secundarias al patógeno.

Por otra parte los mecanismos efectores involucrados en la inmunidad conferida por vacunas están muy relacionados con el tipo de vacuna empleada: las vacunas celulares (DTP) y las acelulares (DTaP) inducirían mecanismos de protección diferentes. DTP induce selectivamente Th1, y luego de una exposición a *B. pertussis* se observa un infiltrado pulmonar con acúmulo de linfocitos, neutrófilos y macrófagos. Las células Th1 también colaboran con los anticuerpos opsonizantes y facilitan la entrada del microorganismo a las células con su correspondiente muerte por mecanismos que involucran moléculas reactivas de nitrógeno o intermediarios de oxígeno. En cambio, las vacunas acelulares inducen mayormente una respuesta del tipo Th2 en ratones y Th1/Th2 en niños sugiriendo algún rol para la inmunidad celular aunque seguramente menos significativo que en el caso de vacunas DTP, especialmente en la protección a largo plazo inducida por DTaP (283).

### **PREVENCIÓN**

Dado que pertussis es una enfermedad con alta contagiosidad y mortalidad la medida de control más importante para la enfermedad es la vacunación. Las vacunas contra pertussis comenzaron a desarrollarse desde el momento en que pudo aislarse el agente causal de la enfermedad en 1906. En 1925 Madsen produjo vacunas a una escala mayor y en 1940 Perla Kendrick introdujo los componentes tetánico, diftérico y adyuvantes a las formulaciones de pertussis. A partir de allí el uso de la vacuna conocida como triple bacteriana se hizo masivo. Estas vacunas, en lo que se refiere al componente pertussis, consisten en suspensiones de la bacteria entera muerta y detoxificada. La composición de las primeras vacunas, con respecto al crecimiento, muerte, detoxificación y preservación no estaba estandarizada y el diseño de ensayos en los que estos parámetros se evaluaban, era escaso. En la década del cincuenta se comenzaron

a evaluar las vacunas existentes y se comprobó la eficacia de la vacuna celular de pertussis en la protección de la enfermedad. A partir de ese momento este tipo de vacunas se utilizaron para vacunaciones masivas en la mayoría de los países desarrollados y esto condujo a una gran disminución en la incidencia, la morbilidad y la mortalidad debidas a pertussis.

Aunque las vacunas celulares producidas por distintos fabricantes difieren con respecto a la composición antigénica y a la inmunogenicidad, y aunque los esquemas de vacunación de los diferentes países son distintos, lo cual dificulta los análisis comparativos, es aceptado que la eficacia de la vacuna celular de pertussis contra la tos convulsa generalmente varía entre 80 y 85% (267, 282, 323).

Asociado a la administración de la vacuna pertussis celular, se ha reportado la inducción de una serie de efectos secundarios que pueden ir desde leves a muy severos, tales como encefalitis, encefalopatía, daño cerebral permanente y muerte. Estas reacciones mediadas por el sistema nervioso central se pueden manifestar también durante la infección producida por *B. pertussis*. Se cree que las toxinas activas, como la toxina pertussis (PT) o el lipopolisacárido (LPS), pueden ser los responsables de dichos efectos adversos (217, 268).

La asociación de los efectos colaterales con la vacunación contra pertussis causó a mediados de los '70 un dramático descenso en la aceptación de la vacuna y varios países desarrollados como Japón, Suecia, Alemania, Italia e Inglaterra suspendieron el uso de la misma o implementaron una vacunación voluntaria. Esto llevó al resurgimiento de la enfermedad y a que la misma tuviera carácter endémico.

Las contraindicaciones absolutas para la administración de esta vacuna son: haber tenido una reacción anafiláctica previa o la presencia de encefalopatía dentro de los 7 días de haber recibido la vacuna. Son contraindicaciones relativas la presencia de fiebre mayor de 40,5° C, llanto prolongado por más de tres horas, convulsiones e hipotonía con hipo respuesta luego de administraciones previas.

Esta situación motivó la búsqueda de nuevas vacunas más efectivas y menos reactogénicas. La purificación y caracterización de distintos antígenos de *B. pertussis* en las décadas siguientes condujo al desarrollo de vacunas acelulares contra pertussis compuestas por uno o más componentes, posibles antígenos protectores altamente purificados.

Las nuevas vacunas acelulares idealmente debían superar a la vacuna celular en distintos aspectos: ser más eficaces en la protección de los síntomas de la enfermedad, del desarrollo de la infección o ambos; y estar libre de compuestos tóxicos como el LPS o la PT biológicamente activa, de modo de tener aceptación pública implementando nuevamente la vacunación masiva. Paradójicamente, se observó que los componentes responsables de los efectos colaterales contribuyen a la eficacia (LPS como adyuvante) y a la protección (PT) (63, 64, 104, 136, 227, 288, 293, 322, 377, 409).

Se pueden considerar distintos tipos de vacunas acelulares, las que pueden estar constituidas por fracciones concentradas a partir de sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis* con eliminación del LPS; o por antígenos de *B. pertussis* altamente purificados; o por antígenos recombinantes, por ejemplo: análogos de PT en la que la toxicidad ha sido eliminada, pero mantiene sus propiedades y la inmunogenicidad es comparable o mejor a la de la PT detoxificada químicamente; y por péptidos sintéticos que mimetizan epitopes de unión a células B o T de antígenos de *B. pertussis*. Se han identificado en PT, FHA y PRN la presencia de dichos epitopes protectores.

La inmunidad se pierde entre siete y veinte años después de una infección natural y cinco a diez años después de inmunización con vacunas celulares (8, 333, 346, 408).

En la actualidad no existe un consenso internacional respecto a qué vacuna emplear, ni qué esquema de vacunación seguir. Así hay países que sólo emplean en sus Calendarios Nacionales de Vacunación, vacunas celulares. Otros que emplean en las primeras dosis vacunas celulares y luego realizan refuerzos con vacunas acelulares. Y otros usan vacunas acelulares en todo el esquema de vacunación (10, 100, 137, 168, 170, 231, 254, 317, 350, 355). No existe



tampoco consenso respecto a qué vacuna acelular utilizar, aunque es aceptado que las de más componentes son las más eficaces (139). En los últimos años debido al creciente registro de casos en adolescentes y adultos, las formulaciones acelulares han vuelto a posicionarse, ya que éstas tienen menor probabilidad de inducir efectos adversos en ese grupo etareo (57, 80, 114, 150, 221, 247, 345, 349, 419, 443). Se han formulado incluso vacunas acelulares dirigidas específicamente a adolescentes y adultos constituidas por los mismos componentes que las formulaciones pediátricas, pero con distinta cantidad sobre todo respecto de la toxina pertussis (66, 72, 87, 98, 147, 224, 325, 358, 419).

En el año 2005 se licenciaron en Estados Unidos dos vacunas acelulares para la utilización en una única dosis en adolescentes y adultos (77, 138, 174, 233, 250, 371, 375, 376, 430).

Todo este escenario diverso respecto de las vacunas en uso parece ser consecuencia, entre otros, de la falta de un conocimiento acabado de la patología, su dinámica y epidemiología. Mejoras en las estrategias de control podrían lograrse con mayor éxito si las mismas se realizaran sobre un conocimiento epidemiológico propio, enriquecido con datos obtenidos en otros países. La copia de recetas sin justificación y las acciones que surgen de respuesta a intereses en general no conducen a buenas estrategias.

## **TRATAMIENTO**

Existen varios antimicrobianos con actividad *in vitro* efectiva contra *B. pertussis* (17, 23, 54, 84, 92, 99, 129, 144, 197, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 219, 243, 290, 423, 428). El antibiótico que se emplea desde hace 30 años es la eritromicina cuya administración durante la fase catarral de la enfermedad, acorta la duración de los síntomas y elimina el organismo del tracto respiratorio superior dentro de los cinco días de iniciada la terapia (76, 161, 236). Pero la administración luego que la fase paroxística ha comenzado, no produce efectos apreciables sobre la duración ni la severidad de los síntomas. La eritromicina generalmente tiene una mala tolerancia por lo que se han incorporado al tratamiento nuevos macrólidos como azitromicina (5 días de tratamiento) y

claritromicina (7 días), ambos con mejor aceptabilidad por parte de los pacientes (200, 201, 368). También puede usarse trimetoprima sulfametoxazol, durante 14 días (293).

El uso de antibióticos también está indicado como quimiprofilaxis (QP) en los contactos de casos detectados (382). Este es un tema controvertido en la literatura médica, que ha traído considerable confusión entre los médicos tratantes y los encargados de dictar normas para su aplicación. Está demostrado que la QP disminuye la tasa de casos secundarios pero no previene la infección. Se obtiene la mayor eficacia cuando se administra antes de los 21 días de la aparición de síntomas en el caso índice. Para evitar el uso indiscriminado de macrólidos, que conduce a un aumento en la resistencia de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, actualmente se recomienda brindar QP postexposición solo a los contactos íntimos de pacientes de alto riesgo, incluyendo dentro de estos a: menores de 1 año de edad, mujeres embarazadas en el tercer trimestre, inmunocomprometidos, pacientes con enfermedades crónicas, etc. Muchas normas incluyen la recomendación de QP para trabajadores de la salud y personal de escuelas (83, 120, 310).

## DIAGNÓSTICO

En la enfermedad clásica, el diagnóstico clínico puede realizarse sin dificultad basándose en la tos paroxística seguida de vómitos, en el estridor inspiratorio, en la marcada linfocitosis y en la ausencia de fiebre. En cambio en aquellos casos en los que la clínica dista de la presentación clásica, como ocurre en pacientes adultos, lactantes o en aquellos con historia vacunal previa, se requiere de confirmación en el laboratorio (417). El análisis en el laboratorio también es requerido para el diagnóstico etiológico diferencial entre *B. pertussis* y *B. parapertussis* (28, 167, 214, 293, 438), y para identificar otros agentes infecciosos que pueden causar síntomas similares: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, virus respiratorios como Sincicial Respiratorio, Parainfluenza o Adenovirus, etc (16, 20, 89, 95, 133, 134, 172, 238, 291, 299, 403, 432).

La gran cantidad de protocolos de evaluación de vacunas acelulares han permitido valorar muchos métodos de diagnóstico de pertussis y conocer acabadamente su sensibilidad y especificidad (27, 113, 124, 142, 146, 162, 258, 276, 292, 366, 383).

A continuación se describen las metodologías diagnósticas más utilizadas:

**Cultivo:** se han diseñado muchos medios de cultivo pero los que permiten una mayor recuperación son el medio clásico de Bordet Gengou suplementado con 10-15% de sangre de oveja o caballo y el de Regan Lowe con agregado de 10% de sangre de las mismas especies animales. Ambos medios pueden adicionarse con cefalexina para inhibir el crecimiento de flora acompañante. Muchos autores prefieren utilizar oxacilina ya que la cefalexina inhibe el crecimiento de algunas especies de *Bordetella* como la *B. holmesii*. Las placas se incuban en aerobiosis en una atmósfera saturada de humedad y se mantienen bajo observación por 14 días (85, 130, 202, 204, 223, 244, 331, 343, 411).

**Inmunofluorescencia:** este método ha sido usado por 40 años debido a su rapidez y bajo costo, a lo que debe sumarse su utilidad cuando los cultivos resultan negativos debido al uso previo de antibióticos. De todas maneras es un método de baja sensibilidad y especificidad por lo que paulatinamente ha sido reemplazado por otros (146).

**PCR:** el uso de PCR ha hecho posible el diagnóstico rápido de un número muy importante de enfermedades infecciosas incluyendo pertussis (222, 294). De todas formas deben respetarse estrictamente las recomendaciones para esta metodología, ya que existen numerosos reportes de resultados falsos positivos debidos a contaminaciones (21, 65, 110, 125, 187, 191, 255, 285, 336, 360, 439).

Se han diseñado diferentes primers entre otros los que permiten amplificar: el gen codificante de PT y su secuencia promotora, diversas secuencias de inserción (IS), el gen que codifica para AC-Hly, una región upstream del gen de

la porina, una región upstream del gen que codifica para la flagelina, etc. Así se han diseñado, por ejemplo, la PCR de IS 481 que detecta *B. pertussis* y *B. holmesii*, IS1001 que detecta *B. parapertussis* y *B. holmesii*, la PCR de AC-Hly que permite el diagnóstico de las tres subespecies del cluster *B. bronchiseptica* y la PCR PT que permite detectar específicamente a *B. pertussis* (1, 11, 12, 15, 81, 111, 126, 143, 213, 220, 230, 234, 239, 240, 253, 257, 262, 272, 275, 297, 304, 324, 326, 333, 334, 352, 362, 380, 381, 394, 400, 410, 413).

**Serología:** la infección natural por *B. pertussis* causa un aumento en la concentración de anticuerpos de tipo IgM, IgG e IgA contra antígenos específicos. Originalmente se utilizaba como diagnóstico de la enfermedad un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos aglutinantes (101, 171, 279). En este test los anticuerpos que se detectan son fundamentalmente los dirigidos contra FIM2/3, PRN y LPS. La experiencia adquirida con esta técnica indica que tiene buena especificidad pero su sensibilidad es pobre. En los últimos 15 años se desarrollaron y perfeccionaron ELISAs para diagnóstico de pertussis, utilizando proteínas específicas del microorganismo como antígenos. Se ha logrado una precisión tal en el método que los coeficientes de variación intraensayo se han reducido a menos del 10%, lo que permite considerar como significativo un aumento en dos veces del título. El principal problema con el diagnóstico serológico es que es imprescindible esperar entre 2 y 4 semanas para obtener la segunda muestra de suero. Adicionalmente, muchos menores de tres meses no desarrollan anticuerpos detectables. La mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *B. pertussis* se logra utilizando ELISA, midiendo anticuerpos IgG e IgA contra PT (102, 182, 384). En adolescentes y adultos, valores aislados altos de IgG o IgA contra PT indican infección (26).

Ninguno de los métodos diagnósticos antes descriptos tiene sensibilidad del 100% en todas las etapas de la enfermedad (Tabla 4), por eso es recomendable utilizar más de uno para aumentar las posibilidades. En los lactantes y niños, los mejores resultados se logran con cultivo y PCR, siendo la serología de

menor importancia por las dificultades de los niños pequeños para elaborar una adecuada respuesta inmune y, además, la posible interferencia de la vacuna en los anticuerpos detectados. En los adultos el cultivo y la PCR tienen porcentajes de positividad más bajos y cobra mayor relevancia la serología.

**Tabla 4. Sensibilidad de los métodos diagnósticos según la fase de la enfermedad**

	<b>Fase catarral (1-2 semanas)</b>	<b>Fase paroxística (3 – 6 semanas)</b>	<b>Fase convaleciente (mayor de 6 meses)</b>
<b>Test de Diagnóstico</b>			
Cultivo	++	-/+	-
PCR	++	++	-
Serología	-/+	++	++

Respecto de las muestras más adecuadas para el diagnóstico microbiológico y molecular es importante recordar que *B. pertussis* coloniza fundamentalmente células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio superior, por lo tanto la muestra útil para cultivo debe provenir de esas células. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de muestras: el hisopado nasofaríngeo (HNF) y el aspirado nasofaríngeo (ANF). Para el primero se deben usar hisopos de dacrón ya que el algodón y el rayón tienen ácidos grasos que resultan tóxicos para *B. pertussis*. Los hisopos de alginato de calcio también podrían ser útiles pero si se va a realizar PCR es preferible no utilizarlos porque pueden presentar factores inhibitorios en la fibra. El hisopo debe ser flexible de forma tal que pueda maniobrase para llegar al sitio de toma de muestra. Aunque en algunas circunstancias resulte más dificultoso, el ANF es el método de elección ya que brinda la mayor sensibilidad tanto para cultivo como para PCR. Idealmente la muestra debe procesarse inmediatamente, especialmente el cultivo ya que *B. pertussis* es un microorganismo sumamente lábil. Cuando esto no sea posible deben utilizarse medios de transporte que conserven al microorganismo y a la vez inhiban el crecimiento de la flora acompañante. Uno de los medios más utilizados es el de Regan-Lowe, preparado a mitad de concentración (289).

## EPIDEMIOLOGÍA DE PERTUSSIS EN ALGUNOS PAÍSES

En la era prevacunal en EEUU la incidencia anual promedio era de 157 casos por 100 000 habitantes (384). En Inglaterra y Gales era de 230/100 000 habitantes. Muchos estudios señalan que solo se informaban alrededor del 18% de los casos totales, por lo que es de esperar que los números reales fueran, al menos, 5 veces superiores. En esta época, pertussis era una enfermedad siempre presente aunque con picos epidémicos cada 2 a 5 años, con un promedio de 3 años. Con la introducción y uso masivo de las vacunas en los años 40 y 50 estas cifras caen más de 150 veces (374). Entre los años 1976 y 1982 en EEUU la incidencia fue de 0.5 a 1.0 casos cada 100 000 habitantes (Fig 2)

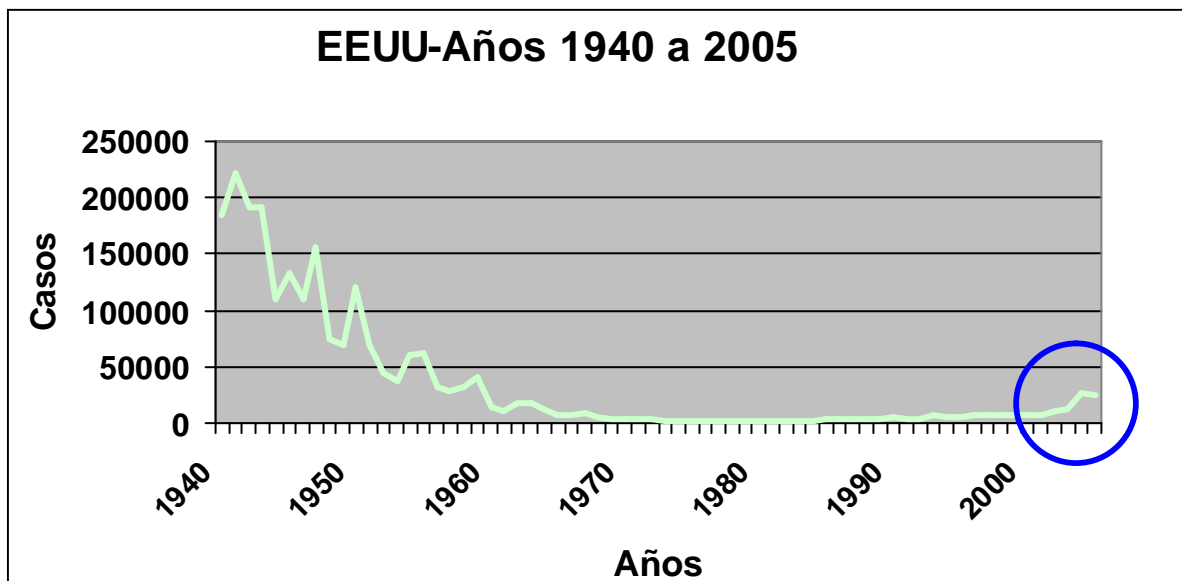


Fig.2. Casos de coqueluche. Estados Unidos. Años 1940 a 2005. (273)

Desde ese momento en adelante ha habido un constante incremento que llegó en 2002 a 3.1 casos /100000 habitantes (88, 193, 371, 436) (Fig. 3).

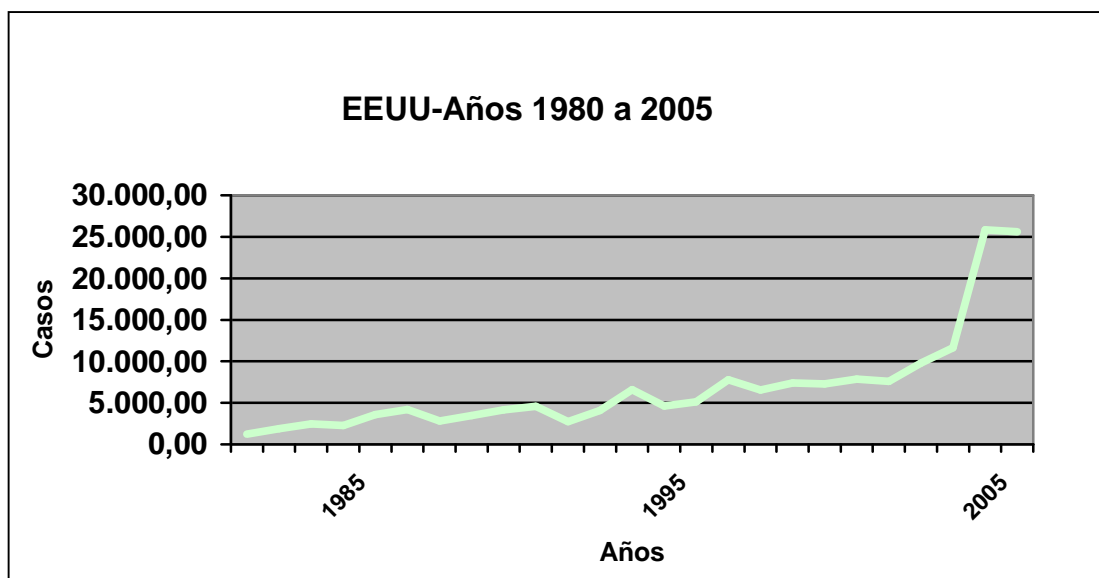


Fig.3. Casos de coqueluche. Estados Unidos. Años 1980 a 2005. (273)

Es complicado discernir si este aumento es un incremento verdadero en la incidencia de la enfermedad o está indicando una mejora en el diagnóstico y reporte de la misma. (74, 145).

En Europa, Asia, Latino América y Oceanía ocurrieron fenómenos comparables a los anteriormente descritos (36, 37, 151, 211, 237, 373, 391, 392). Por ejemplo en Suiza, país con una alta endemia de pertussis, los valores de incidencia se mantuvieron por debajo de 100 casos cada 100 000 habitantes hasta el año 1993. En ese momento comenzó a aumentar hasta llegar a valores de epidemia en el año 1997 con una tasa de incidencia de 185 cada 100000. En Holanda, hasta el año 1996 los casos se habían mantenido en los bajos valores habituales del período post vacunal (inferiores a 2.3 casos por 100000 habitantes), en 1996 aumentan drásticamente los casos hasta llegar a un pico de incidencia de 27.2/100 000, situación que con oscilaciones se mantuvo durante varios años. En este país, con una cobertura vacunal muy alta (superior al 97%) se describió la situación especial de una elevada incidencia en el grupo de niños de 4 a 9 años, lo que algunos interpretaron como una disminución en la efectividad de la vacuna aplicada (7, 107, 386).

A lo largo de la historia, pertussis ha sido una enfermedad de los niños. En la era prevacunal un 95% de los casos se daban en niños menores de 10 años. Luego de la inmunización pediátrica universal y la consiguiente disminución en

el número total de casos hubo un marcado cambio en la distribución por edades (227, 284). Esto puede observarse claramente en los datos de Massachusetts (EEUU), para el período 1933-1939 comparado con 1978-1981 (Fig. 4) (71).

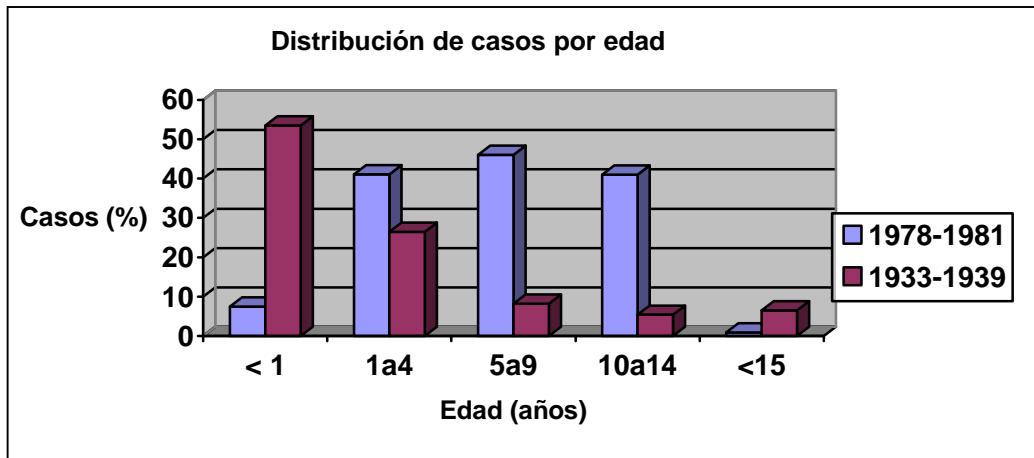


Fig.4. Distribución de casos de pertussis por edad en un período prevacunal (1933-1939) y otro vacunal (1978-1981), Massachusetts (EEUU). (71)

En los últimos 20 años, junto con un ligero aumento de casos, ha habido un corrimiento de los mismos hacia el grupo de adolescentes y adultos, quienes son considerados el reservorio actual de la enfermedad (Fig. 5) (62, 116, 293).

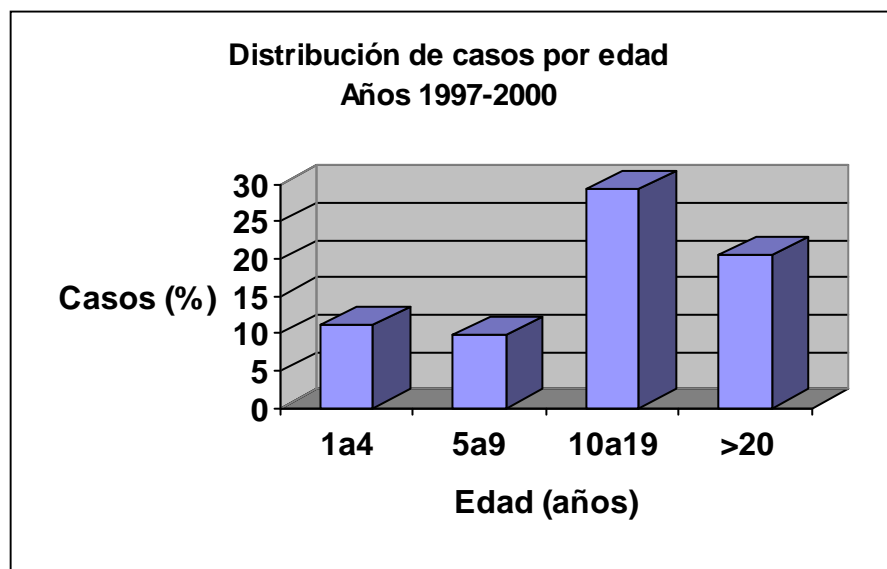


Fig. 5. Distribución de casos de pertussis por edad. Estados Unidos. Años 1997 a 2000. (71)

Pertussis era una causa importante de muerte en el período prevacunal. Entre los años 1926 y 1930 se informaron más de 36 000 muertes por la enfermedad en



EEUU, la mayoría en infantes. Durante este período se reportaron más muertes en el primer año de edad por pertussis que por sarampión, escarlatina, difteria, poliomielitis y meningitis sumadas (71). Estudios recientes demuestran que esta enfermedad también es causa ocasional de muerte en adultos ancianos. La tendencia de mortalidad es claramente descendente, estimada en el año 2004 en 3.9 cada 100 000 habitantes como promedio mundial, con valores que llegan a 10.1 cada 100 000 habitantes en los países de bajos ingresos. Se observa paralelamente un aumento de la proporción en menores de un año, que acerca los valores informados a casi el 100% de las muertes (412, 437).

Se informan casos en todos los lugares poblados del planeta. El patrón cíclico de epidemias de pertussis es similar actualmente a lo que era en la era prevacunal. Como fuera señalado por Fine y Clackson más de 20 años atrás, la inmunización controló la enfermedad pero no disminuyó la circulación de pertussis (56). El patrón cíclico tradicional se seguirá manteniendo ya que implica el tiempo que es necesario para que se acumule un significativo número de nuevos susceptibles para continuar la diseminación (20, 71, 101, 158, 342, 351, 356, 375). Fundamentalmente durante la era vacunal cambiaron los grupos etéreos donde se acantonó pertussis, convirtiendo a los adolescentes y adultos en el reservorio y fuente de infección y diseminación de la enfermedad.

Respecto a la epidemiología de *B. parapertussis*, es mucho menos lo que se conoce. En el período prevacunal se reportaron brotes epidémicos en EEUU, Inglaterra, Francia, República Checa, Bulgaria, Dinamarca, México, Chile, Australia, Japón, España, Portugal, Hungría, Yugoslavia y Finlandia (39, 108, 117, 246, 254, 280, 422).

De todas maneras la frecuencia de pertussis por *B. parapertussis* es muy inferior a la causada por *B. pertussis*: por ejemplo, Eldering y Kendrick informaron en un estudio que abarcaba 15 años, que sobre 4483 aislamientos de *Bordetella* solo 106 (2,4%) eran *B. parapertussis* (19). Los estudios serológicos muestran que las infecciones por *B. parapertussis* son comunes en todas las edades pero especialmente en los menores de 10 años. En Europa, a diferencia de EEUU, los

casos de *B. parapertussis* parecen ser más frecuentes, en algunas series se informa que causan hasta el 20% de los casos de pertussis. Los brotes epidémicos parecen también seguir un ciclo de aproximadamente 3 años, que no ocurre simultáneamente con los brotes de *B. pertussis*. Lautrop describió 79 casos de personas con confirmación bacteriológica de infección con ambas *Bordetellas*, en un tercio de las mismas la infección era simultánea y en el resto, sucesiva. De los datos obtenidos no se pudo concluir que las infecciones por ambos gérmenes fueran más o menos severas ni tampoco que, en las infecciones sucesivas, la infección con el primer agente predisponga a infectarse con el otro (246).

Mucho menos aún, se sabe de la epidemiología de las infecciones causadas por *B. bronchiseptica*. No sabemos cual es su huésped primario, ni como es la transmisión intra e interespecies en la naturaleza. Se ha descrito que el organismo puede comportarse como de vida libre, por lo que la transmisión a múltiples especies puede ocurrir sin contacto directo. Causa infecciones respiratorias en una gran variedad de mamíferos, incluyendo al hombre (157, 416). Las infecciones naturales más y mejor descritas son las que afectan a perros y cerdos, así como a animales de laboratorio. Existen numerosas revisiones sobre casos en seres humanos (300, 435). Alrededor de la mitad de los casos actuales están relacionados a pacientes con Sida, en los que la patología más frecuente es neumonía (264, 393). También ocurren infecciones diseminadas. Otras infecciones respiratorias incluyen sinusitis y bronquitis. Los niños expuestos a animales infectados usualmente desarrollan un síndrome coqueluchoide (273).

### **EPIDEMIOLOGÍA EN ARGENTINA**

Desde 1969 al 1979, se registraron en Argentina brotes epidémicos cada 3 años con la incidencia más alta en los años 1972 y 1976/77. La tasa media anual de notificación fue de 91.9/100 000 habitantes. En nuestro país en la década del 70 se incorpora en el Calendario Nacional de Vacunación la vacuna antipertussis celular (DTP). Hasta 1985 sólo se aplicaban cuatro dosis, en ese año se realiza

una actualización de las normas y se agrega la 5° dosis al ingreso escolar, cambiándose el esquema de vacunación para las primeras cuatro dosis a los 2, 4, 6 y 18 meses (Fig. 6). Durante la década del 80 se producen brotes con la misma periodicidad pero con menor incidencia. En el trienio 1980-1982 la tasa de notificación disminuye un promedio de 52.6%, coincidiendo con una elevación del 31% en la cobertura de vacunación con DPT. En 1984, coincidiendo con un brote de sarampión, vuelve a aumentar la tasa de notificación, para disminuir al año siguiente. Desde 1988 en adelante se observa una estabilización del descenso de la tasa de notificación, notándose una leve fluctuación trianual con aumento de casos. A partir del año 2002, cuando se logra la tasa más baja de incidencia 0.7/100 000, comienza un sostenido aumento de la misma que llega a un máximo en el año 2005 (59, 340)

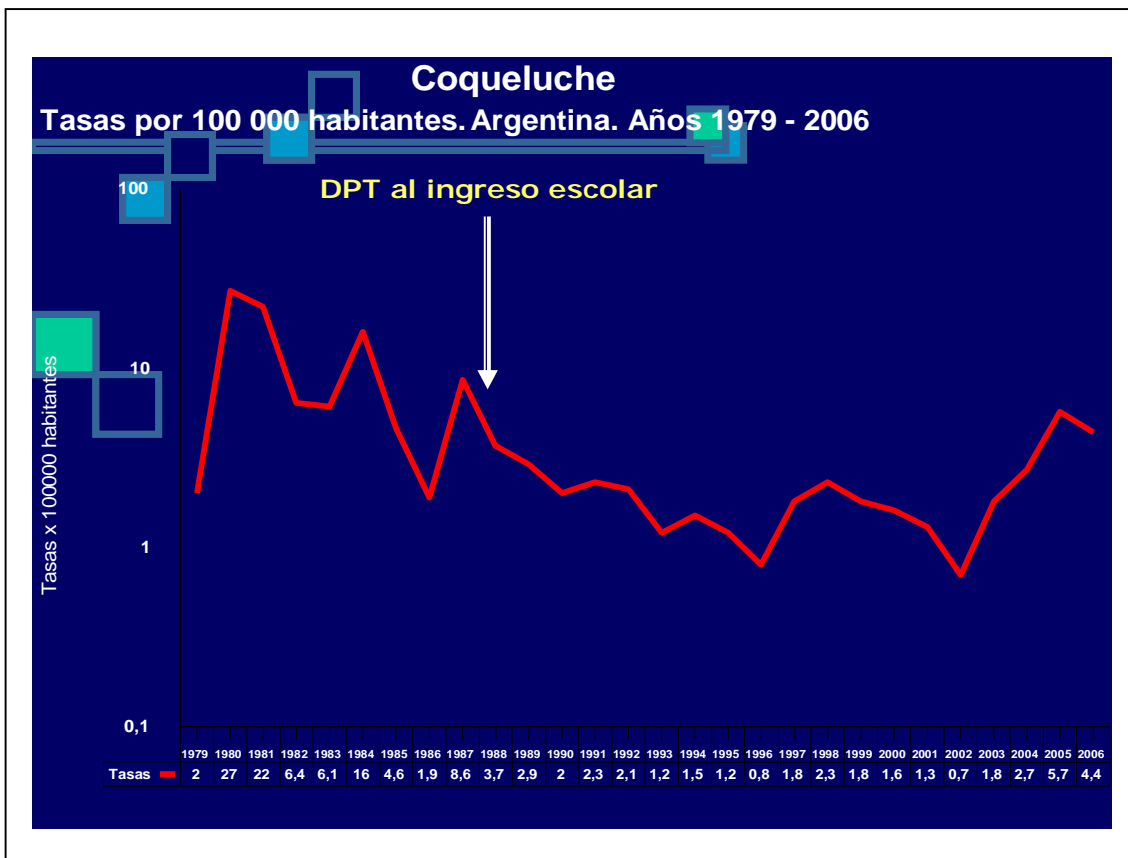


Fig. 6. Incidencia de coqueluche. Argentina. Años 1979 a 2006. (SNVS. Ministerio de Salud. Argentina)

El número de casos notificados en 2000 es 47 veces menor que en 1980. Cuando se comparan los datos de los 2 años se observa que la proporción de casos en menores de 1 año no varía significativamente, en tanto que la proporción de casos en el grupo de 15 a 49 años es 6 veces mayor en 2000 que en 1995.

Si se analizan las tasas de incidencia para los distintos grupos etáreos (Fig. 7) se observa un claro y sostenido aumento en el período 1995/2006 para todos los grupos pero éste es especialmente alto en el grupo de mayores de 50 años (2200% de aumento) y sobre todo en el de 15 a 49 años (3866.7%). Esto demuestra un considerable incremento en la circulación de *B. pertussis* dentro del grupo que actúa como reservorio de la enfermedad (242).

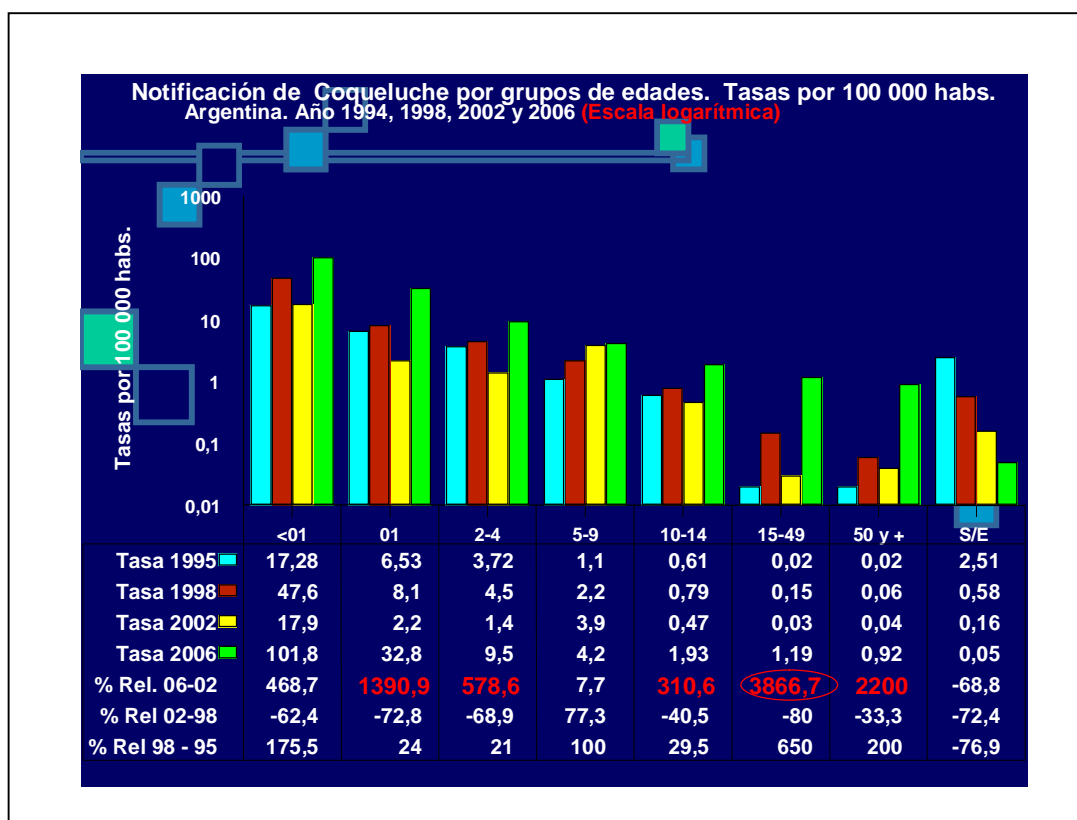


Fig. 7. Tasas de coqueluche por grupos de edad. Argentina. Años 1994, 1998, 2002, 2006. (SNVS. Ministerio de Salud. Argentina).

La tendencia de la mortalidad por coqueluche es claramente descendente, con una curva que concuerda con las notificaciones. El número de fallecidos en 2000 es 8 veces menor que en 1980. El descenso de la mortalidad va acompañado por

un aumento en la proporción de los menores de un año. Dicha proporción aumenta progresivamente desde 70.8% en 1980 hasta llegar al 100% a partir de 1997. Respecto al sexo predomina el femenino en todos los años con excepción de 1982 y 1996 (338).

## **REEMERGENCIA DE LA ENFERMEDAD**

En la era prevacunal las epidemias de pertussis seguían un patrón cíclico, con brotes cada 2 a 5 años. Actualmente la incidencia de pertussis se ha reducido dramáticamente pero el patrón cíclico no ha cambiado. Esto contrasta con otras enfermedades, como sarampión, en las que al generalizarse la vacunación se han alargado los intervalos entre ciclos, paralelo a la disminución en la incidencia. Este diferente comportamiento sugiere que en el caso de sarampión se ha logrado disminuir la incidencia de la enfermedad y la circulación del virus, en cambio en pertussis se ha logrado disminuir la incidencia de enfermedad reportada pero no la circulación del microorganismo (5, 41, 48, 93, 159, 194, 256, 281, 341, 398).

La enfermedad no ha sido eliminada de ningún país a pesar de décadas de altas coberturas vacunales (95, 163). Más aún, se ha informado reemergencia de la enfermedad en algunos países con altas tasas de vacunación: Holanda, Bélgica, España, Alemania, Francia, Australia, Canadá, Estados Unidos, etc. (3, 4, 70, 78, 122, 152, 160, 183, 308, 328, 354, 442).

Las tasas de incidencia en adolescentes y adultos han aumentado significativamente hasta alcanzar valores de 300 e incluso más de 500 /100 000 habitantes por año en varios países. Cada vez hay evidencias más concluyentes que la enfermedad se transmite de los adolescentes y adultos a los niños pequeños, a veces con consecuencias fatales.

Este notable aumento en las tasas de incidencia puede tener varias explicaciones (384):

1. Cambios en los métodos de vigilancia usados, por ejemplo, uso de técnicas diagnósticas más sensibles.

2. Cambios en la calidad de las vacunas en uso. Esto fue informado como la probable causa del aumento de la enfermedad en Canadá. En este país ocurrió un importante brote 5 años después de reemplazarse la vacuna que venía usándose por otra. Si bien no se hicieron estudios comparativos de las eficacias de las vacunas ni se contaba con datos fidedignos sobre la vacuna que se venía usando, repetidas experiencias mostraron que la eficacia de la última vacuna era de 48 a 69%. A pesar de una alta cobertura, el continuo uso de esa vacuna dejó una gran proporción de niños nacidos a partir de 1985 (año en que se comenzó a aplicar) susceptibles a la enfermedad (176, 303).
3. Corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas. Está demostrado que la inmunidad conferida por la infección natural no dura de por vida, según diversos estudios no sería mayor de 20 años. La inmunidad vacunal es incluso de menor duración, según las publicaciones entre 6 y 10 años. Esto quiere decir que en poblaciones como la nuestra, que se aplica la última dosis a los 6 años, tendríamos acumulación de susceptibles a partir de aproximadamente los 16 años de edad (8, 247, 397).
4. Cambios en la población de *Bordetella pertussis*. Este es el caso de la gran epidemia de Holanda de 1996. Se demostró una evolución de las cepas circulantes probablemente inducida por la vacunación (2, 42, 103, 296, 302, 312, 314, 396, 405). La divergencia entre las cepas vacunales y la población bacteriana circulante, que apoyarían dicha hipótesis, fue observado en varios países: Estados Unidos, Finlandia, Reino Unido, etc (31, 38, 58, 61, 67, 121, 173, 311, 440). Estas divergencias podrían causar una disminución en la efectividad de la vacuna en uso. En nuestro país, Hozbor y col. realizaron la caracterización de algunos aislamientos circulantes, especialmente desde el punto de vista del polimorfismo de PRN y PT. Estos aislamientos, provenientes de pacientes pediátricos fueron clasificados como S1A y PRN2, distintos de las cepas vacunales. Esto concuerda con la tendencia observada a nivel mundial. La selección

en nuestro país del mismo tipo de cepas que las aisladas en EEUU y países de Europa brinda un apoyo importante a la hipótesis de la inmunoselección causada por la vacunación (40, 51, 131, 154, 177, 228, 232, 241, 286, 287, 304, 319, 389, 394, 395, 402, 404).

Todos los cambios verificados en la epidemiología de la enfermedad: aumento del número de casos, corrimiento de las edades afectadas, circulación de cepas distintas, incremento de la frecuencia de aparición de especies de *Bordetella* distintas a *B. pertussis*, marcan la imperiosa necesidad de aumentar la vigilancia sobre una enfermedad de tan alto impacto en la salud pública. Es imprescindible profundizar las investigaciones tendientes a clarificar las causas de estas observaciones, única manera de diseñar las acciones más eficientes para atenuar la emergencia de la patología (361).

### **OBJETIVOS**

No ajena a la situación descripta, en la provincia de Neuquén a partir de 2004 se detecta un aumento significativo de casos de pertussis: 210 casos notificados y 95 confirmados por PCR y/o Serología. Este aumento sostenido en el tiempo, marcó la necesidad de contar con metodologías diagnósticas en la provincia de forma de facilitar la toma de medidas oportunas. Para ello se diagramó un proceso de desarrollo e investigación que dio origen a esta tesis, cuyos objetivos fueron:

#### **Objetivo general:**

Investigación de la situación provincial de coqueluche a partir de la implementación y/o desarrollo de metodologías que contribuyan a la confirmación local de los casos sospechosos.

**Objetivos específicos:**

1. Puesta en marcha de metodologías diagnósticas en Laboratorio/s de la Provincia.
2. Aplicación y análisis de resultados en el laboratorio
3. Optimización de las metodologías implementadas con especial orientación a las necesidades y realidades de la Provincia.
4. Aplicación y evaluación de resultados obtenidos.



# CAPÍTULO UNO

## IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE COQUELUCHE EN LA PROVINCIA DE NEUQUÉN

### INTRODUCCIÓN

La Provincia del Neuquén posee una extensión territorial de 94.078 Km<sup>2</sup>. Su límite norte es la provincia de Mendoza hasta la intersección con el meridiano 68° 15' de longitud oeste; al este continúa con el mismo meridiano hasta los ríos Neuquén y Limay, punto de diferenciación con la provincia de Río Negro, y el límite oeste lo traza la cordillera de los Andes, limitando con Chile.

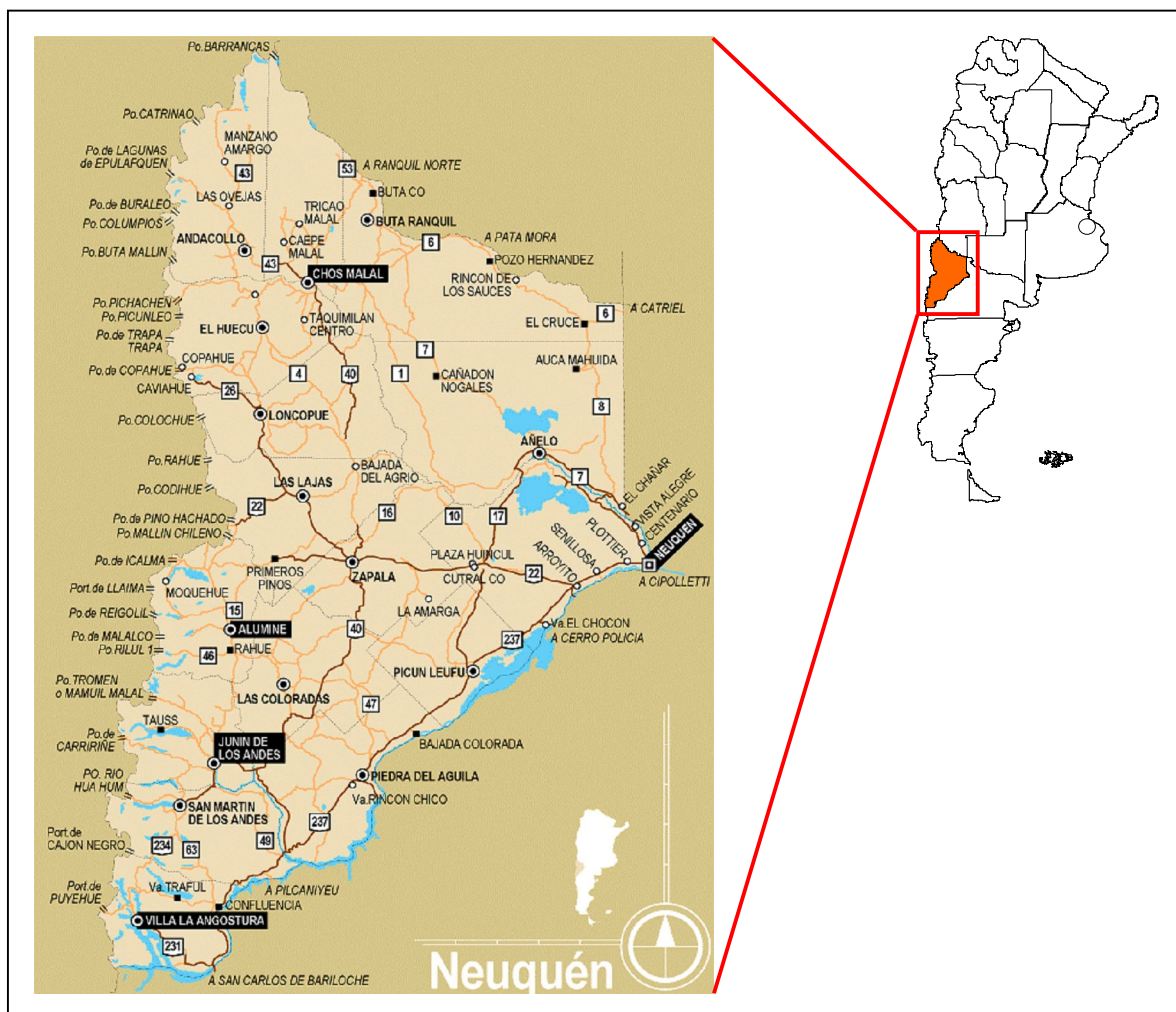


Fig.1. Provincia de Neuquén. Ubicación territorial en la República Argentina

Como el resto de la Patagonia, se caracteriza por una baja densidad poblacional (5 habitantes por km<sup>2</sup>). En 1915, se dividió el territorio en 16 departamentos, respondiendo a principios puramente administrativos y territoriales.

La provincia se caracteriza por tener un alto porcentaje de población migratoria (35%). Esto responde principalmente al marcado dinamismo de la población asociada a las principales actividades económicas de la provincia: turismo, minería, hidrocarburos y construcción de obras públicas. Los cambiantes movimientos migratorios hacen difícil la proyección de poblaciones, en especial en ciertas localidades en las que nuevos emprendimientos generan una gran inmigración o, por el contrario, una fuerte emigración cuando estos finalizan.

Según el censo de 2001, la provincia tiene 473.315 habitantes, con un índice de masculinidad de 59.7. La tasa de variación relativa fue del 21.9% para el período 1991-2001. Los departamentos que más han crecido en población entre ambos censos, son Los Lagos y Pehuenches (107 y 110% de crecimiento); mientras que el departamento de Collón Curá tuvo un decrecimiento poblacional del 44% .

La pirámide poblacional de la provincia presenta una base ancha, 30% la población entre 0 y 14 años, 60% el grupo entre 15 y 64 años (población económicamente activa) y 6% la población de 65 años y más. Sin embargo, la comparación de datos censales previos muestra una tendencia a disminuir su base (Tabla 1 y Fig. 2):

**Tabla 1. Población de la Provincia de Neuquén. Variación intercensal 1980-1991-2001.**  
(Dirección Provincial de Estadísticas y Censos. Neuquén)

<b>Censo</b>	<b>% 0 a 14 años</b>	<b>Variación intercensal</b>
1980	39.2	
1991	34	-4.8 %
2001	30	-4 %

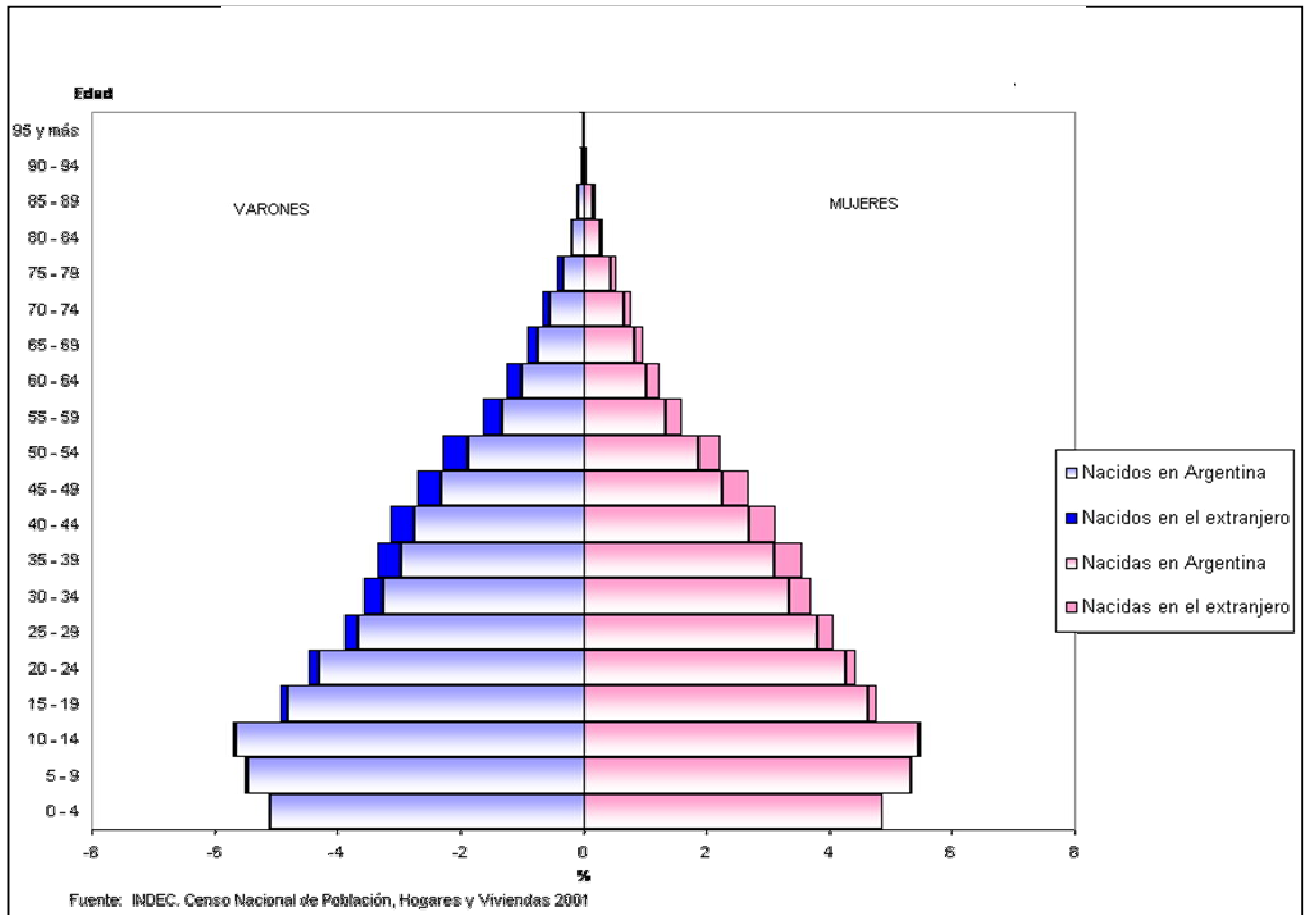


Fig. 2. Provincia de Neuquén. Población: estructura por edad, sexo y lugar de nacimiento.

La provincia puede dividirse en cuatro regiones relativamente definidas. La zona noroeste y cordillerana, de preponderante actividad ganadera (fundamentalmente ovinos y caprinos) y minera; la zona sur, rica en recursos turísticos; la zona centro, con explotaciones de hidrocarburos y mineras, y la zona del alto valle de los ríos Limay y Neuquén, donde predominan las actividades frutícolas e hidroenergéticas.

### ORGANIZACIÓN GENERAL DEL SISTEMA DE SALUD DE NEUQUÉN

En el ámbito del Sector Salud, la provincia está dividida en seis Zonas Sanitarias que contienen 30 áreas programáticas hospitalarias, colindantes. A excepción del área Neuquén capital, que cuenta con tres hospitales y 15 centros de salud, cada una de las áreas programas está representada por un Hospital cabecera y sus Centros de Salud.

Si bien la accesibilidad a los centros urbanos no es igual en toda la provincia, un Sistema de Salud que priorizó entre sus objetivos la extensión de la cobertura, permite a través de centros de salud, puestos sanitarios y visitas programadas a las áreas rurales, extender la cobertura a un muy alto porcentaje de la población.

El Estado definió su responsabilidad para con la Salud en la Constitución Provincial (dictada en 1957), donde se declara: *"Es obligación ineludible de la Provincia velar por la Salud y la Higiene públicas, especialmente en lo que se refiere a la prevención de enfermedades, poniendo a disposición de sus habitantes, servicios gratuitos y obligatorios en defensa de la salud, por lo que ésta significa como capital social"*.

Dentro de este contexto ideológico, se desarrolló la política del Sector Salud. El Sistema Provincial de Servicios de Salud está integrado por los recursos de tres subsectores de atención médica: Público, Privado y de Obras Sociales.

El **Subsector Público** cubre a la totalidad de las localidades de la Provincia, a través de Hospitales y Centros de Salud, así como a las comunidades rurales, por medio de Puestos Sanitarios y/o visitas periódicas desde el hospital de referencia. En muchas localidades del interior de la Provincia, es el único prestador de servicios. Los **Subsectores Privado** y de **Obras Sociales** han localizado sus efectores con internación en las principales ciudades de la Provincia, tales como Neuquén, Centenario, Cutral Có, Plaza Huincul y Zapala. Existen Centros Médicos ambulatorios y consultorios particulares en diversas localidades del interior provincial.

## **PROGRAMACIÓN DE ACTIVIDADES DEL SUBSECTOR PÚBLICO DE SALUD**

En 1970 se formuló una programación de actividades cuyos lineamientos conservan aún plena vigencia y se organizó un sistema de servicios, iniciando un proceso cuya dinámica se ha mantenido merced a su ratificación por los sucesivos gobiernos jurisdiccionales.

La programación de actividades pone énfasis en la promoción y protección de la salud, la atención médica básica y el saneamiento del medio.

Además de la modalidad tradicional de asistencia hospitalaria a través de consulta e internación, se mantiene atención en Centros de Salud ambulatorios (urbanos) y se efectúan visitas a los pobladores rurales, como se mencionó anteriormente, por parte de médico, enfermera, odontólogo, agente sanitario y otros integrantes del equipo de salud. El Subsector Público Provincial comprende un Nivel Central normativo y de conducción general y una red integrada por los establecimientos prestadores de servicios. Dicho Nivel Central es conducido por la Subsecretaría de Salud, dependiente del Ministerio de Salud y Seguridad Social, la cual ejerce su función de conducción hacia las Jefaturas de Zonas Sanitarias. El equipo técnico de la Subsecretaría de Salud cubre las áreas de Programación, Información, Regulación y Control, y Administración. El sistema se continúa con un modelo organizacional regionalizado e integrado, a través de una red de establecimientos de niveles de complejidad creciente, agrupados en Zonas Sanitarias. Para ello se divide el territorio en áreas programáticas locales, bajo la administración de una Zona Sanitaria, que es responsable del funcionamiento de los servicios de salud de su área y está capacitada para articular el funcionamiento de los recursos. Con el crecimiento y desarrollo provincial, las cuatro Zonas Sanitarias en que se dividió inicialmente el territorio, se han transformado en seis, además del Hospital Provincial de Neuquén. En cada Zona Sanitaria hay un hospital cabecera zonal, de mediana complejidad, con el cual se vinculan a través de interconsultas y derivaciones, otros hospitales de baja complejidad ubicados en localidades vecinas.

Existe un hospital que por su ubicación geográfica (en la confluencia de las rutas que se dirigen hacia la capital provincial) progresivamente va tomando características de hospital de referencia interzonal para las Zonas Sanitarias III y IV, que es el Hospital Zapala, y un hospital de referencia provincial (máxima complejidad del sistema), que es el Hospital Dr. Eduardo Castro Rendón, en la ciudad de Neuquén.

La provincia cuenta con 29 hospitales, 68 centros de salud, 64 puestos sanitarios rurales; además de varios establecimientos con internación privados y de obras sociales.

La Zona Metropolitana conduce los servicios de salud de la Ciudad de Neuquén (con excepción del Hospital Neuquén), que están constituidos por el Hospital Dr. Horacio Heller, el Hospital Bouquet Roldán y 16 Centros de Salud, todos ellos con un área programa asignada.

El triángulo que -hacia el este- forma la Provincia, está atendido por seis hospitales: Centenario, Plottier, Senillosa, El Chocón, San Patricio del Chañar y Rincón de los Sauces, bajo la conducción de la Zona Sanitaria I, con asiento administrativo en la Ciudad de Neuquén.

El área centro-sur de la Provincia está atendida por tres hospitales: Cutral Cópula Huinca, Picún Leufú y Piedra del Aguila y constituye la Zona Sanitaria V, con asiento en Plaza Huinca.

La Zona Sanitaria III, con cabecera en Chos Malal, atiende el cuadrante norte de la Provincia, con seis hospitales: Chos Malal, Tricao Malal, Andacollo, Las Ovejas, Buta Ranquil y El Cholar.

La Zona Sanitaria IV atiende el sector sur, con cuatro establecimientos: San Martín de los Andes, Junín de los Andes, Villa La Angostura y Las Coloradas, con cabecera en San Martín de los Andes.

El sector oeste está atendido por siete hospitales dependientes de la Zona II, con asiento en la Ciudad de Zapala: Zapala, Mariano Moreno, Bajada del Agrio, Las Lajas, Loncopue, El Huecú y Aluminé.

Todos los hospitales, así como los Puestos Sanitarios (o Escuelas Rurales colindantes), están conectados por una red de radiocomunicaciones, existiendo además teléfono en casi todas las localidades y en algunos parajes rurales.

Los hospitales que cuentan con teléfono, disponen del servicio de correo electrónico, vinculado con la Subsecretaría de Salud. Los hospitales recurren a sus ambulancias para las derivaciones por vía terrestre y, en caso de requerirse evacuaciones por vía aérea, el servicio es prestado por empresas particulares.

En cuanto a los niveles de complejidad, debe entenderse que, en términos generales, los hospitales de baja complejidad (Nivel III) ofrecen atención médica indiferenciada a través de profesionales especialmente capacitados en medicina general. En los servicios de mediana complejidad (Nivel IV) se incorporan las especialidades llamadas básicas: pediatría, obstetricia, cirugía y clínica médica. En el hospital interzonal (Nivel VI) y en forma parcial en las cabeceras de zonas, se agregan las especialidades de traumatología, oftalmología y otorrinolaringología, además de algunas prácticas de diagnóstico más complejas. El hospital provincial (Nivel VIII) dispone de casi la totalidad de las subespecialidades médicas, además de mantener actividades permanentes de docencia e investigación.

Todos los hospitales de la Provincia ofrecen, normalmente, atención odontológica, así como radiología y laboratorio básicos. A su vez, en cada localidad suele haber Centros de Salud ambulatorios, que dependen del hospital local, con asistencia diaria de profesionales del hospital.

En diferentes parajes de las áreas rurales existen Puestos Sanitarios, que están a cargo de agentes sanitarios y reciben visita médica y odontológica periódica, desde su hospital base.

La organización del sistema de salud de la provincia permite un manejo coordinado de todas las actividades, incluyendo aquellas relacionadas con la vigilancia epidemiológica de patologías priorizadas por las autoridades. Entre estas se destacan aquellas enfermedades prevenibles por vacunación y, dentro de ellas, ocupa un lugar de creciente importancia la coqueluche.

### **SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE COQUELUCE EN LA PROVINCIA DE NEUQUÉN**

Entre los años 1994 y 2000 se notificaron 14 casos de coqueluche en la provincia de Neuquén, ninguno de los cuales fue confirmado ya que en esa época no se realizaban estudios de laboratorio en la provincia ni se derivaban a otros centros. A partir del año 2001 se comenzó con la derivación de sueros al Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB) de la ANLIS "Dr. Carlos

G. Malbrán" (Buenos Aires) para confirmación de la patología. Entre 2001 y 2003 se notificaron 59 casos de los cuales 12 se confirmaron por serología. A partir de 2004 se detecta un aumento significativo de la incidencia con 210 casos notificados y 95 confirmados por PCR y/o Serología. La distribución de los casos de coqueluche durante los años 1994 a 2004 se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2. Casos sospechosos y confirmados de coqueluche, distribución por edad del paciente y año. Provincia de Neuquén. Años 1994 a 2004.**

Año	Total	Confirmados	Sospechosos	Menores de 6 meses	De 6 m a 1 año	Mayores de 1 año
1994	3		3	3	0	0
1995	2		2	2	0	0
1996	0		0	0	0	0
1997	2		2	2	0	0
1998	6		6	3	3	0
1999	1		1	1	0	0
2000	0		0	0	0	0
2001	17	9	8	15	2	0
2002	17	3	14	17	0	0
2003	11	0	11	10	0	1
2004	210	95	115	76	34	100

Frente a esta situación, las áreas involucradas del Nivel Central de la Subsecretaría de Salud tomaron la decisión de crear un grupo de trabajo integrado por representantes de las áreas de epidemiología, inmunizaciones, infectología y red de laboratorios. Se le encomendó estudiar el incipiente brote de coqueluche, organizando las actividades de control que fueran necesarias. De esta manera se normatizaron los procesos de atención, de búsqueda de contactos, de quimioprofilaxis, se solicitaron los recursos necesarios para la compra de insumos y medicamentos, se revisaron las actividades de vacunación y las coberturas alcanzadas con las distintas dosis, se consensuó una definición de caso más apropiada para trabajar en el brote y se decidió evaluar



la posibilidad de contar con metodologías diagnósticas en la Provincia, ya que la gran cantidad de casos lo justificaban y era imprescindible acelerar los tiempos de confirmación para ir teniendo un panorama de la situación más ajustado a la realidad en cada momento.

**Definición de caso sospechoso:** el grupo de expertos decidió disminuir en 7 días el período de los necesario para considerar caso sospechoso, basado en que en situación de brote es necesario sensibilizar la definición para permitir tomar decisiones y acciones más rápidamente (309). Evaluaciones posteriores demostraron que esto permitió sensibilizar la detección de casos sin disminución de importancia en la especificidad. La definición de caso adoptada y aún vigente es:

- **Mayores de 6 meses:** Tos por siete o más días de duración, acompañada por uno o más de los siguientes síntomas o signos: accesos de tos violentos y repetidos (paroxismo), vómitos después de la tos, estridor inspiratorio. Tos por siete o más días de duración que sea contacto de un "caso".
- **En niños menores de 6 meses:** Cuadro clínico de infección respiratoria acompañado de al menos uno de los siguientes: apneas, cianosis, accesos de tos paroxística, vómitos luego de la tos.

Para la clasificación final de los casos fue necesario adoptar algunas definiciones, de esta forma cada caso se consideró:

- **Confirmado:** aquel con PCR positiva y/o cultivo positivo y/o cuádruplicación de los títulos serológicos entre la primera y la segunda muestra. También se considera dentro de esta categoría a aquellos que reúnen criterios clínico epidemiológicos y son contactos de un caso confirmado.

- **No confirmado:** aquel que reúne criterios clínico-epidemiológicos pero no es confirmado por ninguna metodología de laboratorio ni es contacto de caso confirmado.
- **Descartado:** aquel que no reúne criterios clínico-epidemiológicos.

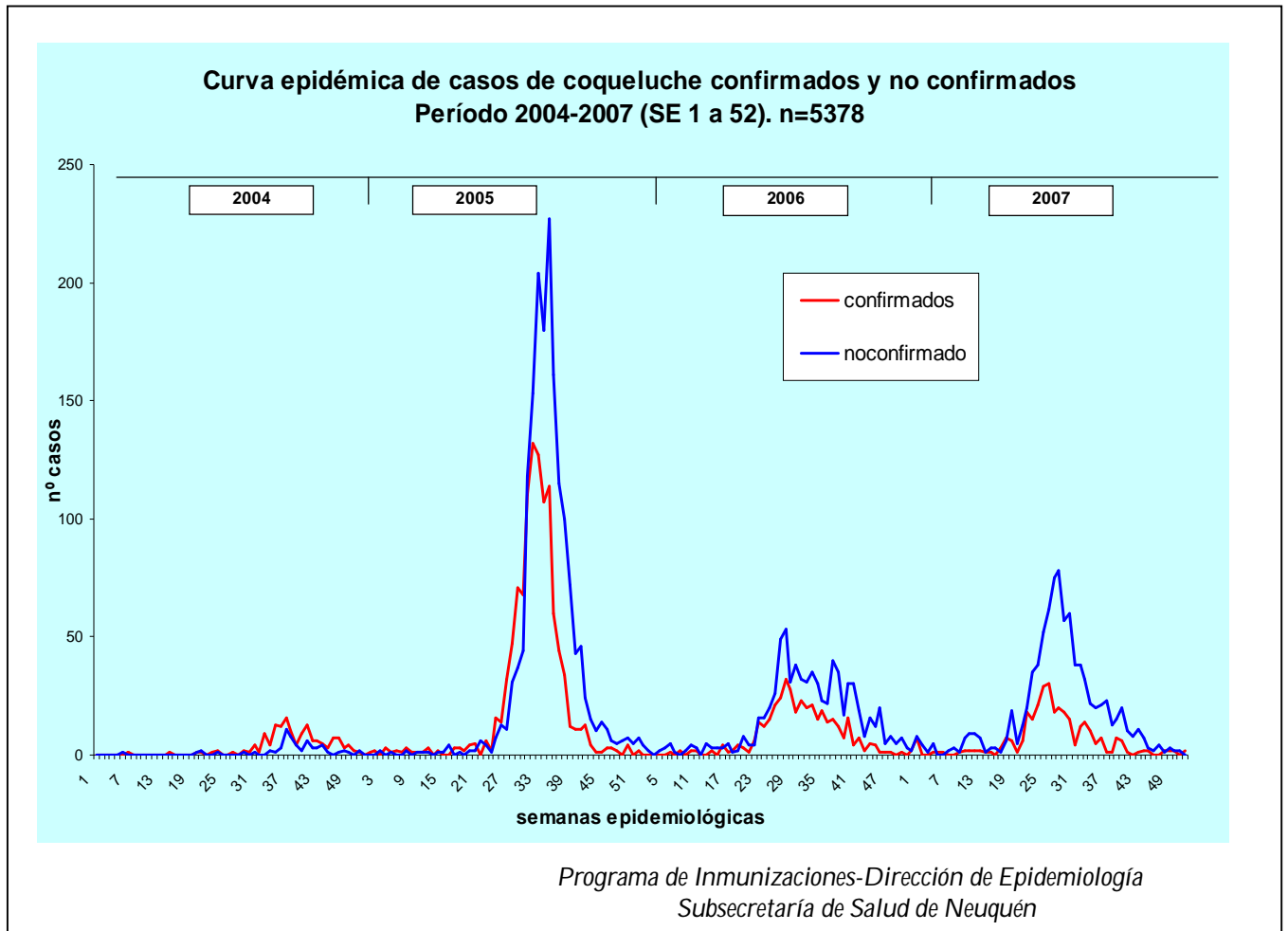
## **IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE COQUELUCHE EN LA PROVINCIA**

Para avanzar en este aspecto, se realizaron las consultas pertinentes a los Laboratorios Nacionales de Referencia: el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) dependiente de ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Ellos fueron quienes asesoraron a la provincia y guiaron la transferencia de las metodologías de cultivo y diagnóstico molecular. Estas fueron las herramientas diagnósticas elegidas teniendo en cuenta la experiencia de los laboratorios microbiológicos locales y la disponibilidad de equipamiento y personal recientemente capacitado en metodologías diagnósticas de base molecular. En Agosto del año 2005 un equipo del IBBM y del INEI-ANLIS Malbrán se trasladó a la ciudad de Neuquén con el objetivo de trabajar en conjunto con los profesionales locales en la puesta a punto de los métodos y en el comienzo del diagnóstico local.

Se decidió implementar la PCR específica para el agente causal, *Bordetella pertussis*, que amplifica la secuencia promotora del gen de la Toxina Pertussis (162, 212), para posteriormente evaluar la necesidad de complementar con otras PCR. También en ese momento se planteó la necesidad de evaluar el funcionamiento del diagnóstico molecular en las muestras provenientes de toda la provincia, teniendo en cuenta las particularidades de la misma y las dificultades que pudieran existir, particularmente en invierno, para realizar las derivaciones de las mismas en forma rápida.

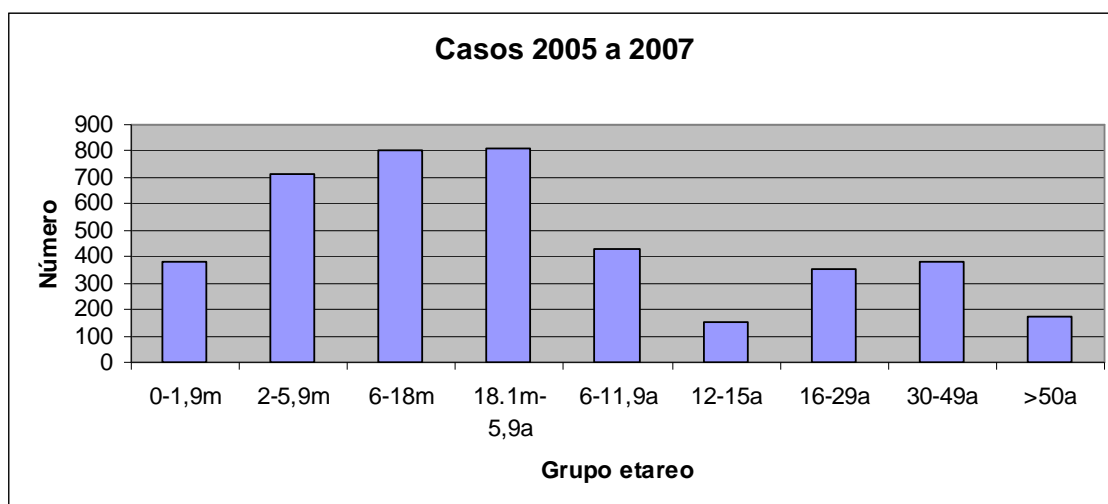
Así a partir de mediados del año 2005 la provincia tuvo la posibilidad de realizar localmente una parte del diagnóstico. Esto coincidió en el tiempo con un incremento notorio de los casos, que alcanzaron niveles de epidemia. Esta

situación tiende, aunque con niveles más bajos, a repetirse en los años 2006 y 2007 estableciéndose una situación endemo-epidémica, es decir una alta endemia con brotes epidémicos anuales (Fig. 3).



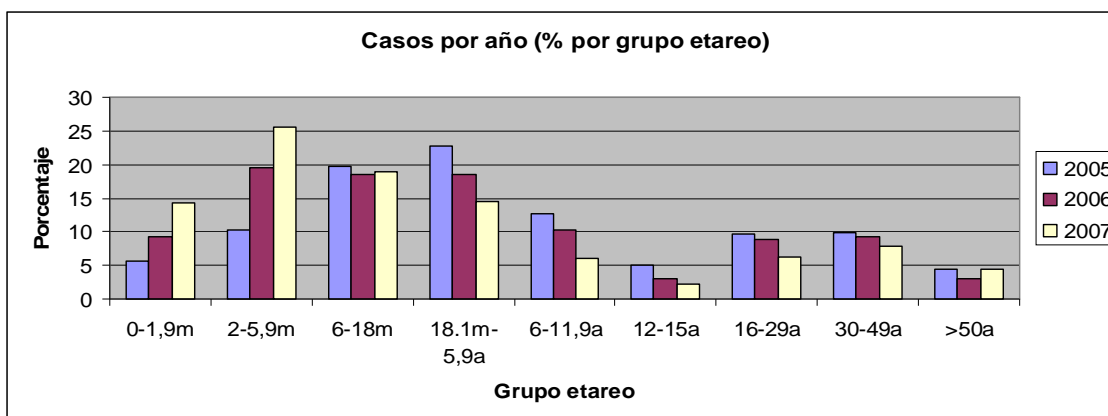
**Fig. 3. Curva epidémica de casos de coqueluche confirmados y no confirmados. Provincia de Neuquén. Años 2004 a 2007**

Durante el período 2005-2007 fueron denunciados más de 5500 casos. El 64,5% de ellos correspondieron a menores de 6 años de edad (Fig. 4). El 35.5% restante se registró en mayores de 6 años de edad, un porcentaje relativamente alto para ese grupo etáreo sobre todo si se tiene en cuenta que clásicamente coqueluche se describe como una enfermedad de la primera infancia. Este número de casos en adolescentes y adultos es importante ya que este grupo puede actuar como reservorio y diseminador del patógeno.



**Fig. 4. Distribución de casos de coqueluche por grupo etáreo. Provincia de Neuquén. Años 2005 a 2007**

Si se desagregan estos datos según el año, se puede observar una tendencia declinante de casos en los grupos de mayor edad con un aumento considerable en los menores de 6 meses (Fig. 5).



**Fig. 5. Distribución de casos de coqueluche por grupo etáreo y año. Provincia de Neuquén. Años 2005 a 2007**

Como puede observarse en el gráfico de distribución de casos confirmados por PCR, los mismos se reparten casi en partes iguales en los grupos de 2 a 6 meses (175/879, 20%), 6 a 18 meses (211/879, 24%) y 18 meses a 6 años (178/879, 20%); siendo los porcentajes en otras edades menores y variables (Fig. 6).

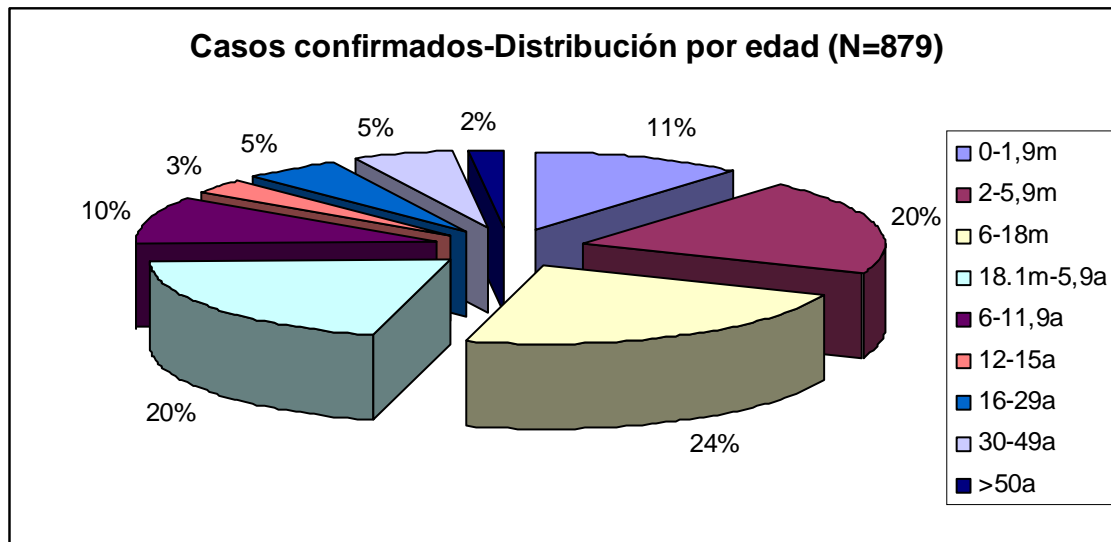


Fig. 6. Casos confirmados de coqueluche. Distribución por edad. Provincia de Neuquén. Años 2005 a 2007

En el siguiente gráfico se observa que el número de casos en pacientes que han recibido tres dosis de vacuna o más es alto (408 casos confirmados en los que este dato es conocido), incluyendo 49 casos en pacientes con esquema completo (5 dosis) (Fig. 7).

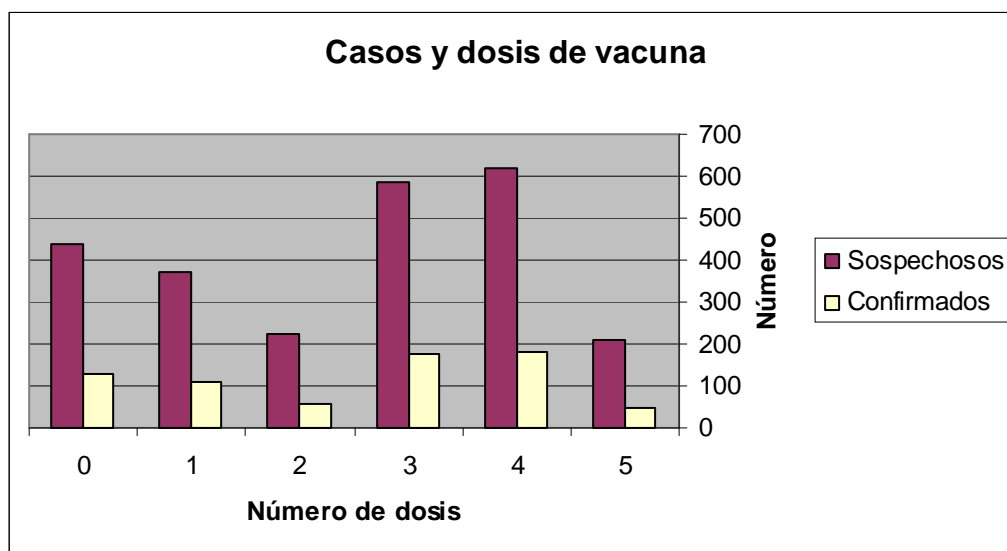


Fig. 7. Distribución de casos sospechosos y confirmados de coqueluche según dosis de vacuna recibidas. Provincia de Neuquén. Años 2005 a 2007.

Estos datos permiten conocer la situación epidemiológica de coqueluche en la Provincia de Neuquén, caracterizada por un brote de gran magnitud en el año 2005 y una situación en los años posteriores que tiende a establecerse como una

endemia con alto número de casos. Hay denuncia de la enfermedad en todos los grupos etéreos pero tienden a concentrarse en los menores de 6 años. La presencia de la enfermedad en adolescentes y adultos merece especial atención. Esta no es una situación privativa de la provincia, ya que se repite en otras regiones del país y en varios países del mundo. Este grupo etéreo constituye el reservorio y la fuente de contagio para los niños más pequeños. En muchos lugares del mundo se ha comenzado, o se está evaluando, la vacunación de adolescentes y adultos como estrategia para disminuir el reservorio. Es también preocupante el alto número de casos en pacientes vacunados, este hecho requiere un profundo análisis ya que puede implicar la necesidad de elaboración de vacunas con mayor eficacia.

Luego del brote del 2005 en nuestra provincia, que afectó a personas de todas las edades y que movilizó recursos de todo el Sistema Provincial de Salud, surgieron muchos interrogantes, entre otros: cuáles fueron las causas de este importante aumento de casos?, cuáles son los mejores criterios de laboratorio para confirmar los casos?, que participación pueden tener otros agentes etiológicos en los cuadros clínicos observados?, cuál es el rol de los adolescentes y adultos en la transmisión de la enfermedad?, cómo actuar en el futuro en situaciones similares?, como proteger a los grupos de mayor riesgo?.

Indudablemente cualquier mejora a introducir en las acciones destinadas al control y manejo de coqueluche debe descansar en la excelencia del diagnóstico confirmatorio del laboratorio. Está claro que la mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica se alcanzan cuando se utilizan adecuadamente las tres herramientas disponibles: cultivo, serología y diagnóstico molecular. Durante la epidemia de coqueluche la provincia decidió implementar la metodología de PCR para confirmar los casos. Con más de 1500 muestras estudiadas en 2005 y más de 2500 ensayos de PCR realizados a lo largo del año, esta metodología se convirtió en una herramienta imprescindible en el manejo de la situación por su rapidez, sensibilidad y especificidad. A pesar de ello, fue

posible advertir algunas limitaciones del método así como incertidumbres respecto a sus parámetros de desempeño.

Uno de los problemas observados fue un número excesivo de repeticiones de las determinaciones. Dada la naturaleza de las muestras utilizadas, casi exclusivamente aspirados nasofaríngeos muchos de ellos altamente mucosos, y un procesamiento simple que abarata costos, muchas amplificaciones no podían interpretarse adecuadamente por suciedad en las corridas electroforéticas y esto requería repetir el proceso con muestras diluídas.

Por otra parte, no existía seguridad respecto al tiempo en que podían conservarse las muestras hasta el procesamiento sin pérdida apreciable de sensibilidad, ni tampoco cual era la forma y la temperatura más adecuada para hacerlo. Como la epidemia se diseminó por toda la provincia y el diagnóstico se centralizó en el laboratorio de referencia de la provincia, muchas muestras debían derivarse desde más de 400 km. Respecto del diagnóstico microbiológico, el cambio realizado fue la descentralización del mismo para intentar una mejora en la recuperación del agente causal al disminuir el tiempo de espera entre la toma de muestra y el cultivo. Los cultivos, a partir de la muestra tomada del paciente con sintomatología compatible con coqueluche, se comenzaron a realizar en los Hospitales cabecera de cada Zona Sanitaria provincial. En cambio, el diagnóstico molecular por PCR continuó centralizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la capital provincial, persistiendo incertidumbre sobre la adecuada conservación de las muestras durante las derivaciones.

Finalmente, existían dudas si la PCR elegida (detección de la secuencia promotora del gen de Toxina pertussis, específica para *Bordetella pertussis*) era la más adecuada dentro de las disponibles y si era posible alguna mejora de la misma.

Con el objetivo de establecer las bases para una mejora en el diagnóstico con herramientas moleculares de coqueluche, que nos permitiera hacer más eficiente el manejo de la situación endemo epidémica de la enfermedad, se diseñó una investigación para encontrar respuesta a las siguientes preguntas:

- 1. *Cuál es la mejor preparación de las muestras respiratorias para la PCR, compatible con costos razonables?***
- 2. *Cómo se conservan mejor las muestras antes de procesarlas?. A que temperatura?. Es necesario un procesamiento preliminar antes de derivarla al Laboratorio de Biología Molecular?***
- 3. *La PCR en uso, es la más adecuada dentro de las existentes y a nuestro alcance?. Es posible introducir alguna mejora en su sensibilidad y/o especificidad?***

Para intentar dar respuestas a las preguntas planteadas se programó una investigación dividida en tres etapas. Los resultados alcanzados se presentan en este trabajo de tesis. Se espera que los mismos puedan contribuir al objetivo de optimizar el diagnóstico molecular de coqueluche, adaptado a condiciones como las que se dan en nuestra provincia y destinado fundamentalmente a dar la respuesta más adecuada posible a cada enfermo independientemente de su lugar de residencia. Se espera además que los mismos ayuden a comprender algunos aspectos de la epidemiología de la enfermedad en Neuquén.



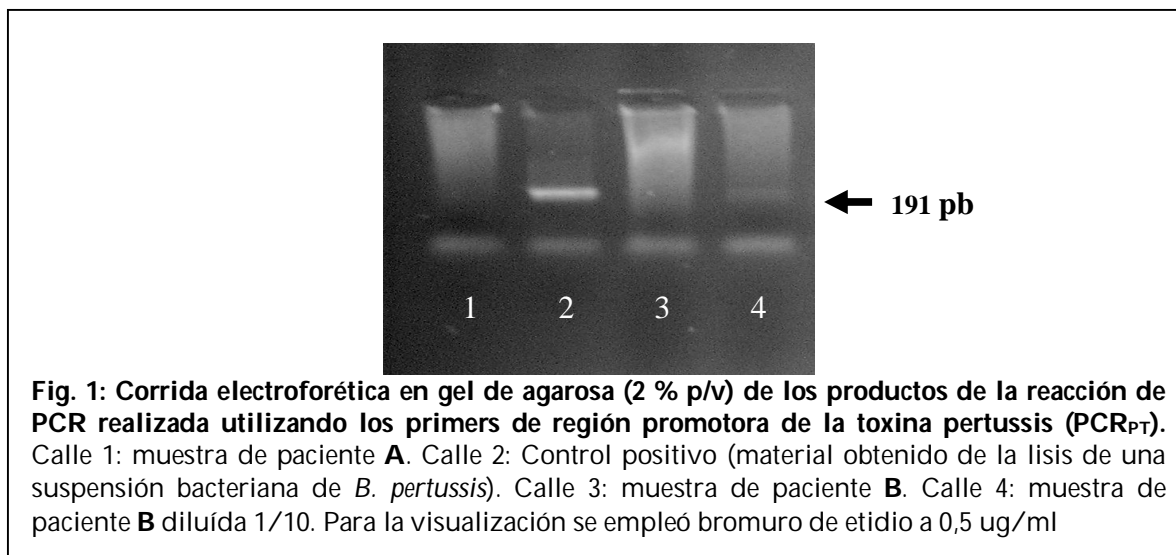
# CAPÍTULO DOS

## OPTIMIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos ha tenido un impacto significativo en el diagnóstico y manejo de muchas enfermedades infecciosas (135, 140, 265, 378). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), permite amplificar cantidades mínimas de ácidos nucleicos y generar millones de copias idénticas de la secuencia del ADN o ARN blanco en cuestión de horas. Esto le permite tener una alta sensibilidad (entre 90% y 100%) y una gran especificidad (más del 95%). Mediante la PCR se pueden detectar directamente en las muestras clínicas, de forma rápida y precisa, la presencia de microorganismos patógenos de lento crecimiento, tales como *Chlamydia*, *Mycoplasma*, micobacterias (97, 385), etc., fastidiosos como *B. pertussis* (1, 11, 15, 21, 110, 111, 128, 142, 162, 212, 257, 336), o que no pueden ser cultivados tales como algunos virus de la hepatitis y papilomavirus (30). La metodología de PCR si bien requiere de comprensión de las aplicaciones clínicas y sus ventajas potenciales, limitaciones y utilidad clínica, es hoy considerada una herramienta poderosa para el diagnóstico rápido y preciso de una serie de enfermedades infecciosas, incluyendo pertussis, con impacto real en el manejo y evolución del paciente. El uso de esta técnica puede incrementar la sensibilidad del gold estándar (cultivo) en casi un 40% con una especificidad estimada de 97% - 98% respecto del cultivo. Además el empleo de la misma ha permitido disminuir los tiempos de obtención de resultados de días a horas. Estas ventajas han motivado el uso más masivo de esta metodología en el diagnóstico de la enfermedad. Tanto para esta metodología como para el diagnóstico microbiológico, la muestra de elección es el aspirado nasofaríngeo y alternativamente, especialmente en adolescentes y adultos, el hisopado

nasofaríngeo. Aunque estas muestras constituyen el mejor material para el diagnóstico, en algunos casos en que su obtención sea difícil, puede optarse por el esputo, especialmente en adultos. Cualquiera de estas tres muestras si bien son las adecuadas para la patología, presentan cierta dificultad para su utilización en el diagnóstico molecular dada su naturaleza mucosa. Esto trae aparejado un incremento en la manipulación de la muestra y la necesidad de realizar repeticiones de la metodología para poder interpretar adecuadamente el resultado. Estos inconvenientes deslucen las ventajas de la metodología y obviamente aumentan costos. El procedimiento más sencillo propuesto para el tratamiento de estas muestras consiste en una incubación de la misma con proteinasa K a 65° C durante al menos una hora. Luego de la incubación se procede a la inactivación de la enzima por calentamiento y a una centrifugación para emplear el sobrenadante como molde de la reacción de PCR (153, 271). Si bien los resultados obtenidos con esta metodología son satisfactorios, es frecuente encontrar resultados como los mostrados en la Fig. 1.



En esta figura puede observarse la interferencia producida por el exceso de mucosidad que en el caso de la muestra obtenida del paciente B se corrige diluyendo la misma (aparece una débil banda que indica positividad, calles 3 y 4 de la Fig. 1). Estas dificultades se presentan con una frecuencia tal que obliga a repetir un porcentaje alto de las muestras con el consiguiente aumento de costos

y demora en la obtención de resultados. Por ejemplo, en el año 2007 hemos recibido en el Laboratorio Central de Neuquén 1267 muestras obtenidas de pacientes con sintomatología compatible con pertussis. Del total de muestras procesadas, un 70.0% se pudieron resolver en la primera determinación, las restantes muestras requirieron repeticiones: 311 (81.8%) de ellas se repitieron una vez, 60 (15.8%) se debieron repetir 2 veces y 9 (2.4%) se resolvieron recién en la cuarta vez que se procesaron. Todas estas repeticiones estuvieron relacionadas a las dificultades en la interpretación de resultados causadas por la mucosidad de las muestras.

Por estas consideraciones, la primera etapa del trabajo de investigación aquí presentado tuvo como objetivo mejorar la calidad de la muestra utilizada para el diagnóstico molecular de coqueluche de forma de disminuir la necesidad de repeticiones. Para ello se seleccionaron de la bibliografía los métodos de preparación de muestras propuestos para especímenes respiratorios y destinados a ser utilizados en varias PCR distintas, algunos fueron modificados ligeramente para adaptarlos a las condiciones de trabajo locales. Se intentó abarcar la mayor diversidad posible de reactivos utilizados, incluso evaluando algunas combinaciones de los propuestos en los distintos trabajos. A continuación se describe la metodología empleada para luego abordar la presentación de los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Cepas y condiciones de cultivo:** Durante el estudio se utilizó una cepa de *B. pertussis* TOHAMA (CIP 8132), cedida por el Laboratorio Nacional de Referencia. La misma se conservó en caldo glicerinado 15% en freezer a -70° C hasta el momento de su uso. Una alícuota de la misma se sembró en agar Bordet Gengou suplementado con sangre ovina defibrinada a una concentración final de 15% v/v. Se incubó a 35° C durante 72 horas en atmósfera saturada de humedad. A partir de este crecimiento en placa se realizaron suspensiones para utilizarlas luego como se detalla más adelante

**Preparación de las muestras:** Los métodos seleccionados para el estudio fueron:

**Método 1:** Este método consiste en el tratamiento de la muestra de ANF (100  $\mu$ l) con 2  $\mu$ l de Proteinasa K (0.2 mg/ml en 12 mM Tris hydrochloride, pH 7.6) durante 1 hora a 65° C. Para ello la muestra previamente debe homogenizarse mediante agitación en vortex durante al menos 15 segundos. Luego de la incubación, se procede a la inactivación de la enzima proteínasa K mediante el calentamiento de la muestra a 100° C durante 10 minutos. Finalmente se procede a centrifugar la muestra a 8000 x g por 2 minutos. El sobrenadante que así se obtiene se emplea como molde (153, 271).

**Método 2:** Es igual al método 1 pero al sobrenadante final se le adicionan 3 volúmenes de etanol 96° y luego se incuba a -20 C durante 30 minutos para lograr la precipitación de ADN. Posteriormente se centrifuga en frío a 16000 x g durante 15 minutos. Se descarta el sobrenadante y se procede a lavar el pellet con 200  $\mu$ l de etanol 70%, se mezcla por inversión y se centrifuga a 16000 x g durante 5 minutos. Finalmente se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 10  $\mu$ l de agua estéril.

**Método 3:** En este método el ANF (100  $\mu$ l) se trata con un agente mucolítico (100  $\mu$ l de una solución 2,5% de N Acetil L Cisteína en 68mM buffer fosfato pH: 6.7), se mezcla por inversión y se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 3000 x g durante 20 minutos. Se descarta el sobrenadante y se usa el sedimento para el paso posterior de extracción de DNA. Se resuspende en 450  $\mu$ l de solución de lisis que contiene KCl, Tris-ClH, Mg<sub>2</sub>Cl, Tween 20 y Nonidet P-40. Se agita en vortex 15 segundos y se incuba a 95° C durante 30 minutos. Completado este tiempo se homogeiniza durante 2 minutos por inversión. Se agregan 9  $\mu$ l de Proteinasa K (0.2 mg/ml), se agita en vortex 15 segundos y se incuba nuevamente 1 hora a 65° C. Posteriormente se procede a inactivar la proteínasa K calentando a 100° C durante 10 minutos. Finalmente se centrifuga a 8000 x g durante 2 minutos (47, 113, 198, 218, 269).

- Preparación de la solución de lisis: se pesan 0.121 g de TRIS y se llevan a 100 ml con agua destilada, se corrige el pH llevándolo a 8.3. Se agregan 746 mg de KCl, 24 mg de Cl<sub>2</sub>Mg, 0.5 ml de TWEEN 20 y 0.5 ml de NONIDET P-40

**Método 3A:** Se utiliza el sobrenadante obtenido en los pasos anteriores como molde para la reacción de PCR.

**Método 3B:** Se realiza luego una extracción con Fenol-Cloroformo: se agrega igual volumen que la muestra de solución de fenol/cloroformo y se mezcla por inversión. Se centrifuga a 10000 x g 20 minutos. Luego se trasvasa la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipita el DNA con 3 volúmenes de etanol absoluto (o un volumen de isopropanol). Se enfría en hielo durante 15 minutos y se centrifuga a 10 000 x g durante 20 minutos. Por último se resuspende en 10 µl de agua estéril.

**Preparación de la solución de fenol/cloroformo:** es una solución de fenol saturado en TRIS pH: 8 / cloroformo. Método práctico: se coloca en una probeta de 250 ml la droga sólida de TRIS hasta la marca 10, se disuelve con 120 ml de agua y se agregan 70 ml de fenol fundido, luego de que se separan las fases se ajusta el pH. Para la solución final se agrega igual volumen de cloroformo.

**Método 4:** Este método introduce la utilización de detergentes (Tween 20 e Igepal/Nonidet). Consiste en la centrifugación directa de la muestra clínica (100 µl) a 16000 x g durante 20 minutos. Luego se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 100 µl de solución tamponada de lisis. Como en los métodos anteriores se incubaba 1 hora a 65° C y se inactiva la proteinasa K durante 10 minutos a 100° C. Se centrifuga a 8000 x g durante 2 minutos. (5).

- Preparación de la solución tamponada de lisis:
  - 10 mM TRIS pH 8.3
  - 0.45% Tween 20
  - 0.45% Igepal CA-630 (0.5 ml de NONIDET P40)
  - 0.2 mg/ml de proteinasa K
  - Preparación: pesar 0.121g de TRIS y llevarlo a 100 ml con agua destilada, llevar a pH: 8.3. Colocar 60 ml de la solución anterior en un frasco estéril y agregar 270 µl de Tween 20, 270 µl de Igepal y 0.012 g de proteinasa K pura. Disolver y fraccionar 150 µl por vial. Conservar a -20° C.

**Método 5:** En este caso se utiliza otro agente mucolítico (Dithiothreitol) junto con una resina (Chelex). Se tratan 100 µl del ANF con 20 µl de dithiothreitol (60 mg/ml) y 3 µl de proteinasa K (0.2 mg/ml) por 1 hora a 65° C. Luego se agregan 200µl de Chelex 100 (50 mg/ml) y se calienta a 100° C durante 15 minutos. Se centrifuga a 16000 x g

durante 15 minutos y por último a 180  $\mu$ l del sobrenadante se le agregan 20  $\mu$ l de una solución que contiene 100mM TRIS y 10 mM EDTA (pH: 7.4).

- Solución TRIS-EDTA pH 7.4: Disolver 0.0186 g de EDTA y 0.06 de TRIS en 5 ml de agua estéril. Llevar a pH: 7.4. (29, 334, 335, 418).

**Método 5 (Modificado):** El objetivo de este método es simplificar los pasos del método anterior. Para ello se prepara una solución de lisis con 20  $\mu$ l de DTT, 3  $\mu$ l de Proteinasa K y 200  $\mu$ l de Chelex por cada muestra, en un tubo eppendorf, y se le agrega posteriormente 100  $\mu$ l del ANF. Se agita 15 segundos en vortex para homogeneizar y se centrifuga a 16000 x g durante 30 segundos. Se coloca en baño de 65° C durante una hora y posteriormente se inactiva la proteinasa K calentando a 100° C durante 15 minutos. Se agita nuevamente en vortex durante 15 segundos y se centrifuga a 16000 x g por 15 minutos. El sobrenadante, sin trasvasar, se usa como templado para la PCR.

**Método 6:** Kit de Qiagen (QIA amp® DNA Mini Kit): método comercial diseñado para la rápida purificación de DNA proveniente de una amplia gama de muestras. Resumidamente, consta de un tratamiento de la muestra con un buffer de lisis conteniendo Proteinasa K, un paso de fijación del DNA a columnas de silica gel, lavados sucesivos para eliminar impurezas y contaminantes y una elusión final del DNA purificado (336, 337).

**Método 7:** Este método combina la utilización de un agente mucolítico con la acción de los detergentes usados previamente (combinación de los Métodos 3 y 4). Para ello, se tratan 100  $\mu$ l de ANF con 100  $\mu$ l de una solución 2,5% de NAC en buffer fosfatos 68 mM pH: 6.7 (método 3). Se mezcla por inversión y se deja 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 16000 x g durante 20 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 100  $\mu$ l de solución de lisis (método 4). Se incuba 1 hora a 65° C y se inactiva la proteinasa K durante 10 minutos a 100° C. Finalmente se centrifuga 2 minutos a 8000 x g.

**Método 8:** este método permite comparar el comportamiento de los 2 agentes mucolíticos ensayados: NAC en el método 4 y dithiothreitol en el método 5. Se tratan 100  $\mu$ l de ANF con 100  $\mu$ l de solución 2,5% de NAC en PBS 68 mM pH: 6.7 (Método 3).

Se mezcla por inversión para homogeneizar y se deja 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 16000 x g durante 20 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 100 µl de agua. Se continúa como en el Método 5, con el agregado de Proteinasa K y CHELEX.

El objetivo de esta parte del estudio fue evaluar el comportamiento de distintos agente mucolíticos y detergentes, junto a distintas metodologías de extracción y purificación de DNA y el uso de resinas. Dada la compleja naturaleza de las muestras respiratorias, también fue necesario evaluar el comportamiento de distintas combinaciones de los mencionados agentes. Todo esto con el fin último de conocer cual es el mejor procedimiento de preparación de las muestras para el diagnóstico molecular.

**Comparación de los distintos métodos:** se realizó una suspensión de *Bordetella pertussis* cepa Tohama en concentraciones variables dependiendo de la experiencia. La concentración bacteriana de la suspensión fue determinada por recuento en placa por triplicado. Con esta suspensión se contaminó un pool de ANF negativos en una proporción 1:10 (suspensión:muestra final). Esta muestra fue procesada de acuerdo a cada uno de los métodos antes descriptos, y a partir del material así obtenido se realizaron diluciones seriadas en base 10. Se utilizó una alícuota de cada una de estas diluciones como molde en la reacción de PCR Standard de nuestro laboratorio.

**Procedimiento Standard de PCR:** Se utilizó la PCR descrita por Grimpel y col. en 1993 (19, 212), con algunas modificaciones realizadas por el Laboratorio Nacional de Referencia (IBBM, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata) y por nuestro propio laboratorio. Este ensayo amplifica la secuencia promotora del gen que codifica para Toxina Pertussis, obteniéndose una banda de 191 pb. Los reactivos y condiciones de la PCR (PCR<sub>PT</sub>) figuran en las siguientes tablas:

Tabla 1: Condiciones de la PCR<sub>PT</sub>

Condiciones de la PCR <sub>PT</sub>		
Desnaturalización inicial	1 min 15 seg a 94°	
Desnaturalización	20 seg a 94°	35 ciclos
Annealing	10 seg a 60°	
Elongación	15 seg a 72°	
Elongación final	30 seg a 72°	

Tabla 2: Reactivos empleados en la PCR<sub>PT</sub>

Reactivos empleados en la PCR <sub>PT</sub>			
Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración en la muestra	Volumen/muestra (µl)
Buffer	10X	1X	2
dNTP	2mM	200 µM	2
Cloruro de Mg	25 mM	2.5 mM	2
Primer P <sub>Tp1</sub>	10 µM	1.0 µM	2
Primer P <sub>Tp2</sub>	10 µM	1.0 µM	2
Agua			6.8
Taq polimerasa	5 U/µl	0.05 U/ µl	0.2
Templado			3
Volumen final			20

**Primers utilizados:**

P<sub>Tp1</sub>: 5´ CCAACGCGCATGCGTGCAGATTCGTC 3´

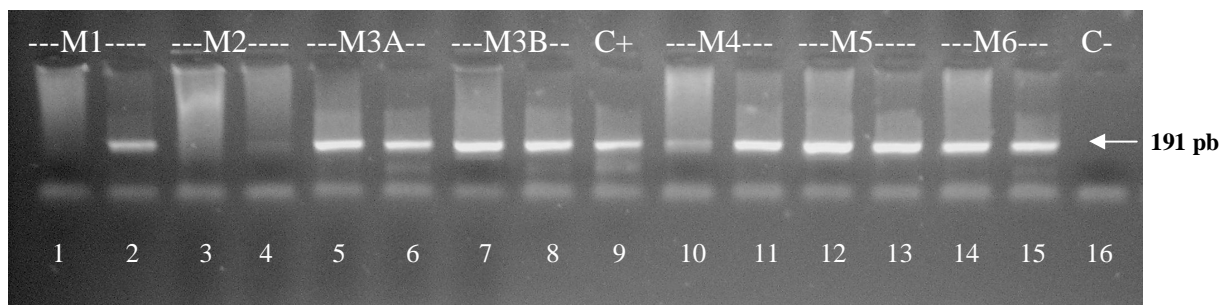
P<sub>Tp2</sub>: 5´ CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCTATTTTA 3´

**Análisis de los productos de PCR:** los productos de la PCR se analizaron en corridas electroforéticas empleando geles de agarosa al 2% (p/v) que contenían 0.5 µg de bromuro de etidio por ml. Las corridas se realizaron a 120 V durante 20 minutos. Los resultados se analizaron por visualización del gel a la luz ultravioleta y fueron registrados empleando una cámara fotográfica digital Panasonic Lumix.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los problemas principales que se presentan en el diagnóstico molecular aplicado a muestras respiratorias, es la naturaleza mucosa de las mismas. Es por ello que las primeras experiencias de este trabajo estuvieron orientadas a evaluar el comportamiento de agentes mucolíticos en la preparación de las muestras para PCR. Las diferentes metodologías empleadas fueron descritas como métodos en la sección Materiales y Métodos de este capítulo. En la figura 2 se muestran los resultados alcanzados cuando se procesó una muestra mucosa suplementada con una suspensión bacteriana de concentración conocida.

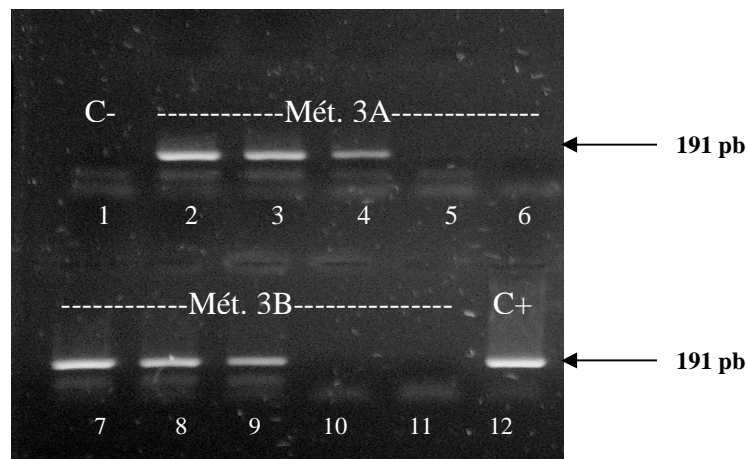


**Fig. 2: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de una muestra clínica de naturaleza mucosa contaminada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama  $10^5$  UFC /ml).** Calle 1: método 1 sin diluir la muestra, calle 2: método 1 con muestra diluída 1/10, calle 3: método 2 sin diluir la muestra, calle 4: método 2 con muestra diluída 1/10, calle 5: método 3A con muestra sin diluir, calle 6: método 3A con muestra diluída 1/10, calle 7: método 3B con muestra sin diluir, calle 8: método 3B con muestra diluída 1/10, calle 10: método 4 con muestra sin diluir, calle 11: método 4 con muestra diluída 1/10, calle 12: método 5 con muestra sin diluir, calle 13: método 5 con muestra diluída 1/10, calle 14: método 6 con muestra sin diluir, calle 15: método 6 con muestra diluída 1/10. Como control de la reacción se empleó el material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (calle 9) y como control negativo agua (calle 16). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/ml.

Como puede observarse en la Figura 2, los métodos 1 y 2 que no utilizan agentes mucolíticos, no permiten una buena resolución de las muestras especialmente cuando las mismas se emplean sin diluir. Las calles presentan un chorreado muy notorio desde el lugar de siembra de las muestras. Al diluir 1/10 la muestra, recién es posible vislumbrar la banda esperada. El método 4, que tampoco incluye agentes mucolíticos, presenta resultados similares aunque menos marcados. También puede observarse que el método 2 que utiliza precipitación del DNA con alcoholes resulta menos sensible que el método 1,

probablemente debido a pérdida de material durante la precipitación (calles 2 y 4). Los métodos 3A (calles 5 y 6), 3B (calles 7 y 8) y 5 (calles 12 y 13) presentan un comportamiento similar al método 6 (comercial), utilizado como método de referencia (calles 14 y 15).

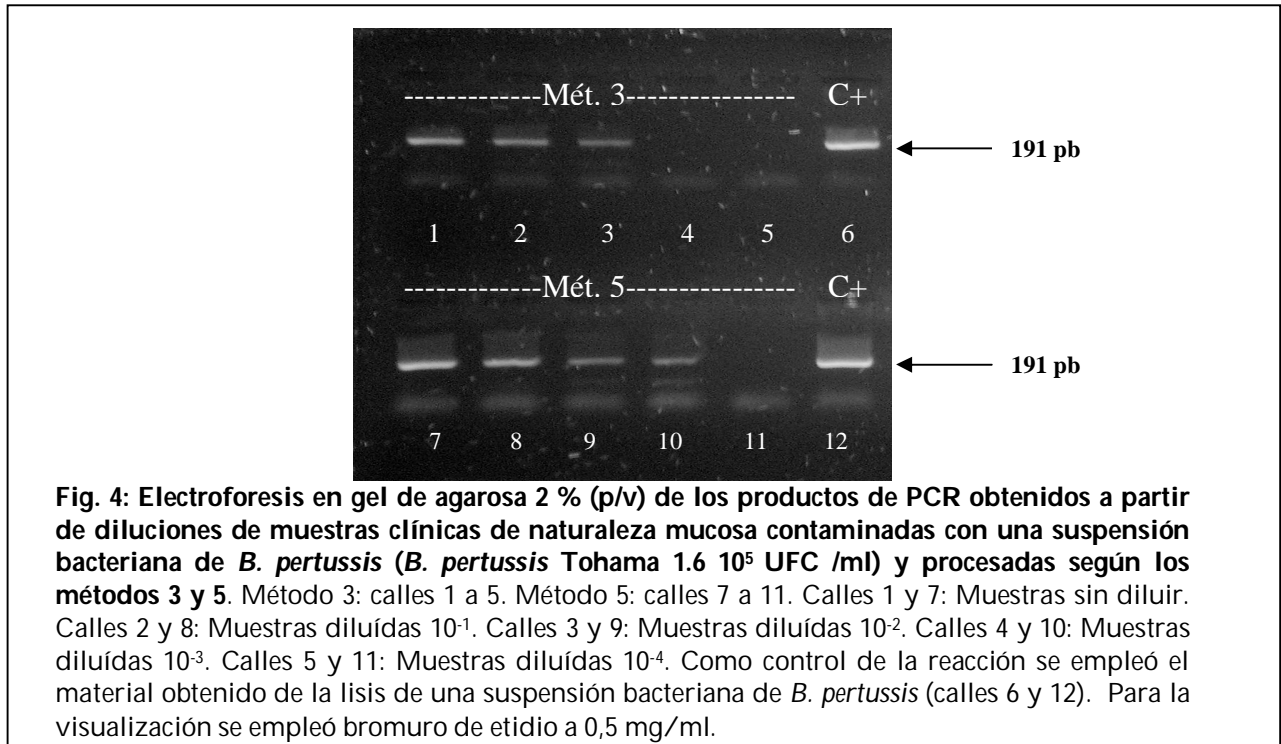
Para investigar si la extracción con fenol/cloroformo y posterior precipitación con alcohol incrementaba la sensibilidad se compararon los métodos 3A y 3B entre sí. Para ello a partir de una muestra mucosa suplementada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* en una concentración final de  $1.6 \cdot 10^4$  UFC/ml, se realizaron las metodologías 3A y 3B de tratamiento de las muestras y los productos obtenidos se diluyeron para ser utilizados como molde de la PCR. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.



**Fig. 3: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de diluciones de muestras clínicas de naturaleza mucosa contaminadas con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama  $1.6 \cdot 10^5$  UFC /ml) y procesadas según los métodos 3A y 3B.. Método 3A: calles 2 a 6. Método 3B: calles 7 a 11. Calles 2 y 7: Muestras sin diluir. Calles 3 y 8: Muestras diluídas  $10^{-1}$ . Calles 4 y 9: Muestras diluídas  $10^{-2}$ . Calles 5 y 10: Muestras diluídas  $10^{-3}$ . Calles 6 y 11: Muestras diluídas  $10^{-4}$ . Como control de la reacción se empleó el material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (calle 12) y como control negativo agua (calle 1). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/ml.**

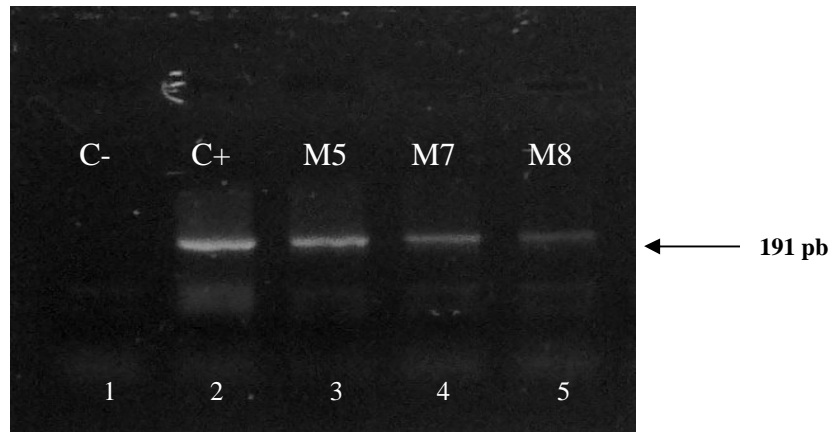
Como puede observarse en la Figura 3, los dos métodos ensayados brindan resultados similares ya que dan positivo hasta una dilución  $10^{-3}$  de la muestra original. Dado que el método 3B es mucho más laborioso, más caro y con mayores posibilidades de introducir contaminaciones en el proceso por incluir más pasos, se descarta su utilización.

Posteriormente se comparan los métodos 3 y 5. Este último introduce la utilización de CHELEX®, una resina compuesta por copolímeros de estireno divinilbenceno que contiene iones iminodiacetato y actúa como agente quelante.



Como se desprende del análisis de la Figura 4, el método 5 permite detectar hasta una dilución más de la muestra es decir una concentración bacteriana de  $1.6 \cdot 10^2$ UFC/ml, lo que indica mayor sensibilidad en la determinación.

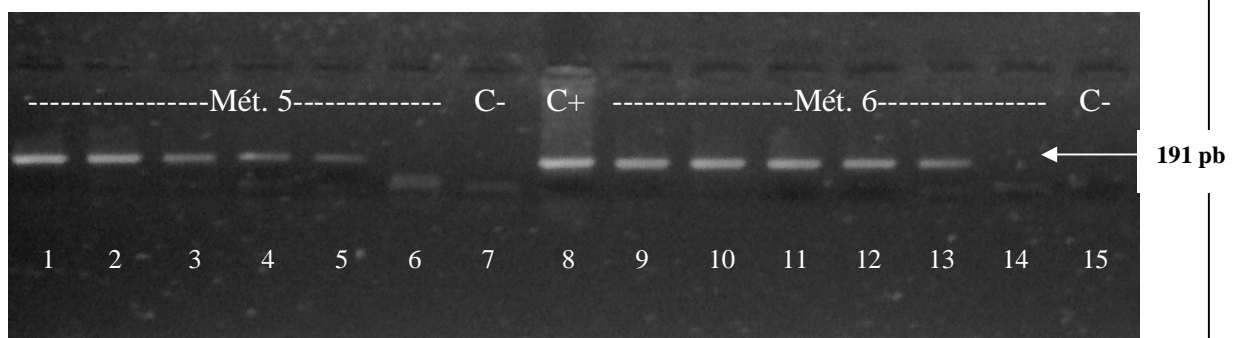
Los métodos 7 y 8 son una combinación de los métodos anteriores. El 7 combina el agente mucolítico del método 3 con el lisante del método 4, el objetivo fue ver si el agregado de este agente mejoraba las cualidades del método 4. El 8 combina también el método 3 con el método 5 y tenía como objetivo ver cual de los dos agentes mucolíticos ensayados (NAC y Dithiothreitol) funcionaba mejor.



**Fig. 5: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de una muestra clínica de naturaleza mucosa contaminada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama  $10^3$  UFC /ml) y procesada según los métodos 5, 7 y 8. Calle 3: Muestra procesada por método 5. Calle 4: muestra procesada por método 7. Calle 5: muestra procesada por método 8. Como control de la reacción se empleó el material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (calle 2) y como control negativo agua (calle 1). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/ml.**

Como puede observarse en la Figura 5, el método 5 presenta mayor intensidad de la banda que los otros métodos, indicando un mejor desempeño en la preparación de las muestras.

El método 5 finalmente fue comparado con un kit comercial de extracción y purificación de DNA (DNA minikit, QIAGEN®) (Método 6), para analizar su comportamiento frente a una técnica considerada de alto rendimiento.

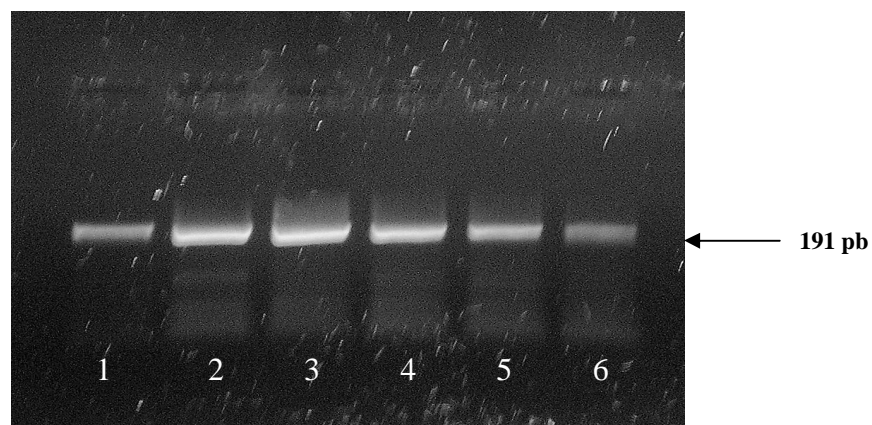


**Fig. 6: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de una muestra clínica de naturaleza mucosa contaminada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama  $1.4 \cdot 10^7$  UFC /ml) y procesada según los métodos 5 y 6. Método 5: calles 1 a 6. Método 6: calles 9 a 14. Calles 1 y 9: Muestras sin diluir. Calles 2 y 10: Muestras diluídas  $10^{-1}$ . Calles 3 y 11: Muestras diluídas  $10^{-2}$ . Calles 4 y 12: Muestras diluídas  $10^{-3}$ . Calles 5 y 13: Muestras diluídas  $10^{-4}$ . Calles 6 y 14: Muestras diluídas  $10^{-5}$ . Como control de la reacción se empleó el material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (calle 8) y como control negativo agua (calles 7 y 15). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/ml.**

Ambos métodos muestran un comportamiento similar ya que permiten detectar señal hasta una dilución  $10^{-5}$  de la muestra (0.42 UFC/reacción). Este dato es de relevante importancia ya que el método propuesto representa un costo inferior (un quinto del valor del método comercial), lo que lo hace muy aplicable al diagnóstico de rutina, especialmente cuando se procesa un número considerable de muestras.

El método 5 implica varios pasos, cada uno de los cuales puede introducir contaminaciones en el sistema que malogren los resultados. Por esa razón, se rediseñó el método para ser realizado en un solo paso y se suprimió el agregado de TRIS/EDTA final.

Se realizó una experiencia para comparar resultados con el método 5 y su modificación y evaluar el aporte del CHELEX® al desempeño del método. Para ello se utilizó una muestra clínica contaminada con una suspensión de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama  $10^4$  UFC /ml). Se la procesó simultáneamente por los métodos 5, 5 modificado y 5 modificado suprimiendo el CHELEX® en la solución de lisis. También fue procesada por el Método 1 para comparar con el método tradicional de procesamiento. Los resultados pueden observarse a continuación



**Fig.7: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de una muestras clínica de naturaleza mucosa contaminada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama  $10^4$  UFC /ml) y procesada según los métodos 5, 5 modificado y 5 modificado sin agregado de CHELEX. Calle 1: Control +. Calle 2: Método 5. Calles 3 y 4: Método 5 modificado. Calle 5: Método 5 modificado sin CHELEX. Calle 6: Método 1.**

Como puede observarse en la figura 7, no hay diferencias significativas entre el Método 5 (calle 2) y el Método 5 modificado en un solo paso (calles 3 y 4). Igualmente se destaca el aporte del CHELEX® al método ya que su ausencia (calle 5) produce una disminución en la intensidad de la banda.

## CONCLUSIONES

En 1994, Meade y col. (277) publican una serie de recomendaciones aplicables al uso de PCR para el diagnóstico de infecciones por *Bordetella pertussis*. Las dos primeras se refieren a que la muestra de elección es el ANF y que el procesamiento del mismo debe mantenerse en el mínimo posible.

Cuando se utilizan técnicas microscópicas para el diagnóstico de infecciones respiratorias, es posible evaluar la calidad de los especímenes sobre los que se trabaja. Si se utilizan técnicas de biología molecular como PCR, esto se torna más difícil, aunque es posible diseñar PCR adicionales que brinden alguna información sobre el tema. Por eso es fundamental que la muestra elegida tenga las mayores posibilidades de contener suficiente material respiratorio como para garantizar la sensibilidad de la técnica. Este requisito es generalmente cumplido por los ANF y frecuentemente no por los HNF. En un estudio realizado en nuestro laboratorio (datos no publicados), para evaluar la calidad de las muestras utilizadas para el diagnóstico de virosis respiratorias utilizando Inmunofluorescencia, se encontró que alrededor de un 16% por ciento de HNF no eran aptos para el diagnóstico por no contener material suficiente según la observación microscópica. En el caso de los ANF este porcentaje era inferior al 4%. Por estas razones, recomendamos fuertemente la utilización de ANF y no HNF.

Como fue planteado y mostrado en la figura 1, una de las dificultades más importantes en el diagnóstico molecular de infecciones respiratorias es la naturaleza mucosa de las muestras que dificulta la visualización de resultados en los geles. Las diluciones y repeticiones a las que esto obliga, atrasan significativamente la obtención de resultados y esto atenta contra una de las ventajas más importantes del diagnóstico por PCR que es su rapidez y la

posibilidad de actuar sobre el paciente y/o el foco de forma más eficiente. Además, si la muestra es muy mucosa es necesario realizar varias diluciones hasta obtener corridas electroforéticas limpias e interpretables. Esto genera incertidumbre sobre si el resultado final, cuando es negativo, no está causado por una excesiva dilución de la muestra.

Esto queda claramente demostrado en experiencias como la mostrada en la figura 2, donde la utilización de agentes mucolíticos no solo permite la obtención de corridas limpias si no que, además, permite la visualización de bandas “ocultas” debajo de los chorreados de las corridas. Por lo tanto estos agentes, N Acetil Cisteína o Dithiothreitol, deben ser incluidos en el procesamiento de las muestras.

Los tres métodos que utilizan agentes mucolíticos permiten una mejora sustancial en la visualización de resultados y por lo tanto se logra disminuir significativamente el número de repeticiones. Comparando los métodos 3A y 3B, se concluye que el comportamiento de ambos es similar. Siguiendo las recomendaciones de Meade y col, se prefiere el 3A por ser más simple y requerir menos manipulación de las muestras.

Al comparar los métodos 3 y 5, se concluye que éste último presenta una sensibilidad mayor, probablemente por el uso de la resina CHELEX®. Este agente actúa secuestrando metales pesados divalentes que podrían dañar el DNA. Además, se sabe que las muestras que contienen sangre, aún trazas de la misma, pueden inhibir la reacción de PCR. La resina CHELEX® actuaría quelando estas sustancias inhibitorias presentes en la sangre, permitiendo de esta manera la reacción de amplificación de DNA.

Los métodos 7 y 8, en comparación con el 5 (Figura 5) permiten demostrar por una parte que el CHELEX mejora la sensibilidad y por otra, que de los 2 agentes mucolíticos utilizados (N Acetil Cisteína y Dithiothreitol) el que se usa en el método 5 (Dithiothreitol) presenta un desempeño superior.

La comparación del método 5 con uno comercial (Figura 6), de reconocido desempeño y simpleza de realización, demuestra una sensibilidad similar. Los métodos comerciales de extracción y purificación de DNA son recomendables

por su estandarización, simpleza y desempeño general; pero tienen el inconveniente de su alto costo. El método descrito aquí tiene un costo sensiblemente menor y los resultados obtenidos son comparables con los mejores métodos comerciales.

Finalmente, una de las dificultades que plantea la utilización de este método evaluado en nuestro laboratorio, es la necesidad de realizar varias etapas lo que potencialmente podría introducir contaminaciones en el proceso. Por esa razón, se adecuó el método para realizarlo en un solo paso. Los resultados alcanzados fueron satisfactorios (Figura 7) por lo que recomendamos la utilización de esta metodología.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que el método de procesamiento debe ser lo más sencillo posible para evitar pérdidas de DNA y contaminaciones, debe tener en su composición un agente mucolítico para contrarrestar la naturaleza mucopurulenta de algunas muestras, debe poseer algún agente que neutralice posibles inhibidores presentes en las muestras y finalmente su costo debe ser accesible; se elige como el método que más se adapta a los requisitos enunciados, al método número 5. Como quedó demostrado en las experiencias realizadas, el método seleccionado tiene un comportamiento comparable a métodos comerciales de reconocido desempeño.



# **CAPÍTULO TRES**

## **ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS**

### **INTRODUCCIÓN**

La provincia de Neuquén tiene un Sistema de Salud organizado como Red de Hospitales y Centros de Salud de complejidad creciente, con un aceitado mecanismo de referencia y contrarreferencia. La provincia, como ya fue dicho, se divide geográficamente en 6 Zonas Sanitarias, cada una de las cuales tiene un Hospital Cabecera de Referencia. Todo el Sistema tiene como referencia final el Hospital Castro Rendón de la capital provincial. La organización de los laboratorios bioquímicos sigue los mismos lineamientos. La provincia tiene en total 22 laboratorios, cada Zona Sanitaria tiene su laboratorio cabecera y en la capital de la provincia se ubican los laboratorios referenciales provinciales, cada uno de ellos haciendo de cabecera de una o más redes temáticas. Finalmente, en la ciudad de Neuquén se encuentra el Laboratorio Central, dependiente del Departamento Red de Laboratorios, que tiene como misión principal servir de apoyo a los laboratorios hospitalarios asumiendo tareas no asistenciales de difícil inserción en los hospitales (preparación de reactivos, controles de calidad, evaluación de nuevos reactivos y procedimientos, Programa Provincial de Control de Calidad, etc). La otra área importante del Laboratorio Central es el desarrollo de nuevas metodologías, con especial énfasis en las técnicas de Biología Molecular, por lo que cuenta con un Laboratorio especialmente dedicado a este fin.

A raíz del brote epidémico de coqueluche del año 2005 se organizó una red provincial dedicada a hacer más eficiente el manejo integral del diagnóstico de la enfermedad desde el laboratorio. Con algunos cambios esa distribución de tareas es la que hoy subsiste. Como puede observarse en el esquema de la figura 1, cada Zona Sanitaria recibe en su Laboratorio Cabecera, las muestras

provenientes de todos los Hospitales y Centros de Salud que están bajo su coordinación. Debido a la extrema labilidad de *Bordetella pertussis*, estos laboratorios realizan los cultivos de las muestras respiratorias y derivan el espécimen para completar estudios al laboratorio del Hospital Heller. Este centro realiza la supervisión de los laboratorios cabecera de Zona Sanitaria y prepara las muestras para el procesamiento por PCR en el Laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio Central, adicionalmente envía muestras para diagnóstico serológico al Laboratorio Nacional de Referencia.

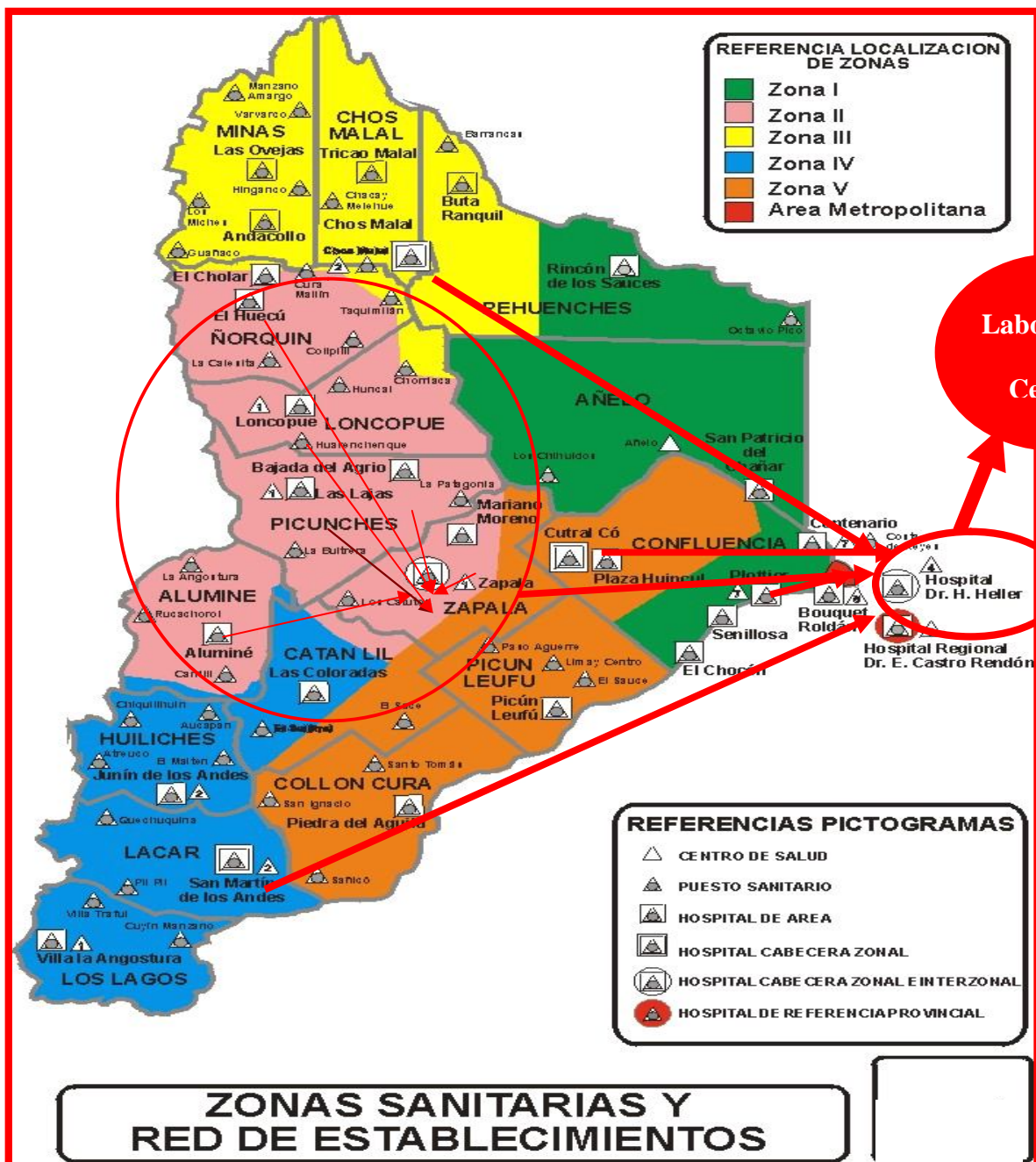


Fig. 1: Zonas Sanitarias y Red de Establecimientos. Provincia de Neuquén. Diagrama de funcionamiento de la Red de Coqueluche

Todo este movimiento de muestras implica una demora en el arribo de las mismas a los laboratorios de procesamiento final. Algunas muestras son derivadas desde parajes muy alejados de la provincia y recorren a veces más de 400 km en dos o tres transportes distintos. Dada esta problemática se decidió analizar cuáles serían las mejores condiciones de derivación y conservación de las muestras, adaptando las recomendaciones que surgieran a la realidad provincial.

Con esta premisa se diseñó esta etapa del estudio cuyo objetivo fundamental fue resolver los siguientes cuestionamientos relacionados al diagnóstico molecular de coqueluche en Neuquén, provincia que por la organización previa de su Sistema de Salud decidió concentrar el mismo en un laboratorio de la capital provincial:

- 1.Cuál es la temperatura ideal para conservar las muestras?***
- 2. Es útil que los laboratorios cabecera de zona realicen un procesamiento inicial antes de derivar?***
- 3. Durante cuanto tiempo puede conservarse la muestra en condiciones de temperatura ideal?***
- 4. Es posible interpretar un resultado de una muestra que, por las razones que fueran, no pudo respetar durante el proceso de derivación, las condiciones de tiempo y/o temperatura establecidos?***

Un principio básico de un sistema de laboratorios en red como el nuestro es el de **EQUIDAD**, es decir que todo habitante de la provincia debe tener posibilidades de acceder al diagnóstico de calidad independiente del lugar donde viva. El conocimiento sobre las mejores condiciones de conservación y transporte de muestras debe contribuir a este principio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Preparación de las muestras:** Con el fin de emular una situación real se decidió en esta etapa trabajar con muestras clínicas suplementadas con una suspensión

de *Bordetella pertussis* cepa Tohama (CIP 8132),  $1.6 \cdot 10^5$  UFC/ml. A partir de estas muestras se procedió a la evaluación de los límites de detección de la metodología aplicada. Para ello primeramente se realizó un pool con varias muestras clínicas que habían resultado negativas en la PCR. La nueva muestra así obtenida fue suplementada con la suspensión bacteriana de *B. pertussis*, realizando una dilución 1/10. Una alícuota de la misma fue procesada empleando el método 5 modificado descrito en el Capítulo 2 y que fuera seleccionado como el más conveniente. El producto de este tratamiento fue dividido en 15 alícuotas de 10  $\mu$ l cada una, las que fueron rotuladas con la letra "P" (muestras conservadas **procesadas** por Método 5). Otra alícuota de la muestra original fue dividida en 15 porciones de 100  $\mu$ l cada una y fueron rotuladas "NP" (muestras conservadas **sin procesar**). 5 tubos rotulados como P y 5 como NP fueron conservados a temperatura ambiente, otros 5 P y 5 NP se colocaron en heladera y finalmente un número igual de tubos de P y NP fueron colocados en freezer. Las temperaturas en los 3 distintos ambientes oscilaron durante los 30 días de la experiencia entre 18° y 24° para el ambiente, 4° y 6° la heladera y -18.5° y -21.5° el freezer. De cada una de las condiciones analizadas se tomaron muestras a las 24 y 72 horas y a los 7, 14 y 30 días. Las muestras P fueron utilizadas directamente en las PCR y las NP fueron procesadas por el Método 5 modificado antes de incluirlas en los ensayos moleculares. El producto final del procesamiento de los tubos NP y los tubos P directamente fueron diluidos serialmente, abarcando concentraciones entre  $1.6 \cdot 10^4$  y  $1.6 \cdot 10^0$  bacterias/ml. Alícuotas de cada una de las diluciones fueron utilizadas como templados utilizando el procedimiento de PCR Standard de nuestro laboratorio. La experiencia completa se realizó por triplicado en tres momentos sucesivos, no superpuestos.

**Procedimiento Standard de PCR:** Se utilizó la PCR descrita por Grimpel y col. ya descrita en el Capítulo 2, páginas 59 y 60 (162, 212).

**Análisis de los productos de PCR:** los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% conteniendo 0.5  $\mu$ g

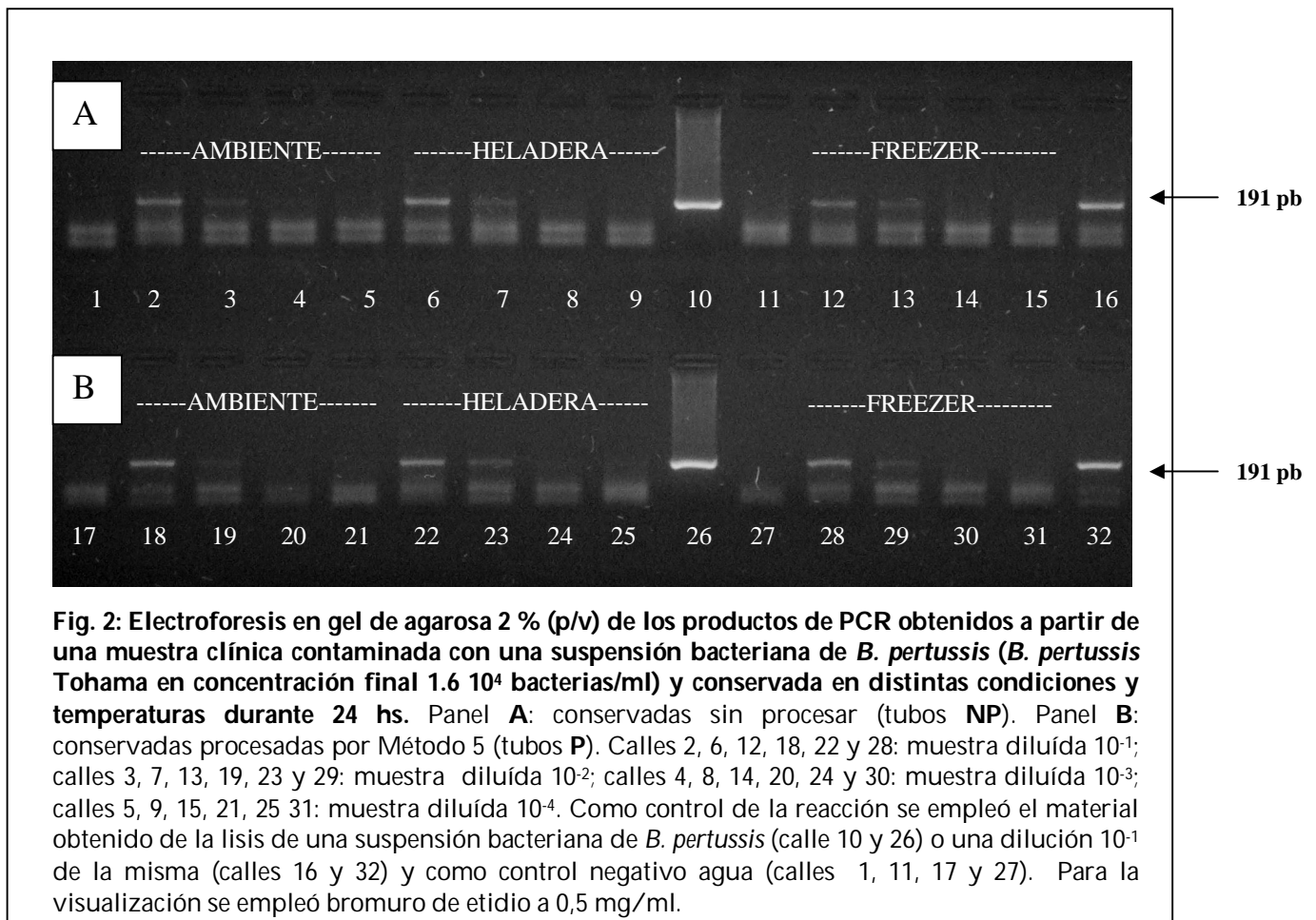
de bromuro de etidio por ml. Las corridas se realizaron a 120 V durante 20 minutos. Se analizaron los resultados por visualización a la luz ultravioleta y captación de imágenes mediante fotografiado del gel.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para analizar las mejores condiciones de conservación de muestras se ensayaron las distintas posibilidades al alcance de los laboratorios provinciales: temperatura ambiente, heladera o freezer. En el análisis se incluyeron distintos tiempos de conservación en cada una de las condiciones evaluadas y muestras con distinto grado de procesamiento: no procesadas o procesadas para la obtención de DNA

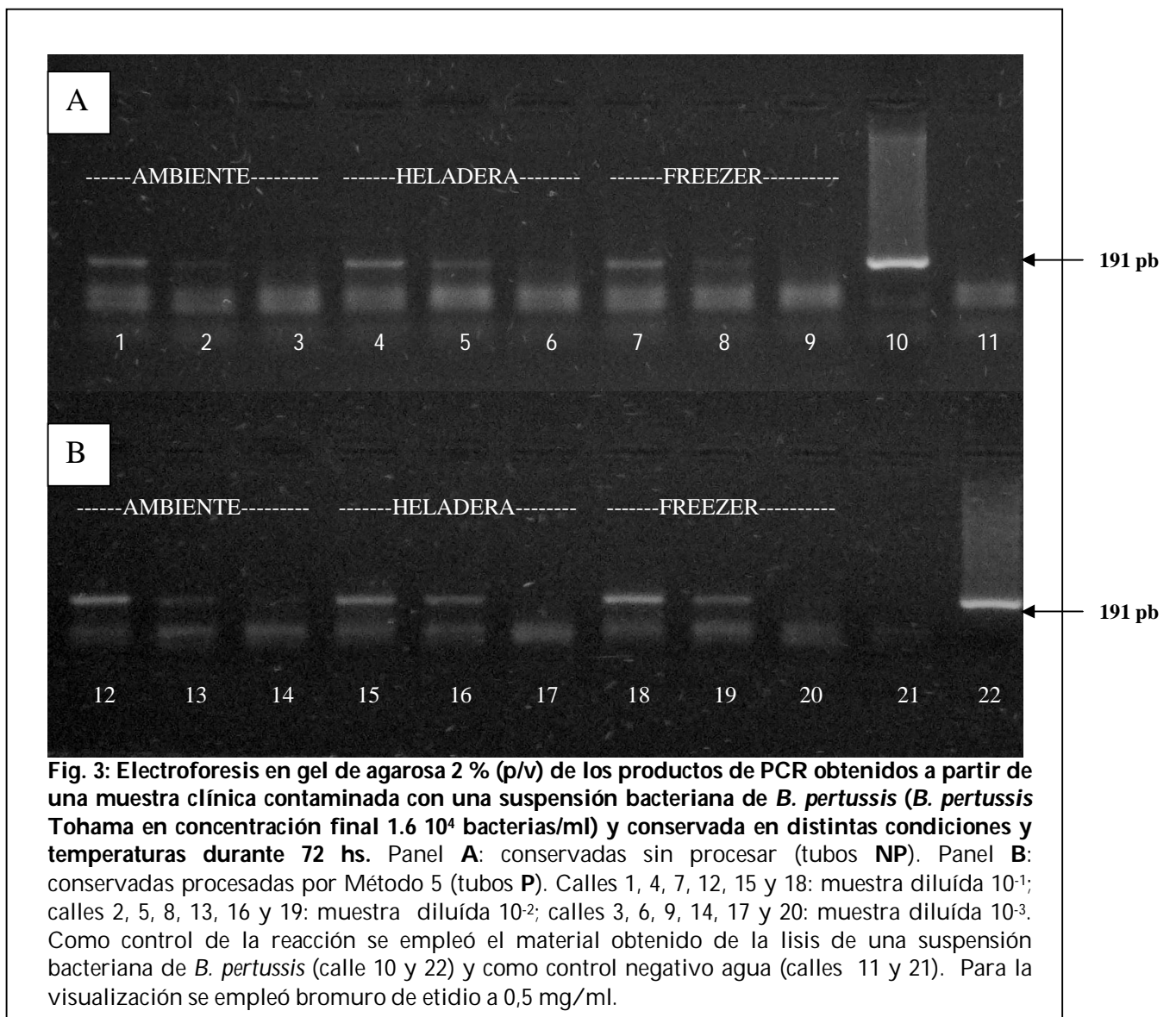
Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

### Conservación 24 horas:



Como puede observarse en la Figura 1 la calidad de las muestras no se ve alterada por haber sido conservadas 24 hs de manera diferencial. Tampoco parece influir en el resultado la preparación previa o no que hayan recibido. En todos los casos fue posible detectar amplicón hasta una dilución  $10^{-2}$  de la muestra original (0.5 UFC/tubo de reacción).

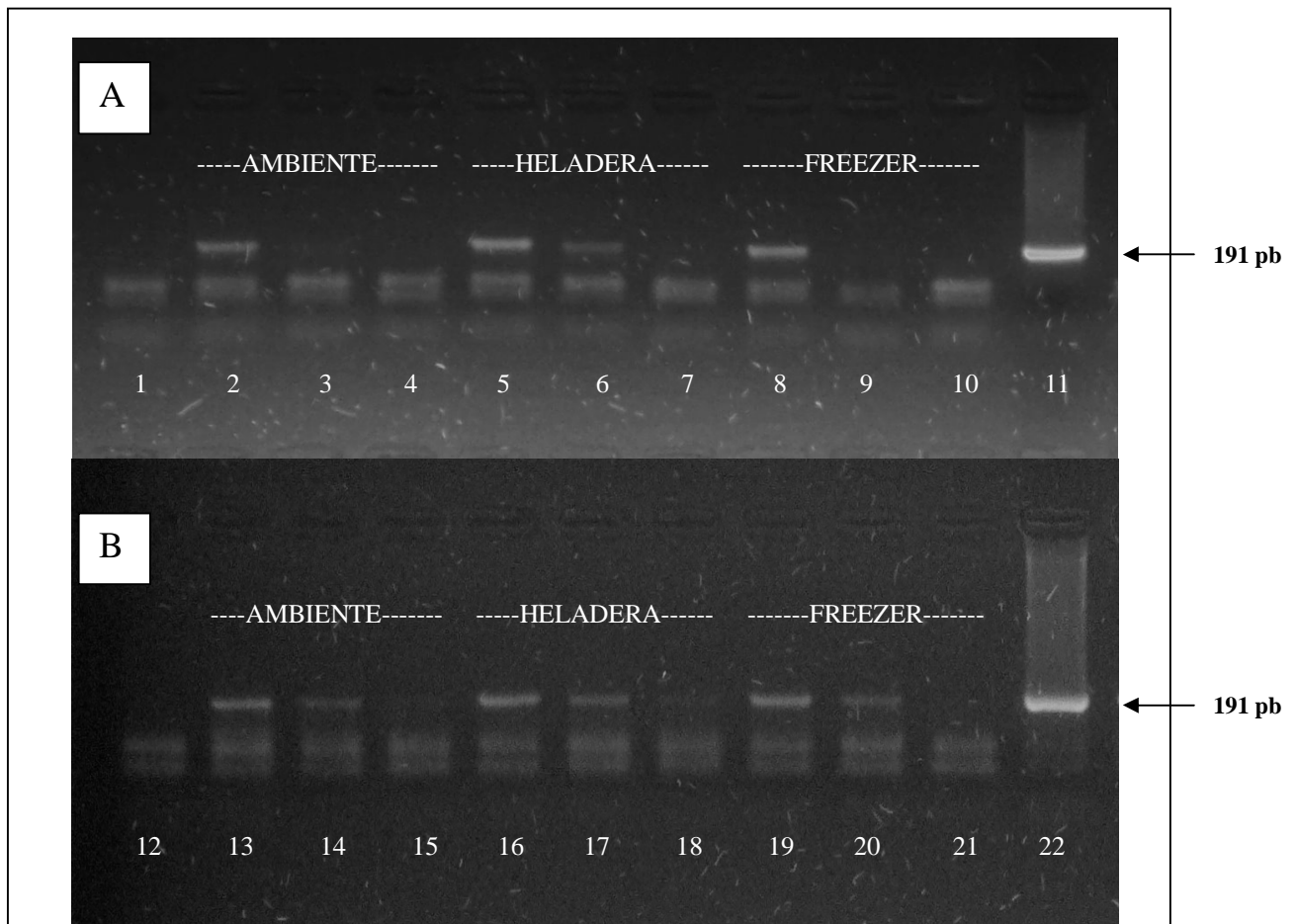
**Conservación 72 horas:**



**Fig. 3: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de una muestra clínica contaminada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama en concentración final  $1.6 \cdot 10^4$  bacterias/ml) y conservada en distintas condiciones y temperaturas durante 72 hs. Panel A: conservadas sin procesar (tubos NP). Panel B: conservadas procesadas por Método 5 (tubos P). Calles 1, 4, 7, 12, 15 y 18: muestra diluída  $10^{-1}$ ; calles 2, 5, 8, 13, 16 y 19: muestra diluída  $10^{-2}$ ; calles 3, 6, 9, 14, 17 y 20: muestra diluída  $10^{-3}$ . Como control de la reacción se empleó el material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (calle 10 y 22) y como control negativo agua (calles 11 y 21). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/ml.**

Luego de 72 horas de conservación en todas las condiciones ensayadas parece observarse el mismo resultado, es decir presencia de amplicón hasta la dilución  $10^{-2}$  de las muestras (equivalente a 0.5 UFC/tubo de reacción). Sin embargo, es posible advertir un leve deterioro en las muestras que han sido conservadas sin procesamiento tal como lo indica la comparación de la intensidad de las bandas del panel A (sin procesamiento) con el panel B (procesadas con el método 5).

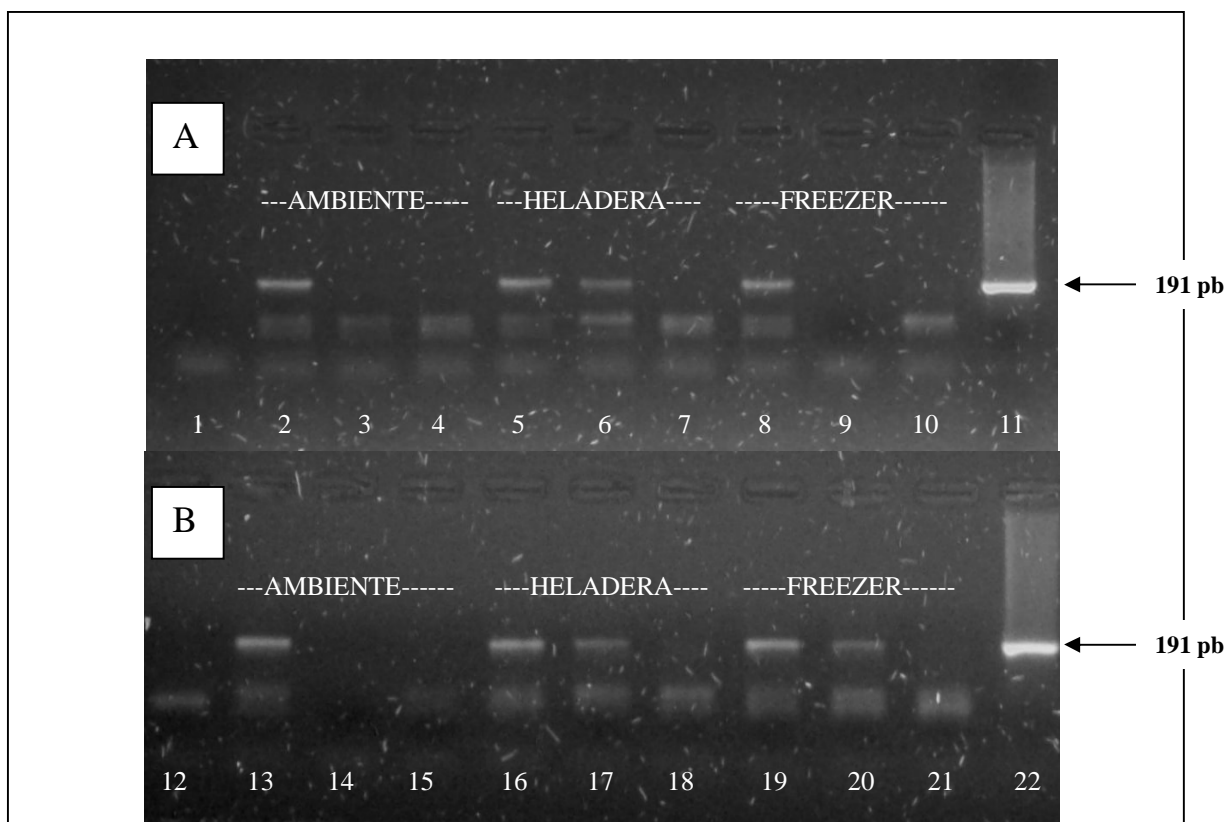
**Conservación 7 días:**



**Fig. 4: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de una muestra clínica contaminada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama en concentración final  $1.6 \cdot 10^4$  bacterias/ml) y conservada en distintas condiciones y temperaturas durante 7 días. Panel **A**: conservadas sin procesar (tubos **NP**). Panel **B**: conservadas procesadas por Método 5 (tubos **P**). Calles 2, 5, 8, 13, 16 y 19: muestra diluída  $10^{-1}$ ; calles 3, 6, 9, 14, 17 y 20: muestra diluída  $10^{-2}$ ; calles 4, 7, 10, 15, 18 y 21: muestra diluída  $10^{-3}$ . Como control de la reacción se empleó el material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (calle 11 y 22) y como control negativo agua (calles 1 y 12). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/ml.**

Luego de 7 días de conservación se hace evidente el deterioro en las muestras conservadas sin preparación previa, especialmente las conservadas a temperatura ambiente y freezer. En estas condiciones de conservación el límite de detección disminuye en relación a las otras condiciones, observándose amplicón sólo hasta diluciones  $10^{-1}$  de las muestras (5 UFC/tubo de reacción). Es de destacar los resultados obtenidos a partir de las muestras procesadas: puede observarse en el panel B de la Figura 3 que si las muestras se conservan procesadas por el Método 5, los resultados son similares a los de las 24 hs alcanzando un límite de detección de 0.5 UFC/tubo de reacción.

**Conservación 14 días:**

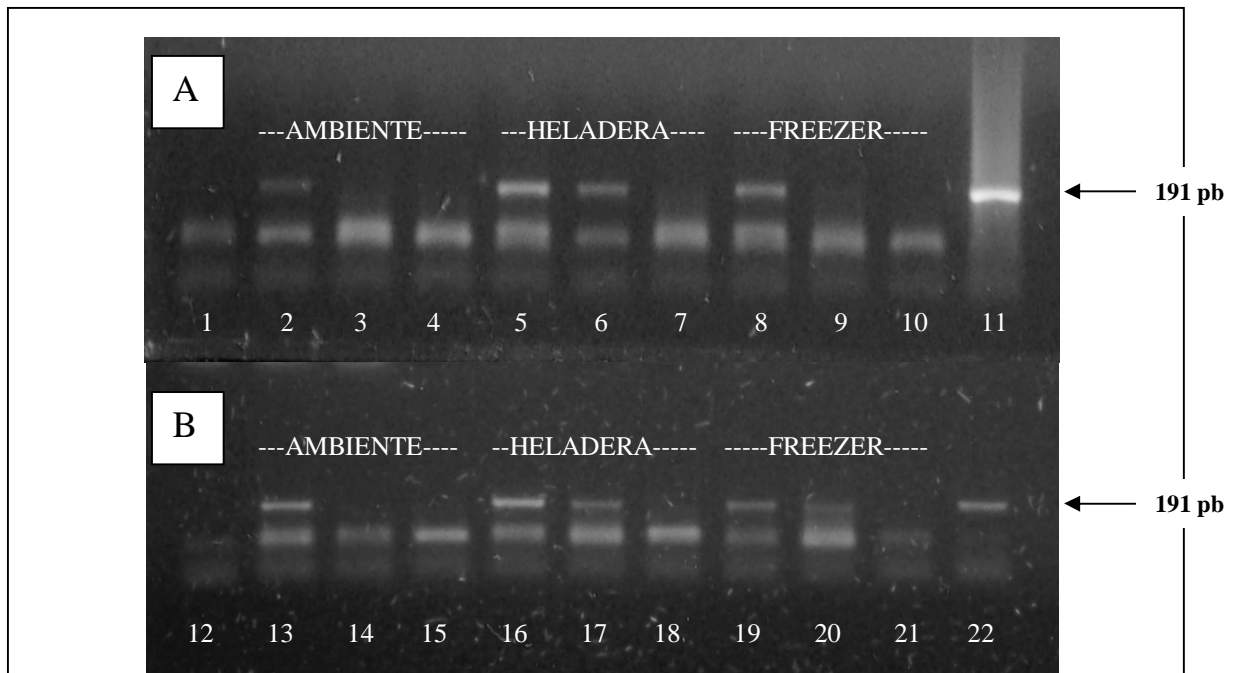


**Fig. 5: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de una muestra clínica contaminada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama en concentración final  $1.6 \cdot 10^4$  bacterias/ml) y conservada en distintas condiciones y temperaturas durante 14 días. Panel A: conservadas sin procesar (tubos NP). Panel B: conservadas procesadas por Método 5 (tubos P). Calles 2, 5, 8, 13, 16 y 19: muestra diluída  $10^{-1}$ ; calles 3, 6, 9, 14, 17 y 20: muestra diluída  $10^{-2}$ ; calles 4, 7, 10, 15, 18 y 21: muestra diluída  $10^{-3}$ . Como control de la reacción se empleó el material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (calle 11 y 22) y como control negativo agua (calles 1 y 12). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/ml.**



Luego de 14 días de conservación las muestras no procesadas parecen no continuar deteriorándose ya que se observan los mismos resultados que los alcanzados luego de 7 días de conservación. Respecto de las muestras procesadas puede observarse un deterioro en las muestras conservadas a temperatura ambiente, en las cuales la positividad desciende a diluciones de  $10^{-1}$  (5 UFC/tubo de reacción). Las otras condiciones de conservación siguen rindiendo un límite de detección de 0.5 UFC/tubo de reacción.

**Conservación 30 días:**



**Fig. 6: Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de PCR obtenidos a partir de una muestra clínica contaminada con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (*B. pertussis* Tohama en concentración final  $1.6 \cdot 10^4$  bacterias/ml) y conservada en distintas condiciones y temperaturas durante 30 días. Panel A: conservadas sin procesar (tubos NP). Panel B: conservadas procesadas por Método 5 (tubos P). Calles 2, 5, 8, 13, 16 y 19: muestra diluída  $10^{-1}$ ; calles 3, 6, 9, 14, 17 y 20: muestra diluída  $10^{-2}$ ; calles 4, 7, 10, 15, 18 y 21: muestra diluída  $10^{-3}$ . Como control de la reacción se empleó el material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (calle 11 y 22) y como control negativo agua (calles 1 y 12). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/ml.**

Luego de 30 días de conservación el deterioro es evidente en las muestras conservadas a temperatura ambiente, tanto en aquellas no procesadas como en las que han sido procesadas previamente. Se mantienen adecuadamente las muestras conservadas en heladera tanto las que fueron previamente procesadas como las que no. Las muestras conservadas en freezer durante 30 días no mostraron variación respecto de lo observado a los 14 días, aunque es evidente que las muestras se conservan mejor en heladera, tanto para aquellas muestras que fueron procesadas como para las que no.

A modo de resumen se muestran los resultados en la siguiente tabla:

**Tabla 1: Límites de detección obtenidos en la PCR<sub>PT</sub> luego de conservar las muestras procesadas y no procesadas a temperatura ambiente, heladera y freezer por 24 y 72 hs y 7, 14 y 30 días.**

Condiciones de conservación		Ambiente	Heladera	Freezer
Tiempo		Límite de detección (UFC/tubo de reacción)		
24 horas	NP	0.5	0.5	0.5
	P	0.5	0.5	0.5
72 horas	NP	0.5 *	0.5	0.5 *
	P	0.5	0.5	0.5
7 días	NP	5 **	0.5	5 **
	P	0.5	0.5	0.5
14 días	NP	5	0.5	5
	P	5 **	0.5	0.5
30 días	NP	5 *	0.5	5
	P	5	0.5	0.5 *

**NP: Tubos conservados sin procesamiento previo**

**P: Tubos conservados procesados por Método 5**

**\* Señales positivas débiles.**

**\*\* Primeros deterioros objetivables**

## CONCLUSIONES

La experiencia diseñada permitió obtener información muy valiosa para guiar la conservación y derivación de muestras desde los lugares donde se atienden los pacientes hasta los centros donde se realizan las determinaciones basadas en metodologías moleculares.

Los resultados más relevantes podrían resumirse de la siguiente manera:

1. Durante las primeras 24 horas no existe deterioro cuantitativo de las muestras, ni tampoco es posible detectar algún cambio cualitativo. Esto es así para muestras conservadas procesadas o no procesadas y en cualquiera de las 3 temperaturas consideradas.
2. A las 72 horas no existen aún cambios cuantitativos aunque es posible observar un incipiente deterioro en las muestras conservadas sin procesar a temperatura ambiente y en freezer.
3. A los 7 días es posible detectar cambios cuantitativos en las muestras conservadas sin procesar a temperatura ambiente y freezer.
4. Recién a los 14 días es posible objetivar un deterioro en las muestras conservadas procesadas, sólo en aquellas conservadas a temperatura ambiente.
5. A lo largo de toda la experiencia no se observaron cambios cuali ni cuantitativos en las muestras conservadas en heladera, tanto en las que fueron procesadas previamente como en las que no.

Resumiendo: las muestras no procesadas se deterioran en mayor medida que las procesadas cuando la conservación se hace a temperatura ambiente o en freezer. La conservación en heladera se muestra como la condición más adecuada tanto para las muestras procesadas como para las no procesadas aún para períodos prolongados de conservación.

Teniendo en cuenta estos resultados y que el procesamiento previo de las muestras en los laboratorios de baja complejidad del interior provincial puede

significar una sobrecarga de difícil manejo, se elaboraron las recomendaciones para conservación y derivación de muestras respiratorias para diagnóstico de coqueluche, incluidas en las **Normas Provinciales de Diagnóstico**:

***“Las muestras deberán permanecer refrigeradas en heladera desde el momento de su obtención. Se derivarán en conservadoras con un adecuado número de refrigerantes. No es necesario ningún procesamiento previo a la derivación. Si por alguna razón fortuita se viera interrumpida la cadena de frío por un período inferior a las 72 horas, la muestra será igualmente procesada y estudiada por PCR ya que no es esperable un deterioro de la misma en esas condiciones. Si por cualquier razón de fuerza mayor fuera necesaria una conservación más prolongada de la muestra, esta debe realizarse en heladera. De todas formas, para el diagnóstico oportuno se recomienda no sobrepasar las 72 horas desde la obtención hasta el arribo al Laboratorio de Referencia.”***

# CAPÍTULO CUATRO

## OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PERTUSSIS

### INTRODUCCIÓN

A pesar del enorme avance que significó la introducción de métodos moleculares para el diagnóstico de infecciones causadas por *Bordetella* spp (37, 383), todavía está pendiente un análisis de la especificidad genómica de los mismos y el diseño de estrategias que permitan controlar las variaciones analíticas de los métodos. El avance en los proyectos genomas contribuirá sin dudas a resolver el primer inconveniente planteado (60). Sin embargo la evolución de los microorganismos con la aparición de secuencias polimórficas, podría afectar la especificidad e incluso la sensibilidad de las distintas PCR. Por ejemplo, en el caso de *B. pertussis* se han detectado loci polimórficos en los genes que codifican para la toxina pertussis y para pertactina (287, 304). También se han informado distintos clusters de variantes genotípicas derivadas de los programas de vacunación masiva (180, 326). Por otra parte, la sensibilidad y especificidad de la PCR pueden afectarse por errores técnicos como en todo proceso analítico, además de otras fallas relacionadas a los sistemas abiertos de detección de amplicones. Pequeñas variaciones en la calidad de los reactivos utilizados, condiciones de temperatura, errores de pipeteo, contaminaciones, etc; pueden causar errores en los resultados finales. Por lo tanto es de crucial importancia incorporar controles que permitan poner en evidencia estas pequeñas variaciones, impidiendo de esta forma disminuciones en la sensibilidad y/o especificidad de los ensayos (235). Los resultados falsos positivos y negativos causados por polimorfismos en las secuencias blanco, variaciones técnicas o ambos, pueden ponerse en evidencia mediante la detección simultánea de múltiples secuencias blanco (38, 327).

Por otra parte, en la situación epidemiológica actual en Argentina y especialmente en Neuquén, resulta importante evaluar la participación de otras especies de *Bordetella* en el Síndrome Coqueluchoide. En este aspecto, es de destacar que en la bibliografía internacional se menciona cada vez más la aparición de otras especies de *Bordetella* distintas de *pertussis* como causante del Síndrome en pacientes de todas las edades. Entre ellas destacamos a *B. bronchiseptica*, cada vez más frecuentemente mencionada como productora de cuadros similares a *pertussis*. También debemos rescatar a *B. parapertussis* como posible agente etiológico de la enfermedad, aunque siempre se la ha considerado como muy poco frecuente y además como causante de cuadros más leves.

Por estas razones se planteó ensayar una PCR multitarget que, además de permitir evitar pérdidas de sensibilidad y especificidad por polimorfismos y errores técnicos, brindara información sobre la presencia de especies de *Bordetella* distintas a *B. pertussis*, único agente etiológico detectado por las PCR en uso actualmente en nuestro medio (38, 327).

La PCR multiplex debería tener la suficiente especificidad para confirmar presencia o ausencia de *B. pertussis*, ya que este es el agente etiológico de la mayoría de los casos de *pertussis* y a la vez la sensibilidad necesaria para detectar el género *Bordetella* en su totalidad o al menos las especies que pudieran estar involucradas en el síndrome clínico que está causando la endemo-epidemia en nuestra provincia.

Por ello se seleccionó como uno de los blancos posibles la secuencia promotora del gen que codifica para la Toxina Pertussis, específica para *B. pertussis*, descartando la IS481 ya que también está presente en *B. holmesii* (262, 332, 333). Para el otro blanco de la PCR, orientada a detección del género o al menos de las especies involucradas en la patología, se eligió la secuencia del gen que codifica para la toxina Adenilato Ciclasa-Hemolisina (AC-Hly) (6, 245). Esta metodología fue descrita en 1993 por Douglas y colaboradores (112). La misma permite la amplificación de un fragmento de 522 pares de bases lo que la hace compatible con la amplificación múltiple junto con la PCR del gen promotor de

toxina pertussis (191 pb). Esta PCR muestra niveles adecuados de sensibilidad para las 3 especies más frecuentemente implicadas en el Síndrome Coqueluchoide: *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Por lo tanto el uso conjunto de los dos pares de primers permitiría detectar la presencia de alguna de las 3 especies mencionadas y confirmar la presencia o ausencia de *B. pertussis*. A continuación se describe la metodología empleada para la PCR multiplex y los resultados obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La optimización de la PCR multiplex se realizó a partir del conocimiento de las condiciones de las dos PCR.

**PCR de la secuencia promotora del gen de Toxina pertussis:** se utilizaron los reactivos y condiciones ya descriptos. En el Capítulo 2, páginas 59 y 60.

**PCR del gen codificante de Adenilato Ciclasa:** se utilizaron los reactivos y condiciones descriptos por Douglas y colaboradores en 1993 (112), con algunas modificaciones realizadas por el Laboratorio Nacional de Referencia (IBBM, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata) y por nuestro propio laboratorio. Los mismos se describen en las siguientes tablas:

Tabla 1: Condiciones de la PCR <sub>AC-Hly</sub>

Condiciones de la PCR <sub>AC-Hly</sub>		
Desnaturalización inicial	2 min a 94°	
Desnaturalización	25 seg a 94°	40 ciclos
Annealing	10 seg a 53°	
Elongación	20 seg a 72°	
Elongación final	20 seg a 72°	

Tabla 2 : Reactivos de la PCR <sub>AC-Hly</sub>

Reactivos de la PCR <sub>AC-Hly</sub>			
Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración en la muestra	Volumen/muestra (μl)
Buffer	10X	1X	2
dNTP	2mM	200 μM	2
Cloruro de Mg	25 mM	2.5 mM	2
Primer AC1	10 μM	0.5 μM	1
Primer AC2	10 μM	0.5 μM	1
Agua			8.8
Taq polimerasa	5 U/μl	0.05 U/ μl	0.2
Templado			3
Volumen final			20

### Primers utilizados

**AC1 5´ATGCAGCAATCGCATCAGGCTGGTTAC 3´**

**AC2 5´GCCGATCACCTTGACCGCCTCGAAAT 3´**

Para comenzar con el diseño de la PCR multiplex AC-Hly/PT se partió de las siguientes condiciones y reactivos (190), que son compatibles con las óptimas para cada PCR individual.

Tabla 3: Condiciones de la PCR <sub>AC-Hly/PT</sub>

Condiciones de la PCR <sub>AC-Hly/PT</sub>		
Desnaturalización inicial	2 min a 94°	
Desnaturalización	25 seg a 94°	40 ciclos
Annealing	15 seg a 56°	
Elongación	20 seg a 72°	
Elongación final	20 seg a 72°	



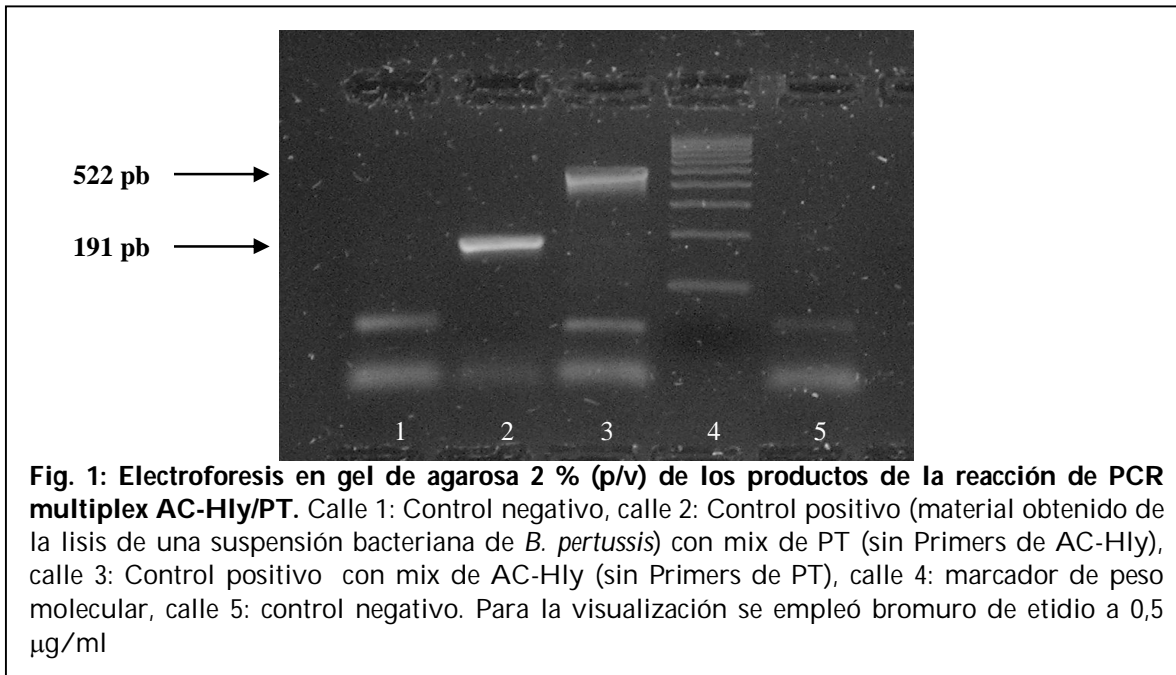
Tabla 4 : Reactivos de la PCR AC-HIy/PT

Reactivos de PCR AC-HIy/PT			
Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración en la muestra	Volumen/muestra ( $\mu$ l)
Buffer	10X	1X	2
dNTP	2mM	200 $\mu$ M	2
Cloruro de Mg	25 mM	2.5 mM	2
Primer PT1	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	1
Primer PT2	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	1
Primer AC1	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	1
Primer AC2	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	1
Agua			6.8
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ l	0.05 U/ $\mu$ l	0.2
Templado			3
Volumen final			20

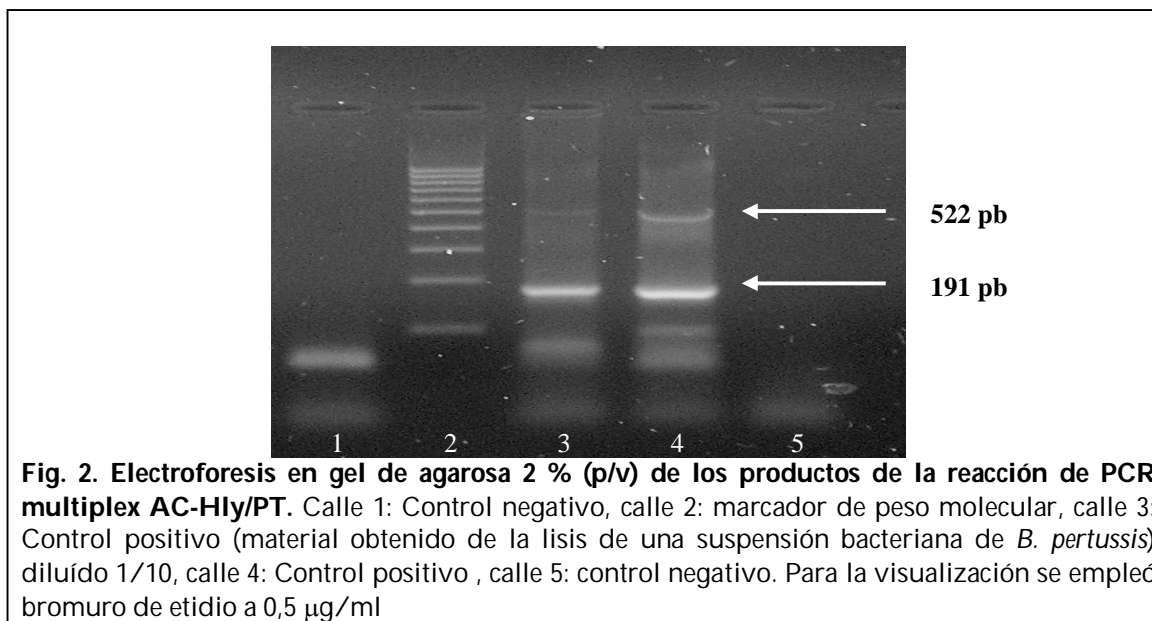
**Análisis de los productos de PCR:** los productos de amplificación obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 2% conteniendo 0.5  $\mu$ g de bromuro de etidio por ml. Las corridas se realizaron a 120 V durante 20 minutos. La visualización se realizó con luz ultravioleta. Los resultados fueron fotografiados para análisis posteriores.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la puesta a punto de la PCR multiplex se comenzó por evaluar el comportamiento de cada par de primers en las condiciones que se emplearían en la multiplex. Para ello se preparó una mezcla de reactivos conteniendo solo primers de PT y otra conteniendo solo primers de AC-HIy. En las condiciones fijadas se produce adecuada amplificación de las dos secuencias seleccionadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.



Cuando se emplearon ambos primers en el mismo tubo para realizar la PCR multiplex, el resultado obtenido es el mostrado en la Figura 2.

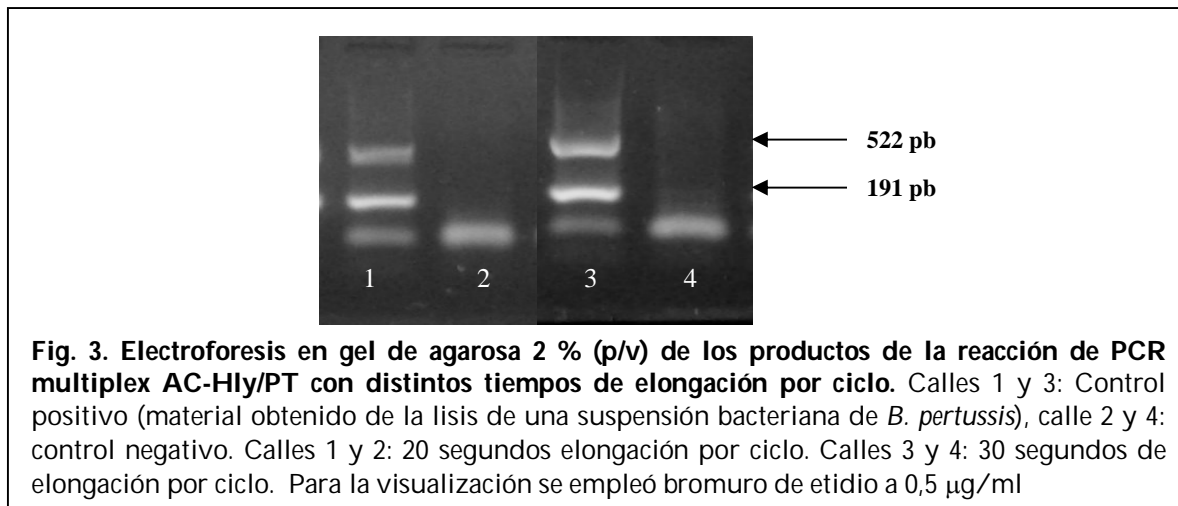


Estos resultados marcan claramente la necesidad de mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad de la PCR. Para ello se ensayaron distintos tiempos de elongación, distintas temperaturas de annealing, diferentes concentraciones de primers de AC-Hly y de PT, agregado de agentes como

dimetil sulfóxido (DMSO) y seroalbúmina bovina (BSA), así como distintas concentraciones de Mg y de TAQ polimerasa (263).

### Tiempo de elongación:

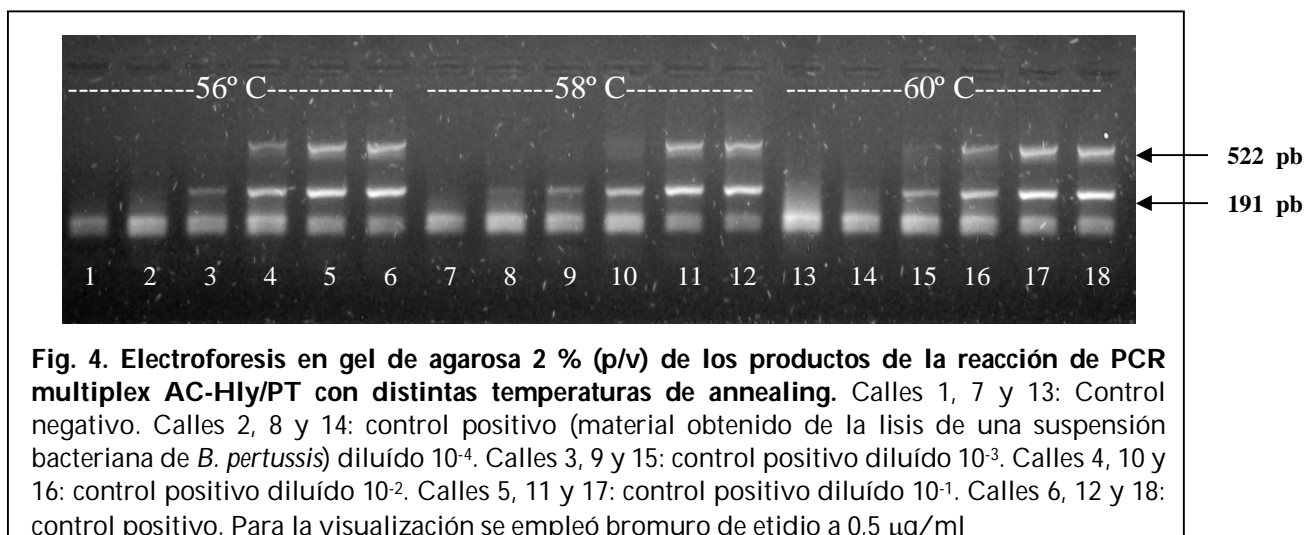
Se consideró que el tiempo de elongación en cada ciclo podría ser insuficiente considerando la longitud de uno de los fragmentos, por lo que se decidió cambiar el mismo de 20 a 30 segundos.



Como se observa en la figura 3, la sensibilidad de la PCR mejora significativamente al adecuar el tiempo de elongación especialmente en lo que se refiere al fragmento correspondiente a AC-Hly.

### Temperatura de annealing:

Otro aspecto crítico en la reacción, es la temperatura de annealing. Para evaluarlo, se realizó una experiencia en la que se emplearon distintas temperaturas cercanas a las óptimas para cada par de primers por separado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.



Puede observarse que a 60° C se obtiene la mayor sensibilidad e intensidad de las bandas para cada uno de los amplicones.

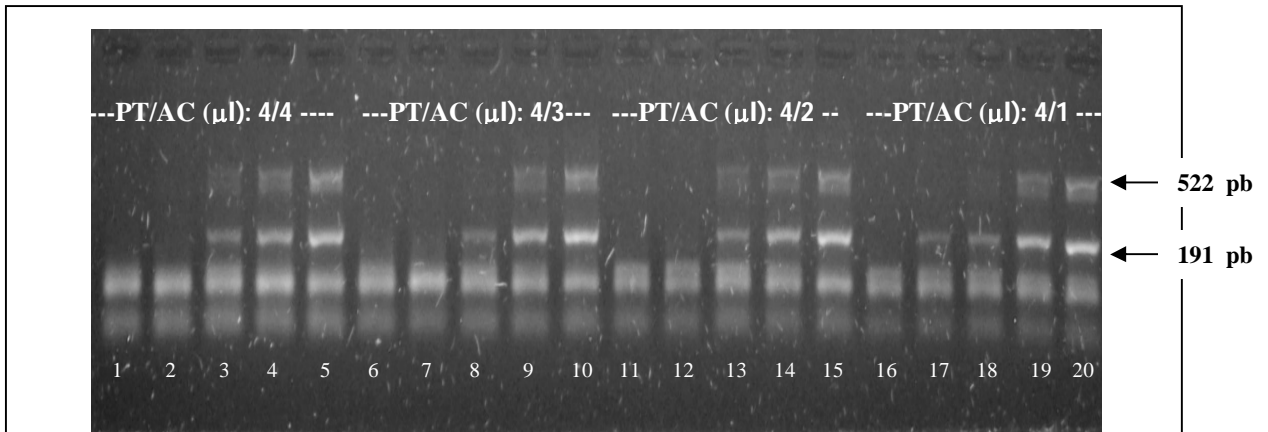
Con estas modificaciones las condiciones de la PCR quedaron definidas como se detalla a continuación:

**Tabla 5: Condiciones de la PCR AC-Hly/PT**

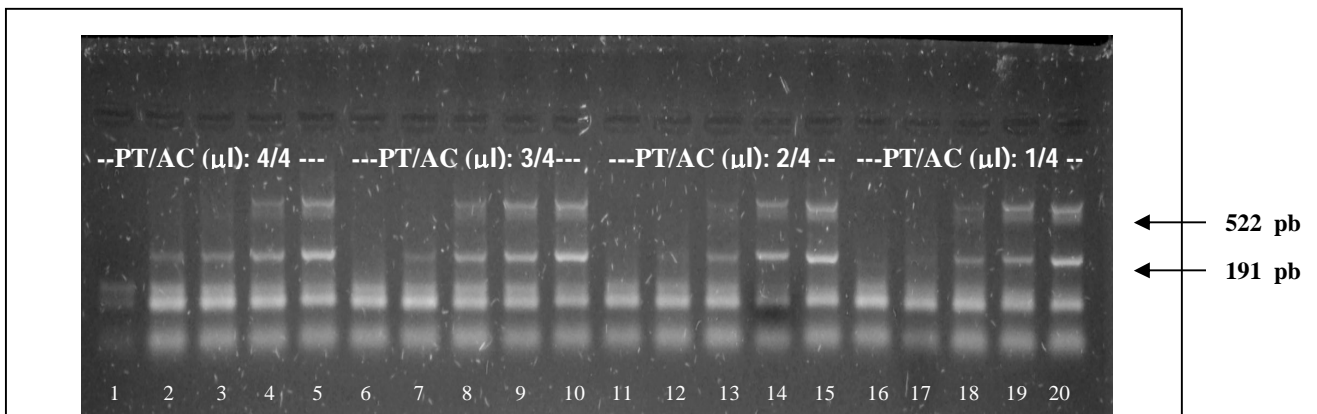
Condiciones de la PCR AC-Hly/PT		
Desnaturalización inicial	2 min a 94°	
Desnaturalización	25 seg a 94°	40 ciclos
Annealing	15 seg a 60°	
Elongación	30 seg a 72°	
Elongación final	20 seg a 72°	

**Concentración de los primers:**

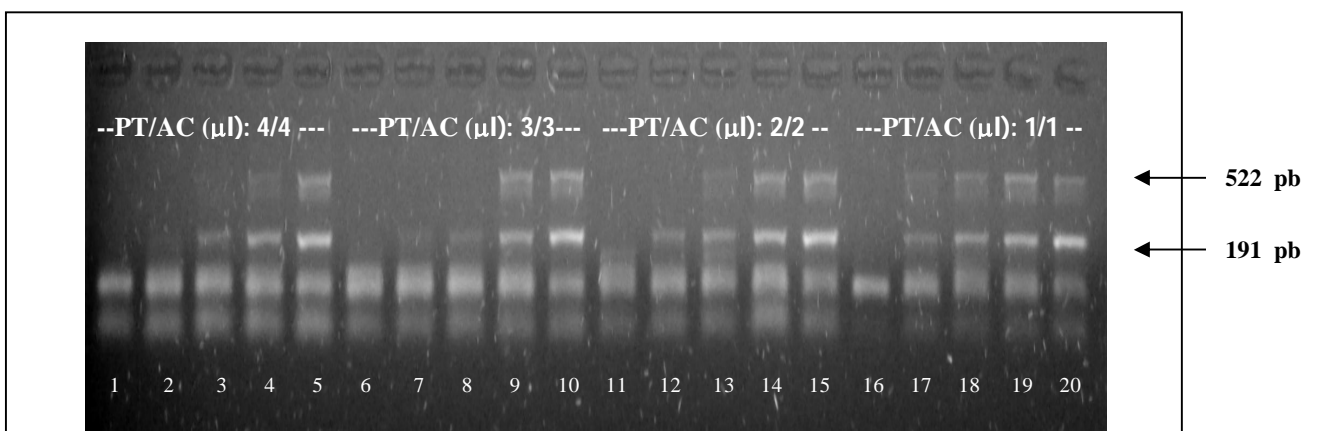
El próximo paso fue evaluar las condiciones de los primers. Para ello se diseñaron experiencias cuantitativas que permitieran poner en evidencia no sólo la óptima relación entre ellos sino también la concentración de cada uno en la solución final de reacción. Los resultados se muestran en las Figuras 5, 6 y 7.



**Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de la reacción de PCR multiplex AC-Hly/PT con distintas relaciones de primers** (cada  $\mu$ l equivale a 10 pmoles en la reacción final). Calles 1, 6, 11, 16: control negativo. Calles 2, 7, 12, 17: control positivo (material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis*) diluído  $10^{-4}$ . Calles 3, 8, 13, 18: Control positivo diluído  $10^{-3}$ . Calles 4, 9, 14, 19: Control positivo diluído  $10^{-2}$ . Calles 5, 10, 15, 20: Control positivo diluído  $10^{-1}$ .



**Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de la reacción de PCR multiplex AC-Hly/PT con distintas relaciones de primers** (cada  $\mu$ l equivale a 10 pmoles en la reacción final). Calles 1, 6, 11, 16: control negativo. Calles 2, 7, 12, 17: control positivo (material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis*) diluído  $10^{-4}$ . Calles 3, 8, 13, 18: Control positivo diluído  $10^{-3}$ . Calles 4, 9, 14, 19: Control positivo diluído  $10^{-2}$ . Calles 5, 10, 15, 20: Control positivo diluído  $10^{-1}$ .

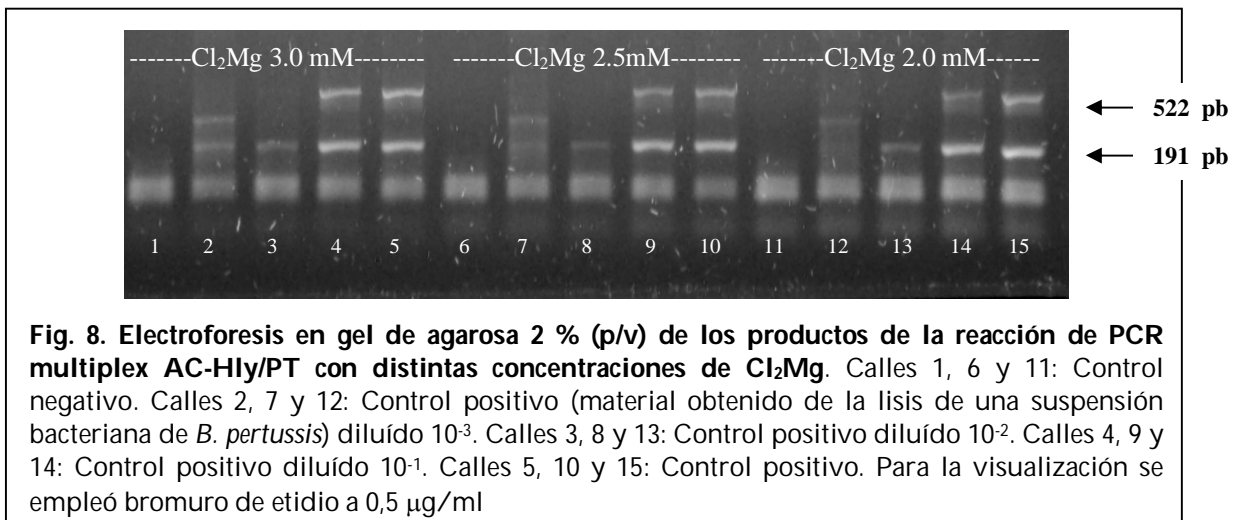


**Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de la reacción de PCR multiplex AC-Hly/PT con distintas relaciones de primers** (cada  $\mu$ l equivale a 10 pmoles en la reacción final). Calles 1, 6, 11, 16: control negativo. Calles 2, 7, 12, 17: control positivo (material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis*) diluído  $10^{-4}$ . Calles 3, 8, 13, 18: Control positivo diluído  $10^{-3}$ . Calles 4, 9, 14, 19: Control positivo diluído  $10^{-2}$ . Calles 5, 10, 15, 20: Control positivo diluído  $10^{-1}$ .

Como puede observarse, la máxima sensibilidad se logra con cantidades equimoleculares de los 2 pares de primers, especialmente cuando se utiliza 1  $\mu$ l de cada uno lo que equivale a una concentración final en el tubo de reacción de 0.5  $\mu$ M. Para las siguientes experiencias se emplea dicha cantidad de primers.

**Concentración de Cloruro de Magnesio:**

El siguiente aspecto a evaluar fue la concentración óptima de Magnesio en la mezcla de reacción, para ello se realizó una prueba cuantitativa utilizando distintas cantidades de Cloruro de Magnesio.

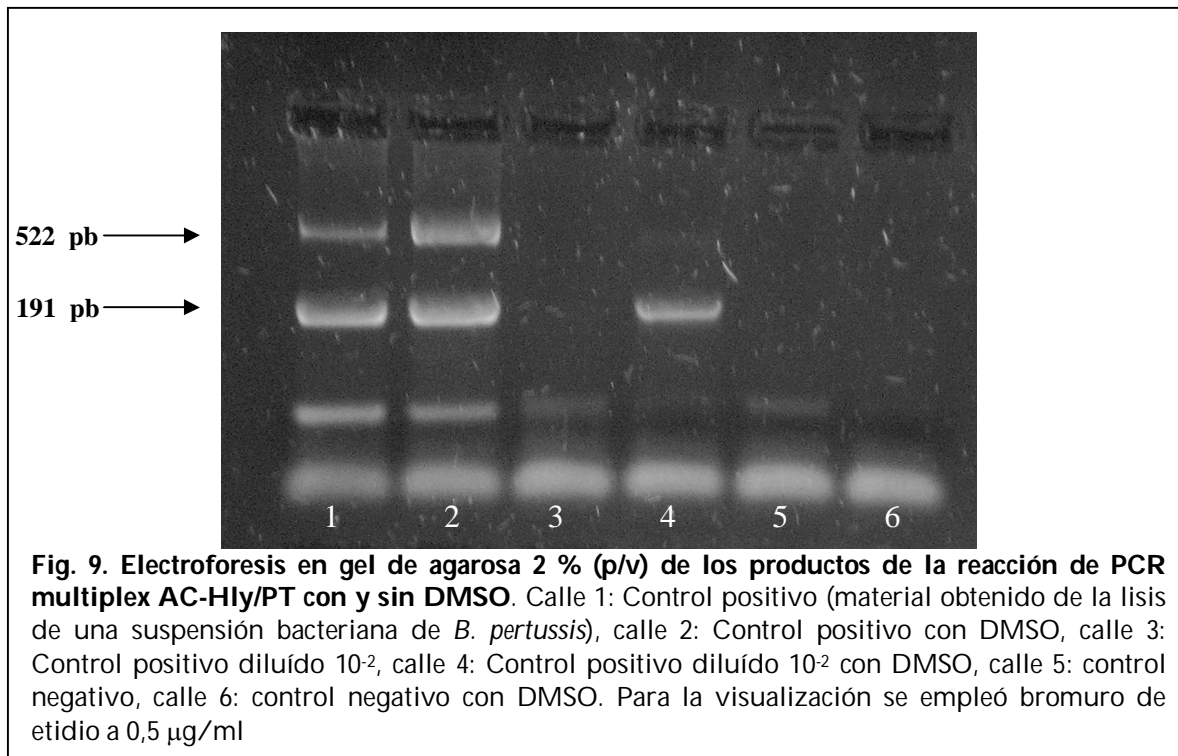


**Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de la reacción de PCR multiplex AC-Hly/PT con distintas concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ .** Calles 1, 6 y 11: Control negativo. Calles 2, 7 y 12: Control positivo (material obtenido de la lisis de una suspensión bacteriana de *B. pertussis*) diluido  $10^{-3}$ . Calles 3, 8 y 13: Control positivo diluido  $10^{-2}$ . Calles 4, 9 y 14: Control positivo diluido  $10^{-1}$ . Calles 5, 10 y 15: Control positivo. Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5  $\mu$ g/ml

El límite de detección no varía con los cambios en la concentración de Mg en el rango estudiado, sin embargo se puede apreciar una disminución en la intensidad de las bandas a medida que la misma baja. Se considera como concentración óptima la de 2.5 mM ya que con ella se logra una disminución apreciable en la intensidad de las bandas inespecíficas sin repercusión apreciable en la intensidad de las bandas específicas.

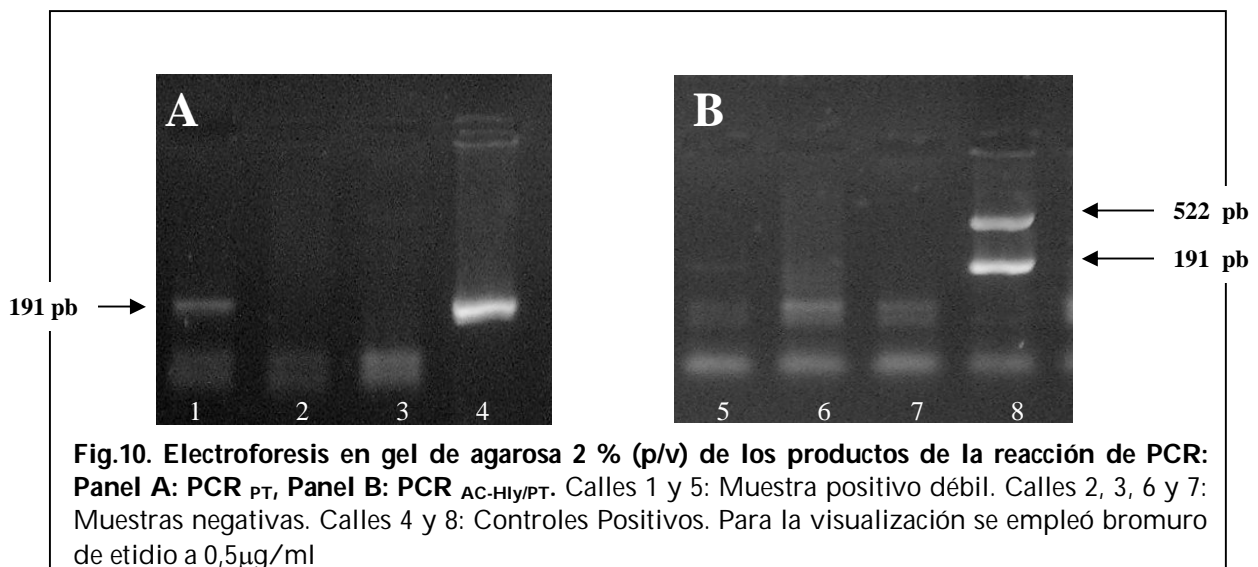
**Agregado de Dimetil Sulfóxido:**

Para mejorar la sensibilidad general de la PCR pero especialmente orientada a la amplificación del fragmento de AC-Hly, se prueba el agregado de Dimetil Sulfóxido (DMSO) a la reacción en una concentración de 5%.

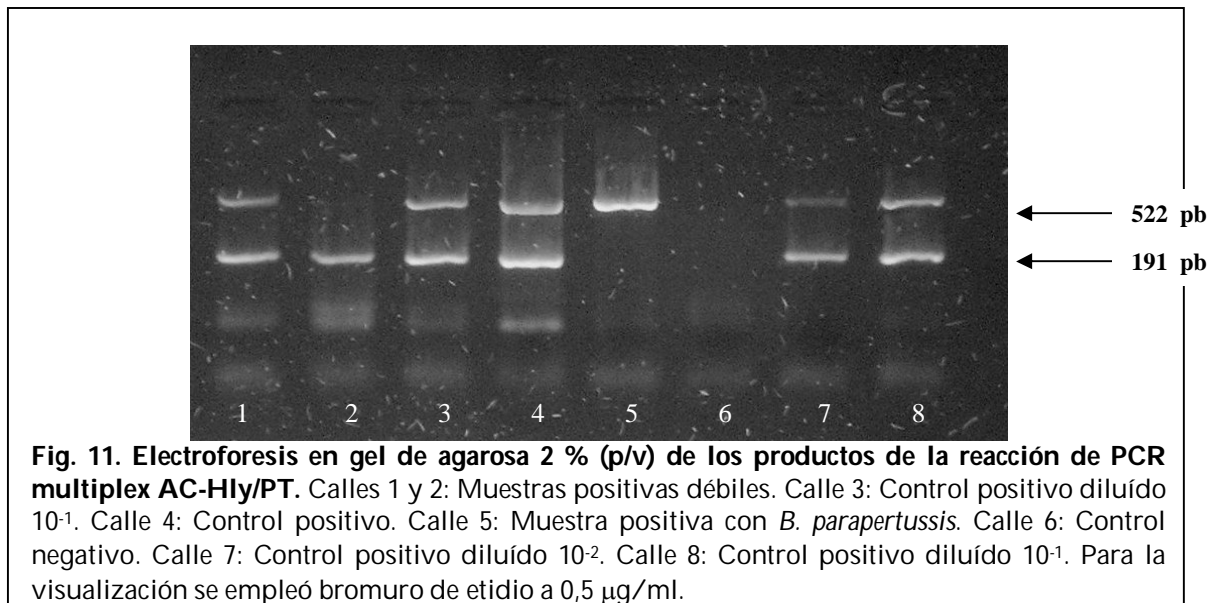


**Aumento de la concentración de TAQ Polimerasa:**

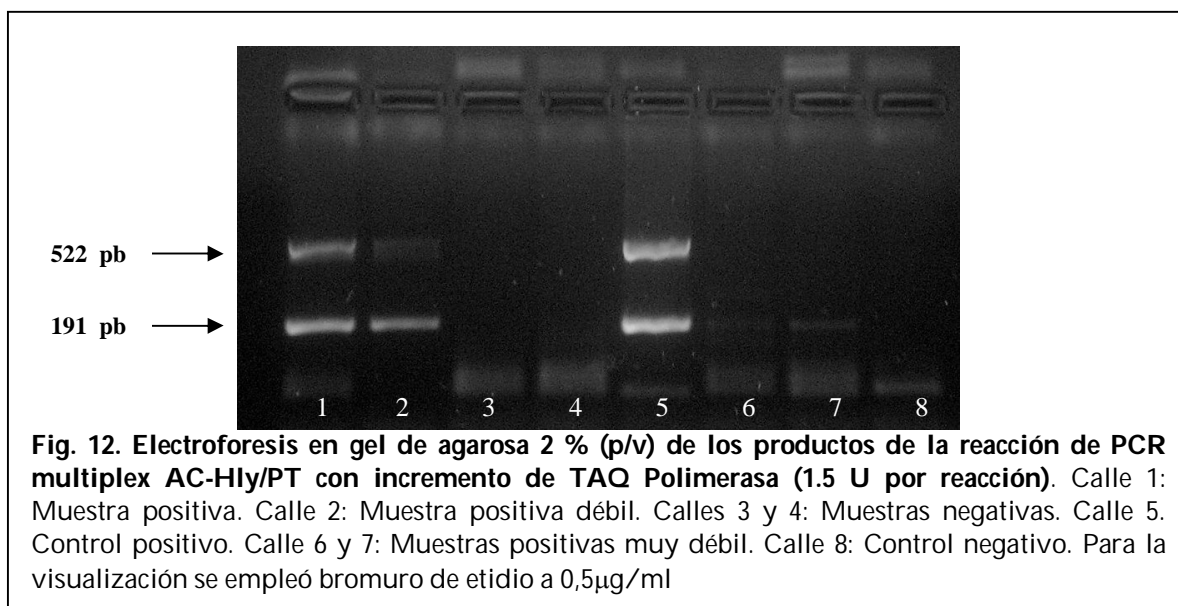
A pesar de una evidente mejora en la sensibilidad con el agregado de DMSO persistieron algunos problemas en la detección de muestras débilmente positivas, como se muestra en la figura 10: se observa como una muestra débilmente positiva en la PCR<sub>PT</sub> (calle 1) presenta una banda de PT apenas visible en la PCR<sub>AC-Hly/PT</sub> (calle 5).



En la Fig. 11 se muestra como en una muestra positiva débil (calle 2) no se observa banda de AC.



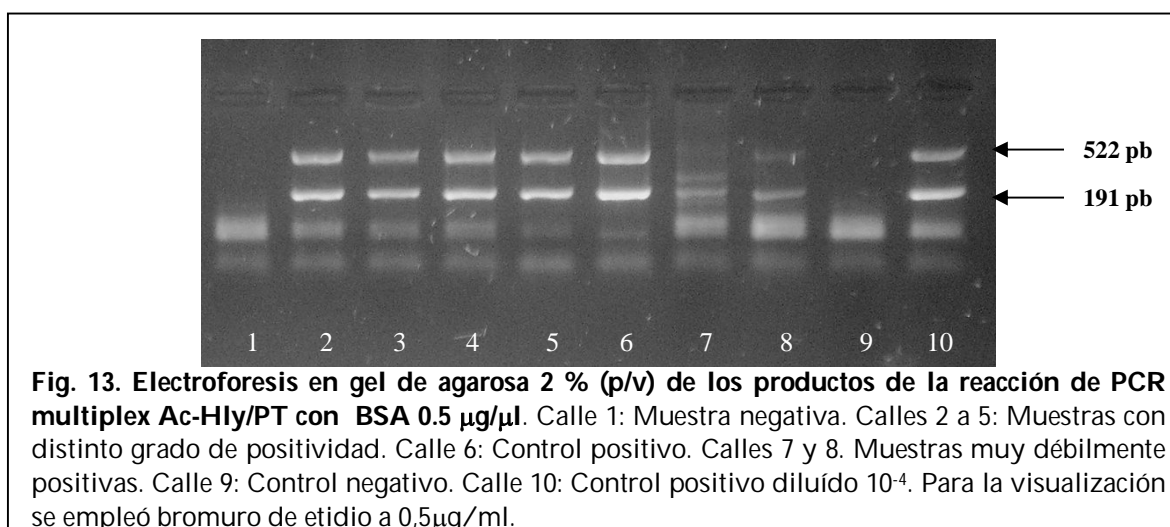
El aumento en la cantidad de unidades de Taq polimerasa agregadas a la mezcla de reacción (de 1U a 1.5U por reacción) derivó en una ligera mejoría en la detección de muestras muy débilmente positivas en la PCR<sub>PT</sub> y que hasta ese momento no habían podido detectarse con la PCR multiplex. En la Fig. 12 se observa una muestra positiva débil (calle 2) y dos muy débiles (calles 6 y 7) que antes no se detectaban con la PCR<sub>AC-Hly/PT</sub>.





**Agregado de Seroalbúmina bovina:**

A pesar de las mejorías logradas en cuanto a la sensibilidad y la posibilidad de detectar muestras muy débilmente positivas, la sensibilidad se mantenía relativamente baja para AC-Hly. Para mejorar este aspecto se agregó a la mezcla de reacción Seroalbúmina Bovina (BSA) en una concentración de 0.5 µg/µl. Como puede observarse en la Fig. 13, con este cambio se detectan muestras muy débilmente positivas que eran negativas en las condiciones anteriores (calles 7 y 8).



**Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de la reacción de PCR multiplex Ac-Hly/PT con BSA 0.5 µg/µl.** Calle 1: Muestra negativa. Calles 2 a 5: Muestras con distinto grado de positividad. Calle 6: Control positivo. Calles 7 y 8. Muestras muy débilmente positivas. Calle 9: Control negativo. Calle 10: Control positivo diluído 10<sup>-4</sup>. Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5µg/ml.

En base a todas las experiencias anteriores las condiciones finales de los reactivos de la PCR AC-Hly/PT es la siguiente:

**Tabla. 6: Reactivos de la PCR AC-Hly/PT**

Reactivos de PCR AC-Hly/PT			
Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración en la muestra	Volumen/muestra (µl)
Buffer	10X	1X	2
dNTP	2mM	200 µM	2
Cloruro de Mg	25 mM	2.5 mM	2
Primer PT1	10 µM	0.5 µM	1
Primer PT2	10 µM	0.5 µM	1
Primer AC1	10 µM	0.5 µM	1
Primer AC2	10 µM	0.5 µM	1
Agua			4.7
DMSO		5%	1
BSA	10 µg/µl	0.5 µg/µl	1
Taq polimerasa	5 U/µl	0.075 U/ µl	0.3
Templado			3
Volumen final			20

## VALIDACIÓN DE LA PCR

Como es bien conocido, antes que un método analítico pueda ser aplicado al estudio de muestras en forma habitual, debe ser validado, así sus características de desempeño pueden ser definidas y adecuadamente aseguradas (388).

Las Normas ISO definen validación como **la confirmación obtenida mediante la provisión de evidencia objetiva, de haber cumplido los requisitos particulares para un uso pretendido y específico** (251, 388).

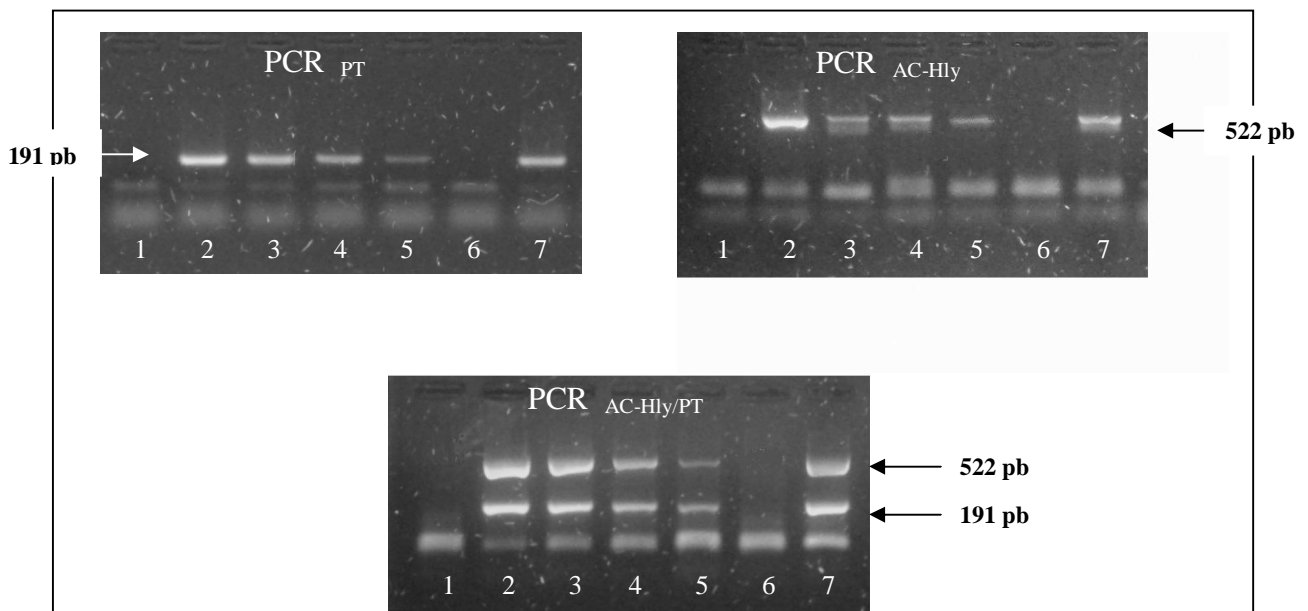
Un método cualitativo, como las PCR con el formato de esta que nos ocupa, es un método de análisis cuya respuesta está basada en la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una cierta cantidad de muestra. La mayoría de los parámetros cualitativos se expresan en términos probabilísticos y entre los que se utilizan para su evaluación se describen los siguientes:

- a) **Rango de trabajo:** intervalo de trabajo en el cual el analito puede determinarse con un adecuado nivel de confianza y precisión. Bajo este concepto se incluyen los términos **Límite de Detección** y **Límite de Corte**. El primero representa la **menor cantidad** de analito detectable y límite de corte es la **cantidad óptima** de analito detectable. Este último se establece mediante la concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetida e independientemente el mismo método analítico en alícuotas de la misma muestra.
- b) **Selectividad:** parámetro que permite ponderar la detección de la mayor cantidad de microorganismos especificados por la técnica evaluada y la ausencia de reacción positiva con otros géneros y especies relacionados. Bajo este concepto de selectividad se incluyen los términos **Exclusividad** e **Inclusividad**. Exclusividad es la habilidad del método de no detectar un rango relevante de cepas relacionadas que pueden provocar reacciones cruzadas. Inclusividad es la habilidad del método de detectar un rango de cepas verdaderamente positivas para los analitos blanco.
- c) **Robustez:** capacidad del método de resistir al cambio cuando se introducen pequeñas variaciones deliberadas a los parámetros del mismo. Deben especificarse las condiciones diferentes para poder

identificar cuales son los factores de la técnica que pueden afectar la robustez.

**Rango de trabajo:** se utilizó la cepa TOHAMA (CIP 8132) de *Bordetella pertussis* en diluciones que abarcaban desde  $5 \times 10^2$  a  $5 \times 10^{-2}$  bacterias/reacción. La prueba se realizó por triplicado por dos operadores distintos en dos días distintos. Se determinó el Límite de Detección para la PCR  $AC-Hly/PT$  y para cada una de las PCR individuales, PCR  $PT$  y PCR  $AC-Hly$ , en sus condiciones propias.

Se obtuvieron los siguientes resultados:



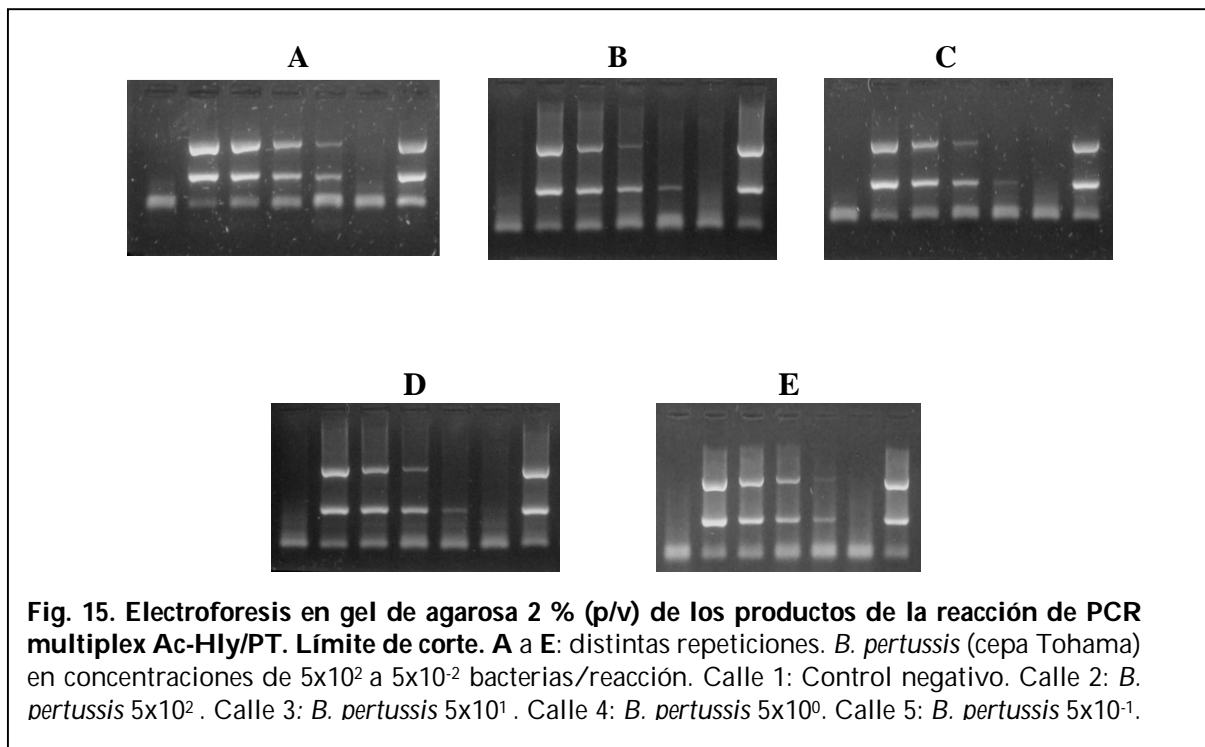
**Fig. 14. Electroforesis en gel de agarosa 2 % (p/v) de los productos de las reacciones de PCR PT, AC-Hly y multiplex AC-Hly/PT. Límite de detección para las tres PCR.** *B. pertussis* (cepa Tohama) en concentraciones de  $5 \times 10^2$  a  $5 \times 10^{-2}$  bacterias/reacción. Calle 1: Control negativo. Calle 2: *B. pertussis*  $5 \times 10^2$ . Calle 3: *B. pertussis*  $5 \times 10^1$ . Calle 4: *B. pertussis*  $5 \times 10^0$ . Calle 5: *B. pertussis*  $5 \times 10^{-1}$ . Calle 6: *B. pertussis*  $5 \times 10^{-2}$ . Calle 7: control positivo.

Las tres PCR, incluyendo las dos secuencias blanco de la PCR  $AC-Hly/PT$ , presentan el mismo límite de detección de 0.5 bacterias por reacción. Esto indica que se han logrado las condiciones óptimas de la PCR multitarget para conservar la sensibilidad de las reacciones individuales.

Luego de sucesivas repeticiones se obtuvieron idénticos resultados en la banda de PT pero la de AC-Hly varió entre 0.5 bacterias por reacción y 5 bacterias por

reacción. De esta forma, se concluye que el límite de detección para PT coincide con el límite de corte (0.5 bacterias por reacción), mientras que para AC-Hly el límite de detección coincide con los anteriores pero el límite de corte es de 5 bacterias por reacción.

Algunas de las repeticiones y sus variaciones se muestran en la siguiente figura

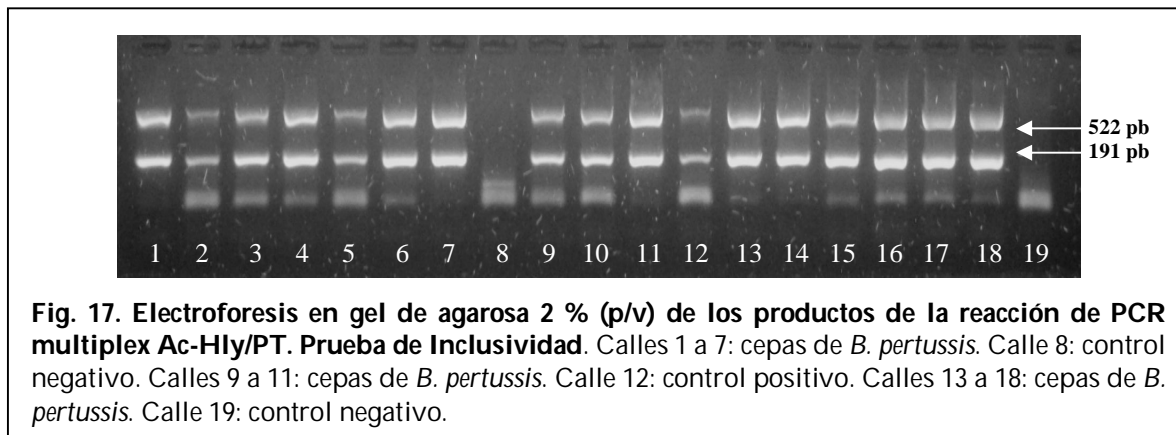
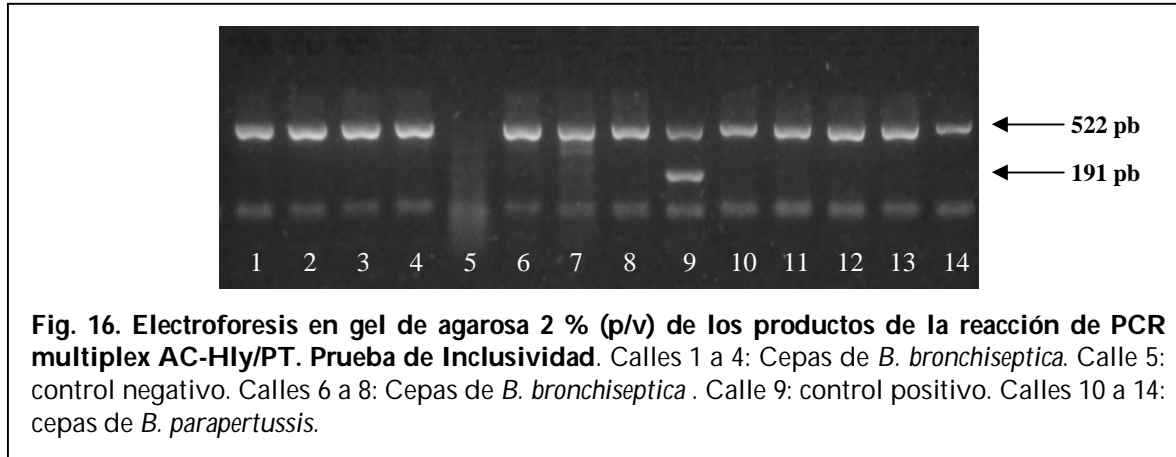


**Tabla 7: Límites de detección y de corte para cada una de las secuencias blanco de la PCR<sub>AC-Hly/PT</sub>**

	<b>PT</b> <b>(bacterias/reacción)</b>	<b>AC-Hly</b> <b>(bacterias/reacción)</b>
<b>Límite de detección</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>
<b>Límite de corte</b>	<b>0.5</b>	<b>5</b>

**Selectividad:** para la prueba de **inclusividad** se utilizaron 33 cepas de *Bordetella* distribuidas en 20 *B. pertussis*, 8 *B. bronchiseptica* y 5 *B. parapertussis*. La totalidad de ellas presentaron las bandas esperadas para el o los genes correspondientes,

al evaluar el DNA equivalente a  $10^3$  UFC por reacción. Los resultados con algunas de esas cepas se muestran en las siguientes figuras:



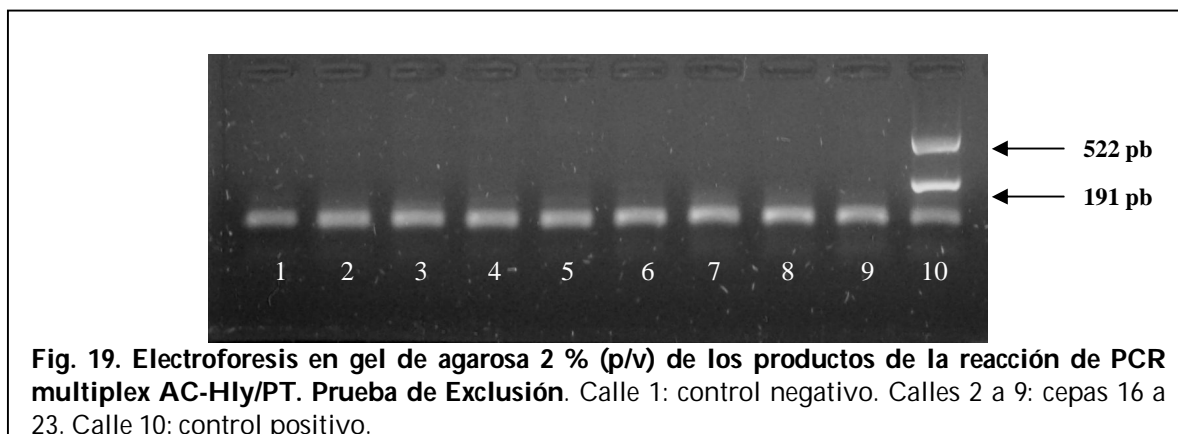
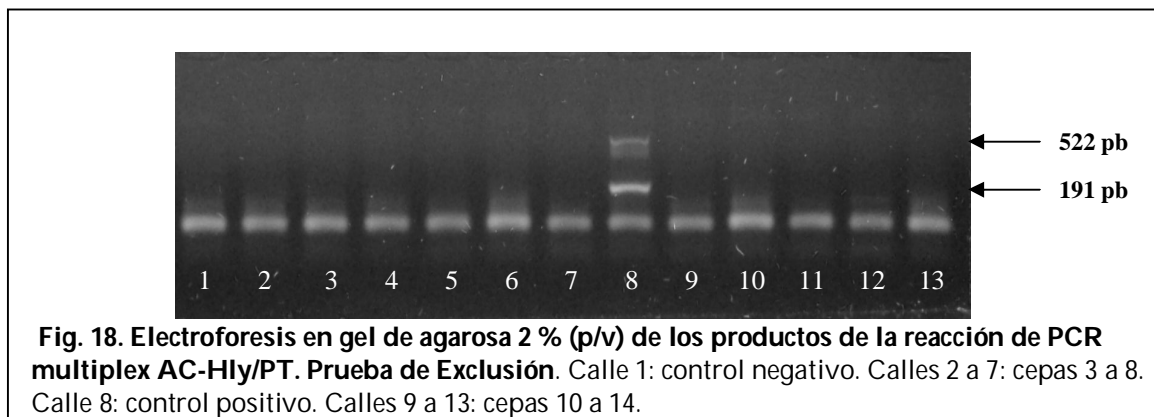
Para estimar la **exclusividad** se utilizaron 32 cepas cuyo detalle es el siguiente:

- 1-*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 2-*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 3-*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, 4-*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 5-*Enterococcus faecalis* ATCC 51299, 6-*Escherichia coli* ATCC 25922, 7-*Escherichia coli* ATCC 35218, 8-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 9-*Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, 10-*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, 11-*Haemophilus influenzae* ATCC 49247, 12-*Haemophilus influenzae* ATCC 49766, 13-*Haemophilus influenzae* ATCC 10211, 14-

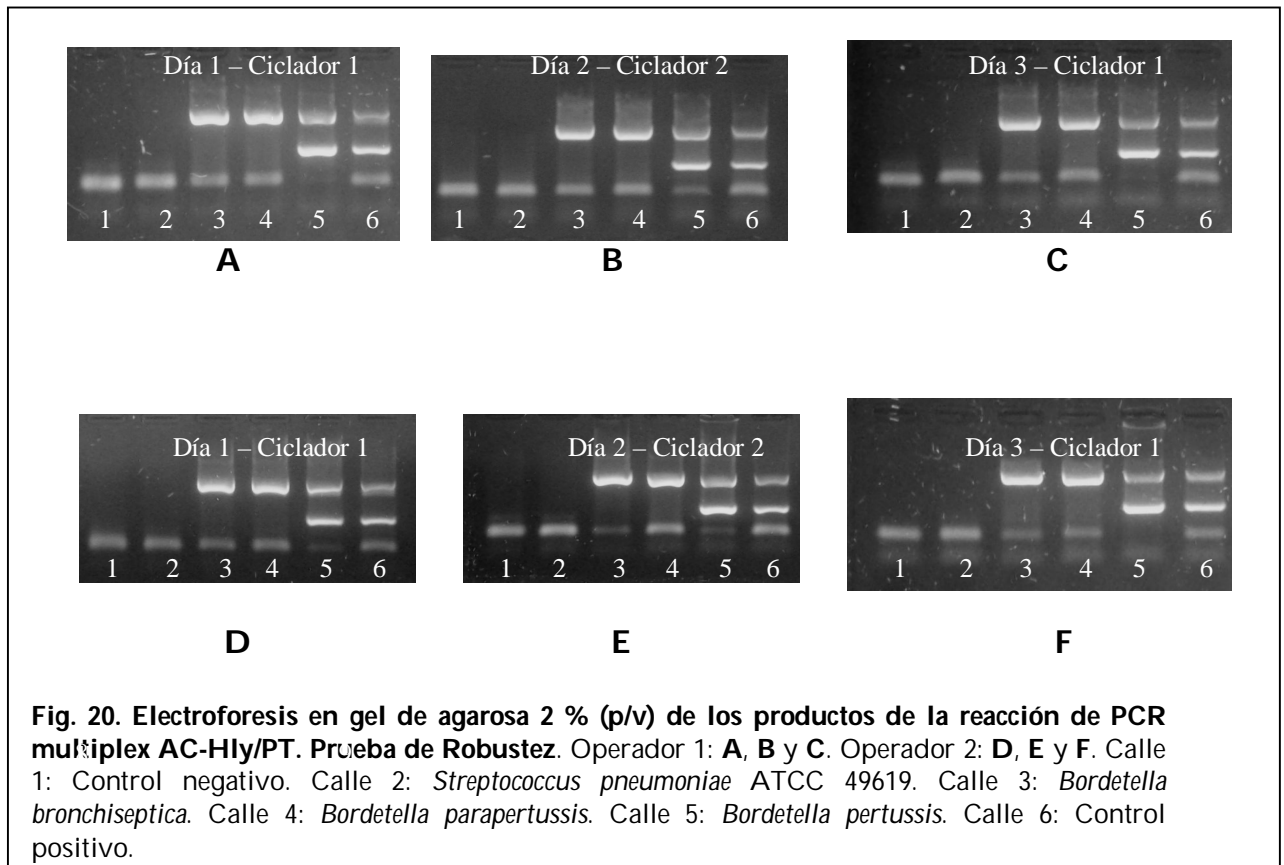
*Streptococcus agalactiae* HHH 38159, **15**-*Streptococcus agalactiae* HHH 38256, **16**-*Streptococcus agalactiae* HHH 38273, **17**-*Streptococcus* grupo G HHH 38061, **18**-*Streptococcus* grupo G HHH 38198, **19**-*Haemophilus influenzae* HHH 38113, **20**-*Haemophilus influenzae* HHH 38133, **21**-*Haemophilus influenzae* HHH 38268, **22**-*Streptococcus pneumoniae* HHH 38206, **23**-*Streptococcus pneumoniae* HHH 38133-2, **24**-*Enterococcus faecium* PNCCB E24, **25**-*Enterococcus raffinosus* HHH 26356, **26**-*Enterococcus gallinarum* PNCCB E24-2, **27**-*Enterococcus casseliflavus* PNCCB E27, **28**-*Escherichia coli* HHH 39853, **29**-*Escherichia coli* HHH 39854, **30**-*Enterobacter cloacae* PEEC 08, **31**-*Proteus mirabilis* HHH 39715, **32**-*Shigella flexneri* HHH 39792.

En su totalidad las cepas presentaron ausencia de señal para los dos fragmentos genómicos considerados, al evaluar la PCR con una concentración de DNA correspondiente a  $10^3$  UFC por reacción.

Los resultados de algunas de estas cepas se muestran en las fotografías siguientes:



**Robustez:** las cuatro cepas estudiadas presentaron la señal o señales esperadas en un total de doce repeticiones que incluyeron dos operadores, dos termocicladores y realizadas en tres días distintos. Algunas de esas experiencias se muestran en la siguiente figura:



Se demuestra así que la PCR es resistente al cambio de respuesta cuando se introducen cambios deliberados tanto de operador como de termociclador y se realizan en tres días distintos.

## CONCLUSIONES

En coqueluche, como en muchas otras enfermedades infecciosas de alta contagiosidad, un diagnóstico rápido es de vital importancia. Especialmente porque permite que el tratamiento antibiótico tenga impacto en la reducción de los síntomas y en el bloqueo de la diseminación del patógeno (1).

El cultivo de *Bordetella pertussis* a partir de secreciones nasofaríngeas del paciente, es altamente específico para el diagnóstico, pero su sensibilidad es

baja y puede demorar entre 4 y 10 días. Los métodos serológicos también aportan sensibilidad y especificidad, pero la necesidad de realizar las determinaciones en muestras pareadas tomadas en fase aguda y convaleciente (separadas al menos por 21 días) retardan aún más el diagnóstico. Además debe considerarse su escasa utilidad en lactantes dada la errática respuesta inmune que se observa y la imposibilidad de diferenciar los anticuerpos generados por vacunación de aquellos que se originan en la infección natural (9, 187).

Por estas razones es fundamental contar con una técnica que, además de sensible y específica, brinde resultados en forma rápida.

En este contexto es que la PCR realiza un aporte invaluable al diagnóstico de coqueluche: puede aplicarse directamente a las muestras clínicas, puede detectar un bajo número de microorganismos aún si han perdido viabilidad, es sensible y específica, es rápida y funciona bien en niños pequeños.

Desde la introducción del diagnóstico por PCR para coqueluche en 1989, se han publicado distintas metodologías en más de 100 trabajos (4, 38). Se han usado como blanco en las distintas técnicas a diferentes regiones del genoma de *Bordetella* sp: secuencias de inserción, gen de adenilato ciclasa, gen de porina, secuencia promotora del gen de la toxina pertussis, etc (1).

A pesar del gran adelanto que significó el aporte de la PCR al diagnóstico, la metodología no fue aún completamente estandarizada. Tampoco han sido convenientemente evaluadas la especificidad genómica de la misma ni la posible influencia de las variaciones analíticas en los resultados. La especificidad genómica en este caso está afectada por un conocimiento aún limitado del genoma de estos microorganismos, y es razonable pensar que la sensibilidad puede estar afectada por polimorfismos en las secuencias blanco.

Ya se ha mencionado la identificación de loci polimórficos en la secuencia codificante de la toxina pertussis y de la pertactina (287) así como la existencia de distintos clusters de variantes genotípicas de *B. pertussis* derivados de los programas masivos de vacunación (180). Adicionalmente, la sensibilidad y la especificidad de la PCR pueden estar afectadas por errores técnicos o analíticos



y también aquellos intrínsecos a toda metodología de amplificación que emplea sistemas abiertos de detección de amplicones (38).

El uso de PCR multi target puede minimizar la incidencia de estas variantes. La probabilidad de existencia de variantes polimórficas en más de un locus simultáneamente en un mismo microorganismo es mínima. De la misma forma, se disminuyen sensiblemente las posibilidades de que los errores técnicos o analíticos afecten a las dos o más secuencias blanco que se estudian. De esta forma se incrementan la sensibilidad y la precisión analítica de la metodología (4).

La elección de la secuencia blanco es crítica para cualquier ensayo de PCR. Es deseable que, además de los beneficios enunciados anteriormente, el uso de una metodología multi target brinde información adicional sobre el o los agentes etiológicos presentes en la muestra estudiada. En el caso de diagnóstico de coqueluche, es altamente recomendable que la combinación de primers elegida permita la detección de las principales especies de *Bordetella* que causan la enfermedad, además de brindar información sobre la presencia o ausencia de *B. pertussis*, microorganismo que causa más del 90% de los casos.

En el presente trabajo se eligieron como secuencias blanco a la secuencia promotora del gen de la toxina pertussis ya que es específica para *B. pertussis* y nuestro laboratorio tiene amplia experiencia con esta metodología porque es la que se usa habitualmente en diagnóstico. La segunda secuencia seleccionada para la PCR multi target fue una secuencia interna del gen que codifica para Adenilato Ciclasa-Hemolisina ya que está presente en las tres especies más frecuentes que causan el Síndrome Coqueluchoide (*B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*) y además puede compatibilizarse con la PCR anterior en un formato multiplex. Los productos de amplificación (191 pares de bases para la PCR de la secuencia promotora de toxina pertussis y 522 para la de Adenilato Ciclasa) son claramente diferenciables en un gel de agarosa. Adicionalmente, es posible compatibilizar las temperaturas de annealing de los distintos primers.

En este trabajo se optimizaron las condiciones de reacción de la PCR multiplex y luego la metodología optimizada fue validada.

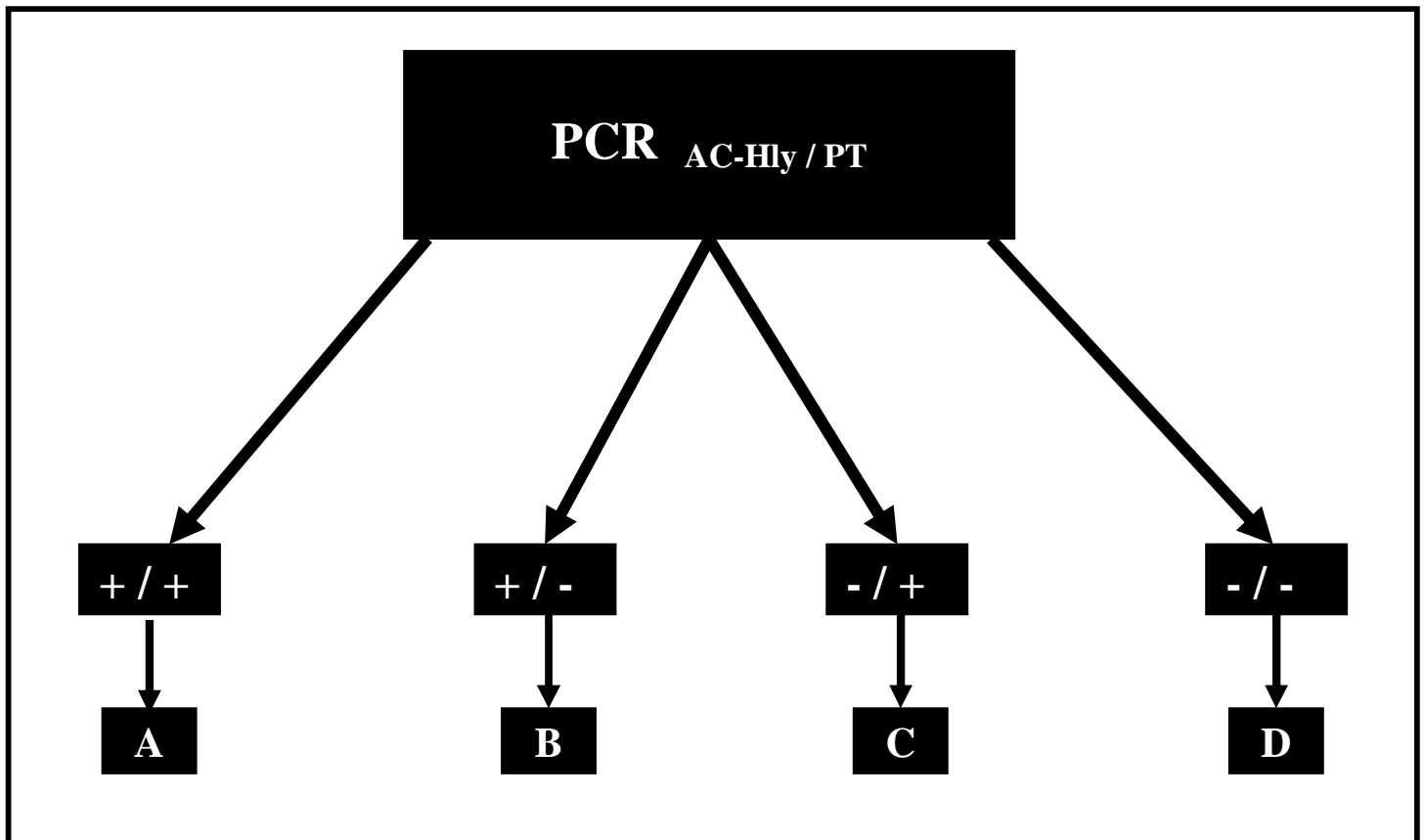
El desempeño fue óptimo ya que se obtuvo un límite de detección igual al de cada PCR realizada individualmente. El mismo fue de 0.5 bacterias por reacción lo que implica una excelente sensibilidad para el diagnóstico de la patología.

Las pruebas de Selectividad permitieron corroborar el excelente desempeño de la PCR, demostrando un 100% de resultados óptimos tanto en los ensayos de Inclusión como en los de Exclusión.

Finalmente, quedó demostrada la Robustez del ensayo obteniendo resultados 100% concordantes al variar el operador, el equipo utilizado y realizando la metodología en tres días diferentes. En total se probó para este parámetro el desempeño de la PCR en doce situaciones distintas.

En suma, el uso de esta PCR multitarget puede aumentar la sensibilidad del diagnóstico de coqueluche, la especificidad del mismo discriminando los resultados falsos positivos/negativos y aumentar el conocimiento sobre los agentes etiológicos implicados en el síndrome coqueluchoide.

Teniendo en cuenta la probable presencia de agentes etiológicos distintos de *B. pertussis*, la posible presencia de microorganismos con variantes polimórficas en las secuencias blanco estudiadas y la posible ocurrencia de errores técnicos; se recomienda la utilización de esta PCR multitarget basándose en el siguiente algoritmo diagnóstico:



### INTERPRETACIÓN:

**A:** Compatible con *B. pertussis*.

**B:** Compatible con *B. bronchiseptica* o *B. parapertussis*: realizar PCR de IS1001 o del gen de Flagelina (347). Considerar polimorfismo en PT o falla técnica: realizar PCR IS 481 o Flagelina.

**C:** Considerar polimorfismo en AC o falla técnica: realizar PCR IS 481 o Flagelina

**D:** Compatible con ausencia de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*.

**NOTA:** +/+ significa presencia de amplicón de AC y PT.

+/- significa presencia de amplicón de AC y ausencia del de PT.

- /+ significa ausencia de amplicón de AC y presencia del de PT

- /- significa ausencia de ambos amplicones

## CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de la historia de la humanidad las enfermedades infecciosas constituyeron la principal causa de muerte, exceptuando las ocasionadas por las guerras. Con la introducción de las vacunas, por un momento pareció haberse derrotado a estas enfermedades pero pese a ello, quedan aún dolencias de vieja data por erradicar. Una de ellas es pertussis. Esta enfermedad no sólo no se ha podido erradicar, pese al uso masivo de vacunas desde 1940, sino que en la actualidad ha reemergido.

En la Argentina la enfermedad ha evolucionado en forma de brotes epidémicos cada cuatro años. Aún por encima de este perfil epidemiológico, se ha venido registrando un aumento significativo de casos sobre todo durante los últimos cuatro años. Esta situación de reemergencia de la enfermedad no es privativa de la Argentina ya que la misma viene registrándose en varios lugares del mundo desde 1990. Varias son las causas que podrían explicarla, la mayoría de ellas asociadas a deficiencias en la vacuna: baja efectividad, corta duración de la inmunidad conferida e inmunoselección de variantes del agente causal con diferencias inmunogénicas respecto de la cepa vacunal.

La provincia de Neuquén no ha sido ajena a este panorama registrando una importante epidemia en el año 2005 con más de 2800 casos notificados. En los años siguientes, además de la existencia de brotes epidémicos de alcance local, la situación adquirió características de endemia con más de 1000 notificaciones en cada uno.

Durante el brote epidémico de 2005 se observó un aspecto epidemiológico llamativo respecto a la distribución de casos confirmados según la edad de los pacientes. El mayor número de casos confirmados de pertussis se registró en edades desde los 18 meses a los 12 años. Este grupo etareo, sorprendentemente además, había recibido entre cuatro y cinco dosis de vacuna contra pertussis (cuádruple y triple bacteriana). Esta situación es similar a la observada en la epidemia de Holanda de los años 1996/97, donde se observa un pico notorio de

casos entre los 3 y los 10 años de edad. La aplicación de modelos matemáticos al análisis de esta situación, permitió postular que el brote de Holanda obedeció a una disminución en la eficacia de la vacuna, probablemente relacionada con un acortamiento del período de protección post vacunal. Se ha postulado que esta reducción en la protección se debe a la aparición de cepas nuevas para las cuales las vacunas en uso son menos efectivas(286, 397). De hecho, en Holanda la población de *B. pertussis* circulantes presentan algunos genes de virulencia (pertactina y toxina pertussis, por ejemplo) con polimorfismos respecto de las cepas que se emplean en la producción de vacunas(286, 404). Esta divergencia molecular observada entre la población bacteriana circulante y las cepas vacunales también se ha registrado en nuestro país (59, 131). Es necesario continuar las investigaciones para clarificar la incidencia de estos hechos en la evolución epidemiológica de la enfermedad en la Argentina y en nuestra Provincia.

Es indudable el impacto positivo que la implementación del diagnóstico molecular de coqueluche produjo en la vigilancia de la enfermedad a nivel país y en nuestra provincia en particular. La combinación del trabajo conjunto del equipo clínico-epidemiológico con el de laboratorio y la posibilidad de contar con resultados rápidos, sensibles y específicos; permitieron un monitoreo en tiempo real de la situación con la posibilidad de tomar acciones de alto impacto en el momento oportuno.

La situación epidemiológica de la enfermedad en la provincia no solo llevó a la implementación local del diagnóstico microbiológico y molecular, sino a mejorarlo de forma de poder hacer frente al número relativamente alto de muestras que se procesaban. Se hizo imprescindible tratar de disminuir las repeticiones de la metodología que se debían hacer sobre una misma muestra dada su naturaleza mucosa. Se trabajó para ello en el mejoramiento del método de procesamiento, de forma que continuara siendo sencillo pero con incrementada capacidad mucolítica y con la adición de agentes que pudieran neutralizar posibles inhibidores presentes en las muestras. El método optimizado consistió básicamente en la utilización de dithiothreitol como

agente mucolítico, proteinasa K y Chelex como agente quelante de probables inhibidores presentes en las muestras.

Dicho método, de menor costo e igual performance que los mejores métodos comerciales disponibles en el mercado, mostró un desempeño excelente en las pruebas de laboratorio. El porcentaje de repeticiones con este método disminuyó drásticamente de alrededor de 30% a menos del 5% de las muestras. Este último valor está representado mayormente por muestras extraordinariamente mucopurulentas, la mayoría de las cuales tampoco pueden ser resueltas con los métodos comerciales ensayados. El uso de esta metodología simple que no insume más tiempo que la tradicional, marca un considerable avance en el diagnóstico molecular de la patología sin elevar apreciablemente los costos.

Otro aspecto que se debió abordar al instalar las metodologías en una provincia como Neuquén, con escasa población y organizada en centros de salud de complejidad creciente con diagnóstico centralizado, fue la optimización en la conservación y envío de las muestras. En este trabajo se evaluaron las condiciones de conservación antes del procesamiento en el laboratorio de Biología Molecular. Los ensayos realizados permitieron demostrar que durante las primeras 72 horas de obtenida la muestra no se observa deterioro de la misma, aún conservada a temperatura ambiente. No hay diferencias entre conservarlas como fueron obtenidas o procesarlas previo a la derivación. La gran mayoría de las muestras llegan al laboratorio de biología molecular con menos de 72 horas desde que fueron obtenidas, y por ello no es necesario hacer ningún tratamiento de la muestra. Dado que a las 72 horas a temperatura ambiente se comienza a percibir una disminución en la intensidad de las señales obtenidas en la PCR, aunque aún no se puede objetivar pérdida de sensibilidad, se recomienda la conservación de la muestra en heladera. Se sugiere no usar freezer ya que su comportamiento demostró ser inferior. Para conservaciones prolongadas se sugiere utilizar heladera ya que las muestras así conservadas fueron las únicas que no evidenciaron cambios a lo largo de los 30 días que duró la experiencia. Las normas de conservación y derivación de

muestras desde los hospitales provinciales hacia el laboratorio de biología molecular se elaboraron en base a las conclusiones obtenidas con las experiencias diseñadas y llevadas a cabo localmente.

Una vez mejorada la preparación de las muestras y establecidos los parámetros para su conservación y derivación, se consideró necesario evaluar la metodología diagnóstica por PCR. La posible existencia de polimorfismos en los genes utilizados como blanco de la PCR y la ocurrencia de algunos errores técnicos en el proceso pueden evitarse con un diseño multi target de la PCR. Teniendo en cuenta esto, se decidió poner a punto y evaluar una PCR con dos secuencias blanco: se eligió una específica para *B. pertussis* (secuencia promotora del gen de toxina pertussis) y otra específica para las especies de *Bordetella* involucradas en el síndrome coqueluchoide: *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* (secuencia del gen de Adenilato Ciclasa-Hemolisina). Con este formato, además de evitar las dos fuentes de error mencionadas anteriormente, se pretendió obtener información adicional sobre otras especies del género *Bordetella* que pudieran estar involucradas en la endemo-epidemia de Neuquén.

Se optimizó la metodología y luego se validó su desempeño en muestras clínicas. Es de destacar que la PCR diseñada demostró una excelente sensibilidad, igual a la de cada PCR realizada en forma individual. También se comprobó una selectividad del 100% y una excelente robustez frente a los desafíos ensayados. De esta manera la **PCR multiplex AC-Hly /PT**, se presenta como una nueva herramienta diagnóstica de excelente desempeño, a la que se le ha maximizado la especificidad y que puede brindar información adicional sobre los agentes etiológicos involucrados en el síndrome coqueluchoide.

En relación a este último punto, en la prueba en terreno de la nueva herramienta diagnóstica, además de detectar pacientes infectados con *B. pertussis* se detectó en seis pacientes con sintomatología compatible con coqueluche, una señal propia de otras especies del género con ausencia de *B. pertussis* (señal de AC-Hly en ausencia de la de PT). De las muestras de estos pacientes se pudieron aislar colonias morfológica y microscópicamente

compatibles con *Bordetella*. Dichas colonias fueron identificadas por pruebas bioquímicas y PCR específicas en Laboratorios de Referencia, como *B. parapertussis*. Merece destacarse que, si bien la literatura es contradictoria en este sentido, existe un predominio de opiniones de que las vacunas actuales tienen limitada o baja eficacia sobre *B. parapertussis* (98, 184, 420, 421). Estos resultados que a nuestro entender son los primeros notificados en nuestro país, son de gran importancia porque demuestran la participación de otros agentes etiológicos cuya trascendencia en la reemergencia de coqueluche debe ser investigada (313).

Finalmente, es de destacar que esta investigación ha impactado favorablemente en la comunidad médica y bioquímica de la provincia y en las autoridades de Salud de la misma. El avance en el diagnóstico de pertussis en la provincia no sólo permitió una mejora en la respuesta a esta enfermedad, sino que permitió la instalación de capacidades básicas aplicables a otras patologías. Es así que en la actualidad, las autoridades de la Subsecretaría de Salud y la comunidad médica valorizan este tipo de metodologías sobre todo porque quedó demostrada su capacidad para brindar las respuestas oportunas tan necesarias en el área de salud.



## BIBLIOGRAFÍA

1. **A. J. Lawrence Glare, E. M., J. C. Paton, R. R. Premier, I. T. Nisbet.** 1990. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1982-1987.
2. **Advani, A., D. Donnelly, H. Hallander.** 2004. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 2890-2897.
3. **Advani, A., D. Donnelly, L. Gustafsson, H. O. Hallander.** 2007. Changes of the Swedish *Bordetella pertussis* population in incidence peaks during an acellular pertussis vaccine period between 1997 and 2004. *APMIS.* **115**: 299-310.
4. **Advani, A., L. Gustafsson, R. M. Carlsson, D. Donnelly, H. O. Hallander.** 2007. Clinical outcome of pertussis in Sweden: association with pulsed field gel electrophoresis profiles and serotype. *APMIS.* **115**: 736-742.
5. **Aguas, R., G. Goncalves, M. G. M. Gomes.** 2006. Pertussis: increasing disease as a consequence of reducing transmission. *Lancet Infect. Dis.* **6**: 112-117.
6. **Ahuja, N., P. Kumar, R. Bhatnagar.** 2004. The adenylate cyclase toxins. **30**: 187-196.
7. **Aksakal, F. M., N. Cöplü, M. N. Ceyhan, C. Sönmez, S. Özkan, B. Esen, M. N. Ilhan, R. Aygün.** 2007. High incidence of pertussis among schoolchildren with prolonged cough in Turkey. *Tohoku J. Exp. Med.* **211**: 353-358.
8. **Al Dajani, N., D. Scheifele.** 2007. How long can we expect pertussis protection to last after the adolescent booster dose of tetanus-diphtheria-pertussis (Tdap) vaccines?. *Paediatr. Child Health.* **12**: 873-874.
9. **Allen, C. W., H. E. Jeffery.** 2005. Pertussis in the neonatal nursery. *J. Paediatr. Child Health.* **41**: 140-142.
10. **Al-Murieb, A., A. M. Brown, A. Rauli, C. George, C. Gander, P. Forrester, S. Gibson.** 2008. Evidence of pertussis clusters in three aged-care facilities in the former Macquarie Area Health Service, NSW. *NSW Public Health Bulletin.* **19**: 157-160.
11. **Anderson, T. P., K. A. Beynon, D. R. Murdoch.** 2003. Comparison of real-time PCR and conventional hemi-nested PCR for the detection of *Bordetella pertussis* in naso pharyngeal samples. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**: 746-749.
12. **André, P., V. Caro, E. Njamkepo, A. M. Wendelboe, A. Van Rie, N. Guiso.** 2008. Comparison of serological and real-time PCR assays to diagnose *Bordetella pertussis* infection in 2007. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 1672-1677.
13. **Andreasen, C., N. H. Carbonetti.** 2008. Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to *Bordetella pertussis* respiratory tract infection in mice. *Infect. Immun.* **76**: 5139-5148.

14. **Antila, M., Q. He, C. de Jong, I. Aart, H. Verbakel, S. Bruisten, S. Keller, M. Haanperä, J. Mäkinen, E. Enrola, M. K. Viljanen, J. Mertsola, A. van der Zee.** 2006. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J. Med. Microbiol.* **55**: 1043-1051.
15. **Aoyama, T., C. Tamura, Y. Takeuchi, T. Kamimura, A. Imaizumi.** 1997. Rapid, sensitive and specific diagnosis of *Bordetella pertussis* using the Polymerase Chain reaction. *Acta Paediatr. Jpn.* **39**: 44-47.
16. **Aoyama, T., Y. Ide, J. Watanabe, Y. Takeuchi, A. Imaizumi.** 1996. Respiratory failure caused by dual infection with *Bordetella pertussis* and respiratory syncytial virus. *Acta Paediatr. Jpn.* **38**: 282-285.
17. **Appleman, M. E., T. L. Hadfield, J. K. Gaines, R. E. Winn.** 1987. Susceptibility of *Bordetella pertussis* to five quinolone antimicrobial drugs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **8**: 131-133.
18. **Ashworth, L. A., R. B. Fitzgeorge, L. I. Irons, C. P. Morgan, A. Robinson.** 1982. Rabbit nasopharyngeal colonization by *Bordetella pertussis*: the effects of immunization on clearance and on serum and nasal antibody levels. *J. Hyg. (Lond.)*. **88**: 475-486.
19. **Aujard, Y., C. Zabe-Desanges, C. Six, V. Goulet, S. Bonacorsi.** 2001. Coqueluche néonatale. *Méd. Mal. Infect.* **31S1**: 39-44.
20. **Bamberger, E. S., I. Srugo.** 2007. What is new in pertussis?. *Eur. J. Pediatr.* Doi 10.1007/s00431-007-0548-2.
21. **Bamberger, E., N. Lahat, V. Gershtein, R. Gershtein, D. Benilevi, S. Shapiro, I. Kassis, L. Rubin, I. Srugo.** 2005. Diagnosing pertussis: the role of polymerase chain reaction. *IMAJ.* **7**: 351-354.
22. **Bamberger, E., O. Starets-Haham, D. Greenberg, A. Karidis, N. Porat, G. Bar-Joseph, R. Gershtein, I. Srugo.** 2006. Adult pertussis is hazardous for the newborn. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**: 623-625.
23. **Bannatyne, R. M., R. Cheung.** 1984. Susceptibility of *Bordetella pertussis* to Cephalosporin derivatives and Imipenem. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **26**: 604-605.
24. **Banus, S., R. J. Vandebriel, J. L Pennings, E. R. Gremmer, P. W. Wester, H. J. van Kranen, T. M. Breit, P. Demant, F. R. Mooi, B. Hoebee, T. G. Kimman.** 2007. Comparative gene expression profiling in two congenic mouse strains following *Bordetella pertussis* infection. *BMC Microbiol.* **7**: doi: 10.1186/1471-2180-7-88.
25. **Baptista, P. N., V. S. Magalhaes, L. C. Rodrigues.** 2007. Children with pertussis inform the investigation of other pertussis cases among contacts. *BMC Microbiol.* **7**: doi: 10.1186/1471-2431-7-21.
26. **Baughman, A. L., K. M. Bisgard, K. M. Edwards, D. Guris, M. D. Decker, K. Holland, B. D. Meade, F. Lynn.** 2004. Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **11**: 1045-1053.
27. **Baughman, A. L., K. M. Bisgard, M. M. Cortese, W. W. Thompson, G. N. Sanden, P. M. Strebel.** 2007. Utility of composite reference standards and

- latent class analysis for evaluating the clinical accuracy of pertussis diagnostic tests. *Clin. Vaccine Immunol.* doi: 10.1128/cvi.00223-07.
28. **Bergfors, E., B. Trollfors, J. Taranger, T. Lagergård, B. Sundh, G. Zackrisson.** 1999. Parapertussis and Pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int. J. Infect. Dis.* **3**: 140-146.
  29. **Birkebaek, N. H., M. Kristiansen, T. Seefeldt, J. Degn, A. Moller, I. Heron, P. L. Andersen, J. K. Moller, L. Ostergard.** 1999. *Bordetella pertussis* and chronic cough in adults. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 1239-1242.
  30. **Birkenmeyer L. G., I. K. Mushahwar.** 1991. DNA probe amplification methods. *J. Virol. Methods.* **35**: 117-126.
  31. **Bisgard, K. M., C. D. C. Christie, S. F. Reising, G. N. Sanden, P. K. Cassidy, C. Gomersall, W. A. Wattigney, N. E. Roberts, P. M. Strebel.** 2001. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* by pulsed-field gel electrophoresis profile: Cincinnati, 1989-1996. *J. Infect. Dis.* **183**: 1360-1367.
  32. **Bisgard, K., F. B. Pascual, K. R. Ehresmann, C. A. Miller, C. Cianfrini, C. E. Jennings, C. A. Rebmann, J. Gabel, S. L. Schauer, S. M. Lett.** 2004. Infant pertussis. Who was the source?. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**: 985-989.
  33. **Bjornstad, O. N., E. T. Harvill.** 2005. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. *Trends Microbiol.* **13**: 355-359.
  34. **Bonacorsi, S., C. Farnoux, P. Bidet, V. Caro, S. Aizenfisz, M. Benhayoun, Y. Aujard, N. Guiso, E. Bingen.** 2006. Treatment failure of nosocomial pertussis infection in a very-low-birth-weight neonate. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 3830-3832.
  35. **Bonhoeffer, J., G. Bär, M. Riffelmann, M. Soler, U. Heininger.** 2005. The role of *Bordetella* infections in patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Infection.* **33**: 13-17.
  36. **Bonmarin, I., D. Levy-Bruhl, S. Baron, N. Guiso, E. Njamkepo, V. Caro and Renacoq participants.** 2007. Pertussis surveillance in French hospitals: results from a 10 year period. *Eurosurveillance.* **12**(1).
  37. **Bonmarin, I., I. Poujol, D. Levy-Bruhl.** 2007. Nosocomial infections and community clusters of pertussis in France, 2000-2005. *Eurosurveillance.* **12**(11).
  38. **Borisova, O., S. Y. Kombarova, N. S. Zakharova, M. Van Gent, V. A. Aleshkin, I. Mazurova, F. R. Mooi.** 2007. Antigenic divergence between *Bordetella pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**: 234-238.
  39. **Borska, K., M. Simkovicova.** 1972. Studies on the circulation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in populations of children. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **16**: 159-172.
  40. **Bottero, D., M. E. Gaillard, M. Fingermann, G. Weltman, J. Fernández, F. Sisti, A. Graieb, R. Roy, O. Rico, G. Ríos, M. Regueira, N. Binsztein, D. Hozbor.** 2007. Pulsed field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin. Vaccine Immunol.* Doi:10.1128/CVI.00177-07.

41. **Bouchez, V., V. Caro, E. Levillain, G. Guigon, N. Guiso.** 2008. Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. Plos ONE. **3**: e2437.
42. **Boursaux-Eude, C., N. Guiso.** 2000. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Infect. Immun. **68**: 4815-4817.
43. **Bradford, W. L., B. Slavin.** 1937. An organism resembling *Hemophilus pertussis*, with special reference to color changes produced by its growth upon certain media. Am. J. Public Health. **27**: 1277-1282.
44. **Brennan, M., P. Strebel, H. George, W. K. Yih, R. Tachdjian, S. M. Lett, P. Cassidy, G. Sanden, M. Wharton.** 2000. Evidence for transmission of pertussis in schools, Massachusetts, 1996: epidemiological data supported by pulsed-field gel electrophoresis studies. J. Infect. Dis. **181**: 210-215.
45. **Briand, V., I. Bonmarin, D. Lévy-Bruhl.** 2007. Study of the risk factors for severe childhood pertussis based on hospital surveillance data. Vaccine. Doi:10.1016/j.vaccine.2007.07.020
46. **Brinig, M. M., K. B. Register, M. R. Ackermann, D. A. Relman.** 2006. Genomic features of *Bordetella parapertussis* clades with distinct host species specificity. Genome Biol. **7**: 1-10.
47. **Broccolo, F., P. Scarpellini, G. Locatelli, A. Zingale, A. M. Brambilla, P. Cichero, L. A. Sechi, A. Lazzarin, P. Lusso, M. S. Malnati.** 2003. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. J. Clin. Microbiol. **41**: 4565-4572.
48. **Broutin, H., F. Simondon, J. F. Guégan.** 2004. Whooping cough metapopulation dynamics in tropical conditions: disease persistence and impact of vaccination. Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.) **271**: S302-S305.
49. **Bruss, J. B., G. R. Syber.** 1999. Protective effects of pertussis immunoglobulin (P-IGIV) in the aerosol challenge model. Clin. Diag. Lab Immunol. **6**: 464-470.
50. **Burns, V. C., E. J. Pishko, A. Preston, D. J. Maskell, E. T. Harvill.** 2003. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. Infect. Immun. **71**: 86-94.
51. **Byrne, S., A. T. Slack.** 2006. Analysis of *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin types from Queensland, Australia, 1999-2003. BMC Infect. Dis. **6**: 53 doi: 10.1186/1471-2334-6-53.
52. **Cadario, M. E.** Comunicación personal.
53. **Cagney, M., C. R. MacIntyre, P. MacIntyre, S. Torvaldsen, V. Melot.** 2005. Cough symptoms in children aged 5-14 years in Sydney, Australia: non-specific cough or unrecognized pertussis?. Respirology. **10**: 359-364.
54. **Carbone, M., M. T. Fera, M. G. Pennisi, M. Masucci, A. De Sarro, C. Macri.** 1999. Activity of nine fluoroquinolones against strains of *Bordetella bronchiseptica*. Int. J. Antimicrob. Agents. **12**: 355-358.
55. **Carbonetti, N. H., G. V. Artamonova, R. M. Mays, Z. E. V. Worthington.** 2003. Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*. Infect. Immun. **71**: 6358-6366.

56. **Caro, J. J., D. Getsios, K. Payne, L. Annemans, P. J. Neumann, E. Trindade.** 2005. Economic burden of pertussis and the impact of immunization. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S48-S54.
57. **Caro, J. J., D. Getsios, W. El-Hadi, K. Payne, J. A. O'Brien.** 2005. Pertussis immunization of adolescents in the United States. An economic evaluation. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S75-S82.
58. **Caro, V., D. Hot, G. Guigon, C. Hubans, M. Arrivé, G. Soubigou, G. Renault-Mongénie, R. Antoine, C. Locht, Y. Lemoine, N. Guiso.** 2006. Temporal analysis of French *Bordetella pertussis* isolates by comparative whole-genome hybridization. *Microbes Infect.* **8**: 2228-2235.
59. **Caro, V., V. Bouchez, N. Guiso, B. Gatti, M. R. Agosti, S. E. González Ayala.** 2007. Pertussis in Argentina and France. *Vaccine.* **25**: 4335-4339.
60. **Caro, V., V. Bouchez, N. Guiso.** 2008. Is the sequenced *Bordetella pertussis* strain Tohama I representative of the species?. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 2125-2128.
61. **Cassiday, P., G. Sanden, K. Heuvelman, F. Mooi, K. M. Bisgard, T. Popovic.** 2000. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J. Infect. Dis.* **182**: 1402-1408.
62. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2002. Pertussis-United States, 1997-2000. Age distribution and incidence of reported cases.
63. **Centers for Disease Control.** 1991. Diphtheria, tetanus and pertussis: recommendations for vaccine use and other preventive measures recommendations of the Immunization Practice Advisory Committee (ACIP). *MMWR.* **40**: 1-28.
64. **Centers for Disease Control.** 1997. Pertussis vaccination. Use of acellular pertussis vaccines among infant and young children recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR.* **46**: 1-25.
65. **Centers for Disease Control.** 2007. Outbreaks of respiratory illness mistakenly attributed to Pertussis-New Hampshire, Massachusetts, and Tennessee, 2004-2006. *MMWR.* **56**: 837-842.
66. **Centers for Disease Control.** 2008. Prevention of pertussis, tetanus, and diphtheria among pregnant and postpartum women and their infants. *MMWR.* **57**: 1-48.
67. **Cherry, J. D.** 1984. The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and United States: a comparative study. *Curr. Probl. Pediatr.* **14**: 1-78.
68. **Cherry, J. D.** 1999. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin. Infect. Dis.* **28S2**: 112-117.
69. **Cherry, J. D.** 1999. Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. *Clin. Infect. Dis.* **28S2**: 107-111.
70. **Cherry, J. D.** 2003. The science and fiction of the "resurgence" of pertussis. *Pediatrics.* **112**: 405-406.

71. **Cherry, J. D.** 2005. The epidemiology of pertussis: A comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics*. **115**: 1422-1427.
72. **Cherry, J. D.** 2005. Pertussis vaccines for adolescents and adults. *Pediatrics*. **116**: 755-756.
73. **Cherry, J. D.** 2007. Immunity to pertussis. *Clin. Infect. Dis.* **44**: 1278-1279.
74. **Cherry, J. D., E. Grimprel, N. Guiso, U. Heininger, J. Mertsola.** 2005. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S25-S34.
75. **Cherry, J. D., J. Gornbein, U. Heininger, K. Stehr.** 1998. A search for serological correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*. **16**: 1901-1906
76. **Chodorowska, M., S. Tyski, D. Kuklinska.** 2000. In vitro activity of macrolides against *Bordetella pertussis* strains isolated in 1968 and 30 years later in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**: 50-52.
77. **Christie, C. D. C., K. M. Garrison, L. Kiely, R. K. Gupta, J. Heubi, C. D. Marchant.** 2001. A trial of acellular pertussis vaccine in hospital workers during the Cincinnati pertussis epidemic of 1993. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 997-1003.
78. **Christie, C., M. L. Marx, C. D. Marchant, S. F. Reising.** 1994. The 1993 epidemic of pertussis in Cincinnati – resurgence of disease in a highly immunized population of children. *N. Engl. J. Med.* **331**: 16-21.
79. **Cimolai, N., C. Trombley.** 2001. Molecular diagnostics confirm the paucity of parapertussis activity. *Eur. J. Pediatr.* **160**: 518-525.
80. **Clark, S. J., S. Adolphe, M. M. Davis, A. E. Cowan, K. Kretsinger.** 2006. Attitudes of US obstetricians toward a combined Tetanus-Diphtheria-Acellular Pertussis vaccine for adults. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2006**: 1-5.
81. **Cloud, J. L., W. C. Hymas, A. Turlak, A. Croft, U. Reischl, J. A. Daly, K. C. Carroll.** 2003. Description of a multiplex *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* lightcycler PCR assay with inhibition control. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**: 189-195.
82. **Cofré G., J.** 2003. Coqueluche en adolescentes y adultos. *Rev. Chil. Infect.* **20S1**: 52-58.
83. **Cofré Guerra, J.** 2006. Quimioprofilaxis en Coqueluche: ¿sacar agua a canastos?. *Rev. Chil. Infect.* **23**: 60-68.
84. **Cohen, R., S. Aberrane, P. Ovetchkine.** 2001. Antibiotiques et coqueluche. *Méd. Mal. Infect.* **31S1**: 82-85.
85. **Connor, K. M., J. F. Porter, M. M. Quirie, W. Donachie.** 1996. Moredun Bordetella medium, an improved selective medium for isolation of *Bordetella parapertussis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 638-640.
86. **Cornia, P. B., B. A. Lipsky, S. Saint, R. Gonzales.** 2007. Clinical problem-solving: Nothing to cough at. *N. Engl. J. Med.* **357**: 1432-1437.
87. **Cortese, M. M., A. L. Baughman, K. Brown, P. Srivastava.** 2007. A “new age” in pertussis prevention. New opportunities through adult vaccination. *Am. J. Prev. Med.* **32**: 177-185.

88. **Cortese, M., M., A. L. Baughman, R. Zhang, P. U. Rivastava, G. S. Wallace.** 2008. Pertussis hospitalization among infants in the United States, 1993 to 2004. *Pediatrics*. **121**: 484-493.
89. **Cosnes-Lambe, C., J. Raymond, M. Chalumeau, C. Pons-Catalano, F. Moulin, N. de Suremain, H. Reglier-Poupet, P. Lebon, C. Poyart, D. Gendrel.** 2007. Pertussis and respiratory syncytial virus infections. *Eur. J. Pediatr.* Doi 10.1007/s00431-007-0633-6.
90. **Cotter, P. A., J. F. Miller.** 2000. Genetic analysis of the *Bordetella* infectious cycle. *Immunopharmacol.* **48**: 253-255.
91. **Couzigou, C., A. Flahault.** 2003. Is pertussis being considered as a cause of persistent cough among adults?. *Eur. J. Epidemiol.* **18**: 1013-1015.
92. **Craig-Mylius, K., A. Weiss.** 2000. Antibacterial agents and release of periplasmic Pertussis Toxin from *Bordetella pertussis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1383-1386.
93. **Crowcroft, N. S., C. Stein, P. Duclos, M. Birmingham.** 2003. How best to estimate the global burden of pertussis?. *Lancet Infect. Dis.* **3**: 413-418.
94. **Crowcroft, N. S., R. Booy, T. Harrison, L. Spicer, J. Britto, Q. Mok, P. Heath, I. Murdoch, M. Zambon, R. George, E. Miller.** 2003. Severe and unrecognized: pertussis in UK infants. *Arch. Dis. Child.* **88**: 802-806.
95. **Crowcroft, N. S., R. G. Pebody.** 2006. Recent developments in Pertussis. *Lancet.* **367**: 1926-1936.
96. **Cummings, C. A., M. M. Brinig, P. W. Lepp, S. van de Pass, D. A. Relman.** 2004. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J. Bacteriol.* **186**: 1484-1492.
97. **Dámato R. F., A. A. Willman, L. H. Hochstein, P. M. Colaninno, M. Scardamaglia, et al.** 1995. Rapid diagnosis of pulmonay tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1832-1834.
98. **David, S., R. van Furth, F. R. Mooi.** 2004. Efficacies of whole cell and acellular vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. *Vaccine.* **22**: 1892-1898.
99. **Day, E., W. L. Bradford.** 1952. Susceptibility of *Haemophilus parapertussis* to certain antibiotics. *Pediatrics.* **9**: 320-326.
100. **de Greeff, S., F. R. Mooi, J. F. P. Schellekens, H. E. de Melker.** 2008. Impact of acellular pertussis preschool booster vaccination on disease burden of pertussis in The Netherlands. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**: 218-223.
101. **de Melker, H. E., F. G. A. Versteegh, J. F. P. Schellekens, P. F. M. Teunis, M. Kretzschmar.** 2006. The incidence of *Bordetella pertussis* infections estimated in the population from a combination of serological surveys. *J. Infect.* **53**: 106-113.
102. **de Melker, H. E., F. G. A. Versteegh, M. A. E. Conyn-van Spaendonck, L. H. Elvers, G. A. M. Berbers, A. van der Zee, J. F. P. Schellekens.** 2000. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis on infection with *Bordetella pertussis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 800-806.
103. **de Melker, H. E., J. F. P. Schellekens, S. E. Neppelenbroek, F. R. Mooi, H. C. Rümke, M. A. E. Conyn-van Spaendonck.** 2000. Reemergence of

- pertussis in the highly vaccinated population of The Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg. Infect. Dis.* **6**: 348-357.
104. **Denoël, P., F. Godfroid, N. Guiso, H. Hallander, J. Poolman.** 2005. Comparison of acellular pertussis vaccines-induced immunity against infection due to *Bordetella pertussis* variant isolates in a mouse model. *Vaccine.* **23**: 5333-5341.
  105. **Diavatopoulos, D. A., C. A. Cummings, L. M. Schouls, M. M. Brinig, D. A. Relman, F. R. Mooi.** 2005. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLOS Pathog.* [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org). **1**: 373-383.
  106. **Diez-Domingo, J., A. Ballester, J. M. Baldó, M. V. Planelles, J. V. Villarroya, T. Alvarez, M. C. Peidró, P. Calero, M. D. Garcés, I. Sorribes, M. Graullera, A. Jubert, M. San Martín, A. González.** 2004. Incidence of pertussis in persons < 15 years of age in Valencia, Spain: seroprevalence of antibodies to pertussis toxin (PT) in children, adolescents and adults. *J. Infect.* **49**: 242-247.
  107. **Dilli, D., I. Bostanci, Y. Dallar, T. Buzgan, H. Irmak.** 2007. Recent findings on pertussis epidemiology in Turkey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Doi: 10.1007/s10096-007-0442x.
  108. **Donchev, D., M. Stoyanova.** 1961. The epidemiological significance of the differentiation of pertussis and parapertussis. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **5**: 294-297.
  109. **Donoso F. A., A. Wegner A., J. León B., M. Ramírez A., J. A. Carrasco O.** 2001. Coqueluche en niños menores de seis meses de vida. *Rev. Chil. Pediatr.* **72**: 334-339.
  110. **Dorson, O., F. Doucet-Populaire.** 1999. Le diagnostic biologique de la coqueluche par PCR. *J. Pediatr. Puericulture.* **12**: 474-479.
  111. **Doucet-Populaire, F., N. Bourgeois, O. Charara, M. Bellaïche, F. Richardin, J. L. Salomon, L. Berardi-Grassias, J. C. Ghnassia, P. Foucaud.** 2002. Utilisation en routine de l'amplification génique pour le diagnostic de coqueluche chez l'enfant. *Arch. Pediatr.* **9**: 1145-1152.
  112. **Douglas, E., J. G. Coote, R. Parton, W. McPhea.** 1993. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. *J. Med. Microbiol.* **38**: 140-144.
  113. **Dragsted, D. M., B. Dohn, J. Madsen, J. S. Jensen.** 2004. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J. Med. Microbiol.* **53**: 749-754.
  114. **Edelman, K., Q. he, J. Mäkinen, A. Sahlberg, M. Haanpera, L. Schuerman, J. Wolter, J. Mertsola.** 2007. Immunity to pertussis 5 years after booster immunization during adolescence. *Clin. Infect. Dis.* **44**: 1271-1277.
  115. **Edwards, K. M., N. Halasa.** 2003. Are pertussis fatalities in infants on the rise? What can be done to prevent them?. *J. Pediatr.* **143**: 552-553.
  116. **Edwards, K. M., T. R. Talbot.** 2006. The challenges of pertussis outbreaks in healthcare facilities: is there a light at the end of the tunnel.? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**: 537-540.



117. **Eidlitz-Markus, T., M. Mimouni, A. Zeharia.** 2007. Pertussis symptoms in adolescents and children versus infants: the influence of vaccination and age. *Clin. Pediatr. (Phila)*. **46**: 718-723.
118. **Eldering, G., P. Kendrick.** 1937. *Bacillus para-pertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither. *J. Bacteriol.* **35**: 561-572.
119. **Eldering, G., P. L. Kendrick.** 1952. Incidence of parapertussis in the Grand Rapids area as indicated by 16 years' experience with diagnostic culture. *Am. J. Public Health.* **42**: 27-31.
120. **Elliott, M., E. Couchene, D. D. Luft.** 2007. Which patients with suspected exposure to pertussis should receive prophylaxis?. [www.jfponline.com](http://www.jfponline.com). **56**: 399-400.
121. **Elomma, A., A. Advani, D. Donnelly, M. Antila, J. Mertsola, H. Hallander, Q. He.** 2005. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3681-3687.
122. **Elomma, A., A. Advani, D. Donnelly, M. Antila, J. Mertsola, Q. He, H. Hallander.** 2007. Population dynamics of *Bordetella pertussis* in Finland and Sweden, neighbouring countries with different vaccination histories. *Vaccine.* **25**: 918-926.
123. **Emsley, P., I. G. Charles, N. F. Fairweather, N. W. Isacs.** 1996. Structure of the *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature.* **381**: 90-92.
124. **Ewanowich, C. A., L. W. L. Chui, M. G. Paranchych, M. S. Pepler, R. G. Marusyk, W. L. Albritton.** 1993. Major outbreak of pertussis in Northern Alberta, Canada: analysis of discrepant direct fluorescence-antibody and culture results by using Polymerase Chain Reaction methodology. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1715-1725.
125. **Farrell, D. J., M. McKeon, G. Daggard, M. J. Loeffelholz, C. J. Thompson, T. K. S. Mukkur.** 2000. Rapid-Cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4499-4502.
126. **Farrell, D. J., G. Daggard, T. K. S. Mukkur.** 1999. Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its application in diagnosis of pertussis in nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 606-610.
127. **Fennelly, N. K., F. Sisti, S. C. Higgins, P. J. Ross, H. van der Heide, F. R. Mooi, A. Boyd, K. H. G. Mills.** 2008. *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptative immune responses. *Infect. Immun.* Doi: 10.1128/IAI.00836-07.
128. **Fenollar, F., D. Raoult.** 2004. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganism. *APMIS.* **112**: 785-807.
129. **Fernandez, R., A. Weiss.** 1996. Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1041-1043.
130. **Ferrer Marcellés, A., F. A. Moraga Llops, M. Olsina Tebar, M. Campins Martí, I. Planells Romeu.** 2003. Tos ferina confirmada por cultivo en un hospital terciario. *An. Pediatr.* **58**: 309-315.

131. **Fingermann, M., J. Fernández, F. Sisti, M. E. Rodríguez, B. Gatti, D. Bottero, A. Graieb, M. E. Gaillard, S. González Ayala, F. R. Mooi, H. Lopardo, D. Hozbor.** 2006. Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine*. **24**: 3513-3521.
132. **Finn, T. W., L. A. Stevens.** 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinants. *Mol. Microbiol.* **16**: 625-634.
133. **Fischer, J. E., J. E. Johnson, T. R. Johnson, B. S. Graham.** 2000. Pertussis toxin sensitization alters the pathogenesis of subsequent respiratory syncytial virus infection. *J. Infect. Dis.* **182**: 1029-1038.
134. **Fischer, J. E., T. R. Johnson, R. Stokes Peebles, B. S. Graham.** 1999. Vaccination with pertussis toxin alters the antibody response to simultaneous respiratory syncytial virus challenge. *J. Infect. Dis.* **180**: 714-719.
135. **Forsum, U., P. Olcén, M. Skurnik.** 2004. Diagnostic clinical bacteriology-recent developments in the application of molecular biology tools. *APMIS*. **112**: 709-712.
136. **Forsyth, K. D., C. H. Wirsing von König, T. Tan, J. Caro, S. Plotkin.** 2007. Prevention of pertussis: Recommendations derived from the second Global pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine*. **25**: 2634-2642
137. **Forsyth, K. D., M. Campins-Martí, J. Caro, J. D. Cherry, D. Greenberg, N. Guiso, U. Heininger, J. Schellekens, T. Tan, C. H. Wirsing von König, S. Plotkin, for The Global Pertussis Initiative.** 2004. New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by The Global Pertussis Initiative. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 1802-1809.
138. **Forsyth, K., M. Nagai, A. Lepetic, E. Trindade.** 2005. Pertussis immunization in the Global Pertussis Initiative International Region. Recommended strategies and implementation considerations. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S93-S97.
139. **Forsyth, K., T. Tan, C. H. Wirsing von König, J. J. Caro, S. Plotkin.** 2005. Potential strategies to reduce the burden of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S69-S74.
140. **Fredricks, D. N., D. A. Relman.** 1999. Application of polymerase chain reactions to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis.* **29**: 475-88.
141. **Friedman, L. E., M. T. Messina, L. Santoferrara, M. A. Santillan, A. Mangano, M. A. Franco.** 2006. Characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains using phenotypic and genotypic markers. *Vet. Microbiol.* **117**: 313-320.
142. **Fry, N. K., O. Tzivra, Y. T. Li, A. McNiff, N. Doshi, P. A. Christopher Maple, N. S. Crowcroft, E. Miller, R. C. George, T. G. Harrison.** 2004. Laboratory diagnosis of pertussis infections: the role of PCR and serology. *J. Med. Microbiol.* **53**: 519-525.
143. **Furuya, D., A. Yagihashi, T. Endoh, N. Uehara, N. Fujii, S. Chiba, N. Watanabe.** 1999. Simultaneous amplification of *Bordetella* repeated insertion sequences and toxin promoter region gene by polymerase chain reaction. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**: 55-63.

144. **Galanakis, E., J. A. Englund, P. Abe, X. Qin.** 2007. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella pertussis* isolates in the state of Washington. *Int. J. Antimicrob. Agents.* doi:10.1016/ijantcag.2006.11.024
145. **Galanis, E., A. S. King, S. A. Halperin.** 2006. Changing epidemiology and emerging risk groups for pertussis. *CMAJ.* **174:** 451-452.
146. **García-Martínez, J., F. Chaves, E. Salto, J. R. Otero.** 2006. PCR en tiempo real, inmunofluorescencia y cultivo para la detección de *Bordetella pertussis*: evaluación prospectiva y epidemiología molecular. *Enferm. Infecc. Microbiol.Clin.* **24:** 500-504.
147. **Gardner, P.** 1999. Indication for acellular pertussis vaccines in adults: the case for selective, rather than universal, recommendations. *Clin. Infect. Dis.* **28S2:** 131-135.
148. **Gerlach, G., F. von Wintzingerode, B. Middendorf, R. Gross.** 2001. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect.* **3:** 61-72.
149. **Geuijen, C. A. W., R. J. L. Willems, M. Bongaerts, J. Top, H. Gielen, F. R. Mooi.** 1997. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit fimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect. Immun.* **65:** 4222-4228.
150. **Gidengil, C. A., T. J. Sandora, G. M. Lee.** 2008. Tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccination of adults in the USA. *Expert Rev. Vaccines.* **7:** 621-634.
151. **Gil, A., I. Oyagüez, P. Carrasco, A. González.** 2001. Hospital admissions for pertussis in Spain, 1995-1998. *Vaccine.* **19:** 4791-4794.
152. **Gilberg, S., E. Njamkepo, I. Parent du Chatelet, H. Partouche, P. Gueirard, C. Ghasarossian, M. Schlumberger, N. Guiso.** 2002. Evidence of *Bordetella pertussis* infection in adults presenting with persistent cough in a French area with very high whole-cell vaccine coverage. *J. Infect. Dis.* **186:** 415-418.
153. **Glare, E. M., J. C. Paton, R. R. Premier, A. J. Lawrence, I. T. Nisbet.** 1990. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28:** 1982-1987.
154. **Godfroid, F., P. Denoël, J. Poolman.** 2005. Are vaccination programs and isolate polymorphism linked to pertussis re-emergence.? *Expert Rev. Vaccines.* **4:** 757-778.
155. **Goebel, E. M., D. N. Wolfe, K. Elder, S. Stibitz, E. T. Harvill.** 2008. O antigens protects *Bordetella parapertussis* from complement. *Infect. Immun.* **76:** 1774-1780.
156. **Gogol, E. B., C. A. Cummings, R. C. Burns, D. A. Relman.** 2007. Phase variation and microevolution at homopolymeric tracts in *Bordetella pertussis*. *BMC Gen.* **8:** doi: 10.1186/1471-2164-8-122.
157. **Goodnow, R. A.** 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* **44:** 722-738.
158. **Greenberg, D. P., C.H. Wirsing von König, U. Heininger.** 2005. Health burden of pertussis in infants and children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24:** S39-S43.

159. **Greenberg, D. P., J. J. Caro.** Summary. Health and economic burden of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S55-S57.
160. **Grgic-Vitek, M., I. Klavs, A. Kraigher.** 2008. Re-emergence of pertussis in Slovenia: Time to change immunization policy. *Vaccine.* **26**: 1874-1878.
161. **Grimprel, E.** La coqueluche en pratique en 2007. *Archiv. Pédiatr.* **14**: 306-309.
162. **Grimprel, E., P. Bégué, I. Anjak, F. Betsou, N. Guiso.** 1993. Comparison of Polymerase Chain Reaction, culture, and Western Immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2745-2750.
163. **Grimprel, E., S. Baron, D. Lévy-Bruhl, J. M. Garnier, E. N'jamkepo, N. Guiso, P. Bégué.** 1999. Influence of vaccination coverage on pertussis transmission in France. *Lancet.* **354**: 1699-1700.
164. **Gross, R., B. Arico, R. Rappuoli.** 1989. Genetics of pertussis toxin. *Mol. Microbiol.* **3**: 119-124.
165. **Gross, R., C. A. Guzmán, M. Sebahia, V. M. dos Santos, et al.** 2008. The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae*. *BMC Genomics.* **9**: 449.
166. **Gross, R., N. H. Carbonetti, R. Rossi, R. Rappuoli.** 1992. Functional analysis of the pertussis toxin promoter. *Res. Microbiol.* **143**: 671-681.
167. **Guiso, N.** 2003. Diagnostics biologiques de la coqueluche. *J. Pédiatr. Puericulture.* **16**: 365-368.
168. **Guiso, N., E. Njamkepo, F. Vié le Sage, F. Zepp, C. U. Meyer, V. Abitbol, N. Clyti, S. Chevallier.** 2007. Long term humoral and cell mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine.* **25**: 1390-1397.
169. **Gzyl, A., E. Augustynowicz, E. Mosiej, M. Zawadka, G. Gniadek, A. Nowaczek, J. Slusarczyk.** 2005. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) versus random amplified polymorphic DNA (RAPD) as new tools for inter- and intra-species differentiation within *Bordetella*. *J. Med. Microbiol.* **54**: 333-346.
170. **Halasa, N. B., A. O'Shea, B. J. La Fleur, K. M. Edwards.** 2008. Poor immune response to a birth dose of diphtheria, tetanus, and acellular pertussis vaccine. *J. Pediatr.* Doi: 10.1016/j.jpeds.2008.03.011.
171. **Hallander, H.** 1999. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin. Infect. Dis.* **28**: S99-106.
172. **Hallander, H. O., J. Gnarpe, H. Gnarpe, P. Olin.** 1999. *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and persistent cough in children. *Scand. J. Infect. Dis.* **31**: 281-286.
173. **Hallander, H., A. Advani, M. Riffelman, C. H. W. von König, V. Caro, N. Guiso, F. R. Mooi, A. Gzyl, M. S. Kalsoft, N. K. Fry, J. Mertsola, Q. He.** 2007. *Bordetella pertussis* strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3257-3262.
174. **Halperin, S. A.** 2005. Pertussis- a disease and vaccine for all ages. *N. Engl. J. Med.* **353**: 1615-1617.

175. **Halperin, S. A.** 2007. The control of pertussis – 2007 and beyond. *N. Engl. J. Med.* **356**: 110-113.
176. **Halperin, S. A., G. De Serres.** 2006. Has the change to acellular pertussis vaccine improved or worsened pertussis control?. *CMAJ.* **175**: 1227-1228.
177. **Han, H. J., K. Kamachi, K. Okada, H. Toyoizumi-Ajisaka, Y. Sasaki, Y. Arakawa.** 2008. Antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates recovered from adults and children in Japan. *Vaccine.* **26**: 1530-34.
178. **Harrington, A. T., J. A. Castellanos, T. M. Ziedalski, J. E. Clarridge III, B. T. Cookson.** 2009. Isolation of *Bordetella avium* and novel *Bordetella* strain from patients with respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 72-74.
179. **Harvill, E. T., P. A. Cotter, J. F. Miller.** 1999. Pregenomic comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* Tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infect. Immun.* **67**: 6109-6118.
180. **Harwick, T. H., P. Cassidy, R. S. Weyant, K. M. Bisgard, G. N. Sanden.** 2002. Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of *Bordetella pertussis* isolated in United States, 1935 to 1999. *Emerging Infectious Disease.* **8** (1).
181. **Hausman, S. Z., J. D. Cherry, U. Heininger, C. H. Wirsing von König, D. L. Burns.** 1996. Analysis of the proteins encoded by the *ptx* and *ptl* genes of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Infect. Immun.* **64**: 4020-4026.
182. **He, Q., J. Mertsola, J. P. Himanen, O. Ruuskanen, M. K. Viljanen.** 1993. Evaluation of pooled and individual components of *Bordetella pertussis* as antigens in an enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 690-695.
183. **He, Q., J. Mertsola.** 2008. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol.* **3**: 329-339.
184. **He, Q., K. Edelman, H. Arvilommi, J. Mertsola.** 1996. Protective role of Immunoglobulin G antibodies to Filamentous Hemagglutinin and Pertactin of *Bordetella pertussis* in *Bordetella parapertussis* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.* **15**: 793-798.
185. **He, Q., M. K. Viljanen, H. Arvilommi, B. Alttanen, J. Mertsola.** 1998. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA.* **280**: 635-637.
186. **Heininger, U.** 2001. Recent progress in clinical and basic Pertussis research. *Eur. J. Pediatr.* **160**: 203-213.
187. **Heininger, U., G. Schmidt-Schläpfer, J. D. Cherry, K. Stehr.** 2000. Clinical validation of a Polymerase Chain reaction assay for the diagnosis of Pertussis by comparison with serology, culture, and symptoms during a large pertussis vaccine efficacy trial. *Pediatrics.* **105**: 31-36.
188. **Heininger, U., K. Klich, K. Stehr, J. D. Cherry.** 1997. Clinical findings in *Bordetella pertussis* infections: results of a prospective multicenter surveillance study. *Pediatrics.* **100**.
189. **Hellwig, S. M. M., A. B. van Sriel, J. F. P. Schellekens, F. R. Mooi, J. G. J. van de Winkel.** 2001. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infect. Immun.* **69**: 4846-4850.

190. **Henegariu, O., N. A. Heerema, S. R. Dlouby, G. H. Vance, P. H. Vogt.** 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. **23**: 504-511.
191. **Herwegh, S., C. Carnoy, F. Wallet, C. Loiez, R. J. Courcol.** 2005. Development and use of an internal positive control for detection of *Bordetella pertussis* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2462-2464.
192. **Hethcote, H. W.** 1997. An age-structure model for pertussis transmission. *Math. Biosci.* **145**: 89-136.
193. **Hethcote, H. W.** 1999. Simulations of pertussis epidemiology in the United States: effects of adult booster vaccinations. *Math. Biosci.* **158**: 47-73.
194. **Hethcote, H. W., Y. Li, Z. Jing.** 1999. Hopf bifurcation in models for pertussis epidemiology. *Math. Comput. Model.* **30**: 29-45.
195. **Hewlett, E. L.** 1999. A commentary on the pathogenesis of pertussis. *Clin. Infect. Dis.* **28S2**: 94-98.
196. **Hewlett, E. L., K. M. Edwards.** 2005. Pertussis – not just for kids. *N. Engl. J. Med.* **352**: 1215-1222.
197. **Hishikawa, H., Y. Isayama, K. Ohmae.** 1988. Decrease in antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* caused by antigenic modulation and phase variation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1891-1892.
198. **Honoré-Bouakline, S., J. P. Vincensini, V. Giacuzzo, P. H. Lagrange, J. L. Herrmann.** 2003. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2323-2329.
199. **Hoppe, J. E.** 1999. Update on respiratory infections caused by *Bordetella parapertussis*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**: 375-381.
200. **Hoppe, J. E., A. Bryskier.** 1998. In vitro susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to two Ketolides (HMR 3004 and HMR 3647), for Macrolides (Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin A, and Roxithromycin), and two Ansamycins (Rifampin and Rifapentine). *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 965-966.
201. **Hoppe, J. E., E. Rahimi-Galougahi, G. Seibert.** 1996. In vitro susceptibility of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to four fluoroquinolones, Cefpirome, and Meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 807-808.
202. **Hoppe, J. E., M. Schlagenhauf.** 1989. Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of *Bordetella pertussis* on charcoal agar. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2115-2117.
203. **Hoppe, J. E., T. Paulus.** 1998. Comparison of three media for agar dilution susceptibility testing of *Bordetella pertussis* using six antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**: 391-393.
204. **Hoppe, J. E., Vogl, R.** Comparison of three media for culture of *Bordetella pertussis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **5**: 361-363.
205. **Hoppe, J., A. Dalhoff, D. Pfründer.** 1998. In vitro susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to BAY 12-8039, Trovafloxacin, and Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1868.

206. **Hoppe, J., C. Simon.** 1990. In vitro susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to seven fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2287-2288.
207. **Hoppe, J., J. Müller.** 1990. In vitro susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to six new oral cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 1442-1443.
208. **Hoppe, J., T. Tschirner.** 1995. Comparison of media for agar dilution susceptibility testing of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 775-779.
209. **Hoppe, J. E., Haug, A.** 1988. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella pertussis* (Part I). *Infection* **16**: 54/126-58/130.
210. **Hoppe, J. E., Haug, A.** 1988. Treatment and prevention of Pertussis by antimicrobial agents. *Infection (Part II)*. **16**: 12/148-16/152.
211. **Horcajada Herrera, I., M. Hernández Febles, R. González Jorge, E. Colino Gil, A. Bordes Benítez, M. J. Pena López.** 2008. Estudio clínico-epidemiológico de la infección por *Bordetella pertussis* en la isla de Gran Canaria en el período 2003-2007. *An. Pediatr. (Barc)*. **69**: 200-204.
212. **Houard, S., C. Hackel, A. Herzog, A. Bollen.** 1989. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the Polymerase Chain Reaction. *Res. Microbiol.* **140**: 477-478.
213. **Hozbor, D., F. Fouque, N. Guiso.** 1999. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* **150**: 333-341.
214. **Hozbor, D., M. Regueira, S. Fossatti, G. Weltman.** 2005. Diagnóstico de *Bordetella pertussis*-Manual de procedimientos. Ministerio de Salud y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Universidad Nacional de La Plata.
215. **Irie, Y., M. H. Yuk.** 2007. In vivo colonization profile study of *Bordetella bronchiseptica* in the nasal cavity. *FEMS Microbiol. Lett.* Doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00852.x.
216. **Janda, W. M., E. Santos, J. Stevens, D. Celig, L. Terrile, P. C. Schreckenberger.** 1994. Unexpected isolation of *Bordetella pertussis* from a blood culture. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2851-2853.
217. **Jefferson, T., M. Rudin, C. DiPietrantonj.** 2003. Systematic review of the effects of pertussis vaccination in children. *Vaccine*. **21**: 2003-2014.
218. **Jensen, J. S., M. B. Borre, B. Dohn.** 2003. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16 rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 261-266.
219. **Kadlec, K., C. Kehrenberg, J. Wallmann, S. Schwarz.** 2004. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from porcine respiratory tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 4903-4906.
220. **Kamachi, K., H. Toyohizumi-Ajisaka, K. Toda, S. C. Soeung, S. Sarta, Y. Nareth, Y. Horiuchi, K. Kojima, M. Takahashi, Y. Arakawa.** 2006. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1899-1902.

221. **Kamachi, K., Y. Arakawa.** 2007. Development of safer pertussis DNA vaccine expressing non toxic C180 polypeptide of pertussis toxin S1 subunit. *Vaccine*. **25**: 1000-1006.
222. **Karch, H., A. Schwarzkopf, H. Schmidt.** 1995. Amplification methods in diagnostic bacteriology (selected examples). *J. Microbiol. Methods*. **23**: 55-73.
223. **Katzko, G., M. Hofmeister, D. Church.** 1996. Extended incubation of culture plates improves recovery of *Bordetella* spp. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1563-1564.
224. **Keitel, W. A.** 1999. Cellular and acellular vaccines in adults. 1999. *Clin. Infect. Dis.* **28S2**: 118-123.
225. **Kerr, J. R., R. C. Matthews.** 2000. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 77-88.
226. **Khelef, N., B. Danve, M. J. Quentin-Millet, N. Guiso.** 1993. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species. *Infect. Immun.* **61**: 486-490.
227. **King, A. J., G. Berbers, H. F. L. M. van Oirschot, P. Hoogerhout, K. Knipping, F. R. Mooi.** 2001. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiol.* **147**: 2885-2895.
228. **King, A. J., T. van Gorkom, J. L. Pennings, H. G. J. van der Heide, Q. He, D. Diavatopoulos, K. Heuvelman, M. van Gent, K. van Leeuwen, F. R. Mooi.** 2008. Comparative genomic profiling of Dutch clinical *Bordetella pertussis* isolates using DNA microarrays: identification of genes absent from epidemic strains. *BMC Genomics.* **9**: 311.
229. **Kirimanjeswara, G. S., P. B. Mann, E. T. Harvill.** 2003. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections. *Infect. Immun.* **71**: 1719-1724.
230. **Knorr, L., J. D. Fox, P. A. G. Tilley, J. Ahmed-Bentley.** 2006. Evaluation of real-time PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis*. *BMC Infect. Dis.* **6**: 62.
231. **Knuf, M., H. J. Schmitt, L. Schuerman, J. M. Jacquet, D. Kjennger, C. A. Segrist, F. Zepp.** 2008. Neonatal vaccination with an acellular pertussis vaccine accelerates the acquisition of pertussis antibodies in infants. *J. Pediatr.* **152**: 655-660.
232. **Kodama, A., K. Kamachi, Y. Horiuchi, T. Konda, Y. Arakawa.** 2004. Antigenic divergence suggested by correlation between antigenic variation and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5453-5457.
233. **Kohberger, R. C., D. Jemiolo, F. Noriega.** 2008. Prediction of pertussis vaccine efficacy using a correlates of protection model. *Vaccine.* **26**: 3516-3521.
234. **Koidl, C., M. Bozic, A. Burmeister, M. Hess, E. Marth, H. H. Kessler.** 2007. Detection and differentiation of *Bordetella* spp by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 347-350.
235. **Koidl, C., M. Bozic, J. Berg, M. Stöcher, G. Mulhauer, E. Marth, H. H. Kessler.** 2005. Addition of a homologous internal control to a real-time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis*. *Clin. Chem.* **51**: 2404-2406.



236. **Korgenski, E. K., J. A. Daly.** 1997. Surveillance and detection of Erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the Intermountain West Region of the United States. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2989-2991.
237. **Korobeinikov, A., P. K. Maini, W. J. Walker.** 2003. Estimation of effective vaccination rate: pertussis in New Zealand as a case study. *J. Theor. Biol.* **224**: 269-275.
238. **Korppi, M., J. Hiltunen.** 2007. Pertussis is common in non vaccinated infants hospitalized for syncytial respiratory virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**: 316-318.
239. **Kösters, K., M. Riffelmann, C. H. Wirsing von König.** 2001. Evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* **50**: 436-440.
240. **Kösters, K., U. Reischl, J. Schmetz, M. Riffelmann, C. H. Wirsing von König.** 2002. Real-time light cyclers PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1719-1722.
241. **Kourova, N., V. Caro, C. Weber, S. Thiberge, R. Chuprinina, G. Tseneva, N. Guiso.** 2003. Comparison of the *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates circulating in Saint Petersburg between 1998 and 2000 with Russian vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3706-3711.
242. **Kowalzik, F., A. Prata Barbosa, V. R. Fernandes, P. R. Carvalho, M. L. Avila-Agüero, D. Y. T. Goh, A. Goh, J. García de Miguel, F. Moraga, J. Roca, M. Campins, L. M. Huang, J. Quian, N. Riley, D. Beck, T. Verstraeten.** 2007. Prospective multinational study of pertussis infection in hospitalized infants and their household contacts. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**: 238-242.
243. **Kurzynski, T. A., D. M. Boehm, J. A. Rott-Petri, R. F. Schell, P. E. Allison.** 1988. Antimicrobial susceptibilities of *Bordetella* species isolated in a multicenter Pertussis surveillance project. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **32**: 137-140.
244. **Kurzynski, T. A., D. M. Boehm, J. A. Rott-Petri, R. F. Schell, P.E. Allison.** 1988. Comparison of modified Bordet-Gengou and modified Regan-Lowe media for the isolation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2661-2663.
245. **Ladant, D., A. Ullmann.** 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* **7**: 172-176.
246. **Lautrop, H.** 1971. Epidemics of parapertussis. 20 years' observations in Denmark. *Lancet.* **ii**: 1195-1197.
247. **Le, T., J. D. Cherry, S. J. Chang, M. D. Knoll, M. L. Lee, S. Barenkamp, D. Bernstein, R. Edelman, K. M. Edwards, D. Greenberg, W. Keitel, J. Treanor, J. I. Ward.** 2004. Immune responses and antibody decay after immunization of adolescents and adults with an acellular pertussis vaccine: the APERT study. *J. Infect. Dis.* **190**: 535-544.
248. **Ledermann D., W.** 2004. Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. *Rev. Chil. Infect.* **21**: 241-246.

249. **Lee, G. M., M. Riffelmann, C. H. Wirsing von König.** 2008. Cost-effectiveness of adult pertussis vaccination in Germany. *Vaccine*. **26**: 3673-3679.
250. **Lee, G. M., T. V. Murphy, Lett, S., M. M. Cortese, K. Kretsinger, S. Schauer, T. A. Lieu.** 2007. Cost effectiveness of pertussis vaccination in adults. *Am. J. Prev. Med.* **32**: 186-193.
251. **Leotta, G. A., I. Chinen, S. Epszteyn, E. Miliwebsky, I. C. Melamed, M. Motter, M. Ferrer, E. Marey, M. Rivas.** 2005. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev. Arg. Microbiol.* **37**: 1-10.
252. **Letowska, I., W. Hryniewicz.** 2004. Epidemiology and characterization of *Bordetella parapertussis* strains isolated between 1995 and 2002 in and around Warsaw, Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 499-501.
253. **Li, Z., D. L. Jansen, T. M. Finn, S. A. Halperin, A. Kasina, S. P. O'Connor, T. Aoyama, C. R. Manclark, M. J. Brennan.** 1994. Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 783-789.
254. **Liese, J. G., C. Renner, S. Stojanov, B. H. Belohradsky, and The Munich Vaccine Study group.** 2003. Clinical and epidemiological picture of *B. pertussis* and *B. parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccine. *Arch. Dis. Child.* **88**: 684-687.
255. **Lievano, F. A., M. A. Reynolds, A. L. Waring, J. Ackelsberg, K. M. Bisgard, G. N. Sanden, D. Guris, A. Golaz, D. J. Bopp, R. J. Limberger, P. F. Smith.** 2002. Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of pertussis. *J. Clin. Microbio.* **40**: 2801-2805.
256. **Lin, Y. C., S. M. Yao, J. J. Yan, Y. Y. Chen, M. J. Hsiao, C. Y. Chou, H. P. Su, H. S. Wu, S. Y. Li.** 2006. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Taiwán, 1993-2004: suggests one possible explanation for the outbreak of pertussis in 1997. *Microbes Infect.* **8**: 2082-2087.
257. **Lind-Brandberg, L., C. Welinder-Olsson, T. Lagergård, J. Taranger, B. Trollfors, G. Zackrisson.** 1998. Evaluation of PCR for the diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *J. Clin. Microbioal.* **36**: 679-683.
258. **Lingappa, J. R., W. Lawrence, S. West-Keefe, R. Gautom, B. T. Cookson.** 2002. Diagnosis of community acquired pertussis infection. Comparison of both culture and fluorescent-antibody assays with PCR detection using electrophoresis or dot blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2908-2912.
259. **Linnemann, C. C., J. Nasenbeny.** 1977. Pertussis in the adult. *Ann. Rev. Med.* **28**: 179-185.
260. **Locht, C., P. Bertin, F. D. Menozzi, G. Renaud.** 1993. The Filamentous Hemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol. Microbiol.* **9**: 653-660.
261. **Locht, C., R. Antoine, F. Jacob-Dubuisson.** 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 82-89.
262. **Loeffelholz, M. J., C. J. Thompson, K. S. Long, M. J. R. Gilchrist.** 2000. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 467.

263. **Lopes, R. F. F., J. P. Moreno Sena, J. M. Chies, J. L. Rodrigues.** 1999. Pit-Stop PCR: An approach to increase final product yield of multiplex PCR. *BioTechniques*. **26**: 638-639.
264. **Lorenzo-Pajuelo, B., J. L. Villanueva, J. Rodríguez-Cuesta, N. Vergara-Irigaray, M. Bernabeu-Wittel, A. Garcia-Curiel, G. Martinez de Tejada.** 2002. Cavitory pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual *Bordetella bronchiseptica* variant producing reduced amounts of pertactin and other major antigens. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3146-3154.
265. **Louie M., L. Louie, A. E. Simor.** 2000. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Can Med Assoc J.* **163**: 301-309.
266. **Mackey, J. E., S. Wojcik, R. Long, J. M. Callahan, W. D. Grant.** 2007. Predicting pertussis in a pediatric emergency department population. *Clin. Pediatr. (Phila).* **46**: 437-440.
267. **Mahon, B. P., M. T. Brady, K. H. G. Mills.** 2000. Protection against *Bordetella pertussis* in mice in the absence of detectable circulating antibody: implications for long-term immunity in children. *J. Infect. Dis.* **181**: 2087-2091.
268. **Maitra, A., A. Sherriff, M. Griffiths, J. Henderson.** 2004. Pertussis vaccination in infancy and asthma or allergy in later childhood: birth cohort study. *BMJ.* **328**: 925-926.
269. **Martin, M. E., C. L. Horton, A. L. Sheffner, J. D. Solomon.** 1968. Direct comparison of the N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide and the trisodium phosphate digestion methods for the culture of Mycobacteria. *Applied Microbiol.* **16**: 506-508.
270. **Mastrantonio, P., P. Stefanelli, M. Giuliano, Y. Herrera Rojas, M. Ciolfi degli Tai, A. Anemona, A. E. Tossi.** 1998. *Bordetella parapertussis* infection in children: Epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 999-1002.
271. **Mastrantonio, P., P. Stefanelli, M. Giuliano.** 1996. Polymerase chain for the detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal aspirates. *J. Med. Microbiol.* **44**: 261-266.
272. **Matthews, R. C., N. Golbang, W. M. Brück, D. Owen, A. Bailey, V. Weston, J. R. Kerr.** 1999. Semiquantitative Polymerase Chain reaction enzyme immunoassay for the diagnosis of pertussis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**: 748-750.
273. **Mattoo, S., J. D. Cherry.** 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 326-382.
274. **Mazengia, E., E. A. Silva, J. A. Peppe, R. Timperi, H. George.** 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**: 2330-2333.
275. **McDonough, E. A., C. P. Barrozo, K. L. Russell, D. Metzgar.** 2005. A multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamidophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens. *Mol. Cell. Probes.* **19**: 314-322.

276. **McGowan, K. L.** 2002. Diagnostic tests for pertussis. Culture vs. DFA vs. PCR. Clin. Microbiol. Newsletter. **24**: 143-149.
277. **Meade, B. D., A. Bollen.** 1994. Recommendations for the use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J. Med. Microbiol. **41**: 51-55.
278. **Melton, A. R., A. A. Weiss.** 1993. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. Infect. Immun. **61**: 807-815.
279. **Mertens, P. L. J. M., F. Stals, E. W. Steyerberg, J. H. Richardus.** 2007. Sensitivity and specificity of single IgA and IgG antibody concentrations for early diagnosis of pertussis in adults: an evaluation for outbreaks management in public health practice. BMC Infect. Dis. **7**: doi: 10.1186/1471-2334-7-53.
280. **Mertsola, J.** 1985. Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. Eur. J. Clin. Microbiol. **4**: 123-128.
281. **Michaels, R. H.** 1998. Pertussis: recent resurgence and advances in diagnostic techniques and control. Semin. Pediatr. Infect. Dis. **9**: 120-125.
282. **Mielcarek, N., A. S. Debie, D. Raze, J. Quatannens, J. Engle, W. E. Goldman, C. Locht.** 2006. Attenuated *Bordetella pertussis*: new live vaccine for intranasal immunisation. Vaccine. **24S2**: 54-55.
283. **Mills, K. H. G.** 2001. Immunity to *Bordetella pertussis*. Microbes Infect. **3**: 655-677.
284. **Montella, S., S. De Stefano, F. Sperli, F. Barbarano, F. Santamaría.** 2007. Increased risk of chronic suppurative lung disease after measles or pertussis in non-vaccinated children. Vaccine. **25**: 402-403.
285. **Mooi, F. R., H. Hallander, C. H. Wirsing von König, B. Hoet, N. Guiso.** 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **19**: 174-181.
286. **Mooi, F. R., H. van Oirschot, K. Heuvelman, H. G. J. van der Heide, W. Gastra, R. J. L. Willems.** 1998. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/Pertactin and Pertussis Toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Infect. Immun. **66**: 670-675.
287. **Mooi, F. R., I. H. M. van Loo, A. J. King.** 2001. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause of its reemergence?. Emerg. Infect. Dis. **7**: 526-528.
288. **Mooi, F. R., S. C. de Greeff.** 2007. The case for maternal vaccination against pertussis. Lancet Infect. Dis. **7**: 614-624.
289. **Morrill, W. E., J. M. Barbaree, B. S. Fields, G. N. Sanden, W.T. Martin.** 1988. Effects of transport temperature and medium on recovery of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs. J. Clin. Microbiol. **26**: 1814-1817.
290. **Mortensen, J. E., G. L. Rodgers.** 2000. In vitro activities of gemifloxacin and other antimicrobial agents against isolates of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. J. Antimicrob. Chemoter. **45S1**: 47-49.
291. **Moshal, K. L., R. L. Hodincka, K. L. Mc Gowan.** 1998. Concomitant viral and *Bordetella pertussis* infections in infants. Pediatr. Infect. Dis. J. **17**: 353-354.

292. **Müller, F. M. C., J. E. Hoppe, C. H. Wirsing von König.** 1997. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2435-2443.
293. **Muñoz, F. M.** 2006. Pertussis in infant, children, and adolescents: diagnosis, treatment, and prevention. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **17**: 14-19.
294. **Murdoch, D. R.** 2004. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *APMIS.* **112**: 713-727.
295. **Muydelmans, G., O. Soetens, M. Antoine, S. Bruisten, b. Vincart, F. Doucet-Populaire, N. K. Fry, P. Olcén, J. M. Scheftel, J. M. Senterre, A. Van der Zee, M. Riffelmann, D. Piérard, S. Lawers.** 2005. External Quality assesment for molecular detection of *Bordetella pertussis* in European laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 30-35.
296. **Muydelmans, G., D. Piérard, N. Hoebrekx, R. Advani, S. Van Amersfoorth, I. de Schutter, O. Soetens, L. Eeckhout, A. Malfroot, S. Lauwers.** 2004. Simple algorithm for identification of *Bordetella pertussis* pertactin gene variants. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1614-1619.
297. **Nakamura, A., T. Sakano, T. Nakayama, H. Shimoda, Y. Okada, R. Hanayama, K. Nomoto, T. Suto, Y. Kinoshita, T. Furue, H. Ono, T. Ohta.** 2008. Neonatal pertussis presenting as acute bronchiolitis: Direct detection of the *Bordetella pertussis* genome using loop-mediated isothermal amplification. *Eur. J. Pediatr.* Doi 10.1007/s00431-008-0744-8.
298. **Narkeviciute, I., E. Kavaliunaite, G. Bernatoniene, R. Eidukevicius.** 2005. Clinical presentation of pertussis in fully immunized children in Lithuania. *BMC Infect. Dis.* **5**: 40.
299. **Nelson, K. E., F. Gavitt, M. D. Batt, C. A. Kallick, K. T. Reddi, S. Levin.** 1975. The role of adenoviruses in the pertussis syndrome. *J. Pediatr.* **86**: 335-341.
300. **Ner, Z., L. A. Ross, M. V. Horn, T. G. Keens, E. F. MacLaughlin, V. A. Starnes, M. S. Woo.** 2003. *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr. Transplant.* **7**: 413-417.
301. **Njamkepo, E., F. Delisle, I. Hagege, G. Gerbaud, N. Guiso.** 2000. *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**: 131-136.
302. **Njamkepo, E., T. Cantinelli, G. Guigon, N. Guiso.** 2008. Genomic analysis and comparison of *Bordetella pertussis* isolates circulating in low and high vaccine coverage areas. *Microbes Infect.* **10**: 1582-1586.
303. **Ntezayabo, B., G. de Serres, B. Duval.** 2003. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**: 22-27.
304. **Nygren, M., E. Reizenstein, M. Ronaghi, J. Lundeberg.** 2000. Polymorphism in the pertussis toxin promoter region affecting the DNA-based diagnosis of *Bordetella* infection. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 55-60.
305. **O'Brien, J. A., J. J. Caro.** 2005. Hospitalization for pertussis: profiles and case costs by age. *BMC Infect. Dis.* **5**: 57-65.
306. **Orenstein, W. A.** 1999. Pertussis in adults: epidemiology, signs, symptoms, and implications for vaccination. *Clin. Infect. Dis.* **28S2**: 147-150.

307. **Parkhill, J., M. Sebahia, A. Preston, L. D. Murphy, N. Thomson, D. E. Harris, M. T. G. Holden, C. M. Churcher, S. D. Bentley, et al.** 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* **35**: 32-40.
308. **Pastore Celentano, L., M. Massari, D. Paramatti, S. Salmaso, A. E. Tozzi.** 2005. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: 761-765.
309. **Patriarca, P. A., R. J. Biellik, G. Sanden, D. G. Burstyn, P. D. Mitchell, P. R. Silverman, J. P. Davis, C. R. Manclark.** 1988. Sensitivity and specificity of clinical case definitions for pertussis. *AJPH.* **78**: 833-836.
310. **Peadon, E., C. Cooper.** 2007. Whooping cough: are health-care workers putting children at risk?. *J. Paediatr. Child Health.* **43**: 398-402.
311. **Peppler, M. S., S. Kuny, A. Nevesinjac, C. Rogers, Y. R. de Moissac, K. Knowles, M. Lorange, G. De Serres, J. Talbot.** 2003. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates from Québec and Alberta provinces of Canada from 1985 to 1994. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3344-3347.
312. **Pereira, A., A. Santo Pietro Pereira, C. A. Moreira-Filho, S. Y. Bando, D. V. Tambourgi.** 2005. Comparative analysis of a *Bordetella pertussis* patient isolated strain and classical strains used in the pertussis vaccine. *Vaccine.* **23**: 4353-4358.
313. **Pianciola, L., M. Mazzeo, D. Bottero, E. Zurita, D. Archuby, M. Almuzara, C. Vay, D. Hozbor.** 2008. *Bordetella parapertussis*: detección de un patógeno para el que no existe una estrategia específica de control, abstr. 186, p. 206. Libro de Resúmenes XIII Jornadas Argentinas de Microbiología, Rosario, Argentina.
314. **Piccolo III, C., L. Billings.** 2005. The effects of vaccinations in an immigrant model. *Math. Comput. Model.* **42**: 291-299.
315. **Pilorget, H., A. Montbrun, T. Attali, I. Tiran-Rajaofera, C. Bony, C. Brayer, S. Sampériz, J. L. Alessandri.** 2003. La coqueluche maligne du petit nourrisson. *Arch. Pédiatr.* **10**: 787-790.
316. **Plotkin, S.** 2005. Aims, scope and findings of the Global Pertussis Initiative. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S5-S6.
317. **Plotkin, S.** 2005. The Global pertussis Initiative. Process overview. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S7-S9.
318. **Postels-Multani, S., H. J. Schmitt, C. H. Wirsing von König, H. L. Bock, H. Bogaerts.** 1995. Symptoms and complications of pertussis in adults. *Infection.* **23**: 139-142.
319. **Preston, A.** 2005. *Bordetella pertussis*: the intersection of genomic and pathobiology. *JAMC.* **173**: 55-62.
320. **Preston, A., D. J. Maskell.** 2002. A new era of research into *Bordetella pertussis* pathogenesis. *J Infect.* **44**: 13-16.
321. **Preston, A., J. Parkhill, D. J. Maskell.** 2004. The Bordetellae: lessons from genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 379-390.
322. **Preston, N. W.** 2006. Diagnosis and prevention of pertussis. *Lancet.* **368**: 1769.
323. **Préziosi, M. P., M. E. Halloran.** 2003. Effects of pertussis vaccination on transmission: vaccine efficacy for infectiousness. *Vaccine.* **21**: 1853-1861.

324. **Probert, W. S., Ely, J., K. Schrader, J. Atwell, A. Nossoff, S. Kwan.** 2008. Identification and evaluation of new target sequences for specific detection of *Bordetella pertussis* by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 3228-3231.
325. **Purdy, K. W., J. W. Hay, M. F. Botteman, J. I. Ward.** 2004. Evaluation of strategies for use of acellular pertussis vaccine in adolescents and adults: a cost-benefit analysis. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 20-28.
326. **Qin, X., D. K. Turgeon, B. P. Ingersoll, P. W. Monsaas, C. J. Lemoine, T. Tsosie, L. O. Stapp, P. M. Abbe.** 2002. *Bordetella pertussis* PCR: simultaneous targeting of signature sequences. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43**: 269-275.
327. **Qin, X., E. Galanakis, E. T. Martin, J. A. Englund.** 2006. Multi-target Polymerase Chain Reaction for diagnosis of Pertussis and its clinical implications. *J. Clin. Microbiol.* Doi: 10.1128/JCM.02042-06.
328. **Ranganathan, S., R. Tasker, R. Booy, P. Habibi, S. Nadel, J. Britto.** 1999. Pertussis is increasing in unimmunised infants: is a change in policy needed?. *Arch. Dis. Child.* **80**: 297-299.
329. **Raymond, J., J. B. Armengaud, C. Cosnes-Lambe, M. Chalumeau, E. Bosdure, H. reglier-Poupet, M. J. El Hajje, J. L. Iñiguez, F. Moulin, C. Poyart, D. Gendrel.** 2007. Pertussis in young infants: apnoea and intra-familial infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 172-175.
330. **Redhead, K., J. Watkins, A. Barnard, K. H. Mills.** 1993. Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* **61**: 3190-3198.
331. **Regan, J., F. Lowe.** 1977. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J. Clin. Microbiol.* **6**: 303-309.
332. **Register, K. B., G. N. Sanden.** 2006. Prevalence and sequence variants of IS 481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of bordetella pertussis. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4577-4583.
333. **Reischl, U., N. Lehn, G. N. Sanden, M. K. Loeffelholz.** 2001. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1963-1966.
334. **Reizenstein, E., B. Johansson, L. Mardin, J. Abens, R. Möllby, H. O. Hallander.** 1993. Diagnostic evaluation of Polymerase Chain Reaction discriminative for *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica*. **17**: 185-191.
335. **Reizenstein, E., L. Lindberg, R. Mollby, H. O. Hallander.** 1996. Validation of a nested *Bordetella* PCR in pertussis vaccine trial. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 810-815.
336. **Riffelmann, M., C. H. Wirsing von König, V. Caro, N. Guiso for the Pertussis PCR Consensus Group.** 2005. Nucleic acid amplification test for diagnosis of *Bordetella* infections. **43**: 4925-4929.
337. **Riffelmann, M., J. Schmetz, S. Bock, C. H. Wirsing von König.** 2007. Preparation of *Bordetella pertussis* DNA from respiratory samples for real-time PCR by commercial kits. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Doi 10.1007/s10096-007-0403-4.
338. **Riva Posse, C. A., I. N. P. Micelli.** 2005. Evolución de la coqueluche en Argentina a finales del siglo XX. *Medicina (B Aires).* **65**: 7-16.

339. **Robbins, J. B.** 1999. Pertussis in adults: Introduction. *Clin. Infect. Dis.* **28S2**: 91-93.
340. **Romano, F. C. B. Quintana, M. L. de Daher, L. Bogni, P. Thomas, m. Moreschi, A. Pérez Maldonado, J. M. Maravilla, J. Teleches, M. Batistesa, G. Gallardo, P. Lamy, A. Gentile.** 2002. Brote de coqueluche en Esquel. *Arch. Arg. Pediatr.* **100**: 11-18.
341. **Rota, M. C., F. D'Ancona, M. Massari, D. Mandolini, A. Giammanco, P. Carbonari, S. Salmaso, M. L. Ciofi degli Atti, The Serological Study Group.** 2005. How increased pertussis vaccination coverage is changing the epidemiology of pertussis in Italy. *Vaccine.* **23**: 5299-5305.
342. **Rothstein, E., K. Edwards.** 2005. Health burden of pertussis in adolescents and adults. 2005. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S44-S47.
343. **Ruijs, G. J., T. W. Groenendijk, M. Biever.** 1991. Shelf life of prepared Bordet-Gengou and Regan-lowie agar plates for the isolation of *Bordetella pertussis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**: 974-978.
344. **Russell, F. M., J. M. Davis, M. J. Whipp, P. H. Janssen, P. B. Ward, J. R. Vyas, M. Starr, S. M. Sawyer, N. Curtis.** 2004. Severe *Bordetella holmesii* infection in a previously healthy adolescent confirmed by gene sequence analysis. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 129-130.
345. **Russi, M.** 2007. Pertussis vaccination of health care workers. *J. Occup. Environ. Med.* **49**: 700-702.
346. **Saemann-Ischenko, G., B. Tillmanns, K. Kösters, M. Riffelmann, C. H. Wirsing von König.** 2001. Stability of antibodies to *Bordetella* antigens in German adults. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 850-853.
347. **Salyers, A. A., D. D. Whitt.** 1994. Introduction to the Host-Parasite interaction, p. 3-15. *In Bacterial pathogenesis, a molecular approach.* ASM Press. Washington, DC.
348. **Salyers, A. A., D. D. Whitt.** 1994. Paradigms of Bacterium-Host interactions: Whooping cough (*Bordetella pertussis*), p. 157-168. *In Bacterial pathogenesis, a molecular approach.* ASM Press. Washington, DC.
349. **Sandora, T. J., C. A. Gidengil, G. M. Lee.** 2008. Pertussis vaccination for health care workers. *Clin. Microbiol Reviews.* **21**: 426-434.
350. **Sato, H., Y. Sato.** 1999. Experience with diphtheria toxoid- tetanus toxoid-acellular pertussis vaccine in Japan. *Clin. Infect. Dis.* **28S2**: 124-130.
351. **Schellekens, J., C. H. Wirsing von König, P. Gardner.** 2005. Pertussis source of infection and routes of transmission in the vaccination era. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S19-S24.
352. **Schläpfer, G., H. P. Senn, R. Berger, M. Just.** 1993. Use of the Polymerase Chain Reaction to detect *Bordetella pertussis* in patients with mild or atypical symptoms of infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 459-463.
353. **Schneerson, R.** 1999. Similarities between the pathogenesis of and immunity to diphtheria and pertussis: the complex nature of serum antitoxin-induced immunity to these two diseases. *Clin. Infect. Dis.* **28S2**: 136-139.
354. **Schouls, L. M., H. G. J. van der Heide, L. Vauterin, P. Vauterin, F. R. Mooi.** 2004. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of



- Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. J. Bacteriol. **186**: 5496-5505.
355. **Scuffham, P. A., P. B. McIntyre.** 2004. Pertussis vaccination strategies for neonates-an exploratory cost-effectiveness analysis. Vaccine. **22**: 2953-2964.
356. **Senanayake, S.** 2007. Pertussis in Australia today. A disease of adolescents and adults that can kill infants. Aust. Fam. Physician. **36**: 51-55.
357. **Senzilet, L. D., S. A. Halperin, J. S. Spika, M. Alagaratnam, A. Morris, B. Smith, and the Sentinel Health Unit Surveillance System Pertussis Working Group.** 2001. Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. Clin. Infect. Dis. **32**: 1691-1697.
358. **Shah, S., M. Caprio, P. Mally, K. Hendricks-Munoz.** 2007. Rationale for the administration of the acellular pertussis vaccine to parents of infants in the neonatal intensive care unit. J. Perinatol. **27**: 1-3.
359. **Referencia eliminada.**
360. **Shaw, F. E.** (ed.). 2007. Outbreaks of respiratory illness mistakenly attributed to pertussis- New Hampshire, Massachusetts and Tennessee, 2004-2006. MMWR. **56**: 837-842.
361. **Sintchenko, V.** 2008. The re-emergence of pertussis: implications for diagnosis and surveillance. NSW Public Health Bulletin. **19**: 143-145.
362. **Sloan, L. M., M. K. Hopkins, P. Shawn Mitchell, E. A. Vetter, J. E. Rosenblatt, W. Scott Harmsen, F. R. Cockerill, R. Patel.** 2002. Multiplex lightcycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. J. Clin. Microbiol. **40**: 96-100.
363. **Smith, A. M., C. A. Guzmán, M. J. Walker.** 2001. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. FEMS Microbiol. Rev. **25**: 309-333.
364. **Smith, C., H. Vyas.** 2000. Early infantile pertussis; increasingly prevalent and potentially fatal. Eur. J. Pediatr. **159**: 898-900.
365. **Somerville, R. L., C. C. Grant, K. Grimwood, D. Murdoch, D. Graham, P. Jackson, M. Meates-Dennis, R. Nicholson, D. Purvis.** Infants hospitalised with pertussis: estimating the true disease burden. J. Pediatr. Child Health. **43**: 617-622.
366. **Sotir, M. J., D. L. Cappozzo, D. M. Warshauer, C. E. Schmidt, T. A. Monson, J. L. Berg, J. A. Zastrow, G. W. Gabor, J. P. Davis.** 2007. Evaluation of Polymerase Chain Reaction and culture for diagnosis of pertussis in the control of a County-wide outbreak focused among adolescents and adults. CID. **44**: 1216-1219.
367. **Spears, P. A., L. M. Temple, D. M. Miyamoto, D. J. Maskell, P. E. Orndorff.** 2003. Unexpected similarities between *Bordetella avium* and other pathogenic *Bordetellae*. Infect. Immun. **71**: 2591-2597.
368. **Srinivasan, R., T. H. Yeo.** 2005. Are newer macrolides effective in eradicating carriage of Pertussis?. Arch. Dis. Child. **90**: 322-324.
369. **Stojanov, S., J. Liese, B. H. Belohradsky.** 2000. Hospitalization and complication in children under 2 years of age with *Bordetella pertussis* infection. Infection. **28**: 106-110.

370. **Storsaeter, J., H. O. Hallander, L. Gustafsson, P. Olin.** 1998. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*. **16**: 1907-1916.
371. **Strebel, P., J. Nordin, K. Edwards, J. Hunt, J. Besser, S. Burns, G. Amundson, A. Baughman, W. Wattigney.** 2001. Population-based incidence of pertussis among adolescents and adults, Minnesota, 1995-1996. *J. Infect. Dis.* **183**: 1353-1359.
372. **T. E. C. Jr.** 1970. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics*. **46**: 522.
373. **Takayama, N., H. Watanabe, I. Fujita, M. Minamitami.** 1989. Seroepidemiology of pertussis in the Japanese population. *Med. Microbiol. Immunol.* **178**: 1-8.
374. **Tan, T.** 2005. Summary. Epidemiology of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S35-S38.
375. **Tan, T., E. Trindade, D. Skowronski.** 2005. Epidemiology of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S10-S18.
376. **Tan, T., S. Halperin, J. D. Cherry, K. Edwards, J. A. Englund, P. Glezen, D. Greenberg, E. Rothstein, D. Skowronski.** 2005. Pertussis immunization in the Global Pertussis Initiative North American Region. Recommended strategies and implementation considerations. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S83-S86.
377. **Tan, T., S. Plotkin.** 2005. Controlling pertussis. Considerations for the future. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S98.
378. **Tang Y. W., G. W. Procop, D. H. Persong.** 1997. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin. Chem.* **43**: 2021-2038.
379. **Taranger, J., B. Trollfors, T. Lagergard, V. Sundh, D. A. Bryla, R. Schneerson, J. B. Robbins.** 2000. Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis. *J. Infect. Dis.* **181**: 1010-1013.
380. **Tatti, K. M., K. H. Wu, G. N. Sanden, P. Greer, J. Sumner, J. Guarner, c. D. Paddock, S. R. Zaki.** 2006. Molecular diagnosis of *Bordetella pertussis* infection by evaluation of formalin-fixed tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1074-1076.
381. **Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, A. van der Zee, B. M. W. Diederens, A. M. Kruijssen, H. Goossens, E. Kuijper, E. C. J. Claas.** 2003. Evaluation of real-time PCR for detection and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4121-4126.
382. **Tewari, T., T. Murphy, J. Moran.** 2005. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis. 2005 CDC guidelines. *MMWR*. **54**: 1-16.
383. **Tilley, P. A. G., M. V. Kanchana, I. Knight, J. Blondeau, N. Antonishyn, H. Deneer.** 2000. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, polymerase chain reaction and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **37**: 17-23.
384. **Tondella, M. L., et al.** 2008. International *Bordetella pertussis* assay standardization and harmonization meeting report. Centers for Disease

- Control and Prevention. Atlanta. Georgia. United States. 19-20 July 2007. Vaccine. doi: 10.1016./j.vaccine.2008.11.072.
385. **Toye B., R. W. Peeling, P. Jessamine, P. Claman, I. Gemmill.** 1996. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men and women by PCR assay. J. Clin. Microbiol. **34**:1396-1400.
386. **Tozzi, A. E., E. Pandolfi, L. Pastore Celentano, M. Massari, S. Salmaso, M. L. Ciofi degli Atti.** 2007. Comparison of pertussis surveillance systems in Europe. Vaccine. **25**: 291-297.
387. **Tozzi, A. E., L. Ravá, M. L. Ciofi degli Atti. S. Salmaso and the Progetto Pertosse Working Group.** 2003. Clinical presentation of pertussis in unvaccinated and vaccinated children in the first six years of life. Pediatrics. **112**: 1069-1075.
388. **Trullols, E., I. Ruisánchez, F. Xavier Rius.** 2004. Validation of analytical methods. Trends Analyt. Chem. **23**: 137-145.
389. **Tsang, R. S. W., M. L. Sill, I. E. Martin, F. Jamieson.** 2005. Genetic and antigenic analysis of *Bordetella pertussis* isolates recovered from clinical cases in Ontario, Canada, before and after the introduction of the acellular pertussis vaccine. Can. J. Microbiol. **51**: 887-892.
390. **Uhl, M. A., J. F. Miller.** 1995. *Bordetella pertussis* BvgAS virulence control system. In *Two-component signal transduction*. Edited by J. Hoch, T. Silhavy. Washington, DC. American Society for Microbiology. 333-349.
391. **Ulloa-Gutiérrez, R., M. Hernández de Meserville, M. L. Ávila-Agüero.** 2008. Bordetella pertussis en Latinoamérica: ¿estamos reconociendo el problema?. An. Pediatr. (Barc). **69**: 197-199.
392. **Ulloa-Gutiérrez, R., M. L. Ávila-Agüero.** 2008. Pertussis in Latin America: current situation and future vaccination challenges. Expert Rev. Vaccines. **7**: 1569-1580.
393. **Valencia, M. E., A. Enríquez, N. Camino, V. Moreno.** 2004. Neumonía por *Bordetella bronchiseptica* en pacientes con el VIH. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **22**: 502-504.
394. **van Amersfoort, S. C. M., L. M. Schouls, H. G. J. van der Heide, A. Advani, H. O. Hallander, K. Bondeson, C. H. W. von König, M. Riffelmann, C. Vahrenholz, N. Guiso, V. Caro, E. Njamkepo, Q. He, J. Mertsola, F. R. Mooi.** 2005. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. J. Clin. Microbiol. **43**: 2837-2843.
395. **van Boven, M., F. R. Mooi, J. F. P. Schellekens, H. E. de Melker, M. Kretzschmar.** 2005. Pathogen adaptation under imperfect vaccination: implications for pertussis. Proc. R. Soc. B. **272**: 1617-1624.
396. **van Boven, M., H. E. de Melker, J. F. P. Schellekens, M. Kretzschmar.** 2001. A model based evaluation of the 1996-7 pertussis epidemic in the Netherlands. Epidemiol. Infect. **127**: 73-85.
397. **van Boven, M., H. E. de Melker, J. F. P. Schellekens, M. Kretzschmar.** 2000. Waning immunity and sub-clinical infection in an epidemic model. Implications for pertussis in The Netherlands. Math. Biosci. **164**: 161-182.
398. **van Boven, M., N. M. Ferguson, A. van Rie.** 2004. Unveiling the burden of pertussis. Trends Microbiol. **12**:116-119.

399. **Van der Berg, B. M., H. Beekhuizen, R. J. L. Willems, F. R. Mooi, R. van Furth.** 1999. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tracts. *Infect. Immun.* **67**: 1056-1062.
400. **van der Zee, A., C. Agterberg, M. Peeters, J. Schellekens, F. R. Mooi.** 1993. Polymerase Chain Reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2134-2140.
401. **van der Zee, A., F. Mooi, J. van Embden, J. Musser.** 1997. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J. Bacteriol.* **179**: 6609-6617.
402. **van Gent, M., D. Pierard, S. Lauwers, H. G. J. van der Heide, A. J. King, F. R. Mooi.** 2007. Characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates that do not express the tracheal colonization factor. *FEMS Microbiol.* **51**: 149-154.
403. **van Kruijssen, A. M., K. E. Templeton, R. N. van der Plas, H. R. van Doorn, E. C. J. Claas, R. N. Sukhai, E. J. Kuijper.** 2006. Detection of respiratory pathogens by real-time PCR in children with clinical suspicion of pertussis. *Eur. J. Pediatr.* Doi 10.1007/s00431-006-0378-7.
404. **van Loo, I. H. M., F. R. Mooi.** 2002. Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. *Microbiol.* **148**: 2011-2018.
405. **van Loo, I. H., K. J. Heuvelman, a. J. King, F. R. Mooi.** 2002. Multilocus Sequence Typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1994-2001.
406. **van Rie, A., A. M. Wendelboe, J. A. Englund.** 2005. Role of maternal pertussis antibodies in infants. *Pediatr. Infect. Dis J.* **24**: S62-S65.
407. **Versteegh, F. G. A., G. J. Weverling, M. F. Peeters, B. Wilbrink, M. T. M. Veenstra-van Schie, J. M. van Leeuwen-gerritsen, E. A. N. M. Mooi-Kokenberg, J. F. P. Schellekens, J. J. Roord.** 2005. Community-acquired pathogens associated with prolonged coughing in children: a prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 801-807.
408. **Versteegh, F. G. A., J. F. P. Schellekens, A. F. Nagelkerke, J. J. Roord.** 2002. Laboratory confirmed reinfections with *Bordetella pertussis*. *Acta Paediatr.* **91**: 95-99.
409. **Vickers, D., A.G. Ross, R. C. Mainar-Jaime, C. Neudorf.** 2006. Whole-cell and acellular pertussis vaccination programs and rates of pertussis among infants and young children. *CMAJ.* **175**: 1213-1217.
410. **Vielemeyer, O., J. Y. Crouch, S. C. Edberg, J. G. Howe.** 2004. Identification of *Bordetella pertussis* in a critically ill Human Immunodeficiency Virus-infected patient by direct genotypical analysis of gram stained material and discrimination from *B. holmesii* by using a unique recA gene restriction enzyme site. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 847-849.
411. **Villuendas, M. C., A. I. López, B. Moles, M. J. Revillo.** 2004. Infección por *Bordetella* spp: 19 años de diagnóstico por cultivo. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**: 212-216.

412. **Vitek, C. R., F. B. Pascual, A. L. Baughman, T. V. Murphy.** 2003. Increase in deaths from pertussis among young infants in the United States in the 1990s. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**: 628-634.
413. **Wadowsky, R. M., R. H. Michaels, T. Libert, L. A. Kingsley, G. D. Ehrlich.** 1996. Multiplex PCR-based assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab specimens. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2645-2649.
414. **Referencia eliminada.**
415. **Walker, K. E., A. A. Weiss.** 1994. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect Immun.* **62**: 3817-3828.
416. **Wallet, F., T. Perez, S. Armand, B. Wallaert, R. J. Courcol.** 2002. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a cystic fibrosis patient: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2300-2301.
417. **Walsh, P. F., L. Kimmel, M. Feola, T. Tran, C. Lim, L. De Salvia, J. Pusavat, S. Michaelson, T. Nguyen, K. Emery, E. Mordechai, M. E. Adelson.** 2008. Prevalence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in infants presenting to the emergency department with bronchiolitis. *J. Emerg. Med.* doi: 10.1016/j.emermed.2008.04.048.
418. **Walsh, P. S., D. A. Metzger, R. Higuchi.** 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* **10**: 506-513.
419. **Ward, J. I., J. D. Cherry, S. J. Chang, S. Partridge, H. Lee, J. Treano, D. P. Greenberg, W. Keitel, S. Barenkamp, D. I. Bernstein, R. Edelman, K. Edwards.** 2005. Efficacy of an acellular pertussis vaccine among adolescents and adults. *N. Engl. J. Med.* **353**: 1555-1563.
420. **Watanabe, M., M. Nagai.** 2001. Reciprocal protective immunity against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection. *Infect Immun.* **69**: 6981-6986.
421. **Watanabe, M., M. Nagai.** 2003. Role of systemic and mucosal immune responses in reciprocal protection against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection. *Infect. Immun.* **71**: 733-738.
422. **Watanabe, M., M. Nagai.** 2004. Whooping cough due to *Bordetella parapertussis*: an unresolved problem. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2**: 447-454.
423. **Watanabe, M., Y. Haraguchi.** 1989. In vitro susceptibility of *Bordetella parapertussis* to various antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 968-969.
424. **Weisberg, S. S.** 2007. Pertussis. *Dis. Mon.* **53**: 488-494.
425. **Wendelboe, A. M., A. van Rie, S. Salmaso, J. A. Englund.** 2005. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S58-S61.
426. **Wendelboe, A. M., M. G. Hudgens, C. Poole, A. Van Rie.** 2007. Estimating the role of causal contact from the community in transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Emerg. Themes. Epidemiol.* 4:15. doi: 10.1186/1742-7622-4-15.

427. **Wendelboe, A., E. Njankepo, A. Bourillon, D. Floret, J. Gaudelus, M. Gerber, E. Grimprel, D. Greenberg, S. Halperin, J. Liese, F. Muñoz-Rivas, R. Teysou, N. Guiso, A. Van Rie.** 2007. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**: 293-299.
428. **Wirsing von König, C. H.** 2005. Use of antibiotics in the prevention and treatment of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S66-S68.
429. **Wirsing von König, C. H., H. Finger.** 1994. Role of Pertussis Toxin in causing symptoms of *Bordetella parapertussis* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 455-458.
430. **Wirsing von König, C. H., M. Campins-Martí, A. Finn, N. Guiso, J. Mertsola, J. Liese.** 2005. Pertussis immunization in the Global Pertussis Initiative European Region. Recommended strategies and implementation considerations. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: S87-S92.
431. **Wirsing von König, C. H., S. Halperin, M. Riffelmann, N. Guiso.** 2002. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect. Dis.* **2**: 744-750.
432. **Wolf, J., A. J. Daley.** 2007. Microbiological aspects of bacterial lower respiratory tract illness in children: atypical pathogens. *Paediatr. Respir. Rev.* doi: 10.1016/j.prrv.2007.07.004
433. **Wolfe, D. N., E. M. Goebel, O. N. Bjornstad, O. Restif, E. T. Harvill.** 2007. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity. *Infect. Immun.* **75**: 4972-4979.
434. **Wolfe, D. N., G. S. Kirimanjeswara, E. T. Harvill.** 2005. Clearance of *Bordetella parapertussis* from the lower respiratory tract requires humoral and cellular immunity. *Infect. Immun.* **73**: 6508-6513.
435. **Woolfrey, B. F., J. A. Moody.** 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 243-255.
436. **World Health Organization.** 2005. Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire. **4(80)**: 29-40.
437. **World Health Organization.** 2008. The global burden of disease: 2004 update.
438. **World Health Organization.** Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis*.
439. **Wylks, C. E., B. Ewald, C. Guest.** 2007. The epidemiology of pertussis in the Australian capital territory, 1999 to 2005 – epidemics of testing, disease or false positives?. *Commun. Dis. Intell.* **31**: 383-391.
440. **Yao, S. M., Y. C. Lin, C. Y. Chou, Y. Y. Chen, M. J. Hsiao, H. Y. Chen, J. J. Chan, H. P. Su, S. Y. Li.** 2005. Antigenic divergence of *Bordetella pertussis* in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5457-5461.
441. **Yih, W. K., E. A. Silva, J. Ida, N. Harrington, S. M. Lett, H. George.** 1999. *Bordetella holmesii*-like organism isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 441-443.
442. **Yih, W. K., S. M. Lett, F. N. des Vignes, K. M. Garrison, P. L. Sipe, C. D. Marchant.** 2000. The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *J. Infect. Dis.* **182**: 1409-1416.
443. **Zepp, F., P. Habermehl, M. Knuf, W. Mannhardt-Laakman, B. Howe, L. R. Friedland.** 2007. Immunogenicity of reduced antigen content tetanus-

diphtheria-acellular pertussis vaccine in adolescents as a sixth consecutive dose of acellular pertussis-containing vaccine. *Vaccine*. **25**: 5248-5252.