



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería de Calidad

**IMPLEMENTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PCR-tr PARA LA DETECCIÓN DE
Bordetella spp. EN MUESTRAS DE EXUDADO NASOFARÍNGEO NEGATIVAS A
VIRUS RESPIRATORIOS.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ingeniería de Calidad

Presenta:

Roxana Velázquez Lanuza

Dirigido por:

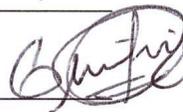
M. en IBB. José Carmen Gudiño Rosales.

SINODALES

M. en IBB. José Carmen Gudiño Rosales.
Presidente


Firma

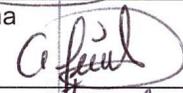
M.S.C. Guillermo Hiyane Nashiro.
Secretario


Firma

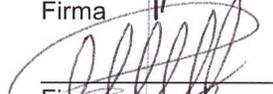
Dr. Juan Bosco Hernández Zaragoza.
Vocal


Firma

M.I.C. Priscilia Martínez López.
Suplente


Firma

M.I. Martha Patricia Magaña Murgía.
Suplente


Firma

Dr. Aurelio Domínguez González
Nombre y Firma
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.
Nombre y Firma
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Agosto 2015
México

RESUMEN

La *Bordetella pertussis* es la bacteria responsable de la tos ferina, enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio humano, cuya tasa de contagio es mayor a 90 % entre los individuos susceptibles, esta enfermedad también puede ser causada por otras especies de *Bordetella* (*parapertussis* y *holmesii*), aunque con mucho menor frecuencia. Tos ferina es una de las principales causas de mortalidad infantil siendo ésta una enfermedad prevenible por vacunación. Aunque la vacunación ha reducido ampliamente la morbilidad y la mortalidad, una reaparición de esta enfermedad ha sido experimentada en todo el mundo, en las últimas dos décadas. De aquí surge la necesidad de implementar métodos más oportunos para su diagnóstico. En el LESPEQ se realiza la búsqueda de *Bordetella pertussis* por el método de cultivo que tarda en emitir un resultado hasta 10 días, con el presente trabajo se validó e implementó la técnica de PCR-tr multiplex para dar un diagnóstico en un día y con mayor sensibilidad. Para implementar el método (con los primers y sondas IS481 y ptx1S), se buscó el modelo de la ecuación, el límite de detección, el límite de cuantificación y un estudio de R&R utilizando la vacuna Dipherix (4,800,000 UFC/ μ L de *Bordetella pertussis*). Una vez implementado el método de PCR-tr multiplex, se realizó una prueba de selectividad y se procesaron muestras procedentes de dos orígenes (con los primers IS481, ptx1S y además hIS1001, pIS1001 y RP): el primer grupo de muestras del departamento de Diagnostico Molecular, muestras nasofaríngeas que dieron resultado negativo o no a virus respiratorios (138 muestras), encontrando un 2.9 % de positividad a *Bordetella pertussis*. El otro grupo de muestras provenían del departamento de Microbiología Clínica, ya analizados por cultivo con resultado positivo o no a *Bordetella pertussis* (46 muestras de casos y 46 muestras de contactos) encontrando en los casos analizados un 47.8 % de positivos comparado con 19.56% positivos en cultivo, de igual forma ocurrió para los contactos 21.7% de positividad en PCR-tr multiplex para *Bordetella* vs 6.52% en cultivo.

Palabras clave: PCR, PCR-tr multiplex, *Bordetella pertussis*, R&R, Modelo de la ecuación, cultivo, Límite de detección y Límite de cuantificación.

SUMMARY

The *Bordetella pertussis* is the bacterium responsible for whooping cough, highly contagious disease of the human respiratory tract, the infection rate is higher than 90% among susceptible individuals, this disease can also be caused by other species of *Bordetella* (*parapertussis* and *holmesii*) although much less frequently. Pertussis is a major cause of infant mortality and this is a vaccine-preventable disease. Although vaccination has greatly reduced morbidity and mortality, unareaparición of this disease has been experienced worldwide in the last two decades. Hence the need for more appropriate methods for diagnóstico. En arises LESPEQ search for *Bordetella pertussis* by culture method it takes to issue a result up to 10 days, this work is done was validated and implemented the technique multiplex PCR-tr to give a diagnosis in a day and with greater sensitivity. To implement the method (with primers and probes IS481 and ptx1S), the model equation, the limit of detection, limit of quantification and a study of R & R using the Diperix vaccine (4,800,000 CFU / mL of *Bordetella pertussis*) was sought . Once implemented the method; PCR-tr multiplex, evidence of selectivity was performed and samples from two sources (with primers IS481, ptx1S and also hIS1001, pIS1001 and RP) were processed: the first group of samples of the Department of Diagnostic Molecular, nasopharyngeal samples had negative result or no respiratory viruses (138 samples), finding a 2.9% positive to *Bordetella pertussis*. The other group of samples were from the Department of Clinical Microbiology, and analyzed by cultivocon positive result or not a *Bordetella pertussis* (46 samples from cases and contacts 46 samples) found in the analyzed cases positive 47.8% compared with 19.56% culture positive , just as was the case for contacts 21.7% positivity in multiplex PCR-tr *Bordetella* vs 6.52% in culture.

Keywords: PCR, multiplex PCR-tr, *Bordetella pertussis*, R & R, model equation and culture.

DEDICATORIA

A Noel, Roxana, Georgina, Chelo y Chente.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al creador de todo el Universo por haberme creado a mí que soy tan insignificante ante todo lo que existe.

Infinitas gracias a mis padres: Heriberto Vicente Velázquez Almanza y Consuelo Lanuza Vera, gracias por ser mis padres, si volviera a nacer los aparto para ser nuevamente su hija.

Agradezco a las autoridades de la Secretaría de Salud por la oportunidad y facilidades para cursar esta maestría (CP Alejandro Tenonio Barrientos, Q.F.B. Mónica Pérez Luna, al M en I.B.B. José Carmen Gudiño Rosales).

Agradezco al Dr, Eusebio Jr. Ventura y al M.I.C. Eric Leonardo Huerta Manzanilla por las gestiones realizadas para crear el vinculo UAQ-SESEQ, a la Dra. Aurora Semat Díaz por su valioso apoyo. Gracias también a todos los maestros que nos compartieron sus conocimientos durante toda la maestría.

Un agradecimiento muy especial a mis maestros Sinodales y a mi Director por sus sabios consejos. Gracias a mis compañeras Q. F. B. Rosa Elena Carrión Jaimes y a la M en IC Priscilia Martínez López por su valioso apoyo, compañerismo y amistad.

Muchas gracias al Maestro Noel Corona Ramirez por ayudarme a estructurar la parte estadística desde un inicio del presente trabajo, eso fue de vital ayuda para saber como diseñar todo el proceso, Muchas muchas gracias, mi respeto y admiración a todos sus conocimientos y experiencia.

Infinitas gracias a toda mi familia por tolerar mis ausencias, Geo gracias por tus enseñanzas eres una niña muy inteligente. Rox gracias por hacerme un ser humano más consciente, a ambas gracias por todas las satisfacciones que me han brindado, estoy orgullosa de ser su mamá, A mi amor gracias por apoyarme en toooooo dooo, te amo.

ÍNDICE.

RESUMEN	I
SUMMARY	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS.	IV
ÍNDICE.	V
ÍNDICE DE CUADROS.	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.	X
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 BORDETELLA; CAUSAS Y DIAGNÓSTICO.	1
I.2 JUSTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.	3
I.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	8
II. REVISIÓN DE LITERATURA	10
II.1 TOS FERINA	10
II.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	26
II.3. FUNDAMENTOS ESTADÍSTICOS.	43
III.1 TEMAS GENERALES DE LA METODOLOGÍA.	57
III.2 VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO.	71

III.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.	82
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	97
IV.1. CURVA DE REGRESIÓN LINEAL	97
IV.2. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN.	104
IV.3. RESULTADOS DEL R&R.	106
IV.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	116
VI. CONCLUSIONES.	124
VII. RECOMENDACIONES	127
VII. DEFINICIONES Y GLOSARIO.	128
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	131

ÍNDICE DE CUADROS.

1. Distintos métodos diagnósticos de acuerdo con la fase de la enfermedad	16
2. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR a tiempo real.	36
3. Equipos para PCR en tiempo real.....	38
5. Cepas para la prueba de selectividad.....	58
6. Cepas para controles positivos de la PCR-tr multiplex.	58
7. Secuencias y sondas para PCR-tr multiplex.....	61
8. Algoritmo de PCR con 4 Targets o secuencias, para identificar tres especies de <i>Bordetella spp.</i>	62
9. Solución Madre de los primers y sondas.	64
10. Mezcla de primers y sondas.....	65
11. Mezcla de reaccion para IS481, hIS1001 y pIS1001.	66
12. MEZCLA DE REACCION PARA ptx1S.....	66
13. Mezcla de reaccion para IS481.....	66
14. Mezcla de reaccion para RP.	66

15. Colocación de los primers IS481 y ptxS1 en una placa para PCR de 96 pozos.....	73
16. Colocación de las extracciones de las diluciones en la placa de PCR.	74
17. Resultados de las lecturas de Ct para IS481.....	76
18. Resultados de las lecturas de CT para ptx1S.....	76
19. Resultados de las lecturas de Ct para el límite de detección del IS481.	78
20. Resultados de las lecturas de Ct para el límite de cuantificación del ptx1S.	79
21. Colocación de las extracciones de las diluciones en la placa de PCR.	79
22. Resultados de las lecturas de Ct para la prueba de R&R para el primer IS481.....	80
23. Resultados de las lecturas de Ct para la prueba de R&R para el primer ptx1S.....	81
24. Colocación de los primers IS481, hIS1001, pIS1001, ptxS1 y RP para el PCR-tr-multiplex, en una placa de 96 pozos para lectura de cepas para prueba de selectividad.	83
25. Colocación de las extracciones, de las las cepas para la prueba de selectividad, en la placa de PCR.	84
26. Colocación de los primers IS481, hIS1001, pIS1001, ptxS1 y RP para el PCR-TR MULTIPLEX en una placa de 96 pozos para lectura de muestras clínicas.	86

27. Colocación de las extracciones, de las cepas para la prueba de selectividad, en la placa de PCR.	87
28. Criterios de interpretación de PCR-tr multiplex para la identificación de Bordetella.	96
29. Resultados de las lecturas de Ct para IS481.	97
30. Resultados de las lecturas de CT para ptx1S.	100
31. Resultados de las lecturas de Ct para el límite de cuantificación del IS481.	104
32. Resultados de las lecturas de Ct para el límite de cuantificación del ptx1S.	104
33. Resultados de las lecturas de Ct para la prueba de R&R para el primer IS481.	106
34. Tabla ANOVA de dos factores con interacción para el primer IS481.	109
35. Estudio de R&R del sistema de medición para el primers IS481.	109
36. Resultados de las lecturas de Ct para la prueba de R&R para el primer ptx1S.	111
37. Tabla de ANOVA de dos factores con interacción para el primer ptx1S.	114
38. R&R del sistema de medición para el primer ptx1S.	114
39. Resultados de la prueba de selectividad.	117

ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Diagnósticos actuales más utilizados para detectar <i>Bordetella pertussis</i>	2
2. Historia natural de la infección y utilidad de las pruebas diagnósticas, de acuerdo a la fase en que se encuentra el cuadro clínico.....	4
3. Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública para el diagnóstico de tos ferina por cultivo.	5
4. Cobertura diagnóstica de la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública para el diagnóstico de tos ferina por PCRtr multiplex.	6
5. <i>Bordetella pertussis</i>	10
6. Pasos de la infección de <i>B. pertussis</i> en el hospedero.....	11
7. Representación del patógeno <i>B. pertussis</i> con sus factores de virulencia.	12
8. Crisis de tos paroxística.	14
9. Incidencia de tos ferina reportados (por 100 000 habitantes) por año y grupo de edad. Estados Unidos, 1999-2012.	22
10. Casos de <i>Bordetella pertussis</i> por año – Estados Unidos, 1922–2012.	22
11. Molécula de ADN.	27
12. Horquilla de replicación del ADN.....	29
13. La amplificación exponencial del ADN tras una serie de ciclos por PCR.	31

14. Mecanismos de las sondas de hidrólisis	37
15. Termociclador con su equipo de computo y software específico para PCR-tr.....	39
16. Gráfico de resultados emitidos por el termociclador para PCR-tr.....	41
17. Esquema de un proceso. Sobre los productos se miden las variables de salida.....	43
18. La variabilidad de un proceso.	44
19. Fuentes de variabilidad en las mediciones.	47
20. Presición y exactitud a través del tiro al blanco.	49
21. Precisión y exactitud a través de la curva normal.....	49
22. Resultados gráficos de un estudio R&R.....	52
23. Diagrama de flujo de la metodología.....	56
24. Extracción de ADN.....	67
25. Extracción manual en campana de bioseguridad clase II-A LABCONCO.	68
26. Robot para extracción automatizada de ADN	69
27. Diluciones de trabajo de la vacuna DIPERTIX.....	72
28. Area de ensamble.	73
29. Lectura del Ct con el Threshold o Umbral.....	75

30. Control Positivo a <i>Bordetella pertussis</i> (cepa)	88
31. Control Positivo a <i>Bordetella parapertussis</i> (cepa)	89
32. Control positivo a <i>Bordetella holmesii</i> (cepa)	90
33. Control Negativo.....	91
34. Muestra de paciente positiva a <i>Bordetella pertussis</i>	92
35. Muestra de paciente positiva a <i>Bordetella parapertussis</i>	93
36. Muestra de paciente positiva a <i>Bordetella holmesii</i>	94
37. Muestra de paciente negativa a las tres especies de <i>Bordetella</i>	95
38. Análisis estadístico de los datos para primer IS481.....	98
39. Modelo de Regresión lineal para el primer IS481.....	99
40. Analisis estadístico de los datos para primers ptxS1.....	101
41. Modelo de Regresión lineal para el primer ptx1S.....	102
42. Estudio de R&R para el primer IS481	108
43. Estudio de R&R para el primer ptx1S.....	113
44. Total de muestras procesadas por el método implementado.....	116
45. Comparativo del cultivo vs PCR del análisis de los casos.....	118
46. Presencia de <i>Bordetella pertussis</i> por edad (casos).....	119

47. Comparativo de PCR vs cultivo (contactos).....	120
48. Comparativo de Cultivo vs PCR-Tr multiplex de dos estudios.....	121
49. Resultado del análisis de muestras DIM.....	123

I. INTRODUCCIÓN

I.1 BORDETELLA; CAUSAS Y DIAGNÓSTICO.

La tos convulsa o pertussis o tos ferina es una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio humano, causada por varias especies de bacterias Gram-negativas del género *Bordetella*, con una tasa de contagio mayor a 90 % entre los individuos susceptibles. Las especies de *Bordetella* que han sido asociadas con esta enfermedad son: *B. pertussis* , *B. parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* y *B. holmesii* (Mooi, F. R.y Greeff, S. C. 2007).

De las cuatro especies, *B. pertussis* es la que ocasiona mayor morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Esta bacteria es un patógeno estrictamente humano del cual no se conocen reservorios animales o ambientales, transmitiéndose al inhalar microgotas provenientes del estornudo o tos de una persona infectada, su mecanismo de afectación al paciente es por medio de liberación de toxinas una vez instalada en las células ciliadas de la nasofaringe. Tos ferina es una de las principales causas de mortalidad infantil siendo ésta una enfermedad prevenible por vacunación (Mooi, F. R. y Greeff, S. C. 2007).

Aunque la vacunación contra la tos ferina ha reducido ampliamente la morbilidad y la mortalidad debido a la *Bordetella pertussis*, una reaparición de esta enfermedad ha sido experimentado en todo el mundo en las últimas dos décadas (Muñoz, F.M. 2006).

Concomitantemente con la reemergencia de la enfermedad en los últimos años se ha observado un notorio incremento del número de casos reportados en adolescentes y adultos, registrándose además manifestaciones clínicas atípicas, las cuales hacen evidente un creciente carácter persistente de la enfermedad (Loeffelholz, M. J., 2003).

Seguramente este cambio epidemiológico es un fenómeno multifactorial en que el índice de sospecha ha aumentado y las técnicas diagnósticas de laboratorio están más disponibles y son más solicitadas. Pero detrás de ello hay dos nuevos conocimientos fundamentales:

- Los adultos se reinfectan y vuelven a enfermarse rompiendo un antiguo dogma de que la enfermedad dejaba inmunidad para toda la vida.
- La inmunidad conferida por la vacuna tradicional es transitoria y se extingue tras 6 a 10 años de colocada (Birkebaek, N. H. y col., 1999).

Los métodos de diagnóstico más comunes para la detección de *B. pertussis* son: El cultivo, PCRtr y Serología (ELISA y aglutinación), los cuales se representan en la figura 1.

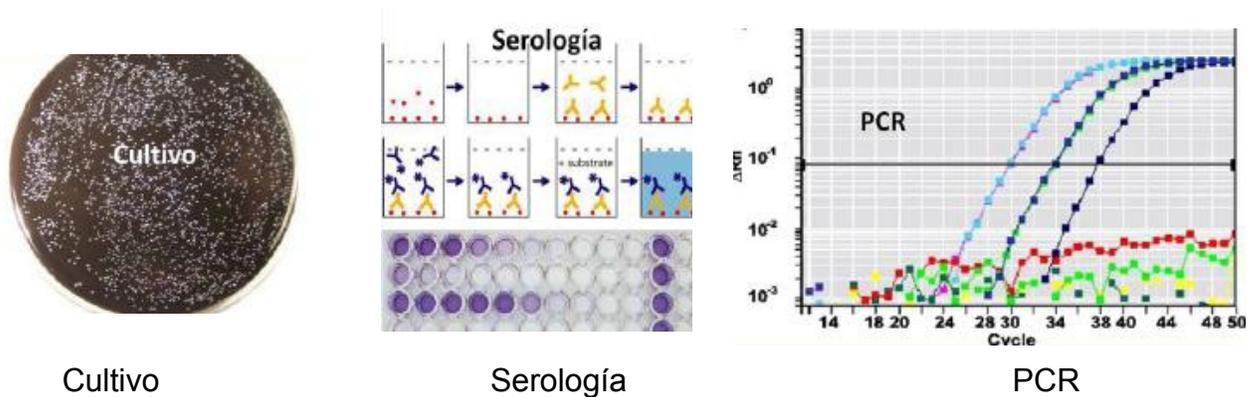


Figura 1. Diagnósticos actuales más utilizados para detectar *Bordetella pertussis*.

El cultivo se realiza en medios especiales como Bordet Gengou para identificar la bacteria por métodos microbiológicos. La Serología se realiza por métodos de Elisa principalmente y finalmente la PCR se lleva a cabo en un termociclador, obteniendo gráficas de amplificación como se muestra.

Fuente: InDRE, 2012

Es importante señalar que en este estudio utilizaremos el método de PCRtr (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real) ya que es el método diagnóstico más sensible y rápido pues nos da la oportunidad de entregar un resultado al paciente en un día contra 10 días que se podría tardar el cultivo en dar una respuesta.

I.2 JUSTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.

En México se realiza la vigilancia epidemiológica a través de la RNLSP (Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública en la República Mexicana) para el Diagnóstico de Tos ferina.

La Red para el diagnóstico de tos ferina está formada por 26 laboratorios, de los cuales el 83.8% realizan el cultivo para *Bordetella pertussis* y otras especies, sin embargo, es necesario que el 100% de los mismos participen en esta Red para fortalecer la vigilancia epidemiológica continua de la tos ferina a nivel Nacional (InDRE, 2014).

El Laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro, actualmente participa en la RNLESP para el diagnóstico de tos ferina por cultivo, y para optimizar esta vigilancia, es que queremos implementar y optimizar el diagnóstico por PCR-tr, para vigilar la salud de la población Queretana en relación a esta bacteria, lo cual es motivo del presente trabajo.

La PCRtr ofrece mayor posibilidad que el cultivo y la serología en la detección de infección en pacientes con sintomatología no definida o en los asintomáticos, incluyendo aquellos individuos previamente inmunizados, lo que permite definir con más claridad la epidemiología de la tos ferina (Bej, A. K. y col., 1991).

Además, la PCRtr multiplex permite detectar la infección por *B. pertussis* y otras especies, inclusive en aquellos individuos que ya tienen tratamiento antimicrobiano previo.

La toma de decisión para la elección del método diagnóstico y que está directamente relacionado con la histotia natural de la tos ferina, se justifica con la figura 2, ya que cada etapa de la enfermedad presenta diferentes indicadores.

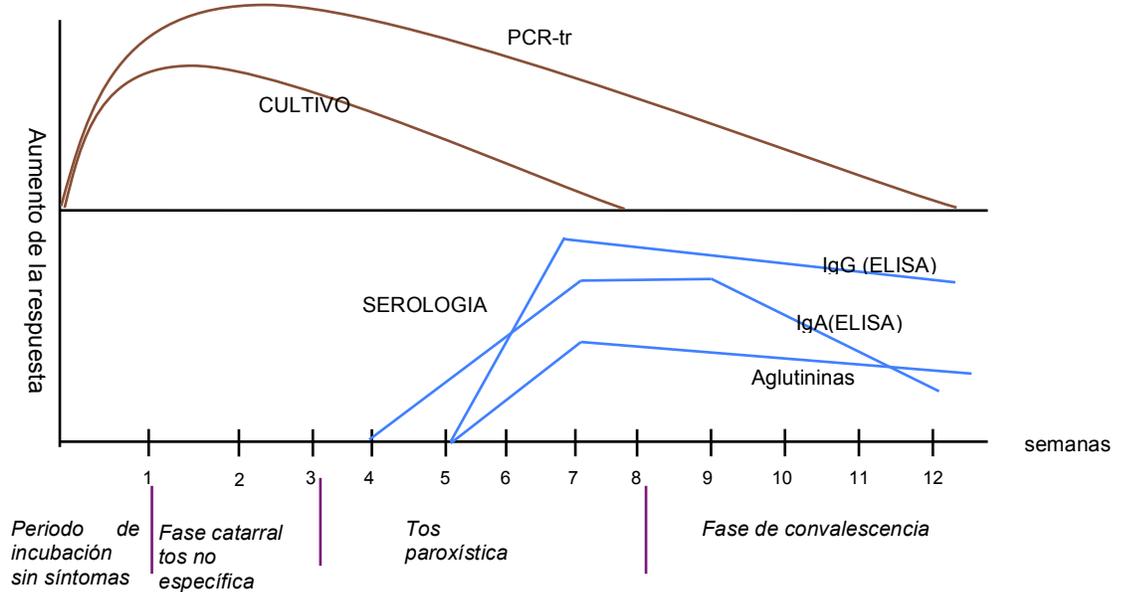


Figura 2. Historia natural de la infección y utilidad de las pruebas diagnósticas, de acuerdo a la fase en que se encuentra el cuadro clínico.

Podemos apreciar la importancia de la toma de decisión del diagnóstico a realizar directamente relacionado a la etapa de la enfermedad, para obtener un resultado positivo en cultivo, debemos tomar la muestra en las dos primeras fases y todavía en las 2 ó 3 semanas de la fase paroxística, mientras que serología detecta los anticuerpos hasta la fases paroxística y convalecencia. Por su parte, la PCR es el método que se puede realizar en todas las etapas de la enfermedad .

Fuente: Hoppe, J. E. 1995.

El cultivo es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el estándar de oro para la confirmación de casos por laboratorio. Sin embargo este método es poco sensible desde el punto de vista de recuperación del microorganismo que no va más allá del 60%. Se ha reportado que la mayor recuperación se da en infantes y niños no vacunados. El éxito del cultivo que es un diagnóstico más específico se basa en la oportunidad de la toma de la muestra, que debe ser dentro de la fase catarral o de las dos a tres primeras semanas de inicio de la tos (Cotter, P. y Miller, J. 2001) (Ver figura 2).

La técnica de PCRtr persiste positiva a pesar de usar antimicrobianos, hasta 89% tras 4 días y 56% a los 7 días de haber administrado éste. En una evaluación prospectiva se detectó PCR positiva en 21% de 34 pacientes aún tras 28 días o más de toser. Se ha destacado como la mejor herramienta para estudiar *B. pertussis* en adultos y ha permitido reconocer que el estado de portación transitoria de *B. pertussis* sí existe (Cotter, P. Y Miller, J. 2001).

La situación de vigilancia actual del Laboratorio Estatal del Estado de Querétaro con respecto a este diagnóstico se ilustra en las figuras 3 y 4 (InDRE, 2014).



Figura 3. Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública para el diagnóstico de tos ferina por cultivo.

No todos los estados de la República están integrados a la RNLSP y de los que si están integrados, algunos envían control de calidad para su evaluación y otros no como se muestra en la figura.

Fuente: InDRE, 2014.

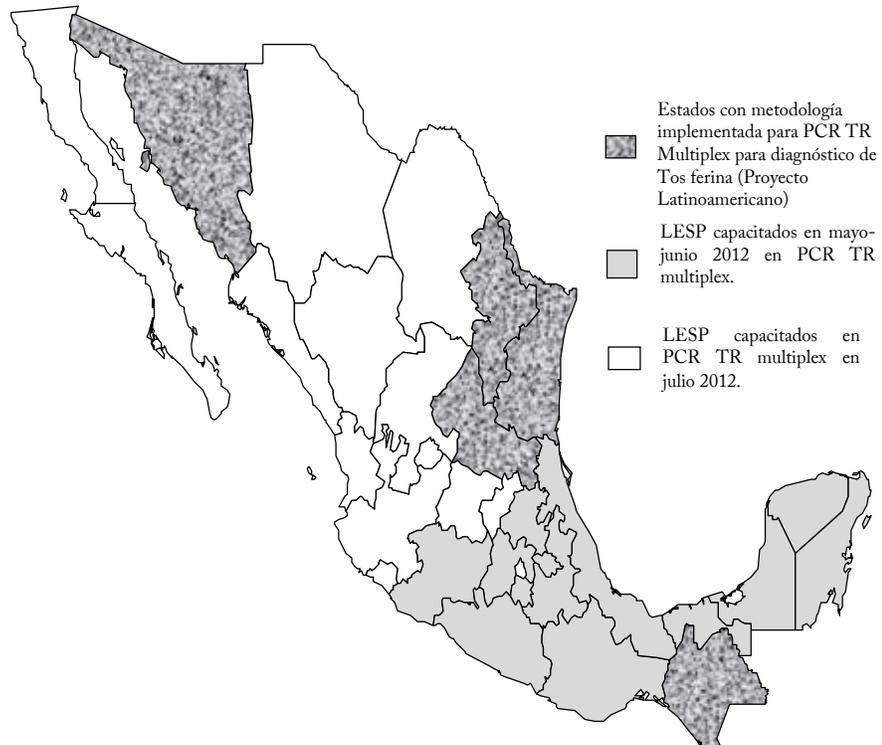


Figura 4. Cobertura diagnóstica de la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública para el diagnóstico de tos ferina por PCRtr multiplex.

Tan solo Nuevo León, Tamaulipas, Sonora, San Luis Potosí y Chiapas tienen la infraestructura y los insumos necesarios para llevar a cabo la PCR, Los demás estados que conforman la RNLSP ya han sido capacitados por el InDRE en esta metodología.

Fuente: InDRE, 2014

Como se puede apreciar en la figura 3, el Estado de Querétaro actualmente realiza cultivo y en la figura 4 se aprecia que no realizamos todavía la identificación de *Bordetella pertussis* por PCRtr. Con la implementación de este método se realizará esta prueba que ayudará al diagnóstico de Bordetella con resultados más oportunos para el tratamiento del paciente en el Estado de Querétaro.

En un estudio realizado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, se demostró que la amplificación de ADN de la *Bordetella spp* por PCRtr es más sensible que el cultivo bacteriano y ofrece resultados en menor tiempo

(InDRE, 2012). Por tal motivo en este estudio se pretende implementar la técnica de PCRtr y optimizar el diagnóstico de *B. pertussis* en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Querétaro.

Dicha implementación y Optimización consta de varias fases: Partir del método de PCRtr que dicta el InDRE y validarlo con las condiciones de nuestro Laboratorio, haciendo lo siguiente: una regresión lineal, un R&R, identificar el límite de detección y cuantificación de la prueba, aplicar el método con bacterias diferentes a *Bordetella spp* y que también son patógenos de las vías respiratorias, para ver su especificidad ó selectividad.

Finalmente, una vez implementada la técnica, leer muestras ya analizadas por el método de cultivo bacteriano para comparar el resultado con PCRtr y por otro lado analizar las muestras nasofaríngeas con resultado negativo o no a virus respiratorios para descartar la presencia de *Bordetella pertussis* como agente causal de estas IRAS (Infecciones Respiratorias Agudas).

De encontrarse la bacteria presente en estas muestras por el método de PCRtr se optimizará el tiempo de resultado a futuros pacientes; de 10 días (método actual por cultivo) a un día.

I.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

I.3.1. HIPÓTESIS:

Es posible encontrar *Bordetella pertussis* por PCR-tr multiplex, en muestras de exudados nasofaríngeos cuyo diagnóstico fue negativo a otros virus y en muestras cuyo diagnóstico está dirigido a la búsqueda de *Bordetella pertussis* por cultivo.

I.3.2. OBJETIVOS:

Objetivo General:

Implementar el método diagnóstico para *Bordetella spp* por la técnica de PCRtr multiplex en el Laboratorio Estatal de Salud Pública para dar un resultado oportuno y fortalecer la vigilancia epidemiológica en el Estado de Querétaro.

Objetivos específicos:

1.- Determinar el modelo de la ecuación de regresión lineal para este método de medición.

2.- Determinar el límite de detección y cuantificación del método utilizando la cepa pura de *Bordetella pertusis* (vacuna DIPERTIX) para identificar las condiciones más óptimas para llevar a cabo la PCRtr.

3.-Realizar un estudio de R&R (Repetibilidad y Reproducibilidad) para el método de medición.

4.-Validar la Especificidad analizando otro tipo de bacterias con el método de medición.

5.-Fortalecer la vigilancia epidemiológica en el estado, con la búsqueda de la presencia de *Bordetella pertussis* en muestras de exudados nasofaríngeos para complementar el diagnóstico que haya sido negativo a otros virus respiratorios.

6.-Analizar muestras con el método de PCRtr multiplex que han sido negativas o no a *Bordetella pertussis* por el método de cultivo para comparar ambos resultados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1 TOS FERINA

II.1.1. GÉNERO BORDETELLA.

La enfermedad fue descrita por primera vez por Baillou, durante una epidemia en París en 1578 y el año 1679, Sydenham denominó pertussis (per, intensa + tosis, tos) a esta enfermedad respiratoria que afectaba a lactantes y niños provocando en muchos casos la muerte (Cone, T. E. J., 1970).

Bordetella pertussis es un cocobacilo Gram negativo, (barra corta), inmóvil, es un aeróbio estricto, extremadamente pequeño con un tamaño promedio de 0.5 μm de diámetro por 2 μm de longitud, se pueden observar como bacterias aisladas o en pares (Murray, R. P., 2005). En la figura 5 podemos apreciar una imagen de los bacilos de la Bordetella.



Figura 5. Bordetella pertussis.

Escaneo de imagen en microscopio electrónico de la bacteria y ampliificada 5,000 veces. Se aprecia que es un pequeño bacilo.

Fuente: Colegio de Médicos de Filadelfia, 2015.

Las personas que tienen tos ferina por lo general transmiten la enfermedad cuando tosen o estornudan cerca de otras personas, quienes a su vez inhalan las bacterias que causan la enfermedad. Muchos de los bebés que contraen la tos ferina son infectados por sus hermanos mayores, padres o personas que los cuidan (que ya han perdido la inmunidad), quienes probablemente ni siquiera saben que padecen la enfermedad (Bisgard, K.M., 2004 y Wendelboe, A. M. 2007).

II.1.2. FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD.

La infección por *B. pertussis* inicia con la adherencia a las células epiteliales ciliadas del aparato respiratorio, produciendo un daño tisular localizado. *B. pertussis* se localiza únicamente en los cilios del epitelio que recubre nasofaringe, tráquea y bronquios (Molina, L. J., 2014). Como se observa en la figura 6.

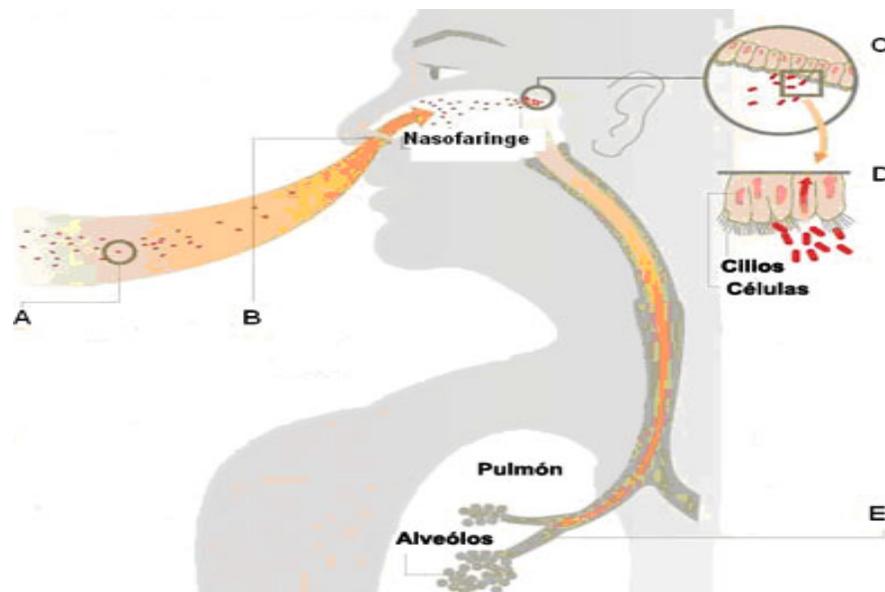


Figura 6. Pasos de la infección de *B. pertussis* en el hospedero.

A) Bordetella se propaga por medio de las gotitas de saliva. B) Ingresa al hospedero por las fosas nasales. C) Se adhiere a las células ciliadas de la nasofaringe. D) Se adhiere a los cilios de las células de la mucosa respiratoria y produce la toxina. E) Inician los síntomas de la enfermedad.

Fuente: Facultad de Medicina de la UNAM, 2014.

por vía aérea, es atrapada por el mucus y posteriormente los fragmentos de mucina que contienen bacterias son eliminados por las células ciliadas. La colonización del epitelio respiratorio persiste por varias semanas y está asociada con cilio-estasis y daño localizado en el epitelio y en el tejido subyacente mesenquimatoso. *Bordetella* actúa uniéndose preferentemente a las células ciliadas y multiplicándose en su superficie, produciendo finalmente la muerte de éstas, debido a la producción de sus compuestos tóxicos. Los efectos sistémicos son producidos por toxinas liberadas cuando la bacteria se multiplica en el tracto respiratorio. La unión de la toxina pertussis a neutrófilos polimorfonucleares (un tipo de leucocitos) desencadena en conjunto la estimulación de la fagocitosis de *Bordetella pertussis* y dentro de nuestras células desencadena otros mecanismos de ataque (Molina, L. J., 2014).

II.1.3. SINTOMATOLOGÍA.

El cuadro clínico asociado a esta enfermedad, puede manifestar variaciones dependiendo de diversos factores como el historial de vacunación, la etapa de la infección, la edad y/o las condiciones clínicas del paciente.

La tos ferina clásica se puede dividir en tres estadios según los signos y síntomas. Después del periodo de incubación que oscila de una a dos semanas, hay una fase denominada catarral de comienzo insidioso seguido de la fase paroxística y finalmente la fase de convalecencia. Estas tres etapas se describen brevemente a continuación (Molina, L. J., 2014):

- Catarral (Primera fase). Dura de una a dos semanas y en ese estadio los pacientes son más contagiosos. Los signos y síntomas son inespecíficos, por lo que es difícil diferenciarla de una infección leve del tracto respiratorio superior e incluso de un resfriado común. Debido a ello es poco frecuente el diagnóstico temprano y las manifestaciones más comunes comprenden rinorrea, estornudos, a veces fiebre leve y tos ocasional, que gradualmente se va volviendo severa.

- Paroxística (Segunda fase) que se observa en la figura 8. Tiene una duración de tres a seis semanas y los cultivos tomados durante este periodo por lo general son positivos. Los síntomas incluyen progresión de la tos, que es paroxística, emetizante y

cianozante (seguida de esfuerzo respiratorio prolongado y un sonido agudo característico). La tos suele ser provocada por esfuerzos mínimos, como comer, reír o cambiar de posición, y en los menores de 1 año puede acompañarse de dificultad respiratoria, cianosis y apnea.

- Convalecencia (Tercera fase). Puede durar de dos a tres semanas hasta varios meses. Las manifestaciones clínicas disminuyen de manera gradual y la tos va desapareciendo, aunque puede haber recurrencia de paroxismos leves e infecciones respiratorias repetitivas incluso meses después del episodio agudo de tos ferina. Se presentan otras infecciones bacterianas secundarias con frecuencia, como neumonía y otitis media, en especial en los menores de seis meses (Molina, L. J., 2014).



Figura 8. Crisis de tos paroxística.

En la fase paroxística de la enfermedad el paciente presenta fuertes episodios de tos que pueden ser tan graves que en ocasiones han causado convulsiones.

Fuente: CDC, 2012.

En los niños mayores, el pronóstico generalmente es muy bueno. Los bebés tienen el mayor riesgo de muerte y requieren un control cuidadoso. Pues se pueden presentar complicaciones como: Neumonía, convulsiones, Trastorno convulsivo (permanente), Hemorragia nasal, infección de oído, daño cerebral por falta de oxígeno,

sangrado en el cerebro (hemorragia cerebral), discapacidad intelectual, detención de la respiración o respiración lenta (apnea) y Muerte (Kaneshiro, K. N., 2014).

II.1.4. DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y RECOMENDACIONES.

El diagnóstico de la tos ferina se basa, en las manifestaciones clínicas. El mejor método diagnóstico es la identificación de *B. pertussis* en el cultivo de secreciones nasofaríngeas, que se obtienen mediante procedimientos de toma de exudado o por aspiración (Molina, L. J., 2014).

Resulta erróneo esperar los resultados del cultivo para establecer el diagnóstico de la enfermedad y con el diagnóstico clínico se deben instaurar las medidas terapéuticas convenientes. El cultivo se toma antes de administrar antibióticos y de preferencia al final del periodo catarral porque se torna negativo rápidamente. Por lo general, la sensibilidad de la prueba es mayor si se obtiene la secreción en la etapa catarral o al inicio de la paroxística. La probabilidad de aislar al microorganismo es menor si el paciente ha sido vacunado, si ha recibido antibióticos recientemente o si se obtienen las muestras de secreciones tres semanas después del comienzo de los síntomas (Molina, L. J., 2014).

Históricamente, el cultivo ha sido considerado como el método diagnóstico estándar de oro en los niños, sin embargo, la sensibilidad de las pruebas diagnósticas guarda relación con la fase de la enfermedad en la que el paciente se encuentra como ya se indicó con anterioridad.

Las pruebas serológicas son utilizadas para ver el nivel de anticuerpos después de la vacunación, en algunas ocasiones también se utiliza para confirmar un resultado que ha sido indeterminado o negativo por las otras técnicas, solo que para que tenga validez debemos tener una muestra de suero del paciente al inicio de la enfermedad y otra en la fase de convalecencia o paroxística, para realizar un comparativo del nivel de anticuerpos (Molina, L. J., 2014).

El diagnóstico molecular de la tosferina, método más actualmente utilizado, se fundamenta en la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es una técnica rápida, sensible y específica que ha sido de gran utilidad en el diagnóstico

de *B. pertussis* . Respecto a los sitios blancos en el DNA que se utilizan para la amplificación, las más utilizadas son: una secuencia de inserción altamente repetida IS 481; una secuencia de la región promotora de la toxina pertusis ptxSI; el gen de la adenilato ciclasa y parte del gen de la porina 2.

El médico debe conocer las limitaciones de las diferentes pruebas actualmente disponibles en relación con la fase de la enfermedad para escoger el mejor diagnóstico confirmatorio de infección por *B. pertussis* de acuerdo a la fase en que se encuentra el paciente como vemos en el cuadro 1, donde la alta oportunidad de positividad en el diagnóstico elegido, depende de la etapa de la enfermedad. (Tozzi, A. E. y col., 2005).

CUADRO 1. Distintos métodos diagnósticos de acuerdo con la fase de la enfermedad

Fuente: Tozzi, A. E. y col., 2005.

	FASE DE LA ENFERMEDAD		
	CATARRAL	PAROXISTICA	CONVALESCENCIA
CULTIVO	++	-/+	-
PCR	++	++	-
SEROLOGÍA	-/+	++	++

El tratamiento es con antibióticos, como eritromicina, y pueden hacer desaparecer los síntomas más rápidamente si se inician bien temprano. Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes reciben el diagnóstico demasiado tarde cuando los antibióticos no son muy efectivos. Sin embargo, los medicamentos pueden ayudar a reducir la capacidad del paciente para diseminar la enfermedad a otras personas. (Kaneshiro, K. N., 2014)

Desde el pasado la droga de elección para el tratamiento de pertussis ha sido la eritromicina, sin embargo su utilización fue asociada con una serie de efectos adversos entre los que se incluyen hipertrofia pilórica, estenosis en infantes y arritmias

cardíacas, aunque se sigue utilizando. Actualmente se recomienda la utilización de claritromicina y azitromicina. En niños mayores de dos meses de edad con alergia o intolerancia a los macrólidos se puede emplear trimetoprim-sulfametoxazol (Altunaiji, S., 2007).

Los bebés menores de 18 meses requieren constante supervisión, ya que la respiración puede detenerse temporalmente durante los ataques de tos. Los bebés con casos graves se deben hospitalizar. Se puede utilizar una tienda de oxígeno con bastante humedad. De igual manera, se pueden administrar líquidos por vía intravenosa si los ataques de tos son tan severos que impiden que el paciente beba lo suficiente. A los niños pequeños se les pueden recetar sedantes (medicamentos que le provocan sueño). Los jarabes para la tos, los expectorantes y los antitusígenos por lo general no sirven y no se deberían utilizar. (Kaneshiro, K. N., 2014).

II.1.5.EPIDEMIOLOGÍA.

La tos ferina es una enfermedad con morbimortalidad significativa, especialmente en el niño menor de un año, pues a esta edad, no tienen el esquema de vacunación completo. La *Bordetella pertussis* ocupa el quinto puesto en las causas de muerte prevenible por vacunas en menores de 5 años, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2007). A pesar de la amplia inmunización con la vacuna, aún se registran entre 20 y 40 millones de casos por año en todo el mundo (el 90% de estos en países en desarrollo) y se producen entre 200.000 y 300.000 muertes anuales (OMS, 2007).

En los bebés menores de 1 año de edad que contraen la tos ferina, alrededor de la mitad son hospitalizados. De aquellos niños que son hospitalizados con tos ferina, alrededor del 67% tendrá la apnea, el 23% va a contraer neumonía, y el 1,6% va a morir (CDC, 2014).

En los últimos años, hasta 1450 niños han sido hospitalizados debido a la tos ferina y de 10 a 20 mueren cada año en los Estados Unidos. La mayoría de las muertes por tos ferina son los bebés que son demasiado pequeños para ser protegidos por la vacuna contra la tos ferina de la infancia (DTaP) (CDC, 2014)

Los adolescentes y los adultos también pueden experimentar complicaciones de la tos ferina. Las complicaciones son generalmente menos graves en este grupo de edad, especialmente en aquellos que han sido vacunados. Las complicaciones más frecuentes en los adolescentes y adultos a menudo son causados por la tos en sí, incluyendo la incontinencia urinaria (28%), síncope (6%), y fracturas de costillas por el esfuerzo al toser (4%) (CDC, 2014).

El Laboratorio Estatal de Salud Pública está involucrado en la Vigilancia Epidemiológica en el Estado de acuerdo al siguiente Marco legal, que nos faculta como institución pública para dar apoyo a la prevención y control de las enfermedades: La Secretaría de Salud es el órgano normativo y rector del SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) y éste tiene como principal función impulsar el desarrollo adecuado de la Vigilancia Epidemiológica en el país, en conformidad con las disposiciones aplicables y conferidas en el Reglamento interior de la secretaría de salud, para llevar a cabo lo anterior, cuenta con diferentes subsistemas y uno de ellos es el Sistema Laboratorio en la Vigilancia Epidemiológica, estos Laboratorios conforman la RNLSP (Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública) y está estructurada en tres niveles: nacional (InDRE y CCAYAC), estatal (Laboratorios Estatales y Regionales de Salud Pública del Estado) y local (Laboratorios de centros de salud, hospitales y jurisdiccionales). La coordinación e interacción de los laboratorios del SINAVE debe ser en todos los niveles. Este marco jurídico legal se desprende del siguiente listado de documentos oficiales:

-Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. DOF 05/02/1917, Última Reforma D.O.F. 15/02/2012.

-Ley General de Salud. Artículo 3, XV; 59; 64, III; 133; 134, I; 136, 138, 139 y 141. DOF 7/02/1984, Última Reforma DOF 07/06/2012.

-Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica. DOF: 19/02/2013.

-Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo.

-Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. DOF: 23/06/2006.

-Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

-Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de enero de 2004, última reforma publicada DOF 10 de enero de 2011.

-Secretaría de Salud. Programa Sectorial de Salud 2013-2018. Diario Oficial de la Federación DOF: 12/12/2013.

-Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. Diario Oficial de la Federación, DOF: 20/05/2013, www.dof.gob.mx

-Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2013-2018. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, primera edición 2014.

-Lineamientos para programas de evaluación externa del desempeño de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, InDRE- Secretaría de Salud, México 2014.

-Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, InDRE-Secretaría de Salud, México 2014.

II.1.6. INCIDENCIA EN MÉXICO.

La Tos Ferina o Pertusis no es una enfermedad erradicada en América Latina, estadísticas oficiales como las de México muestran que en un periodo de 15 años el número de casos de esta enfermedad creció 372%. De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, de la Secretaría de Salud, la cifra de reportes

por Tos Ferina en México se elevó de 202 casos anuales, en 1997, a 752 casos confirmados en 2012 (Cruz, A. 2013).

En México, como producto de la aplicación de la vacuna anti-pertussis, la morbilidad de la tos ferina ha tenido una baja significativa, así en 1950 la tasa de morbilidad era de 130 por 100,000 habitantes, en 1980 disminuyó a menos de 10 por 100,000 habitantes, sin embargo a partir del año 2008 se ha presentado un notable incremento en el número de casos, 162 por 100,000, con una incidencia global de 0,15 por 100,000 habitantes (InDRE, 2012).

Entre 2002 y 2003 se realizó un estudio transversal para determinar la frecuencia de tos prolongada (>14 días) en 14 escuelas secundarias de la Ciudad de México, donde 12,273 adolescentes fueron evaluados. Se documentaron 62 casos de tos prolongada. Entre esos sujetos se documentaron 20 (32.8%) casos positivos para *B. pertussis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-tr). También fueron positivos 16 (10%) de 152 contactos escolares y 8 (27.6%) de 29 contactos familiares (Tomé, S. P., 2008).

Durante el año 2009 se confirmaron por laboratorio 185 casos (21%) de 879 estudiados y se estudiaron un total de 2060 contactos y en 76 (3.8%) se detectó la presencia de *Bordetella pertussis* . En 2010 se estudiaron un total de 722 casos de los cuales 46 (6.37%) fueron confirmados por el laboratorio como positivos, de ahí la importancia de la búsqueda de portadores que son los que favorecen la transmisión de esta enfermedad, a pesar de existir, la prevención a través de la vacunación (InDRE, 2012).

De acuerdo con los informes de la Dirección General de Epidemiología, en el reporte de casos confirmados en la República mexicana, los estados con mayor prevalencia fueron Sonora con 95 casos, Jalisco con 25 casos, Nuevo León con 20 y el Estado de México y Durango con 7 cada uno. En el grupo de edad de menores de un año se reportaron 103 casos (57%) y en el grupo de 1 a 4 años, 17 casos (9%) (DGE, 2009).

Los datos disponibles nos hacen suponer que el país presenta una situación similar a la que existe en otros países de América Latina (Ulloa, G. R. y col., 2008).

II.1.7. INCIDENCIA EN EL MUNDO.

La introducción de la vacunación extendida en el mundo causó en los años 40, una disminución marcada del número de casos y muertes debido a esta enfermedad, sin embargo, la incidencia de la misma ha ido aumentando durante los últimos 15 a 20 años a nivel mundial, especialmente en los preadolescentes, adolescentes y en menores de 5 meses de edad (CDC, 2014).

Estimaciones de la OMS revelaron que Latinoamérica fue responsable de aproximadamente el 7% de todos los casos de *B. pertussis* a nivel global en 2005 (OMS, 2007). A pesar de la importante carga de enfermedad observada en América Latina, existen escasas publicaciones recientes sobre tos ferina en el continente (Ulloa, R., 2008).

Estados Unidos está experimentando un resurgimiento de la tos ferina, lo podemos apreciar en las figuras 9 y 10. Desde el año 2010, vemos entre 10.000 y 50.000 casos de tos ferina cada año y los casos se presentan en todos los estados. En 2012, vimos la mayoría de los casos que habíamos visto en 60 años, había 48.277 casos notificados de tos ferina; 2.269 de esos casos fueron en niños menores de 3 meses de edad y 15 de esos niños murieron (CDC, 2014).

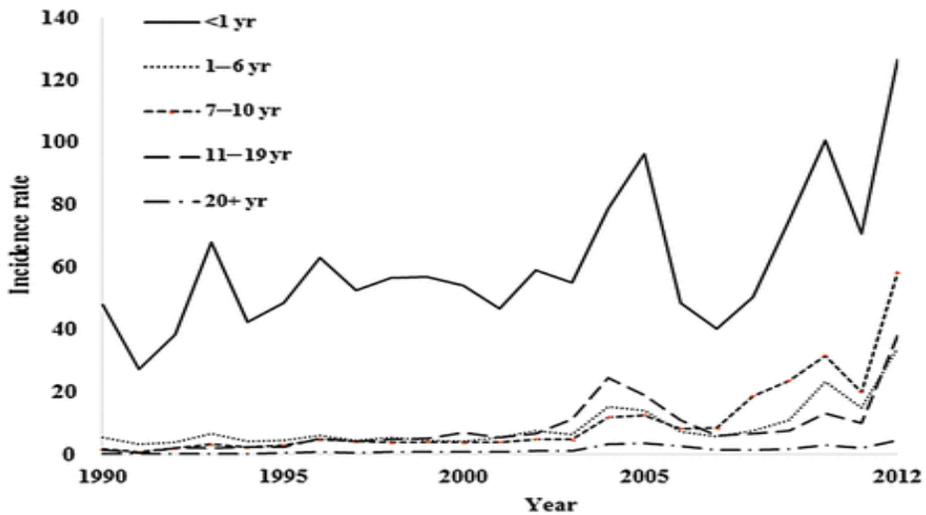


Figura 9. Incidencia de tos ferina reportados (por 100 000 habitantes) por año y grupo de edad. Estados Unidos, 1999-2012.

Podemos apreciar un pico considerable en el año 2005 y posteriormente un aumento a partir del año 2010.

FUENTE: CDC, 2014.

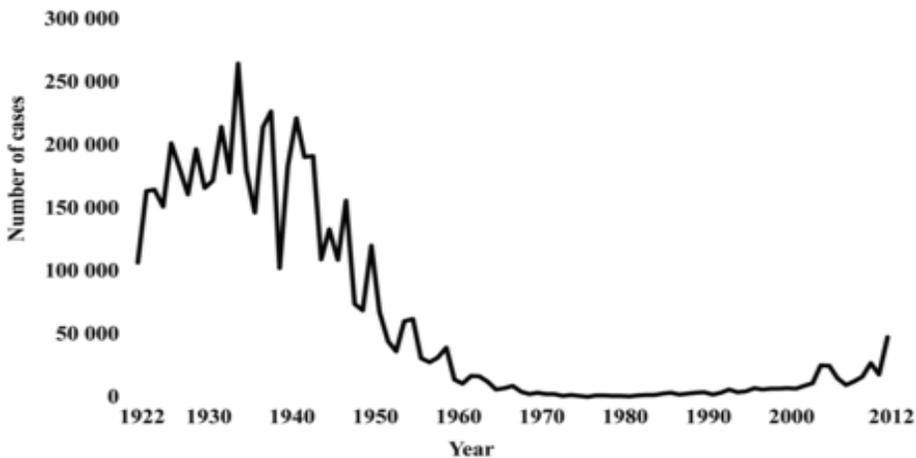


Figura 10. Casos de Bordetella pertussis por año – Estados Unidos, 1922–2012.

Antes de la introducción de la vacuna se aprecia una alta cantidad de casos, posteriormente se observa que la enfermedad está bajo control y hasta el año 2010 tenemos que se presentan casos a la alza.

FUENTE: CDC, 2014.

II. 1. 8. REEMERGENCIA.

Antes de la vacunación, la tos ferina era una enfermedad universal de la primera infancia. Actualmente a pesar del aparente control de la enfermedad en los Estados Unidos y otros países que se logró gracias a la vacunación, la tos ferina está resurgiendo. Aunque las vacunas acelulares han estado en uso durante 20 años, los nuevos datos están informando sobre su baja eficacia y poca durabilidad en la protección y la contribución de estas características, para el resurgimiento de la tos ferina (Clark, T. A., 2014).

Las vacunas acelulares para la infancia contra la tos ferina fueron autorizadas e implementadas en los EE.UU., en la década de 1990 después de un esfuerzo por mejorar el perfil de seguridad de las vacunas de células enteras. Sin embargo el cambio de la inmunidad de las vacunas acelulares, es posible que sea una de las razones que conduzcan al recién resurgimiento de la tos ferina y al aumento de la necesidad de considerar nuevas estrategias de prevención (Clark, T. A. et al. 2012).

Para evaluar el riesgo de tos ferina con el tiempo desde la vacunación en niños en Minnesota y Oregón que recibieron 5 dosis de vacuna acelular contra la tos ferina (DTaP). Esta evaluación reporta aumento constante en el riesgo de tos ferina en los años posteriores a la finalización de las 5 dosis administrada con DTaP. Este aumento es probablemente atribuible en parte a la disminución de la inmunidad de las vacunas DTaP. Seguir vigilando la carga de enfermedad y la efectividad de la vacuna en niños completamente vacunados en los próximos años será importante para evaluar el riesgo en curso como cohortes vacunados exclusivamente con vacuna acelular contra la tos ferina (Tarlof, F. Y., 2013).

Según informes de los centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, en Estados Unidos, se registró el triple de casos en 2005 con respecto a 2001, hecho que se ha evidenciado también en otras partes del mundo (CDC,2013). Dicho aumento en la incidencia ha sido atribuido a factores tales como el incremento en la circulación de *B. pertussis*, disminución en la inmunidad inducida por la vacuna en adolescentes y adultos, disminución de las coberturas vacunales en ciertos países desarrollados, mayor número de notificaciones, el uso de pruebas diagnósticas más

precisas. Se destaca el papel de los adolescentes y los adultos jóvenes en la epidemiología de la enfermedad, ya que por lo general presentan una infección leve y poco sintomática, sirviendo de fuente de contagio a lactantes que, por ser muy pequeños, no han recibido las dosis de vacuna necesarias para gozar de protección contra *B. Pertussis* (Plotkin, S., 2005).

II.1.9. VACUNACIÓN, INMUNIZACIÓN Y RECOMENDACIONES.

Entre los años 1914 y 1923, Hess, Luttinger y Madsen llevaron a cabo los primeros ensayos de vacunación anti-pertussis (Ledermann, W. D., 2004).

De esta forma la primera vacuna desarrollada contra la enfermedad conteniendo bacterias enteras inactivadas, fue introducida en los Estados Unidos en la década de 1940 generalizándose su uso a partir de la década de 1950. Problemas asociados a la reactogenicidad de la vacuna a células enteras promovieron el desarrollo de vacunas acelulares compuestas por antígenos purificados. La primera vacuna anti-pertussis acelular fue introducida en Japón en 1981 (Sato, Y. et al, 2008).

En octubre de 2012, el Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización (ACIP) votó a favor de recomendar que el personal de salud debe administrar una dosis de Tdap (vacuna) a cada mujer embarazada, independientemente de la historia previa del paciente de recibir la vacuna Tdap (o Td). Para maximizar la respuesta de los anticuerpos de la madre y la transferencia pasiva de anticuerpos al bebé, el momento óptimo para la administración Tdap es entre 27 y 36 semanas de gestación. Esta recomendación se basa en el [Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos](#) y el [Colegio Americano de Enfermeras-Parteras](#) (ACOG, 2013).

La vacunación rutinaria de lactantes y adolescentes es la estrategia preventiva más eficaz. Actualmente se aconseja la administración de 5 dosis de toxoides diftérico y tetánico sumado a *pertussis* acelular (Tdap) a los 2, 4, 6, 15 y 18 meses, 4 a 6 años y a los 11 a 12 años (McNeil, B. E., et al, 2011).

En la República de Panamá, la cobertura vacunal contra *B. pertussis* en la población menor de un año de vida, entre los años 2004 a 2007, osciló entre el 87,4 a 89,7%. En el año 2008 se introdujo la vacunación a adolescentes, mujeres en puerperio

inmediato y a sus parejas en el Programa Ampliado de Inmunizaciones de Panamá (Nieto. G. J. , et al, 2009).

Debido al incremento en la incidencia de la infección en adolescentes y adultos, la Organización Mundial de la Salud recomienda reemplazar el esfuerzo de difteria y tétanos (Td) que se aplica a los adolescentes por un refuerzo combinado de difteria, tétanos y pertussis acelular (DtaP) e incluso está planteada la conveniencia de aplicar un refuerzo a los adultos (Molina, L.J., 2014).

Frente a la ocurrencia de aumento de casos de tos ferina en varios países de la Región, la OPS/OMS realiza las siguientes recomendaciones (OPS, 2012):

Fortalecer la vigilancia, a fin de monitorizar la carga de la enfermedad, evaluar el impacto de la estrategia de vacunación implementada en el país e identificar brotes. Cada brote epidémico de tos ferina debe ser cuidadosamente estudiado para mejorar el entendimiento actual de la epidemiología de la enfermedad en la Región de las Américas (OPS, 2012).

Analizar las coberturas de vacunación en niños de 1 año y menores de 5 años, con especial énfasis en la identificación de lugares con bajas coberturas. Los países deben asegurar coberturas con tres dosis de vacunas contra pertusis >95% en niños <1 año de edad e instar a que la vacunación sea oportuna así como el completar los esquemas. La 4^a dosis de vacunación con DPT debe de ser incorporada como parte de la vacunación del programa regular en todos los países, y las coberturas alcanzadas con esta dosis (así como con cualquier otra) deben de ser objeto de cuidadoso registro, monitoreo, reporte y evaluación. Vacunar a los trabajadores de la salud para prevenir la transmisión nosocomial a lactantes menores de seis meses y personas inmunocomprometidas. Inmunizar a las mujeres embarazadas en caso de un brote, a fin de proporcionar una protección óptima a recién nacidos (OPS, 2012).

II.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

II.2.1. ADN.

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por K. Mullis y sus colaboradores en 1985 ha revolucionado la biología molecular y la medicina molecular. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Mientras que antes sólo podían obtenerse cantidades mínimas de un gen específico, ahora incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse con la PCR hasta un millón de ejemplares en tan sólo unas pocas horas (Saiki et al., 1985).

Para comprender los mecanismos de la PCR y sus aplicaciones debemos conocer antes los componentes, estructura y replicación del ADN sin dejar de mencionar que en 1953, el bioquímico estadounidense James Watson y el biofísico británico Francis Crick publicaron la primera descripción de la estructura del ADN. Su modelo adquirió tal importancia para comprender la síntesis protéica, la replicación del ADN y las mutaciones, que los científicos obtuvieron en 1962 el Premio Nobel de Medicina por su trabajo (Alberts, B., et al., 1983).

Componentes del ADN:

Cada molécula de ADN está constituida por dos cadenas o bandas formadas por un elevado número de compuestos químicos llamados nucleótidos. Estas cadenas forman una especie de escalera retorcida que se llama doble hélice. Cada nucleótido está formado por tres unidades: una molécula de azúcar llamada desoxirribosa, un grupo fosfato y uno de cuatro posibles compuestos nitrogenados llamados bases: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C) (Schnek, C. y Massarini, B., 2007).

La molécula de desoxirribosa ocupa el centro del nucleótido y está flanqueada por un grupo fosfato a un lado y una base al otro. El grupo fosfato está a su vez unido a la desoxirribosa del nucleótido adyacente de la cadena. Estas subunidades enlazadas desoxirribosa-fosfato forman los lados de la escalera; las bases están enfrentadas por

parejas, mirando hacia el interior, y forman los travesaños (Schnek, C. y Massarini, B., 2007). Como podemos observar en la figura 11.

Los nucleótidos de cada una de las dos cadenas que forman el ADN establecen una asociación específica con los correspondientes de la otra cadena. Debido a la afinidad química entre las bases, los nucleótidos que contienen adenina se acoplan siempre con los que contienen timina, y los que contienen citosina con los que contienen guanina. Las bases complementarias se unen entre sí por enlaces químicos débiles llamados enlaces de hidrógeno y así forman los polinucleótidos que conforman el ADN (Alberts, B., et al., 1983).

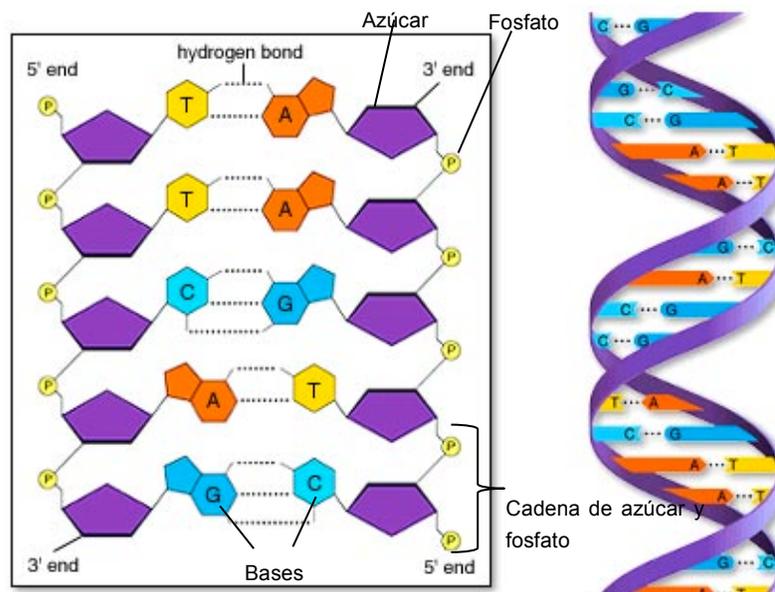


Figura 11. Molécula de ADN.

La estructura de la molécula de ADN está constituida por la asociación de moléculas llamadas nucleótidos, formadas por la unión de una molécula de fosfato, una del azúcar desoxirribosa y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina y citosina) de éstas sólo se une la adenina con la timina y la guanina con la citosina.

Fuente: Alberts, B., et al., 1983

El ADN contiene toda la información genética que define la estructura y la función de un organismo. Hay tres procesos diferentes encargados de la transmisión de la información genética: replicación, transcripción y traducción.

Durante la replicación, un ácido nucléico bicatenario se duplica para formar copias idénticas. Con este proceso se perpetúa la información genética. Durante la transcripción, un segmento de ADN que constituye un gen se lee y se transcribe en una secuencia monocatenaria de ARN. El ARN pasa del núcleo al citoplasma. Finalmente, durante la traducción, la secuencia de ARN se traduce a una secuencia de aminoácidos que forman una proteína (Alberts, B., et al., 1983).

En casi todos los organismos celulares, la replicación de las moléculas de ADN tiene lugar en el núcleo, justo antes de la división celular. Empieza con la separación de las dos cadenas de polinucleótidos, cada una de las cuales actúa a continuación como plantilla para el montaje de una nueva cadena complementaria. A medida que la cadena original se abre, cada uno de los nucleótidos de las dos cadenas resultantes atrae a otros nucleótidos complementarios previamente formados por la célula (Alberts, B., et al., 1983).

A medida que los nucleótidos complementarios van encajando en su lugar, una enzima llamada ADN polimerasa los une enlazando el grupo fosfato de uno con la molécula de azúcar del siguiente, para así construir la hebra lateral de la nueva molécula de ADN. Este proceso continúa hasta que se ha formado una nueva cadena de polinucleótidos a lo largo de la antigua; se reconstruye así una nueva molécula con estructura de doble hélice. Las cadenas tienen dirección, pues los grupos fosfatos forman un puente entre el quinto carbono de azúcar de un nucleótido y el tercer carbono del azúcar del siguiente, que determina un extremo 3' y otro 5'. Las dos cadenas apareadas corren en direcciones opuestas (son antiparalelas) (Schnek, C. y Massarini, B., 2007).

Durante la replicación, la molécula de ADN se desenrolla y cada cadena se convierte en un ADN molde para la síntesis de una cadena complementaria nueva. Cada molécula hija, consistente en una cadena nueva y una vieja de ADN, es una copia

exacta de la molécula madre este proceso es muy complejo e intervienen muchas enzimas como lo podemos ver en la figura 12 (Alberts, B., et al., 1983).

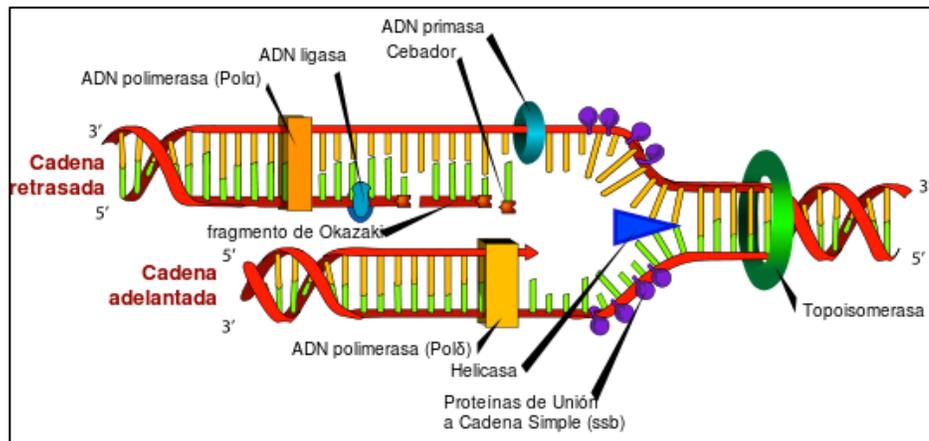


Figura 12. Horquilla de replicación del ADN.

En la replicación del ADN se obtienen copias de una molécula de ADN y esta es fundamental para la transferencia de la información genética, como vemos se realiza la separación de la doble cadena y la replicación a la vez. El avance es bidireccional, lo que acorta el tiempo y esta función del ADN es lo que se aprovecha in vitro como el principio de la PCR.

Fuente: Llanos, D. 2011

La replicación del ADN es la clave del proceso en que se basa la amplificación por PCR, lo cual se lleva a cabo de manera in vitro y será parte medular del presente trabajo y en seguida se explica de manera más detallada.

II.2.2. PRINCIPIOS DE LA PCR.

La técnica de PCR se basa en la replicación del ADN con la intervención de la enzima ADN polimerasa. Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en sentido 5' a 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una

región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena, se utilizan los denominados iniciadores (primers). Estos son una pareja de oligonucleótidos diseñados de tal manera que sean complementarios a cada uno de los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Este proceso se lleva a cabo mediante ciclos alternados de temperaturas altas y bajas, que permiten separar las hebras de ADN formadas entre sí tras cada fase de replicación y, la unión nuevamente de estas hebras con la polimerasa para que vuelvan a duplicarse. Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción (efecto Peltier) controlando la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. La automatización del proceso se debe al descubrimiento de la enzima Taq polimerasa termoestable, extraída del *Thermus aquaticus*, que eliminó el inconveniente de agregar enzima fresca en cada paso de la reacción (Nikitina, T.V., et al, 2003).

Tras cada ciclo, las hebras de ADN recién sintetizadas pueden servir de ADN molde para el ciclo siguiente. Como se indica en la figura 13, el producto principal de esta reacción exponencial es un segmento de ADN bicatenario cuyos extremos vienen definidos por los extremos 5' y 3' de los oligonucleótidos cebadores y cuya longitud viene dada por la distancia entre los cebadores. Los productos de una primera ronda de amplificación efectiva son moléculas de ADN de diferentes tamaños, cuyas longitudes pueden superar la distancia entre los sitios de unión de los dos cebadores. En la segunda ronda, estas moléculas generan hebras de ADN de longitud definida que se acumulan de forma exponencial en rondas posteriores de amplificación y constituyen los productos dominantes de la reacción. Así, la amplificación, que es el número final de ejemplares de la secuencia diana, se expresa con la siguiente expresión matemática: $(2^n - 2N)x$ donde n es el número de ciclos, $2N$ es el número de moléculas del primer producto obtenidas tras el primer ciclo y de los segundos productos obtenidos tras el segundo ciclo con longitud indefinida, x es el número de ejemplares del ADN molde original. Teóricamente, al cabo de 20 ciclos de PCR habrá una amplificación de 220 veces, suponiendo que cada ciclo tiene un rendimiento del 100 %. El rendimiento de una PCR varía de un ADN molde a otra y depende del grado de optimización que se haya conseguido (Sambrook, J. y Russel, D. W., 2001)

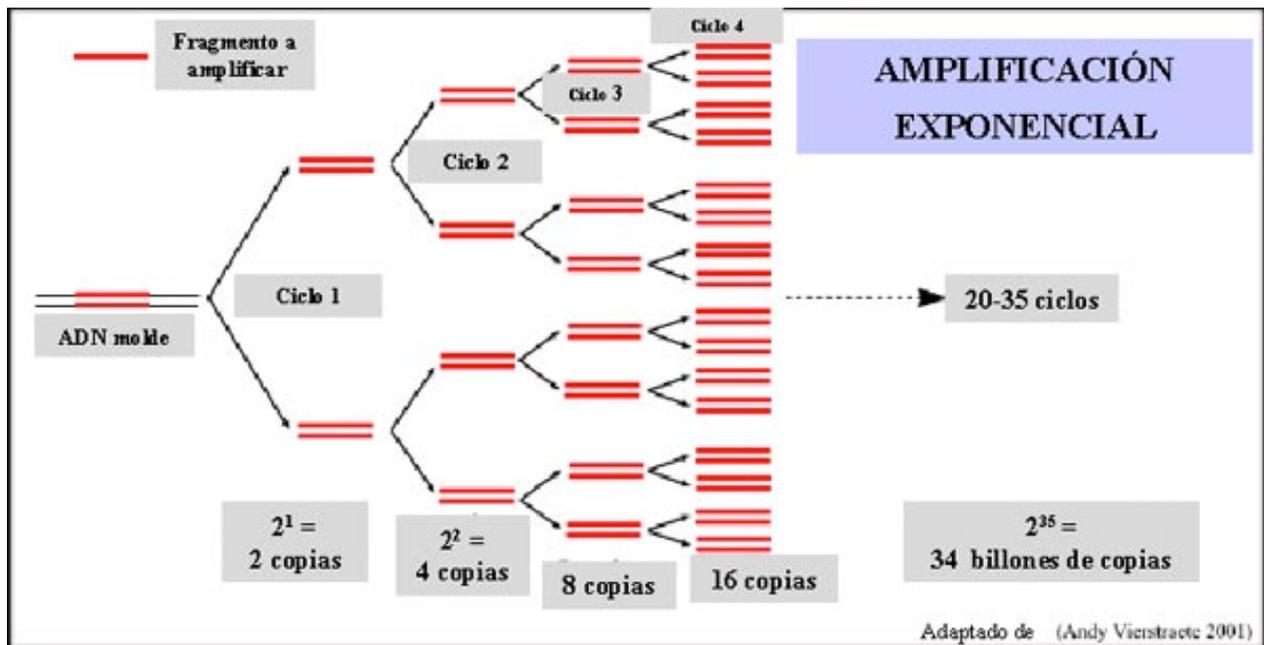


Figura 13. La amplificación exponencial del ADN tras una serie de ciclos por PCR.

La técnica de PCR permite amplificar, de manera selectiva, fragmentos de ADN de un determinado microorganismo, situados entre dos regiones cuyas secuencias son conocidas, esto se realiza mediante un tiempo llamado ciclo, tras varios ciclos, el resultado que se obtiene es la amplificación exponencial del fragmento de ADN seleccionado.

Fuente: Gibello, A. 2001.

Para llevar a cabo una reacción de PCR como ya vimos se necesitan diferentes componentes los cuales describimos brevemente a continuación.

Los componentes de la PCR son:

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). Es una mezcla de nucleótidos (azúcar desoxirribosa, base nitrogenada y fosfato), que sirve de sustrato para la síntesis de nuevo ADN.

Iniciadores (primers). Dos oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre 10-30 nucleótidos, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción. Deben estar enfrentados (uno en cada hebra del ADN), para delimitar el fragmento a amplificar.

ADN polimerasa. El descubrimiento en 1976 de la Taq polimerasa, una ADN polimerasa extraída de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* que habita medios de muy alta temperatura (50-80 °C), eliminó los grandes inconvenientes del método de la PCR. Esta ADN polimerasa es estable a altas temperaturas, permaneciendo activa hasta después de la desnaturalización del ADN.

Cationes Divalentes, cofactor importante para generar la reacción enzimática en el proceso de formación del ADN como el Magnesio.

Solucion amortiguadora, permite mantener el equilibrio acido-base en la reacción de la PCR.

ADN Molde en cadena sencilla o doble, proporciona las secuencias necesarias para amplificar la región específica de interés (Rodríguez N. y Barrios, M. A., 2009).

Las etapas de la PCR son:

La PCR consiste en una serie de cambios repetidos de temperatura llamados ciclos. Por lo general el número de ciclos es de 20 a 30 o más, cada ciclo consiste en tres cambios de temperatura. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo, dependen de algunos parámetros en los que se incluye, la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción así como la temperatura de unión de los iniciadores (Sambrook, J. y Russel, D. W., 2001).

Desnaturalización del ADN. En la primera etapa, la reacción es llevada a una temperatura de 94-96°C y se mantiene entre 30 segundos y un minuto. A estas temperaturas el ADN se desnaturaliza (se separan las dos hebras que lo constituyen). La temperatura a la cual se decide llevar a cabo esta etapa va a depender de la proporción de Guanina-Citocina (G-C) que tenga la hebra, así como también del largo de la misma.

Alineamiento/Unión del iniciador a la secuencia complementaria. En la segunda etapa también conocida como hibridación, los iniciadores se unen a las regiones 3' complementarias que flanquean el fragmento que se quiere amplificar. Para ello, es necesario bajar la temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos, permitiendo así el alineamiento. La polimerasa y el iniciador se unen entonces al híbrido formado por la cadena molde y empieza la síntesis del ADN. Los iniciadores actúan como límite de la región de la molécula que va a ser amplificada.

Extensión/Elongación de la cadena. En la tercera etapa, la polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementario a la hebra molde, añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5' a 3' uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente. La temperatura en esta etapa depende de la ADN polimerasa que se utilice. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está entre 74-80°C, aunque por lo general se usa 74°C. El tiempo de elongación va a depender del tipo de polimerasa empleado, así como también del tamaño del fragmento de ADN que se requiere amplificar.

Elongación final. En la cuarta etapa, la temperatura es regulada de 70-74°C durante 5 minutos tras el último ciclo de PCR, con el objeto de asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado (Sambrook, J. y Russel, D. W., 2001).

Por último, el producto amplificado es mantenido a una temperatura de 4°C por un periodo indefinido lo cual permite conservar el producto de la reacción. Para comprobar que la PCR ha generado el fragmento de ADN esperado, se emplean técnicas como la electroforesis, que permite separar los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su tamaño. Por lo general se emplea la electroforesis en gel de agarosa para fragmentos grandes, en acrilamida para fragmentos más pequeños y asociada a marcaje fluorescente así como la electroforesis capilar o automáticamente el termociclador nos indica el valor del Ct al cual amplificó nuestro producto si es que estamos usando PCR en tiempo real o cuantitativa, (Mathews, C. K, et al, 2003) que actualmente es la más usada y en la que nos apoyaremos para este trabajo.

Tipos de PCR:

PCR Convencional: Amplifica la región de interés en el ADN molde, mediante secuencias sintéticas específicas, no es cuantitativa y se complementa con un corrimiento de la muestra amplificada en un gel de agarosa o acrilamida para someterla a electroforesis y así obtener las bandas características del patógeno que se busca.

PCR Tiempo Real: Detecta y mide las secuencias de ácidos nucleicos producidos. Dicho método requiere el uso de secuencias sintéticas “Primers”, similares a los empleados en la PCR convencional, su diferencia reside en la presencia de marcadores fluorescentes unidos a las secuencias sintéticas o mediante el empleo de métodos alternos basados en química fluorescente. Para ello, es necesario la presencia de un equipo (termociclador) que permita medir la intensidad de fluorescencia.

PCR Múltiple: Modificación de la PCR convencional y tiempo real, su principio comprende la amplificación de dos o más moldes de ADN, diferentes entre sí, en una misma reacción en donde se debe cuidar que las sondas de cada juego de primers no sean iguales si van a estar en la misma reacción, este es el tipo de PCR-tr que utilizamos en el presente trabajo.

PCR Transcripción Reversa: Su aplicación es usada para amplificar secuencias específicas de ácidos ribonucleicos (ARN), tales como ARN mensajero (ARNm) o ARN viral. El método empleado abarca la utilización de enzimas que permitan crear el ADN complementario mediante el proceso de transcripción reversa.

PCR Anidada: Consiste en una PCR convencional, con la diferencia de presentar una segunda ronda de amplificación, empleando pares de secuencias sintéticas diferentes a las usadas en la primera ronda (Rodríguez N. y Barrios, M. A., 2009).

La PCR a tiempo real combinada con los nuevos sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés clínico. Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación, la PCR a

tiempo real, irá reemplazando la PCR convencional y se extenderá a un amplio abanico de aplicaciones microbiológicas (Costa, J., 2004).

Para propósitos de esta tesis nos enfocaremos a la PCR en tiempo real múltiple y PCR en tiempo real sencilla.

II.2.3. PCR EN TIEMPO REAL (PCRtr ó PCR-TR)

La PCR en tiempo real (o PCR cuantitativa) surgió para resolver el problema de la cuantificación de la técnica de la PCR convencional. En la PCR en tiempo real se emplean sondas marcadas con fluorocromos. Las sondas de hidrólisis, frecuentemente empleadas en esta técnica, son oligonucleótidos que presentan fluorocromos en ambos extremos y tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Uno de los fluorocromos actúa como donador de fluorescencia en el extremo 5' y el otro como aceptor de esta fluorescencia en el extremo 3'. La ADN polimerasa se desplaza sobre la cadena de ADN sintetizando la cadena complementaria a partir de un fragmento de ADN que sirve de molde (cebador). Al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado, la hidroliza y el fluorocromo del extremo 5' de la sonda (el donador) es liberado. El fluorocromo aceptor no puede entonces absorber la fluorescencia del donador por estar alejado de él espacialmente. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN presente, y la representa gráficamente (Costa, J., 2004).

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas, de manera especial.

Sondas de hibridación específicas.

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas molecular beacons y las sondas FRET (Costa, J., 2004).

CUADRO 2. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR a tiempo real.

Fuente:(Costa, J., 2004).

Fluorocromo	Máx λ_{abs} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
TET	522	550
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460,502	526,650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480,565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480,565	613
Rojo de Tejas	596	615
Homodímero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

En el presente trabajo utilizaremos sondas de hidrólisis por lo que describiremos su mecanismo.

Sondas de hidrólisis: Son oligonucleótidos (fragmentos de ADN) marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En el cuadro 2 se relacionan los fluorocromos más empleados

y sus espectros de excitación y emisión. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador, como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 14). (Holland P. M., et al, 1991)

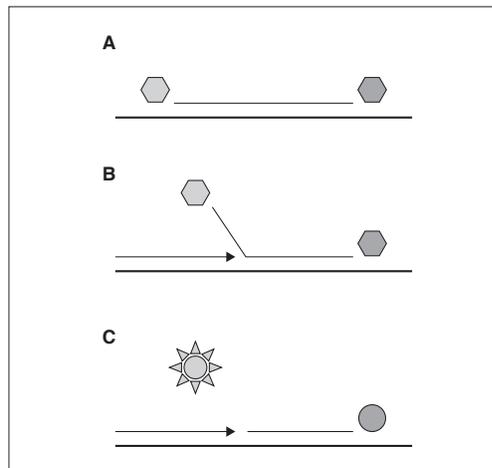


Figura 14. Mecanismos de las sondas de hidrólisis.

Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor que absorbe la fluorescencia liberada por el donador, para que esto ocurra estas dos moléculas deben estar estrechamente próximas dando una señal.

Fuente: Costa, J., 2004 .

Equipos para PCR a tiempo real

En el cuadro 3 se describen los equipos para llevar a cabo la PCR a tiempo real y sus fabricantes. Están compuestos por un termociclador y por un lector de fluorescencia y diseñados para poder efectuar la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los viales usados y en cualquier momento de la reacción. Los más

utilizados son los equipos fabricados por Applied Biosystems y Roche Diagnostics (figura 15), pero en general todos los modelos actuales permiten muchas o todas las aplicaciones. Las diferencias más importantes entre estos equipos hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante. Disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez (Costa, J., 2004).

CUADRO 3. Equipos para PCR en tiempo real.

Fuente: (Costa, J., 2004).

Instrumento	Fabricante	Sistema térmico	Tiempo de reacción	Capacidad
Serie GeneAmp Serie AbiPrism	Applied Biosystems	Convencional	2 h	96
ICycler iQ	BioRad	Convencional	2 h	96-384
LightCycler	Roche Diagnostics	Aire	20-60 min	32
SmartCycler	Cepheid	Placa cerámica	40-60 min	16-96
MX4000	Stratagene	Convencional	90 min	96
Rotor Gene	Corbett Research	Aire	50 min	32

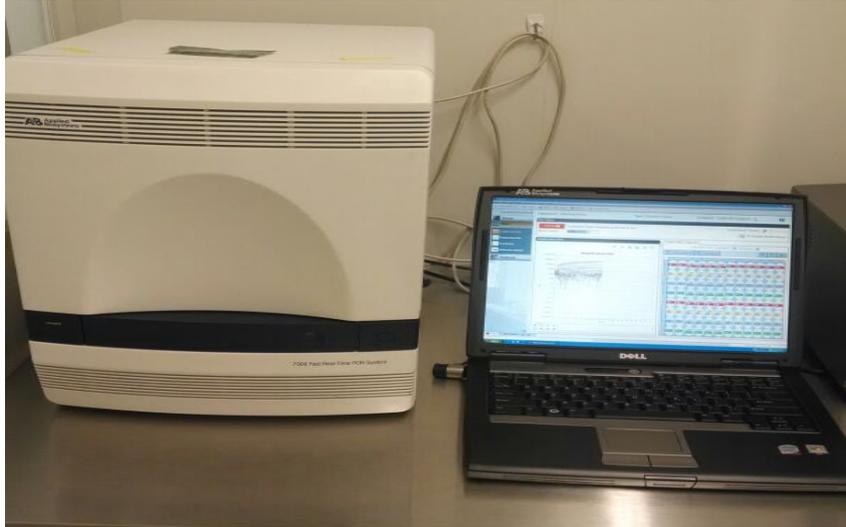


Figura 15. Termociclador con su equipo de computo y software específico para PCR-tr.

Una vez que se ponen las muestras y mezclas maestras en la placa de reacción se pone esta en el termociclador para llevar a cabo la replicación del ADN y al final la lectura del fragmento de ADN que estamos evaluando, lo cual se registra en la computadora gracias al software.

Fuente: LESPQ, 2015

Opciones de los equipos de PCR a tiempo real.

Los programas de los equipos de PCR a tiempo real tienen diversas opciones a continuación citaremos algunas:

1. *Amplificación y detección de ADN o ARN diana en la muestra.*

2. *PCR múltiple.* Se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de ADN diana en la misma reacción, esto se aplica por ejemplo para detectar diferentes especies de un mismo género de bacterias como es el caso del presente trabajo.

3. *Cuantificación del ADN o ARN diana en la muestra.* Se puede cuantificar la concentración inicial de ADN (o ARN) diana en la muestra de manera muy sencilla, añadiendo simplemente unos controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana (curva patrón) en la tanda de amplificación. En la PCR a tiempo real el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles (figura 16). Por lo tanto, se puede controlar la amplificación en las fases iniciales, cuando la concentración de los reactivos todavía no es limitante y el efecto de la variabilidad en la eficiencia de amplificación es menos importante. Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (C_p , de *crossing point*) o ciclo umbral (C_t , de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus C_p o C_t correspondientes se dibuja una curva patrón. Interpolando en ella los valores de los C_t de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ADN inicial (Niesters H.G., 2001).

4. *Análisis de curvas de disociación.* Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar características de los amplicones para comprobar su especificidad. También permite el análisis de mutaciones (Niesters H.G., 2001).

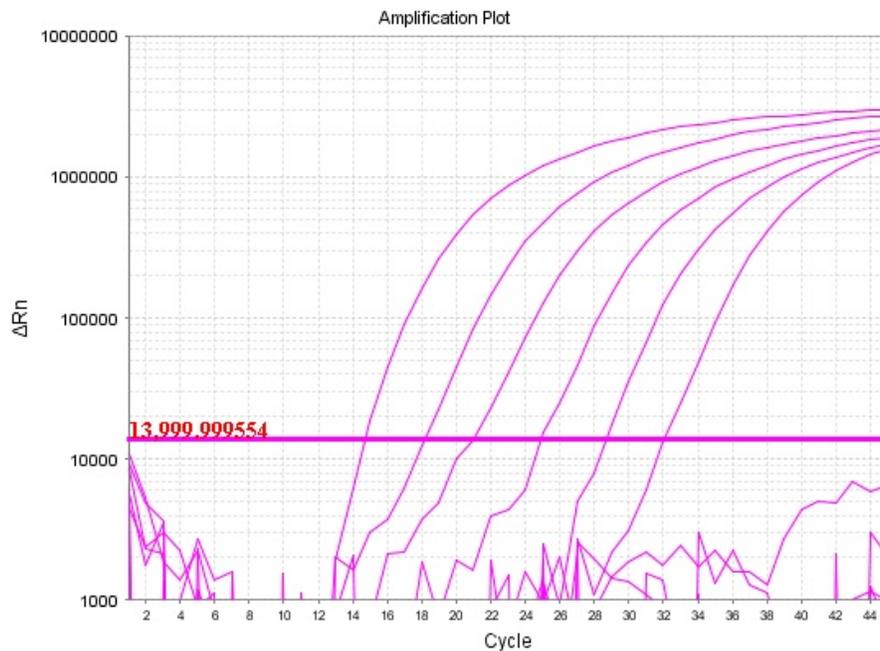


Figura 16. Gráfico de resultados emitidos por el termociclador para PCR-tr.

Con estas gráficas podemos ver el valor del CT, que leemos apartir del umbral que determinamos en el eje de la “Y”, el cual es menor conforme mayor sea la concentración del fragmento de ADN amplificado.

Fuente: LESPEQ, 2014.

Aplicaciones de la PCR en tiempo real.

En el ámbito de la microbiología clínica, la PCR se ha aplicado en tres grandes campos:

1. Diagnóstico etiológico. La PCR es sobre todo útil en ausencia de métodos de diagnóstico alternativos o cuando éstos son muy complejos, para mejorar la eficacia diagnóstica complementando métodos convencionales o si se requiere un diagnóstico rápido y precoz del agente etiológico para poder iniciar el tratamiento específico lo antes posible.

2. Control del tratamiento con antimicrobianos. La PCR se utiliza tanto para la selección de los pacientes que deben ser tratados como para, una vez iniciado el tratamiento, comprobar su eficacia, siendo importante para ello disponer de métodos cuantitativos.

3. Caracterización genética de agentes infecciosos. Genotipificación; identificación de mutaciones determinantes de resistencias a fármacos o de virulencia; epidemiología molecular; etc (Costa, J., 2004).

Es previsible que gracias a sus indudables ventajas y a la sencillez de su empleo, la PCR a tiempo real vaya reemplazando la PCR clásica, y que su aplicación se extienda a un número cada vez mayor de agentes infecciosos, implementándose progresivamente en la rutina asistencial. Algunas empresas de diagnóstico (Roche Diagnostics, Artus, Abbott, Celera) han hecho ya una apuesta decidida por la nueva tecnología y tienen disponibles, kits para el diagnóstico de los agentes infecciosos de mayor interés comercial mediante sistemas de PCR a tiempo real (por ejemplo; VIH, VHB, VHC, citomegalovirus, etc.). La PCR a tiempo real, combinada con los nuevos sistemas automáticos para la preparación de las muestras, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación o cuantificación de esos agentes infecciosos, tal es el caso de muchos virus o de bacterias que crecen sólo con medios de cultivo especiales y cuyo proceso de cultivo es tardado como la *Bordetella pertussis* (Lind-Brandberg, L., et al, 1998).

II.3. FUNDAMENTOS ESTADISTICOS.

Desde la antigüedad el hombre ha tenido la necesidad de medir para tomar conciencia de su entorno. Como ejemplo podemos referirnos al Antiguo Testamento de la Biblia, donde se dice:

Hazte un arca de maderas resinosas. Haces el arca de carrizo y la calafateas por dentro y por fuera con betún. Así es como la harás: longitud del arca, trescientos codos, la anchura cincuenta codos, y su altura treinta codos. Hacer el arca con cubierta y a un codo la rematarás por encima, pones la puerta del arca en su costado y haces un primer piso, un segundo piso y un tercero (Génesis, 6-14;16.).

Así mismo surgen los procesos (Figura 17), que son un conjunto de actividades entrelazadas o interrelacionadas que reciben determinados insumos (entradas) que son transformados en un resultado (salidas): un producto o servicio. Un proceso está conformado por varias etapas o subprocesos, mientras que los insumos incluyen sustancias, materiales, productos o equipos. Los resultados pueden ser un producto en sí o alguna modificación de los insumos, que a su vez será un insumo para otro proceso (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

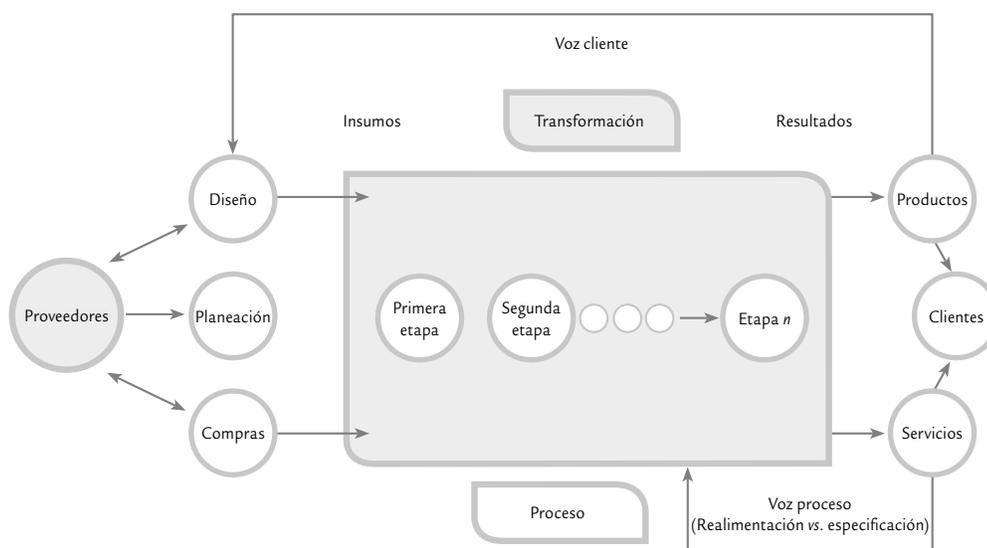


Figura 17. Esquema de un proceso. Sobre los productos se miden las variables de salida.

Fuente: Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009.

El resultado de todo proceso se debe a la acción conjunta de las 6 M (Materiales, Maquinaria, Mano de obra, Mediciones, Medio ambiente y Métodos)(Figura 18), por lo que si hay un cambio significativo en el desempeño del proceso, sea accidental u ocasionado, su razón se encuentra en una o más de las 6 M. En todo proceso, cada una de las 6 M tiene y aporta su propia variación; por ejemplo, los materiales no son idénticos, ni toda la gente tiene las mismas habilidades y entrenamiento. Por ello, será necesario conocer la variación de cada una de las 6 M y buscar reducirla. Pero además es necesario monitorear de manera constante los procesos, ya que a través del tiempo ocurren cambios en las 6 M, como la llegada de un lote de material no adecuado o con características especiales, descuidos u olvidos de la gente, desajustes y desgaste de máquinas y herramientas, etc (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

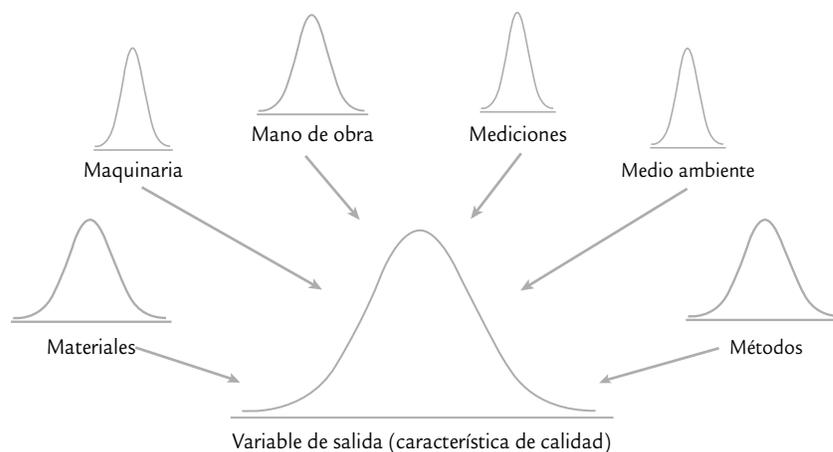


Figura 18. La variabilidad de un proceso.

Cada M aporta una parte, no necesariamente igual, de la variación total observada. Las 6 M están íntimamente relacionadas e involucradas en la calidad final de la variable de salida.

Fuente: Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009.

Según E. Deming establece que el estudio analítico de los procesos nos permite aumentar el conocimiento sobre el sistema de causas que lo afectan, y para realizar un estudio analítico se requieren tomar mediciones. Al hacer mediciones, las lecturas que se obtienen nunca son exactamente iguales, aún cuando las efectúa la misma persona, sobre la misma pieza, el mismo método, etc. Esta variación puede ser relativamente grande o pequeño, pero siempre existirá (Chávez, M. M. et al., 2007).

Los tipos de Errores de acuerdo al origen, pueden ser:

Errores por el instrumento o equipo de medición. Puede deberse a defectos de fabricación (deformaciones, imperfecciones mecánicas, etc.) y tiene valores máximos permisibles establecidos en normas o información técnica de fabricantes de instrumentos. Los errores por el instrumento pueden determinarse mediante calibración.

Error del operador o por el método de medición. Muchas de las causas del error aleatorio se deben al operador, por ejemplo falta de agudeza visual, descuido, cansancio, alteraciones emocionales, etc. Otro tipo de error son debido al método o procedimiento con que se efectúa la medición. El principal es la falta de un método definido y documentado.

Error por condiciones ambientales. Tenemos que considerar las condiciones más óptimas para nuestras mediciones pues tanto puede afectar la temperatura, presión, etc. (Chávez, M. M. et al., 2007).

Para saber que tan confiables son nuestras mediciones y que tipo de errores se involucran evaluamos los sistemas de medición.

II.3.1. EVALUACION DE LOS SISTEMAS DE MEDICION.

Llevar a cabo la evaluación de los sistemas de medición significa tratar de asegurar y controlar las mediciones. Con lo anterior se desea:

- Un criterio para aceptar un equipo de medición nuevo

- Aumentar la confianza de los clientes
- Permitir asegurar la calidad del producto disminuyendo costos
- Apoyar objetivamente las decisiones de mejorar
- Incrementar la eficiencia en el uso de recursos.
- Validar un método nuevo.
- Etc.(Chávez, M. M. et al., 2007)

Esto es, se debe asegurar la calidad de las mediciones, ya que tienen una influencia directa en los productos y servicios. La calidad de las mediciones obtenidas en un sistema de medición esta relacionada con ciertas propiedades, algunas se mencionan a continuación (Chávez, M. M. et al., 2007):

1. Exactitud o sesgo
2. Repetibilidad
3. Reproducibilidad
4. Estabilidad
5. Linealidad
6. Sensibilidad
7. Incertidumbre
8. Límite de cuantificación
9. Límite de detección.
10. Especificidad
11. Capacidad
12. etc.

Todo proceso tiene variabilidad y los procesos de medición no son la excepción; los valores observados son el resultado del comportamiento verdadero más el “ruido” de la medición, por lo que se hace necesario evaluar el sistema de medición. (Chávez, M. M. et al., 2007) y así evaluar la calidad de nuestras mediciones como describiremos a continuación.

II.3.2. CALIDAD DE LAS MEDICIONES.

Un punto de partida clave es entender que cualquier proceso de medición genera un error. Por lo tanto, lo que se observa no es exactamente la realidad, más bien es la realidad más un error de medición. Esto se traduce en que la *variación total observada* en unos datos es el resultado de la variación propia del producto más el error del proceso de medición (figura 19) (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

En particular, las fuentes principales que contribuyen al error del proceso de medición son el equipo de medición, los operadores (reproducibilidad) y la variación dentro de la muestra. La variabilidad del equipo se divide a su vez en los siguientes componentes:

Calibración. La exactitud y linealidad del instrumento.

Estabilidad. El cambio del instrumento con el transcurso del tiempo.

Repetibilidad y Reproducibilidad. La variación observada cuando un operador mide de manera repetida la misma pieza con el mismo instrumento.

Linealidad. La exactitud a lo largo del rango de operación del instrumento, por ejemplo en el caso de una báscula que mide un rango de 0 a 100 kilogramos, interesa que sea exacta en todo este rango (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

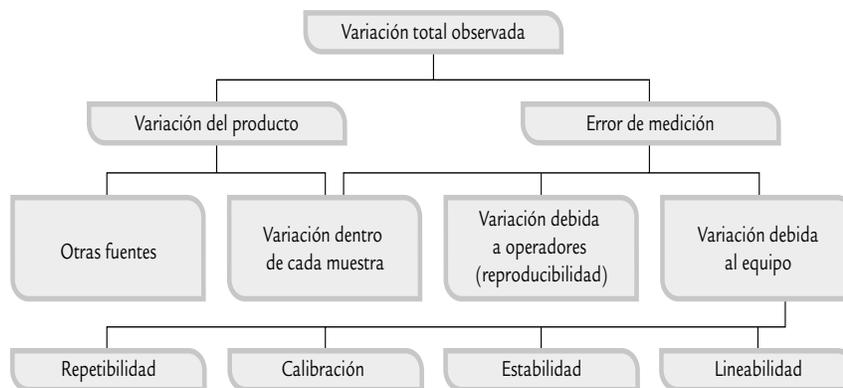


Figura 19. Fuentes de variabilidad en las mediciones.

La variación total observada en un proceso de medición se puede medir y el estadístico y la forma de medición dependen de su origen.

Fuente:Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009.

Un aspecto adicional que no es considerado en la figura 19 es la sensibilidad o resolución del equipo, que se refiere a la habilidad del instrumento de medición para discriminar entre piezas similares; se recomienda que éste sea capaz de reportar al menos 10 valores espaciados a lo largo del rango de variación de las piezas que pretende medir (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

En el cuadro 4, se resume parte de los conceptos que se comentaron antes y la forma en que se manifiestan como problemas en un sistema de medición.

CUADRO 4. Conceptos básicos de la calidad de las mediciones.
Fuente: Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009.

EL SISTEMA DE MEDICIÓN DEBERÍA SER	PROBLEMAS TÍPICOS
<p>Preciso y exacto El sistema genera mediciones individuales, así como el promedio de éstas que es muy parecido al valor verdadero.</p>	<p>Inexacto e impreciso Tanto las mediciones individuales como su promedio se alejan del valor verdadero.</p>
<p>Repetible Mediciones repetidas realizadas por una persona sobre el mismo mensurando resultan muy parecidas.</p>	<p>No repetible Mediciones repetidas de un operador sobre el mismo espécimen muestran un exceso de variabilidad.</p>
<p>Reproducible Dos o más personas que miden el mismo objeto obtienen en promedio resultados muy similares.</p>	<p>No reproducible Dos o más personas que miden las mismas piezas obtienen en promedio resultados sensiblemente diferentes.</p>
<p>Estable en el tiempo El sistema de medición no cambia a través del tiempo.</p>	<p>Inestable en el tiempo El sistema de medición cambia a través del tiempo.</p>

En el cuadro 4, es necesario aclarar que la precisión y la exactitud son dos manifestaciones del error (variabilidad) de cualquier proceso de medición (figuras 20 y 21). La *precisión* es la variación que presentan los resultados al medir varias veces una misma pieza o al mensurando con el mismo equipo (sus componentes principales son la repetibilidad y la reproducibilidad). En otras palabras, la precisión es la habilidad de un proceso de medición para repetir y reproducir su propia medición, independientemente de si dicha medición es correcta o no. Por su parte, la *exactitud* o *sesgo* se refiere al *desfase* o *desplazamiento* que tienen las mediciones con respecto al estándar o verdadero valor que se supone conocido (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

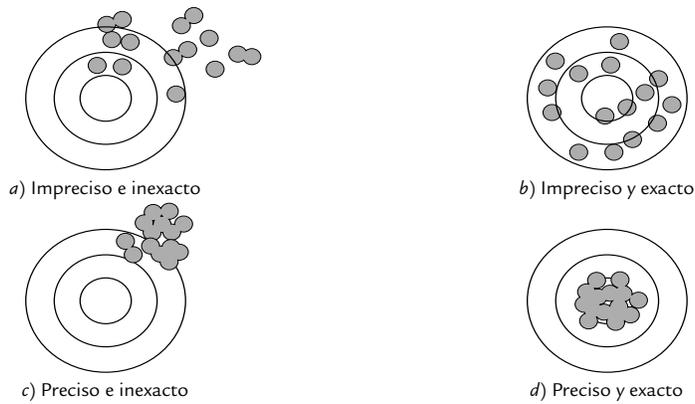


Figura 20. Presición y exactitud a través del tiro al blanco.

a) no deseado, b) no deseado, c) no deseado, d) si deseado pues estamos siendo repetitivos y dando al valor verdadero.

Fuente: Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009.

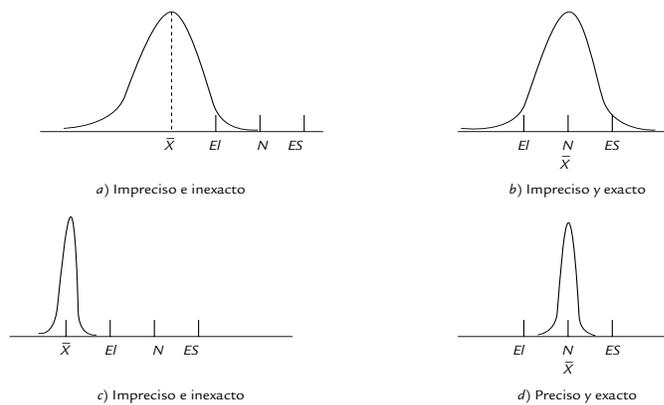


Figura 21. Precisión y exactitud a través de la curva normal.

Como podemos observar la distribución de nuestras mediciones debe estar centrada con la media y los límites de especificación, lo ideal es como se muestra en el último inciso.

Fuente: Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009

Para estudiar la exactitud es preciso contar con un estándar o patrón (ver figura 21), de modo que se pueda suponer conocida la magnitud verdadera a medir. Por ejemplo, si con una balanza, durante cuatro semanas, se pesa 25 veces un objeto

patrón que pesa un kilogramo, entonces la exactitud o sesgo se estima mediante la diferencia entre la media de los 25 datos (\bar{X}) y el verdadero valor (N) del mensurando (un kilo, en este caso). La variabilidad que muestran las mediciones alrededor de un kilogramo es la precisión de la báscula (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

ESTUDIO LARGO DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

Como ya hemos mencionado, la repetibilidad y la reproducibilidad son los componentes de la precisión. La repetibilidad de un instrumento de medición se refiere a la precisión o variabilidad de sus mediciones cuando se obtienen varias mediciones del mismo objeto en condiciones similares (mismo operador); mientras que la reproducibilidad es la precisión o variabilidad de las mediciones del mismo objeto pero en condiciones variables (diferentes operadores) (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009)

En los estudios R&R se evalúa de modo experimental qué parte de la variabilidad total observada en los datos es atribuible al error de medición; además, permite cuantificar si este error es mucho o poco en comparación con la variabilidad del producto y con las tolerancias de la característica de calidad que se mide (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

Las fuentes de variabilidad que se pueden evaluar en un estudio largo de repetibilidad y reproducibilidad son: variabilidad del producto, del instrumento y de los operadores. Sean σ^2_{total} la variabilidad total observada; σ^2_{prod} la varianza atribuible al producto (partes o piezas), σ^2_{instru} la variabilidad o error del instrumento de medición y σ^2_{oper} la variabilidad o error debido a operadores, entonces se cumple la siguiente relación: $\sigma^2_{total} = \sigma^2_{prod} + \sigma^2_{oper} + \sigma^2_{instr}$, así tenemos que $\sigma^2_{instr} = \sigma^2_{repeti}$ y $\sigma^2_{oper} = \sigma^2_{reprod}$ (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

Por lo tanto, el error o variabilidad de las mediciones debido a la repetibilidad y reproducibilidad se obtiene con: $\sigma^2_{R\&R} = \sigma^2_{repeti} + \sigma^2_{reprod}$. (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009). En este trabajo se realiza un estudio de R&R como se describe en la metodología.

Pasos para realizar un estudio R&R largo:

-Seleccionar dos o más operadores para conducir el estudio acerca del instrumento de medición de interés.

-Seleccionar en forma aleatoria un conjunto de 10 o más partes o piezas que serán medidas varias veces por cada operador. Es importante que la selección se realice a partir de piezas que reflejen las diferentes dimensiones de piezas que se producen. Por ejemplo, una buena estrategia de selección sería tomar una pieza de la producción de cada turno.

-Decidir el número de ensayos o veces que cada operador medirá la misma pieza. En este método se deben hacer por lo menos dos ensayos, y tres es lo más recomendable.

-Etiquetar cada parte y aleatorizar el orden en el cual las partes se dan a los operadores. Identificar la zona o punto en la parte donde la medición será tomada, así como el método o técnica que deberá aplicarse.

-Obtener en orden aleatorio la primera medición (o ensayo) del operador *A* para todas las piezas seleccionadas.

-Volver a aleatorizar las piezas y obtener la primera medición del operador *B*.

-Continuar hasta que todos los operadores hayan realizado la primera medición de todas las piezas.

-Repetir los tres pasos anteriores hasta completar el número de ensayos elegidos. Es preciso asegurarse de que los resultados previos de un ensayo no son conocidos por los operadores. Es decir, en cada medición realizada el operador no debe conocer cuál pieza está midiendo, ni cuáles fueron sus mediciones anteriores sobre ella, menos las reportadas por los demás operadores.

-Hacer el análisis estadístico de los datos. Realizar las repeticiones o ensayos operador por operador como se describe en los pasos anteriores puede introducir efectos temporales en la reproducibilidad (variación debida a los operadores), por lo

que otra manera adecuada de obtener los datos es medir en orden completamente aleatorio cada combinación (operador, pieza) para cada repetición (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009). En el presente estudio aplicaremos un análisis de ANOVA para el estudio R&R largo y enseguida se describe.

El análisis de varianza (ANOVA) es un método más efectivo que el de Medias y rangos ya que permite identificar y cuantificar de mejor manera todas las fuentes de variación presentes en el estudio R&R. El método de ANOVA no supone de antemano la inexistencia de interacción *operador* × *parte*, como lo hace el método basado en medias y rangos. De tal forma que cuando hay interacción significativa el método de medias y rangos subestima la magnitud del error de medición ($\sigma_{R\&R}$). En cambio, el método de ANOVA reparte la variación total (σ^2_{total}) de los datos (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

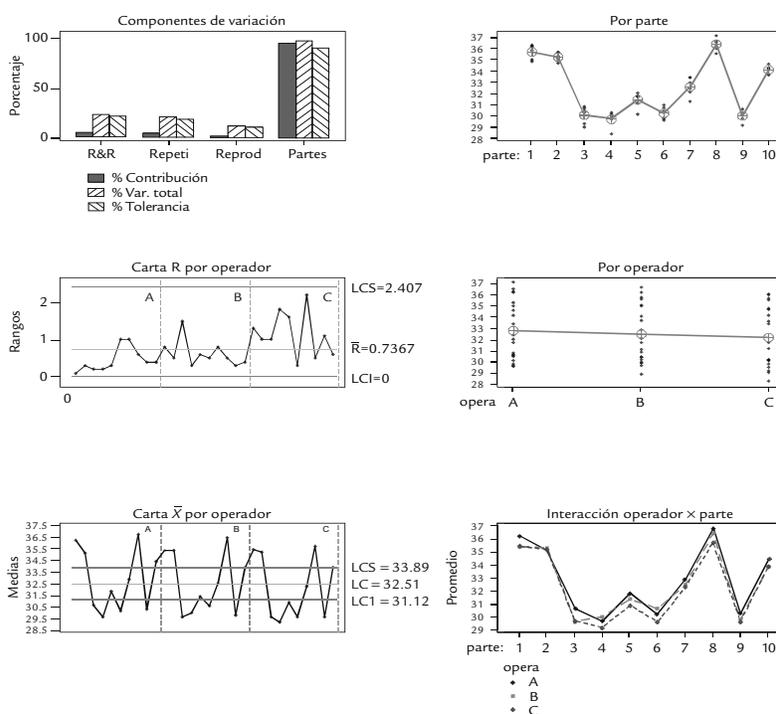


Figura 22. Resultados gráficos de un estudio R&R.

a) Componentes de la variación, b) grafico de las partes, c) gráfico de rangos por operador, d) Gráfico por operador, e) carta de medias por operador y finalmente f) Gráfica para ver la interacción operador-parte.

Fuente:Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009

En la figura 22 se presentan seis gráficos que ayudan a la interpretación de los resultados del estudio R&R. El porcentaje de contribución es el cociente de cada componente de varianza con respecto a la varianza total ($\sigma^2_{\text{comp}}/\sigma^2_{\text{total}}$) índice que provee una interpretación en la escala de las varianzas: si la contribución es menor que 10% el sistema de medición es aceptable, pero se requiere una contribución máxima de 1% para que sea excelente. (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

El estudio nos da mucha información valiosa para tomar decisiones con relación al proceso estudiado. Como vemos en la figura 22 nos presenta 6 tipos de gráficos diferentes y cada uno de ellos nos informan acerca de como se comporta el sistema de medición en cuestión con diferentes enfoques.

Es muy importante poner atención en la relación Presición /Tolerancia y la interpretamos de la siguiente manera:

$P/T \leq 10\%$, excelente proceso de medición

$10\% < P/T \leq 20\%$, bueno

$20\% < P/T \leq 30\%$, marginal (casi inaceptable)

$P/T \geq 30\%$, inaceptable y debe corregirse (Gutiérrez, P. H. y De La Vara, S. R., 2009).

En el presente trabajo vamos a llevar a cabo un análisis de R&R (Repetibilidad y Reproducibilidad) para ver que tan confiable es la implementación del método. En la parte de metodología se especifica con más detalle el diseño de este análisis estadístico.

III. METODOLOGÍA.

El presente trabajo se realizó en área de Diagnóstico Molecular del Laboratorio Estatal de Salud Pública que pertenece a la Dirección de Protección contra Riesgos Sanitarios de la Secretaría de Salud de Gobierno del Estado de Querétaro.

El desarrollo del método se realizó por una química con grado licenciatura, y en la parte del R&R intervinieron dos analistas, la misma química antes mencionada y otra química analista con grado de maestría.

La metodología que implementamos está sujeta a los lineamientos establecidos por el InDRE ya que es nuestro organismo rector en lo referente a pruebas del área de Vigilancia Epidemiológica (incluida la tos ferina) y es la institución de referencia a nivel nacional. El InDRE a su vez se fundamenta en los lineamientos establecidos por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Atlanta desde el año 2011 para PCR-Tr multiplex.

Esta metodología se desarrolla en tres partes:

En la primera (III.1 TEMAS GENERALES DE LA METODOLOGÍA), abordamos temas generales para desarrollar las dos partes siguientes.

En la segunda (III.2 VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO) se describe como se llevó a cabo la implementación del método; donde se realizó el cálculo de UFC/ μ L de la cepa utilizada como referencia (vacuna Dipertix), la curva de regresión lineal, límite de detección, límite de cuantificación y R&R del método de PCR en tiempo real para identificación de *Bordetella pertussis*.

En la tercera parte (III.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS) se realizó la prueba de Selectividad y el procesamiento de las muestras aplicando este método. Dichas muestras fueron de exudados nasofaríngeos del Laboratorio Estatal de Salud Pública de dos departamentos:

1-Muestras del departamento de Diagnóstico Molecular de exudados nasofaríngeos para complementar el diagnóstico que haya sido negativo o no a otros

virus respiratorios (139 muestras recibidas en el LESPQ del 3 de enero de 2013 al 2 de mayo de 2014) las cuales estaban conservadas a -70 °C con su material de ADN ya extraído.

2-Muestras del departamento de Microbiología Clínica que han sido analizadas para búsqueda de *Bordetella pertussis* por el método de cultivo, con la finalidad de comparar ambos resultados: Cultivo y PCR multiplex en tiempo real (en total 92 muestras de las cuales son; 46 casos y 46 contactos, estos últimos sólo pertenecen a los casos que dieron resultado positivo a *Bordetella spp*, recibidas en el LESPQ del 28 de enero de 2013 al 31 de octubre de 2014). Las muestras se conservaron en microtubos de polipropileno con capacidad de 2000 µL con tapa de rosca, en solución salina a -70 °C antes de la extracción de ADN.

Podemos ver la metodología resumida en el siguiente diagrama de flujo (ver figura 23).

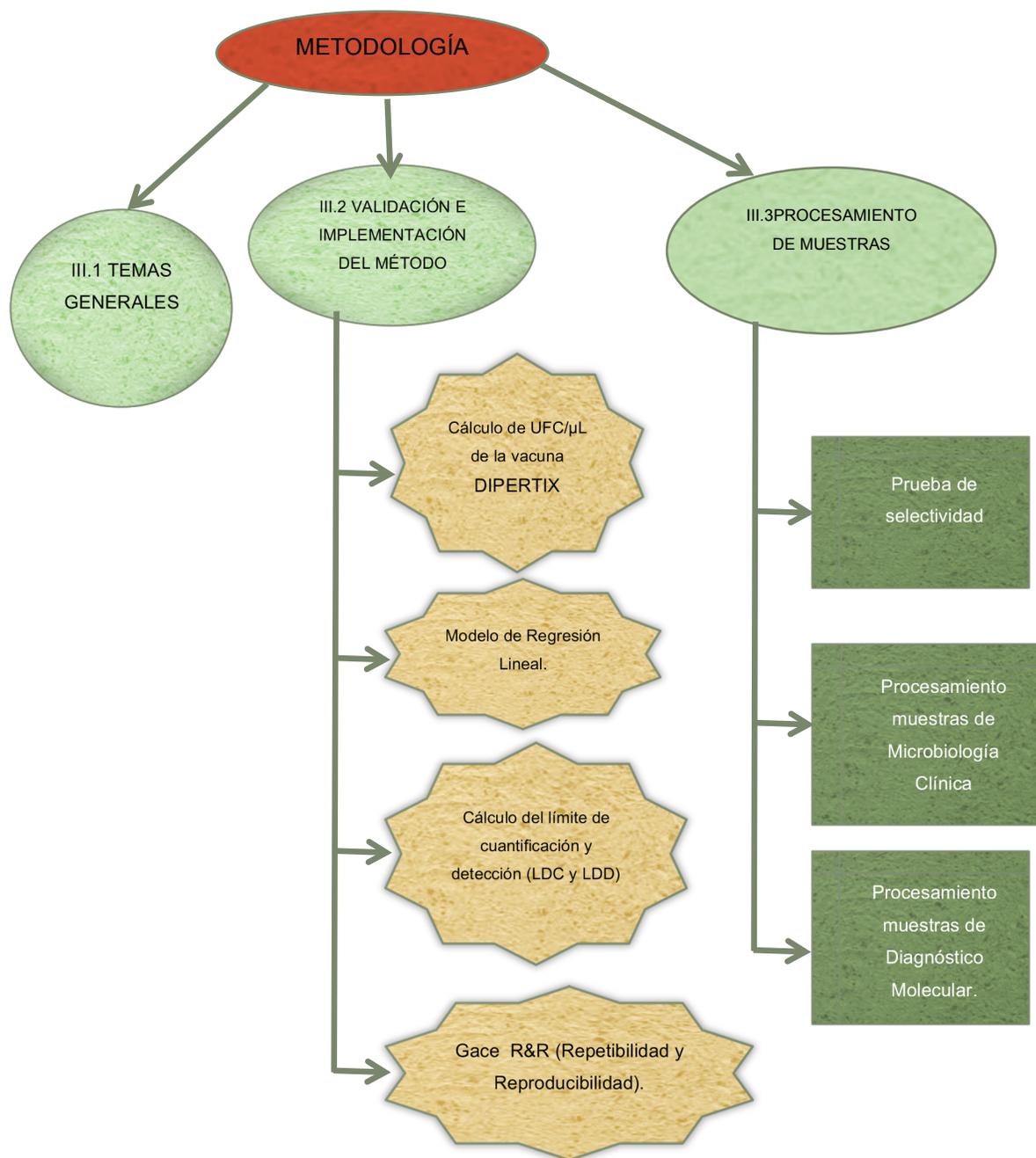


Figura 23. Diagrama de flujo de la metodología.

III.1 TEMAS GENERALES DE LA METODOLOGÍA.

III.1.1. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa de Bordetella pertussis .

Para realizar la curva de regresión lineal, límite de detección, límite de cuantificación, capacidad y R&R se utilizó la vacuna del Sector Salud con las siguientes especificaciones:

Nombre: DIPERTIX (proporcionada por el Centro de Salud de Menchaca I).

Fabricante: Biofarma.

Origen: Indonesia

Fecha de caducidad: diciembre 2014.

Concentración: 4UI de *Bordetella pertussis* .

No. de registro: 578M2004SSAIV.

Cepas de bacterias diferentes a Bordetella spp.

Para la prueba de Selectividad del método se utilizaron diferentes cepas que también afectan las vías respiratorias y que podrían venir en la muestra del paciente adicional o no a la *Bordetella pertussis* :

CUADRO 5. Cepas para la prueba de selectividad.

BACTERIA	PROCEDENCIA	CLAVE
Staphylococcus aureus	Ceparío LESPQ	ATCCBAA1708
Staphylococcus epidermidis	Ceparío LESPQ	ATCC14990
Klebsiella pneumoniae	Ceparío LESPQ	NCTC9633
Pseudomonas aeruginosa	Ceparío LESPQ	ATCC13388
Enterobacter aerogenes	Ceparío LESPQ	ATCC35029
Escherichia coli	Ceparío LESPQ	ATCC25922
Streptococcus pneumoniae	Evaluación del desempeño InDRE	IRAB1402016
Haemophilus influenza	Evaluación del desempeño InDRE	IRAB1402156
Neisseria meningitidis	Evaluación del desempeño InDRE	IRAB1402100

Cepas para controles del método de PCR TR MULTIPLE.

Estas cepas se utilizaron como controles positivos en el PCR-tr multiplex.

CUADRO 6. Cepas para controles positivos de la PCR-tr multiplex.

BACTERIA	PROCEDENCIA
<i>Bordetella pertussis</i>	Vacuna DIPERTIX
<i>Bordetella parapertussis</i>	Evaluación del desempeño InDRE
<i>Bordetella holmesii</i>	Evaluación del desempeño InDRE

MATERIAL GENERAL:

El material que a continuación se enlista es utilizado de rutina para desempeñar cualquier prueba de PCR en el Laboratorio para cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

- Bata desechable para cirujano de manga larga estéril.
- Puntas con filtro estériles de 10 μ L
- Puntas con filtro estériles de 200 μ L
- Puntas con filtro estériles de 1000 μ L
- Microtubos estériles de polipropileno con capacidad de 1500 μ L
- Microtubos estériles de polipropileno con capacidad de 600 μ L
- Microtubos estériles de polipropileno con capacidad de 2000 μ L con tapa de rosca.
- Gradillas de plástico para tubos de 1500 μ L
- Guantes desechables de nitrilo
- Placas de 96 pozos para PCR
- Película adhesiva óptica para tapar placas de 96 pozos.
- Tiras de tapas ópticas de 8 pozos para placas de PCR
- Caja de almacenamiento para criotubos para temperaturas de hasta -70 °C
- Contenedor para puntas desechables
- Marcadores indelebles
- Recipiente MagNA Pure para reactivos con capacidad de 3.5, 20, 30 y 100 mL
- Tapa para Recipiente MagNA Pure para reactivos.
- Puntas largas para el robot MagNA pure.
- Depósito de desechos para Robot MagNA Pure.
- Mascarilla cubre bocas desechables.

-Cofia o cubre pelo desechables

-Cubre zapatos desechables.

EQUIPOS:

Los equipo necesarios y que fueron utilizados en el presente trabajo se enlistan a continuación los cuales forman parte del inventario del Laboratorio Estatal de salud Pública del Estado de Querétaro:

-Termociclador Applied Biosystems 7500 FAST TIEMPO REAL–PCR.

-Robot MAGNA PURE LC 2.0

-Campana de Bioseguridad clase II-A LABCONCO.

-Gabinete para PCR LABCONCO

- Campana de UV 500 CROSSLINKER AMERSHAM

- Campana de Bioseguridad LUMISTELL

-Calentador de bloque en seco multiblock THERMO SCIENTIFIC

- Ultracongelador REVCO (hasta -70 °C)

- Refrigerador SANYO (2-8 °C)

- Refrigerador MABE (2-8 °C)

- Centrífuga 5415D EPPENDORF

- Centrífuga HETICH ROTOFIX 32-A

- Agitador VORTEX GENIE II DAIGGER.

- Microcentrífuga MINISPIN EPPENDORF

- Espectrofotómetro BioRad Smart Spec Plus.

REACTIVOS:

Los siguientes reactivos enlistados sueron utilizados para llevar a cabo nuestra metodología y fueron proporcionados por el Departamento de Diagnóstico Molecular del LESPEQ.

-Estuche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit para extracción de ácidos nucleicos. El cual incluye: Solución de lisis, Proteinasa K, Partículas de vidrio magnéticas, solución de lavado 1, solución de lavado 2, solución de lavado 3 y solución de elusión.

-Agua bidestilada libre de nucleasas.

-TaqMan Gene Expression Master Mix

-Primers y sondas que se especifican en el cuadro 7.

Para la parte de validación se utilizaron sólo los primers y sondas de las secuencias de IS481 y ptxS1.

Para la parte de implementación del método en proceso de muestras y prueba de selectividad; se utilizaron todos los primers y sondas (cuadro 7) en el PCR PCR-tr multiplex.

CUADRO 7. Secuencias y sondas para PCR-tr multiplex.

Secuencia(5' a 3')	Nombre de secuencia	Tamaño del amplicón en pb
CAA GGC CGA ACG CTT CAT	IS481 -F	66
GAG TTC TGG TAG GTG TGA GCG TAA	IS481 -R	
FAM-CA GTC GGC CTT GCG TGA GTG GG -BHQ1	IS481 -P	
GGC GAC AGC GAG ACA GAA TC	hIS1001 -F	67
GCC GCC TTG GCT CAC TT	hIS1001 -R	
Quas670-CG TGC AGA TAG GCT TTT AGC TTG AGC GC -BHQ3	hIS1001 -P	
TCG AAC GCG TGG AAT GG	pIS1001 -F	65
GGC CGT TGG CTT CAA ATA GA	pIS1001 -R	
HEX-AG ACC CAG GGC GCA CGC TGT C -BHQ1	pIS1001 -P	
CGC CAG CTC GTA CTT C	ptxS1 -F	55
GAT ACG GCC GGC ATT	ptxS1 -R	
FAM-AA TAC GTC GAC ACT TAT GGC GA -BHQ1	ptxS1 -P	
CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG	RNaseP -F	80
TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG	RNaseP -R	
FAM-CC CCA GTC TCT GTC AGC ACT CCC TTC -BHQ1	RNaseP -P	

F=Forward, R=Reverse, P=Probe.

Se utilizaron cinco pares de oligonucleótidos iniciadores y sondas específicos, trazables al CDC de Atlanta en Estado Unidos Americanos y al InDRE en México:

Las secuencias del IS481 es positiva para *Bordetella pertussis* y *Bordetella holmesii* , mientras que el juego de primers y sondas correspondientes a la secuencia pIS1001 amplifica sólo para *Bordetella parapertussis*, por otra parte el hIS1001 son positivos únicamente para *Bordetella holmesii* y finalmente el ensayo de ptxS1 amplifica tanto para *Bordetella pertussis* como para *Bordetella parapertussis* (cuadro 8).

CUADRO 8. Algoritmo de PCR con 4 Targets o secuencias, para identificar tres especies de *Bordetella spp.*

FUENTE: InDRE, 2014

Especie	<i>ptxS1</i>	IS481	hIS1001	pIS1001
<i>B. pertussis</i>	+	+	-	-
<i>B. parapertussis</i>	+	-	-	+
<i>B. holmesii</i>	-	+	+	-
<i>B. pertussis</i> y <i>B. parapertussis</i>	+	+	-	+
<i>B. pertussis</i> y <i>B. holmesii</i> *	+	+	+	-

Es importante decir que; el conjunto ptxS1 es específico para la subunidad S1 del gen que codifica para la toxina de pertussis, con una sola copia en *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, mientras que la secuencia IS481 es una secuencia de inserción que se encuentra en múltiples copias por cada célula de *Bordetella pertussis* (50 a 238 copias por genoma) y *B. holmesii* (8 a 10 copias por genoma). Para la secuencia pIS1001 nos ocupa decir que está presente solamente en *B. parapertussis* con 20 a 23 copias por genoma y hIS1001 en *B. holmesii* con 3 a 5 copias por genoma.

Los primers de RNAsa P humana los usamos como un indicador interno de la prueba, que en lo sucesivo llamaremos RP, es una ribonucleoproteína compuesta de

una molécula de RNA y al menos diez subunidades protéicas. La RNAsa P es una endonucleasa que se encuentra en el núcleo de las células humanas (Rosenbland et al., 2006).

En un estudio realizado por Luo y colaboradores en 2005, donde utilizaron el gen de RNAsa P como un control interno para monitorear el control de calidad del proceso de extracción del DNA para la detección de virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 por PCR, donde demostraron la utilidad de los oligonucleótidos y la sonda para la detección de la RNAsa P humana como control interno para medir la calidad de la muestra (origen del la muestra, si se tomó la muestra o no, etc.), la extracción de ácidos nucleicos y para la detección de inhibidores de la reacción de PCR.

La no amplificación del marcador RP, indica que la toma de la muestra, preparación de reactivos, extracción de ADN o el proceso de amplificación fue inadecuado.

Los iniciadores y sondas se recibieron liofilizados. Previo a su uso se hidrataron con agua grado biología molecular para obtener la solución madre de concentración 50X (ver cuadro 9). Ya hidratados los reactivos se almacenan a -70 ° C.

CUADRO 9. Solución Madre de los primers y sondas.

Nombre de secuencia	Solución Madre (50X)
IS481 Forward	650
IS481 Reverse	650
IS481 Probe	150
hIS1001 Forward	650
hIS1001 Reverse	650
hIS1001 Probe	150
pIS1001 Forward	650
pIS1001 Reverse	650
pIS1001 Probe	150
ptxS1 Forward	650
ptxS1 Reverse	650
ptxS1 Probe	150
RP Forward	650
RP Reverse	650
RP Probe	150

La preparación de la mezcla de primers y sondas se realiza de acuerdo al cuadro 10 en un tubo eppendorf para cada juego de primers y sonda por separado y se resguarda como primer mix.

CUADRO 10. Mezcla de primers y sondas.

REACTIVO	Primer mix (volumen en μL)
Agua	282
IS481 Forward	6
IS481 Reverse	6
IS481 Probe	6
Agua	282
hIS1001 Forward	6
hIS1001 Reverse	6
hIS1001 Probe	6
Agua	282
pIS1001 Forward	6
pIS1001 Reverse	6
pIS1001 Probe	6
Agua	282
ptxS1 Forward	6
ptxS1 Reverse	6
ptxS1 Probe	6
Agua	282
RP Forward	6
RP Reverse	6
RP Probe	6

De la preparación de mezcla primers y sondas indicados en el cuadro 10, se preparó la mezcla de reacción para IS481, hIS1001, y pIS1001 en un mismo tubo y separados en un tubo cada uno, para PTXSI y RP ver cuadro 11, 12 y 14.

CUADRO 11. Mezcla de reaccion para IS481, hIS1001 y pIS1001.

MEZCLA DE PRIMER CON SONDAS	VOLUMEN POR REACCIÓN EN μ L
IS481	1.5
hIS1001	1.5
pIS1001	1.5
TaqMan®Gene expression master mix	1.5
Agua	10
Volumen total	16

CUADRO 12. MEZCLA DE REACCION PARA ptx1S.

MEZCLA DE PRIMER CON SONDAS	VOLUMEN POR REACCIÓN EN μ L
Primer mix PtxIS	1.5
TaqMan®Gene expression master mix	10
Agua	4.5
Volumen total	16

CUADRO 13. Mezcla de reaccion para 1S481.

MEZCLA DE PRIMER CON SONDAS	VOLUMEN POR REACCIÓN EN μ L
Primer mix IS481	1.5
TaqMan®Gene expression master mix	10
Agua	4.5
Volumen total	16

CUADRO 14. Mezcla de reaccion para RP.

MEZCLA DE PRIMER CON SONDAS	VOLUMEN POR REACCIÓN EN μ L
Primer mix RP	1.5
TaqMan®Gene expression master mix	10
Agua	4.5
Volumen total	16

III.1.2. EXTRACCIÓN DE ADN.

Extracción de ADN se realizó de dos maneras: Manual y Automatizada. El principio de ambas extracciones es el mismo, el cual se ilustra en la figura 24.

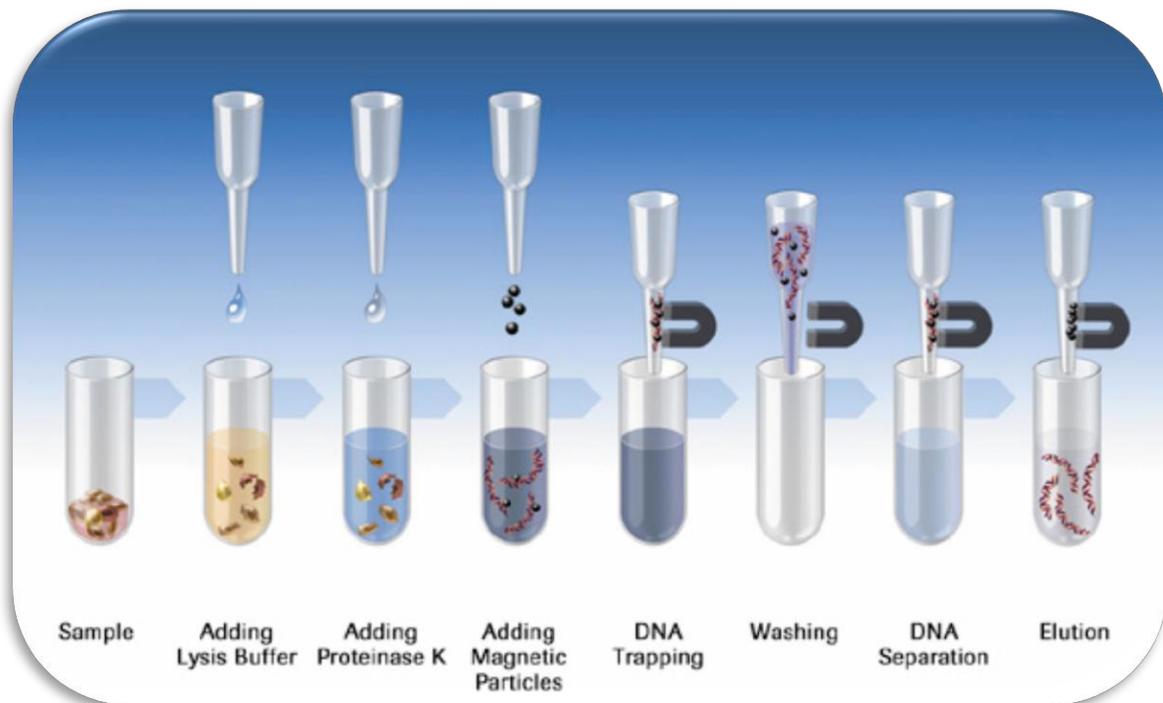


Figura 24. Extracción de ADN.

FUENTE: ROCHE, 2008.

EXTRACCIÓN DE ADN MANUAL.

La extracción manual se realizó para todas las muestras de la vacuna DIPERTIX, controles positivos, muestras de cepas diferentes a *Bordetella spp* para la

prueba de selectividad (cuadro 5) y para las muestras de casos, en una Campana de Bioseguridad clase II-A LABCONCO (ver figura 25), como se describe en el Instructivo de Extracción de Ácidos Nucleicos con el estuche *MagNA Pure Total NA Isolation Kit*.



Figura 25. Extracción manual en campana de bioseguridad clase II-A LABCONCO.

FUENTE: LESPQ, 2014

EXTRACCIÓN DE ADN AUTOMATIZADA

La extracción automatizada de ADN se realizó para las muestras de contactos, de los casos que dieron positiva la prueba de PCR TR multiplex, en el robot Magna

Pure LC 2.0 (figura 26) y como se describe en el Instructivo de Extracción de Ácidos Nucleicos con el estuche *MagNA Pure Total NA Isolation Kit*.

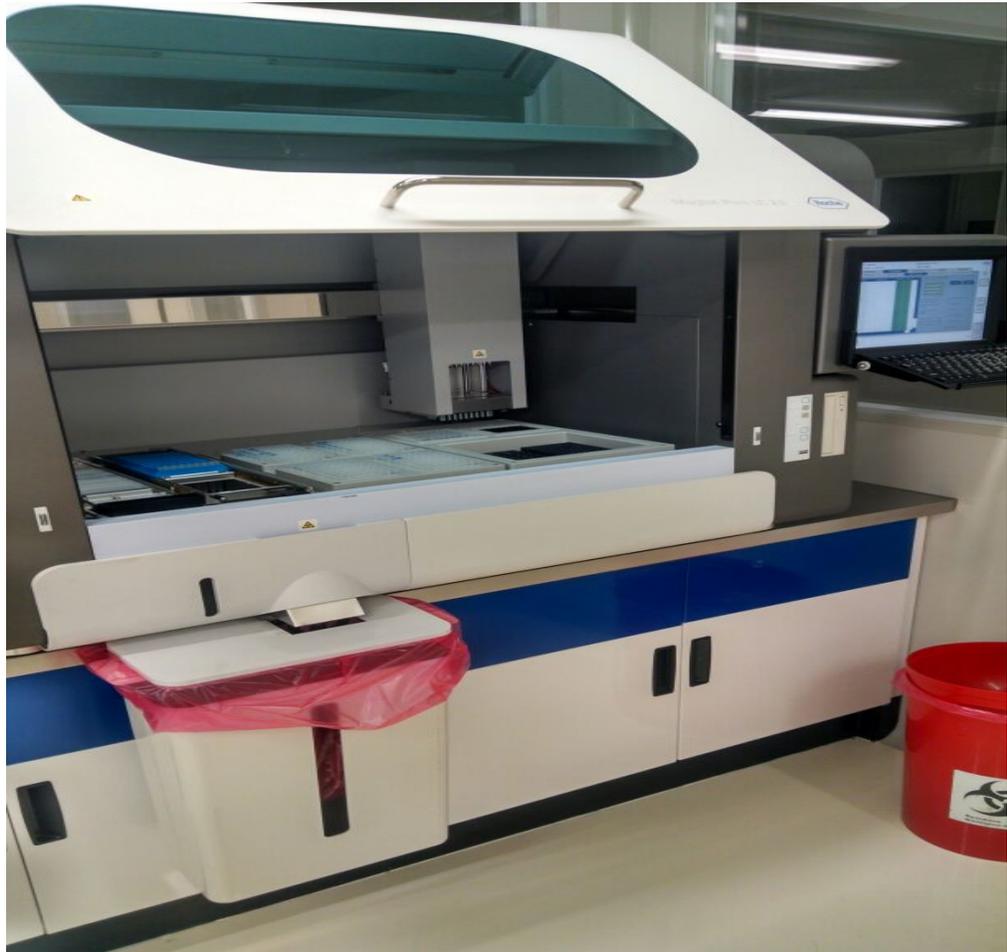


Figura 26. Robot para extracción automatizada de ADN

FUENTE: LESPQ, 2014

III.1.3. PREPARACIÓN PARA REALIZAR EL PCR-TR

Condiciones de almacenamiento de los reactivos para PCR-TR

Todos los reactivos en uso cotidiano se deben almacenar a 4° C.

Los iniciadores y las sondas se reciben liofilizados y deben almacenarse a una temperatura de 2 a 8 °C. Previo a su uso deben hidratarse con agua grado biología molecular, la concentración final, se indica en el cuadro 9 para obtener la concentración de trabajo, la cual se almacena a -70 °C. Mezclar con la punta de la micropipeta (cargar y descargar la micropipeta aproximadamente 20 veces). Ya hidratados los reactivos se mezclan ambos primers con su respectiva sonda de acuerdo al cuadro 10 y se almacenan en alícuotas a una temperatura de 2 a 8 °C.

Preparación de la mezcla de reacción para PCR-tr multiplex.

Mantener todos los reactivos en bloques de enfriamiento para tubos durante todo el montaje de la prueba. La preparación de la mezcla de reacción se realizó de acuerdo al cuadro 11, 12, 13 y 14, estos valores sólo son para una reacción, se deben realizar los cálculos de acuerdo al número de muestras que se vayan a trabajar, además se deben considerar los controles positivos y negativo por cada corrida de PCR-tr multiplex.

Adición de moldes a la mezcla de reacción.

Este procedimiento se realizó de dos maneras:

1.-Se distribuyeron los primers en la placa de la misma forma para la curva de regresión lineal, límite de detección, límite de cuantificación y R&R. Después de preparar la mezcla de reacción para cada juego de iniciadores y sondas, se dispensan en cada pozo 16 µL de esta mezcla de reacción y 4 µL de muestra con una micropipeta

este procedimiento se debe de efectuar para cada una de las mezclas de primers y sondas de IS481 y ptxIS.

2.-La otra manera de distribuir los primers (IS481, ptxS1, hIS1001, pIS1001, RP) fue para las pruebas de selectividad y el procesamiento de las muestras (procedentes del Departamento de Microbiología Clínica y Diagnóstico molecular).

A continuación explicaremos a detalle como se realizó cada prueba de manera particular (en los apartados III.2 y III.3)

III.2 VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO.

En cada corrida de PCR en tiempo real de esta etapa se analizaron muestras de concentración inicial conocida, para esto utilizamos como muestra la vacuna DIPERTIX.

Para saber la cantidad de UFC en la vacuna se realizó lectura de la suspensión en un espectrofotómetro BioRad Smart Spec Plus a 550nm de longitud de onda y se extrapoló a una curva de MacFarland, la cual nos indicó que una concentración de 4 UI de suspensión de vacuna es equivalente a 4.8×10^6 UFC/ μ L de *Bordetella pertussis* .

Es importante declarar que el termociclador se calibra de acuerdo al instructivo DIM-I-001 Calibración del termociclador 7500 fast de applied biosystems y que todo el equipo de medición volumétrico utilizado (las pipetas automáticas) para el proceso, se verifican de acuerdo al Instructivo de verificación de micropipetas DIM-I-003.

III.2.1.CURVA DE REGRESIÓN LINEAL.

La curva de regresión lineal se realizó haciendo 10 diluciones por cuatuplicado partiendo de la vacuna Dipertix (la cual contiene 4,800,000 UFC/ μL de *Bordetella pertussis*). La vacuna se tomó como dilución 10^0 , se homogenizó en vortex y de ahí tomamos 10 μL en 900 μL de buffer de fosfatos, contenidos en microtubos de polipropileno con capacidad de 2000 μL con tapa de rosca, y así sucesivamente hasta la dilución 10^{10} como se muestra en la figura 27.

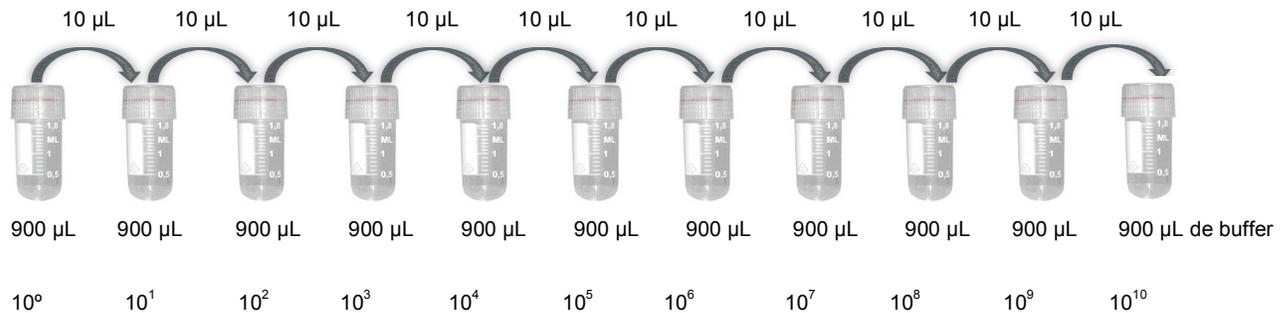


Figura 27. Diluciones de trabajo de la vacuna DIPERTIX.

Fuente: LESPEQ, 2014.

Se realizó extracción manual de ADN de cada dilución y se midió el Ct en el termociclador, de la siguiente manera:

Colocar la mezcla de primers IS481 y ptx1S (16 μL en cada pozo, cada primer en pozo diferente) comenzando de arriba hacia abajo en la columna correspondiente como se indica en el cuadro 15.

Posteriormente se colocó 4.0 μL de agua grado biología molecular en los pozos 1A y 2A, esto servirá como control negativo (NTC, Negative Template Control). Cada placa se cubrió con una tapa para placa con la finalidad de proteger de la luz y contaminación, manteniendo en temperatura de refrigeración hasta su uso.

CUADRO 15. Colocación de los primers IS481 y ptxS1 en una placa para PCR de 96 pozos.

	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481
	Número de pozo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼

Se añadieron 4.0 μL de la extracción de cada dilución de tal manera que tenemos 10^0 en M1 y así sucesivamente hasta la dilución 10^{10} en M10, por cuatro repeticiones (ver cuadro 16), para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 16 μL , este paso se realiza en un gabinete de bioseguridad tipo II en el área de ensamble (ver figura 28)



Figura 28. Area de ensamble.

Fuente: LESP, 2015.

CUADRO 16. Colocación de las extracciones de las diluciones en la placa de PCR.

	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481
	Número de pozo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	M8	M8	M5	M5	M2	M2	M10	M10	M7	M7
B	M1	M1	M9	M9	M6	M6	M3	M3	NTC	NTC	M8	M8
C	M2	M2	M10	M10	M7	M7	M4	M4	M1	M1	M9	M9
D	M3	M3	NTC	NTC	M8	M8	M5	M5	M2	M2	M10	M10
E	M4	M4	M1	M1	M9	M9	M6	M6	M3	M3	NTC	NTC
F	M5	M5	M2	M2	M10	M10	M7	M7	M4	M4		
G	M6	M6	M3	M3	NTC	NTC	M8	M8	M5	M5		
H	M7	M7	M4	M4	M1	M1	M9	M9	M6	M6		

Finalmente, tapar la placa con una película adherible protectora de contaminación o evaporación de los ácidos nucleicos. Trasladar la placa de microtubos con una cubierta, al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real (Applied Biosystems 7500 Fast). Centrifugar la placa antes de introducirla al termociclador de manera manual de una sola vez, para que todo el líquido baje al fondo.

Programar el termociclador previamente para realizar corridas de PCR -TR en la plantilla de diagnóstico de Bordetella en el equipo ABI 7500 Fast Dx, de acuerdo al Instructivo del equipo.

Una vez concluida la corrida de la placa poner el umbral de lectura en la gráfica en 14,000. La gráfica se pone en función logarítmica y se toman las lecturas de Ct de cada dilución y para cada primer (ver la figura 29 como ejemplo).

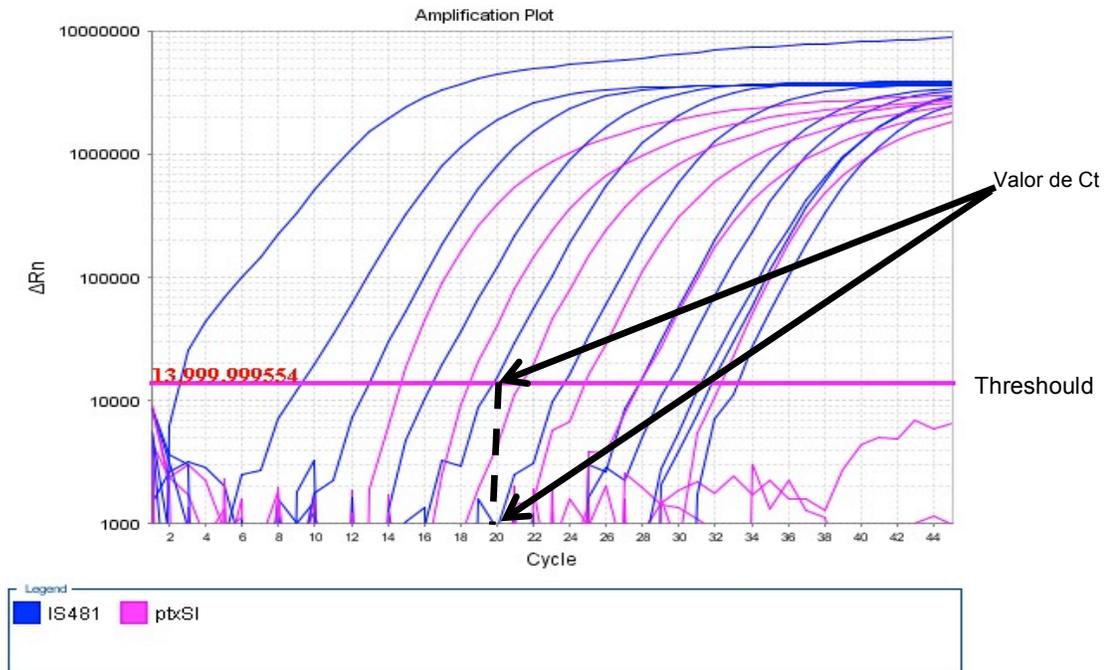


Figura 29. Lectura del Ct con el Threshold o Umbral.

Fuente: LESPEQ, 2014

Para cada muestra, el número de ciclos necesarios para interceptar el valor umbral se llama “ciclo umbral” o “threshold *cycle*” (Ct). El Ct es inversamente proporcional al número de copias iniciales del ADN muestra. Por tanto, se graficó el logaritmo de la cantidad inicial de ADN del estándar (vacuna Dipertix) de concentración conocida versus el Ct (el promedio de las cuatro lecturas) y se obtuvo como resultado una línea recta para cada uno de los primers IS481 y ptxS1 de donde se origina una ecuación con pendiente negativa, que representa el comportamiento de cada uno de los primers. Con estos datos se llenan los formatos de los cuadros 17 y 18.

CUADRO 17. Resultados de las lecturas de Ct para IS481.

No. de dilución	UFC/ μ L	Lecturas de Ct para IS481.			
		Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4
10^0	4,800,000				
10^{-1}	480,000				
10^{-2}	48000				
10^{-3}	4800				
10^{-4}	480				
10^{-5}	48				
10^{-6}	4.8				
10^{-7}	0.48				
10^{-8}	0.048				
10^{-9}	0.0048				
10^{-10}	0.00048				

CUADRO 18. Resultados de las lecturas de CT para ptx1S.

No. de dilución	UFC/ μ L	Lecturas de CT para ptx1S.			
		Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4
10^0	4,800,000				
10^{-1}	480,000				
10^{-2}	48000				
10^{-3}	4800				
10^{-4}	480				
10^{-5}	48				
10^{-6}	4.8				
10^{-7}	0.48				
10^{-8}	0.048				
10^{-9}	0.0048				
10^{-10}	0.00048				

Realizamos el análisis de los datos para la regresión lineal con el software estadístico Minitab.

III.2.2. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

En este apartado estamos determinando el rango dinámico de cuantificación y detección de nuestro método, requisito indispensable para publicar resultados de calidad el cual se espera sea diferente para ambos primers ya que el número de secuencias de cada uno es diferente en la misma bacteria.

Límite de detección y cuantificación del primer IS481.

Toda vez que se analizó la lectura de Ct hasta la dilución 10^{-10} nos dimos cuenta que el primers IS481 se comportó, hasta la dilución 10^{-8} , linealmente al graficar el logaritmo de la cantidad inicial de ADN del estándar (vacuna Dipertix) de concentración conocida versus el Ct (el promedio de las cuatro lecturas) y en las subsecuentes diluciones (10^{-9} y 10^{-10}) se comportó de manera no esperada, en algunas de las lecturas de estas diluciones no dio valor. Esto nos hizo saber que el límite de cuantificación está en la dilución 10^{-8} y el límite de detección entre las diluciones 10^{-8} y 10^{-9} para encontrar este último, realizamos diluciones de la dilución 10^{-8} en quintuplicados.

Las diluciones se realizaron del eluente ya extraído con ADN de la dilución 10^{-8} de la siguiente manera: Se hicieron 2 diluciones de la dilución 10^{-8} , En la primera se tomaron 25 μL de esta dilución (10^{-8}) y se agregaron a un tubo eppendorf con 75 μL de solución de buffer de fosfatos a la cual se le llamó dilución 25%. La segunda dilución se realizó tomando 15 μL de la dilución 10^{-8} y se agregaron a un tubo eppendorf con 85 μL de solución de buffer de fosfatos a la cual se le llamó dilución 15%. La tercera y última dilución, se realizó tomando 10 μL de la dilución 10^{-8} y se agregaron a un tubo eppendorf con 90 μL de solución de buffer de fosfatos a la cual se le llamó dilución 10%. Estos datos se vaciaron en el formato del cuadro 19.

CUADRO 19. Resultados de las lecturas de Ct para el límite de detección del IS481.

Lecturas de Ct para IS481.						
Nombre de dilución	UFC/ μ L	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5
25% de 10^{-8}	0.012					
15% de 10^{-8}	0.0072					
10% de $10^{-8} = 10^{-9}$	0.0048					

Límite de detección y cuantificación del primer ptx1S.

Toda vez que se analizó la lectura de CT hasta la dilución 10^{-10} nos dimos cuenta que los primers ptx1S se comportó, hasta la dilución 10^{-6} , linealmente al graficar el logaritmo de la cantidad inicial de ADN del estándar (vacuna Dipertix) de concentración (UFC/ μ L) conocida versus el Ct (el promedio de las cuatro lecturas) y en las subsecuentes diluciones (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10}) se comportó de manera no esperada, en algunas de las lecturas de estas diluciones no dio un valor. Esto nos hizo saber que el límite de cuantificación está en la dilución 10^{-6} y para encontrar el límite de detección que ahora sabemos, está entre las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} , se realizaron otras diluciones del estándar 10^{-6} (vacuna Dipertix) en quintuplicados.

Las diluciones se realizaron del eluente ya extraído con ADN de la dilución 10^{-6} de la siguiente manera: Se hicieron 3 diluciones : En la primera se tomaron 25 μ L de esta dilución (10^{-6}) y se agregaron a un tubo eppendorf con tapa con 75 μ L de solución de buffer de fosfatos a la cual se le llamó dilución 25%. La segunda dilución se realizó tomando 15 μ L de esta dilución (10^{-6}) y se agregaron a un tubo eppendorf con tapa, con 85 μ L de solución de buffer de fosfatos a la cual se le llamó dilución 15%. La tercera y última dilución, se realizó tomando 10 μ L de esta dilución (10^{-6}) y se agregaron a un tubo eppendorf con tapa, con 90 μ L de solución de buffer de fosfatos a la cual se le llamó dilución 10% . Los datos obtenidos se vaciaron en el formato del cuadro 20.

CUADRO 20. Resultados de las lecturas de Ct para el límite de cuantificación del ptx1S.

		Lecturas de Ct para ptx1S.				
Nombre de dilución	UFC/ μ L	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5
25% de 10^{-6}	1.2					
15% de 10^{-6}	0.72					
10% de $10^{-6}=10^{-7}$	0.0048					
10^{-8}	0.048					

III.2.3. R&R : REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

Se realizó un análisis de Repetibilidad y Reproducibilidad largo y cruzado para cada uno de los primers (ptx1S y IS481, cada uno con 8 diluciones de vacuna) con dos operadores y 3 repeticiones de cada uno. Las lecturas de las extracciones de ADN se realizaron en el Termociclador con los dos primers, utilizando una placa de 96 pozos para PCR, Las diluciones se organizaron de acuerdo al cuadro 21.

CUADRO 21. Colocación de las extracciones de las diluciones en la placa de PCR.

	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481	ptxS1	IS481
	Número de pozo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	M8	M8	M7	M7	M6	M6				
B	M1	M1	NTC	NTC	M8	M8	M7	M7				
C	M2	M2	M1	M1	NTC	NTC	M8	M8				
D	M3	M3	M2	M3	M1	M1						
E	M4	M4	M3	M3	M2	M2						
F	M5	M5	M4	M4	M3	M3						
G	M6	M6	M5	M5	M4	M4						
H	M7	M7	M6	M6	M5	M5						

R&R para el primer IS481.

Cada operador realizó las diluciones como se indica en la figura 27 y realizó extracciones de ADN por triplicado, de forma manual de las diluciones; 10^{-1} hasta la 10^{-8} (diluciones de la curva de regresión) las cuales se pusieron en una placa de PCR de 96 pozos por triplicado para su corrida en el termociclador como se indica en el cuadro 21 y se registraron en el formato del cuadro 22.

CUADRO 22. Resultados de las lecturas de Ct para la prueba de R&R para el primer IS481.

		Lecturas de Ct para IS481.					
No. de dilución	UFC/ μ L	Lectura 1		Lectura 2		Lectura 3	
		Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2
10^{-1}	480,000						
10^{-2}	48000						
10^{-3}	4800						
10^{-4}	480						
10^{-5}	48						
10^{-6}	4.8						
10^{-7}	0.48						
10^{-8}	0.048						

Posteriormente el análisis estadístico de los datos para el R&R se hizo en el software estadístico Minitab.

R&R para el primer ptx1S.

Cada operador realizó las diluciones como se indica en la figura 27 y realizó extracciones de ADN, por triplicado, de forma manual de las diluciones; 10^{-1} hasta la 10^{-6} (diluciones de la curva de regresión) las cuales se pusieron en una placa de PCR de 96 pozos por triplicado para su corrida en el termociclador como se indica en el cuadro 21 y se registraron en el formato del cuadro 23.

CUADRO 23. Resultados de las lecturas de Ct para la prueba de R&R para el primer ptx1S.

		Lecturas de Ct para ptx1S.					
No. de dilución	UFC/ μ L	Lectura 1		Lectura 2		Lectura 3	
		Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2
10^{-1}	480,000						
10^{-2}	48000						
10^{-3}	4800						
10^{-4}	480						
10^{-5}	48						
10^{-6}	4.8						

Posteriormente el análisis estadístico de los datos para el R&R se hizo en el software estadístico Minitab.

III.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.

Una vez que se validó e implementó el método para la detección de *Bordetella pertussis* con los primers IS481 y ptx1S, se procesaron las muestras con este método utilizando éstos y también otros primers (hIS1001, pIS1001 y RP) para diferenciar de las especies de *Bordetella* (*pertussis*, *parapertussis* y *holmesii*) que pudieran estar presentes en la muestra clínica, este es el motivo por lo que se llama PCR en tiempo real Multiplex (porque se utiliza más de un primers en el mismo pozo).

Como ya lo mencionamos al inicio de esta metodología se procesaron muestras procedentes de dos diferentes departamentos del LESPQ:

1-Muestras del departamento de Diagnóstico Molecular de exudados nasofaríngeos para complementar el diagnóstico que haya sido negativo a otros virus respiratorios.

2-Muestras del departamento de Microbiología Clínica que han sido analizadas para búsqueda de *Bordetella pertussis* por el método de cultivo, con la finalidad de comparar ambos resultados: Cultivo y PCR-tr multiplex.

Con este método también se hizo la prueba de selectividad para las extracciones de ADN de las cepas del cuadro 5 (bacterias que pueden estar en las vías respiratorias y se probó con esta prueba que no interfieren en la identificación de *Bordetella pertussis* por este método).

III.3.1. PRUEBA DE SELECTIVIDAD.

Se realizó extracción manual de ADN de las cepas del cuadro 5 y se midió el Ct de la siguiente manera:

En esta parte de la metodología se utilizan la mezcla de los primers como se prepara en los cuadros 11, (IS481, hIS1001, pIS1001 esta mezcla de primers va en el mismo pozo pues cada una de sus sondas amplifican en diferente longitud de onda y no se cruzan las señales, por lo que se pueden distinguir perfectamente),¹² (ptx1S) y

14 (RP). Colocar la mezcla de primers (16 μ L en cada pozo) comenzando de arriba hacia abajo en la columna correspondiente como se indica en el cuadro 24.

CUADRO 24. Colocación de los primers IS481, hIS1001, pIS1001, ptxS1 y RP para el PCR-triplex, en una placa de 96 pozos para lectura de cepas para prueba de selectividad.

	ptxS1	IS481	RP	ptxS1	IS481	RP	ptxS1	IS481	RP	ptxS1	IS481	RP
		hIS1001			hIS1001			hIS1001			hIS1001	
		pIS1001			pIS1001			pIS1001			pIS1001	
	Número de pozo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC									
B			
C									
D			
E			
F									
G			
H	▼	▼▼▼	▼	▼	▼▼▼	▼	▼	▼▼▼	▼	▼	▼▼▼	▼

Posteriormente se colocó 4.0 μ L de agua grado biología molecular en los pozos 1A, 2A, 3A, esto sirvió como control negativo (NTC, Negative Template Control).

Cada placa se cubrió con una tapa para placa con la finalidad de proteger de la luz y contaminación, manteniendo en temperatura de refrigeración hasta su uso.

Se añadieron 4.0 μ L de la extracción de cada bacteria, de tal manera que tenemos la primera muestra en: 1B, 2B y 3B, la segunda muestra en: 1C, 2C Y 3C y así sucesivamente por dos repeticiones de cada cepa (ver cuadro 25), se obtuvo un volumen final de mezcla de reacción de 20 μ L, este paso se realiza en un gabinete de bioseguridad tipo II, en área de Ensamble (Figura 28).

Para identificar las muestras en la corrida se nombraron con sus abreviaturas de género y especie.

Así por ejemplo si tenemos las muestras staphylococcus aureus (S. au), Klebsiella pneumoniae (K. pn), etc. y quedarían como se muestra en el cuadro 25.

En los pozos asignados para las últimas tres muestras se adicionan las extracciones de los controles positivos de *Bordetella pertussis* (C+ p), *Bordetella parapertussis* (C+ pp) y *Bordetella holmesii* (C+ h), para ver el control de calidad nuestra amplificación.

CUADRO 25. Colocación de las extracciones, de las las cepas para la prueba de selectividad, en la placa de PCR.

	IS481			IS481			IS481			IS481		
	ptxS1	hIS1001	RP	ptxS1	hIS1001	RP	ptxS1	hIS1001	RP	ptxS1	hIS1001	RP
		pIS1001			pIS1001			pIS1001			pIS1001	
	Número de pozo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC									
B	S. au	S. au	S. au									
C	K. pn	K. pn	K. pn									
D	Etc	etc	etc									
E												
F										C+ p	C+ p	C+ p
G										C+pp	C+pp	C+pp
H	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	C+ h	C+ h	C+ h

Finalmente, tapar la placa con una película adherible protectora de contaminación o evaporación de los ácidos nucleicos. Trasladar la placa de microtubos cubierta con su tapa, al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real (Applied Biosystems 7500 Fast).

Centrifugar la placa antes de introducirla al termociclador de manera manual de una sola vez, para que todo el líquido baje al fondo.

Programar el termociclador previamente para realizar corridas de PCR-tr multiplex en la plantilla de diagnóstico de Bordetella en el equipo ABI 7500 Fast Dx.

Una vez concluida la corrida de la placa poner el umbral de lectura en la gráfica en 14,000. La gráfica se pone en función logarítmica y se toman las lecturas de Ct de cada cepa, En esta prueba esperamos que sólo amplifiquen los controles.

III.3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS .

Es importante mencionar que la prueba para las muestras clínicas es cualitativa y por lo tanto se reporta como POSITIVO o NEGATIVO.

Se realizó extracción manual de ADN para los casos y para los contactos se realizó extracción automatizada. Para las muestras de exudados nasofaríngeos y que dieron negativas a virus respiratorias ya se tenía la extracción, se midió el Ct de la siguiente manera:

Se utilizó la mezcla de los primers como se prepara en los cuadros 11, (IS481, hIS1001, pIS1001, esta mezcla de primers va en el mismo pozo, pues cada una de sus sondas amplifican en diferente longitud de onda y no se cruzan la señal por lo que se pueden distinguir perfectamente), 12 (ptx1S) y 14 (RP) Estos dos últimos van en pozos separados. Colocar la mezcla de primers (16 µL en cada pozo) comenzando de arriba hacia abajo en la columna correspondiente como se indica en el cuadro 26.

CUADRO 26. Colocación de los primers IS481, hIS1001, pIS1001, ptxS1 y RP para el PCR-TR MULTIPLEX en una placa de 96 pozos para lectura de muestras clínicas.

	ptxS1	IS481	RP	ptxS1	IS481	RP	ptxS1	IS481	RP	ptxS1	IS481	RP
		hIS1001			hIS1001			hIS1001			hIS1001	
		pIS1001			pIS1001			pIS1001			pIS1001	
	Número de pozo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC									
B			
C	.	.	.									
D			
E			
F	.	.	.									
G			
H	∇	∇ ∇ ∇	∇	∇	∇ ∇ ∇	∇	∇	∇ ∇ ∇	∇	∇	∇ ∇ ∇	∇

Posteriormente se colocó 4.0 µL de agua grado biología molecular en los pozos 1A, 2A, 3A, esto sirvió como control negativo (NTC, Negative Template Control).

Cada placa se cubrió con una tapa para placa con la finalidad de proteger de la luz y contaminación, manteniendo en temperatura de refrigeración hasta su uso.

Se añadieron 4.0 µL de la extracción de cada muestra, de tal manera que tenemos la primera muestra 1B, 2B y 3B, la segunda muestra en 1C, 2C Y 3C y así sucesivamente (ver cuadro 27), se obtuvo un volumen final de mezcla de reacción de 20 µL, este paso se realiza en un gabinete de bioseguridad tipo II.

Para identificar las muestras en la corrida se nombraron con sus números de clave, asignado en su momento por el departamento de Recepción de muestras del LESPQ.

Así por ejemplo si tenemos las muestras con claves: 1324, 1325, 1326, etc. quedarían como se muestra en el cuadro 27.

En los pozos asignados para las últimas tres muestras se adicionan las extracciones de los controles positivos de *Bordetella pertussis* (C+ p), *Bordetella parapertussis* (C+ pp) y *Bordetella holmesii* (C+ h), para ver el control de calidad de las mezclas de reacción que si amplifican para las cadenas de ADN que esperamos.

CUADRO 27. Colocación de las extracciones, de las cepas para la prueba de selectividad, en la placa de PCR.

	ptxS1	IS481 hIS1001	RP	ptxS1	IS481 pIS1001	RP	ptxS1	IS481 hIS1001	RP	ptxS1	IS481 pIS1001	RP
Número de pozo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█
B	1324	1324 █ █ █	1324 █	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█
C	1325	1325 █ █ █	1325 █	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█
D	1326	1326 █ █ █	1326 █	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█
E	Etc	etc █ █ █	etc █	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█
F	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	C+ p	C+ p █ █ █	C+ p █
G	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	█	█ █ █	█	C+pp	C+pp █ █ █	C+pp █
H	▼	▼ █ █ █	▼ █	▼	▼ █ █ █	▼	▼	▼ █ █ █	▼	C+ h	C+ h █ █ █	C+ h █

Finalmente, tapar la placa con una película adherible protectora de contaminación o evaporación de los ácidos nucleicos. Trasladar la placa de microtubos cubierta con su tapa, al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real (Applied Biosystems 7500 Fast).

Centrifugar la placa antes de introducirla al termociclador de manera manual de una sola vez, para que todo el líquido baje al fondo.

Programar el termociclador previamente para realizar corridas de PCR TR en la plantilla de diagnóstico de *Bordetella* en el equipo ABI 7500 Fast Dx.

Una vez concluida la corrida de la placa poner el umbral de lectura en la gráfica en 14,000. La gráfica se pone en función logarítmica y se toman las lecturas de Ct de cada muestras.

Los resultados esperados para controles positivos y negativo, de acuerdo a las gráficas que nos arroja el termociclador, se observan en las figuras 30, 31, 32 y 33.

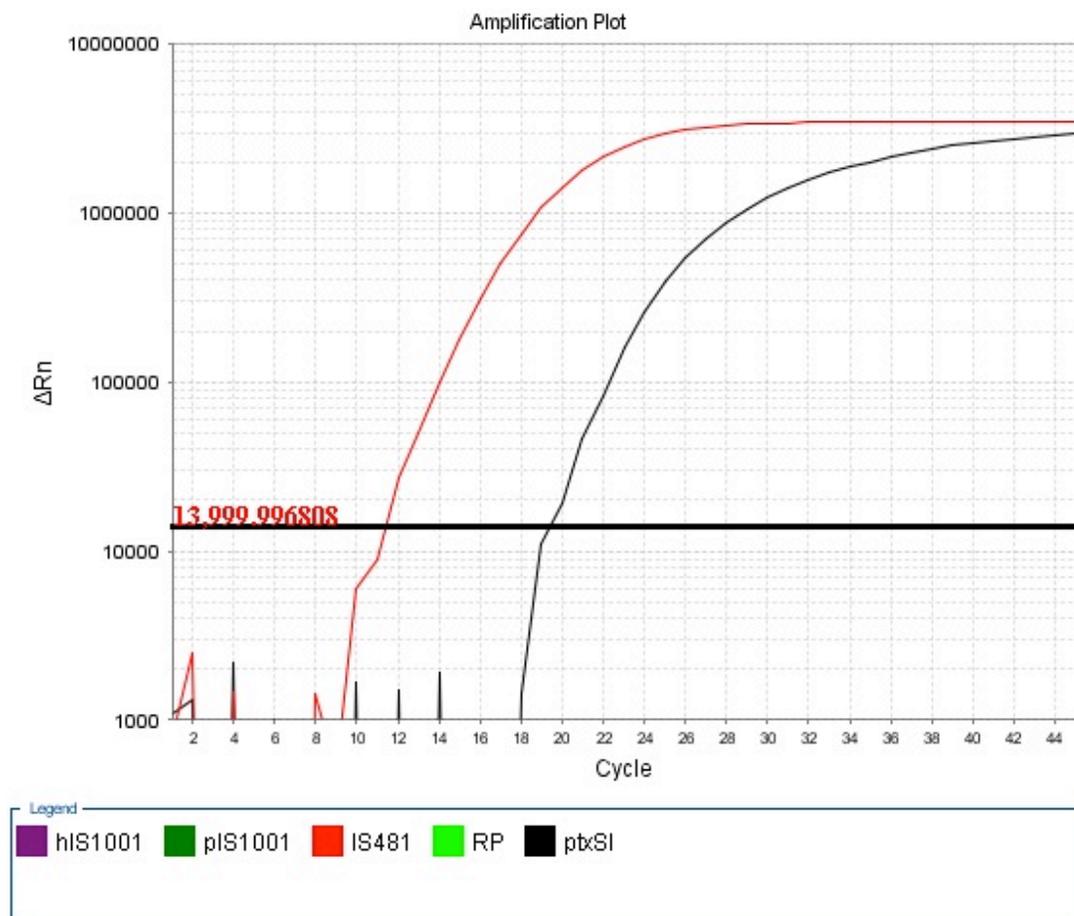


Figura 30. Control Positivo a *Bordetella pertussis* (cepa)

En la figura 30 estamos mostrando la gráfica que esperamos para un control positivo a *Bordetella pertussis*, esta gráfica nos indica las curvas de amplificación de los primers específicos para esta bacteria: el color rojo nos indica la presencia del primer IS481, mientras que la señal negra nos indica la presencia del segmento de ADN correspondiente al primer ptxS1 y la presencia de ambos a la vez nos indican que es *Bordetella pertussis* positivo.

La figura 31 nos muestra la huella digital para una *Bordetella parapertussis* la cual debe presentar la amplificación de los primers: PIS1001 que es específico para la especie parapertussis y el ptxS1 el cual como podemos ver es un primer que comparte con la *Bordetella pertussis*.

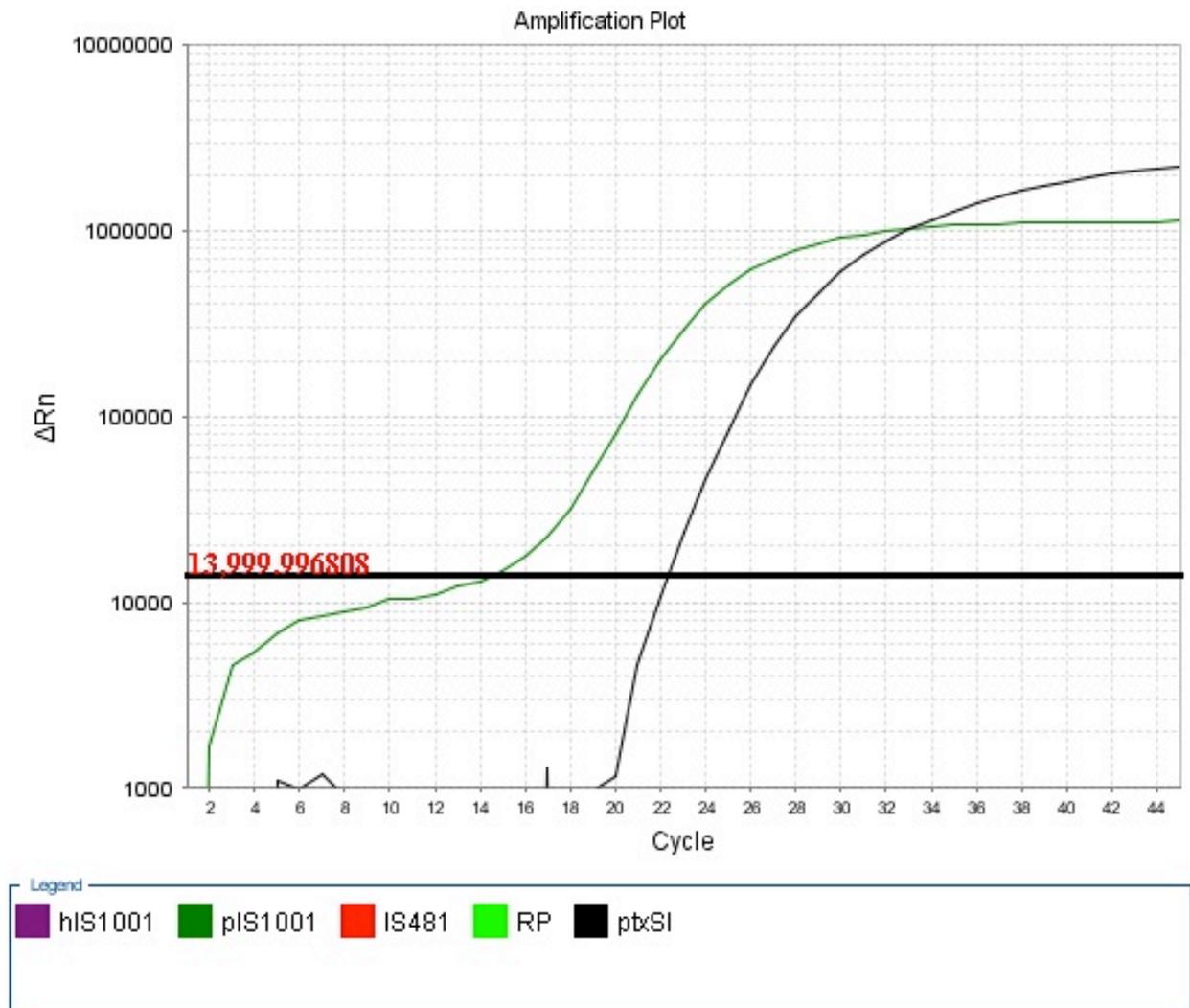


Figura 31. Control Positivo a *Bordetella parapertussis* (cepa)

Para la *Bordetella holmesii* la amplificación de los primers IS481 y hS1001 es vital para indicarnos su presencia (ver figura 32), como podemos ver; el primer IS481 es compartido con la *Bordetella pertussis*, mientras que el primer hS1001 es exclusivo de la *Bordetella holmesii*.

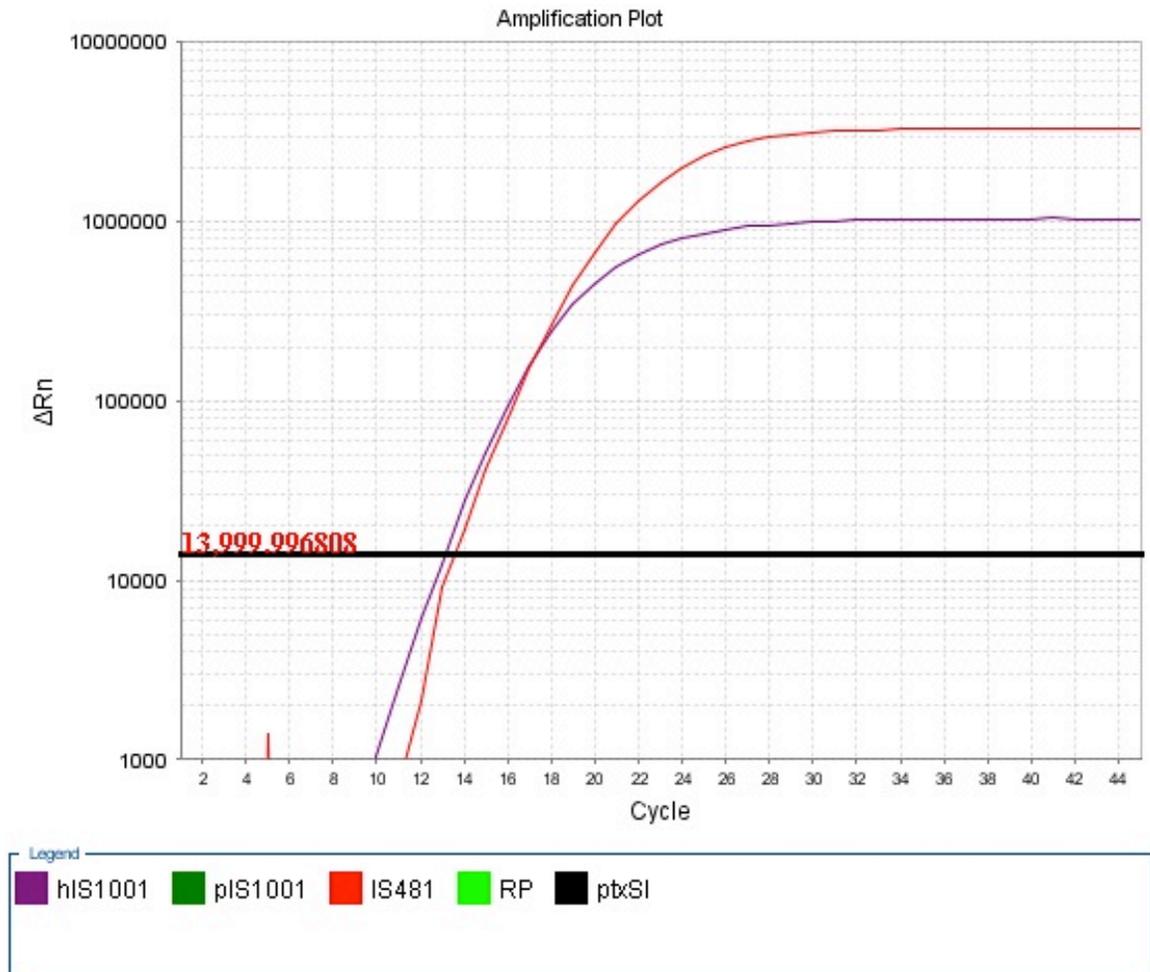


Figura 32. Control positivo a *Bordetella holmesii* (cepa)

En la figura 33, vemos como nos presenta la señal del termociclador, el control negativo en el cual no debe haber ninguna amplificación y lo podemos encontrar como NTC que por sus siglas en inglés significa Negative Template Control.

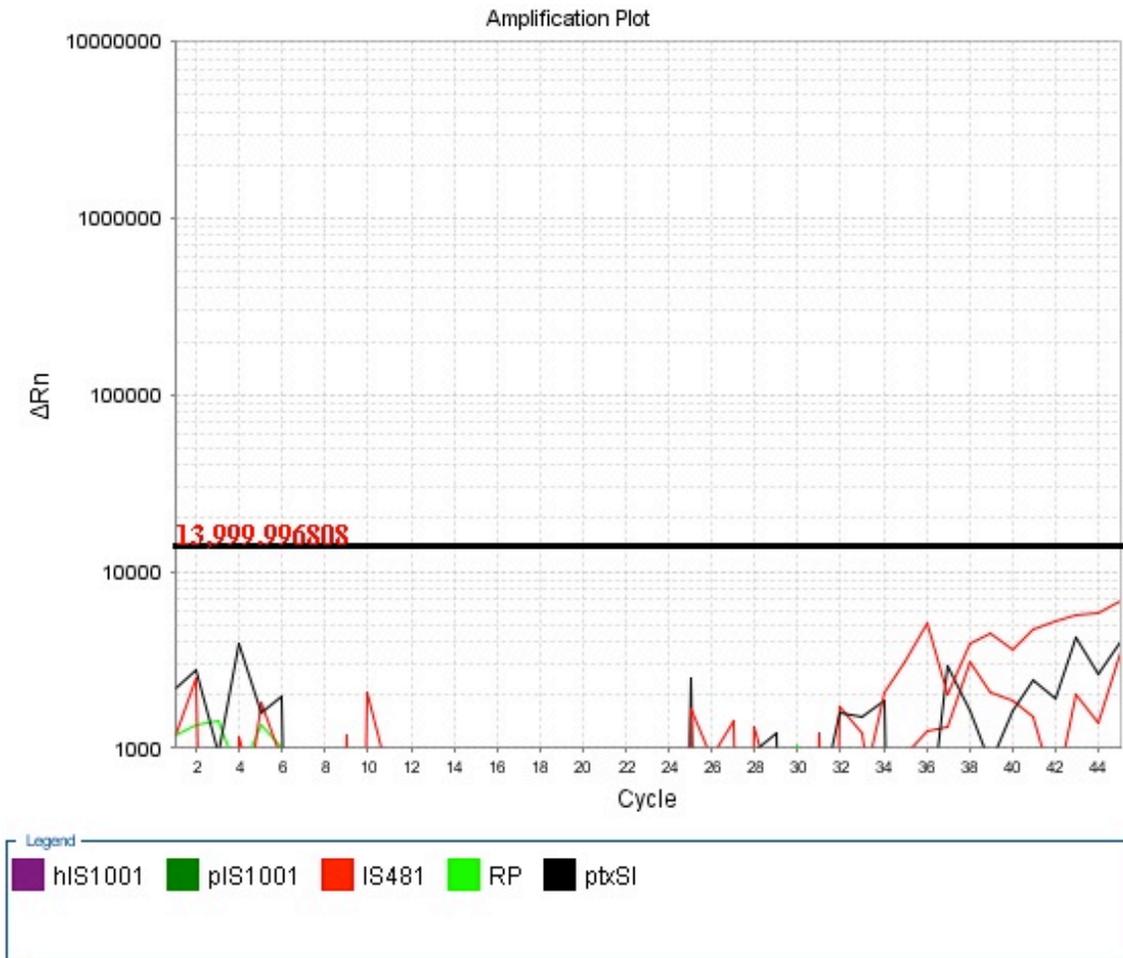


Figura 33. Control Negativo.

Quando estamos frente a una muestra de paciente positiva a *Bordetella pertussis*, esperamos encontrar una gráfica como en la figura 34; la curva de color verde fluorescente es una amplificación de un gen presente en las células del género homo sapiens llamado RP gen de la RNAasa P humana, nos sirve como control interno, y nos indica el origen de la muestra (si amplifica decimos que es una muestra adecuada y si no amplifica decimos que es una muestra inadecuada) y las otras dos curvas de amplificación (roja y negra) son las esperadas para *Bordetella pertussis* como se indicó en la figura 30.

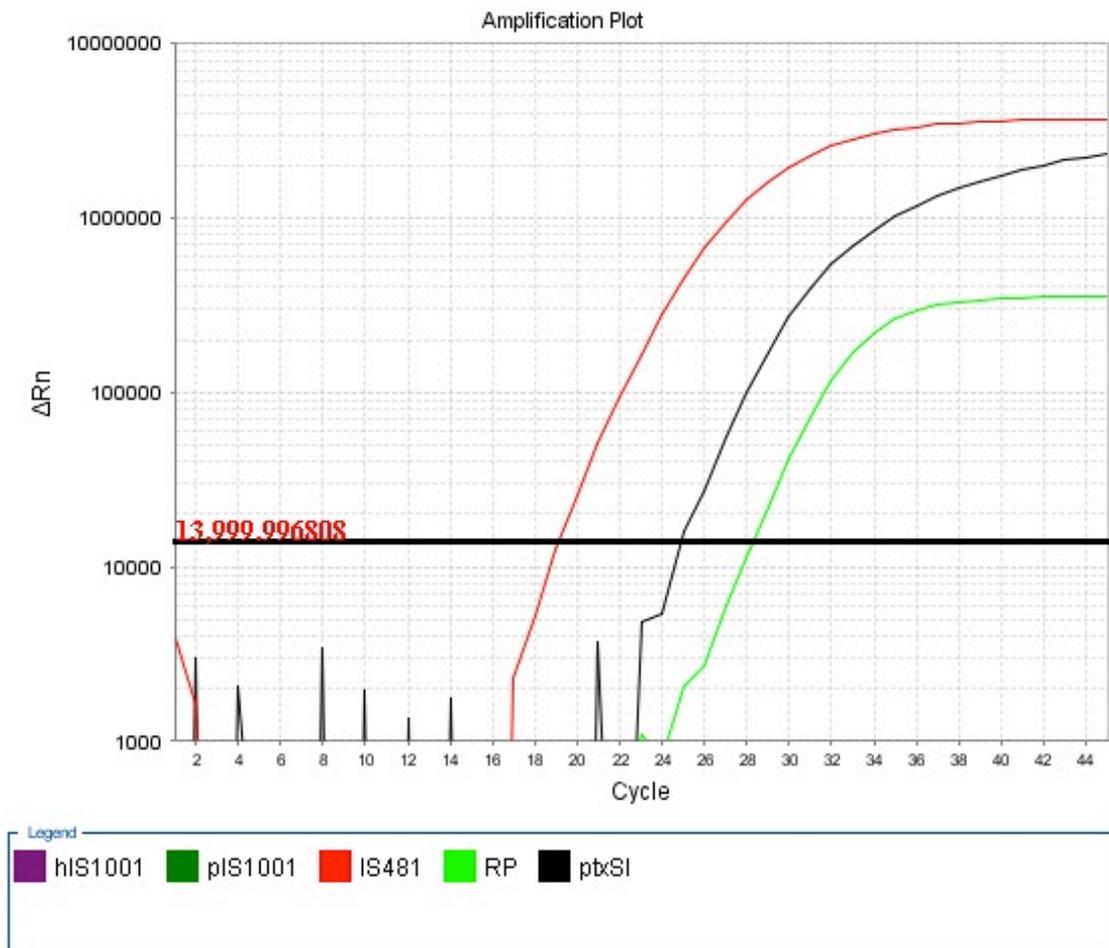


Figura 34. Muestra de paciente positiva a *Bordetella pertussis*.

Para una muestra de paciente que amplifica positiva a *Bordetella parapertussis* debemos ver una gráfica como se muestra en la figura 35. En esta gráfica observamos dos curvas verdes una de ellas (verde fluorescente) nos indica el control interno también llamada RP, y la segunda curva verde junto con la curva negra nos indican que se trata de la presencia de la especie de *Bordetella parapertussis* y son específicas para esta bacteria.

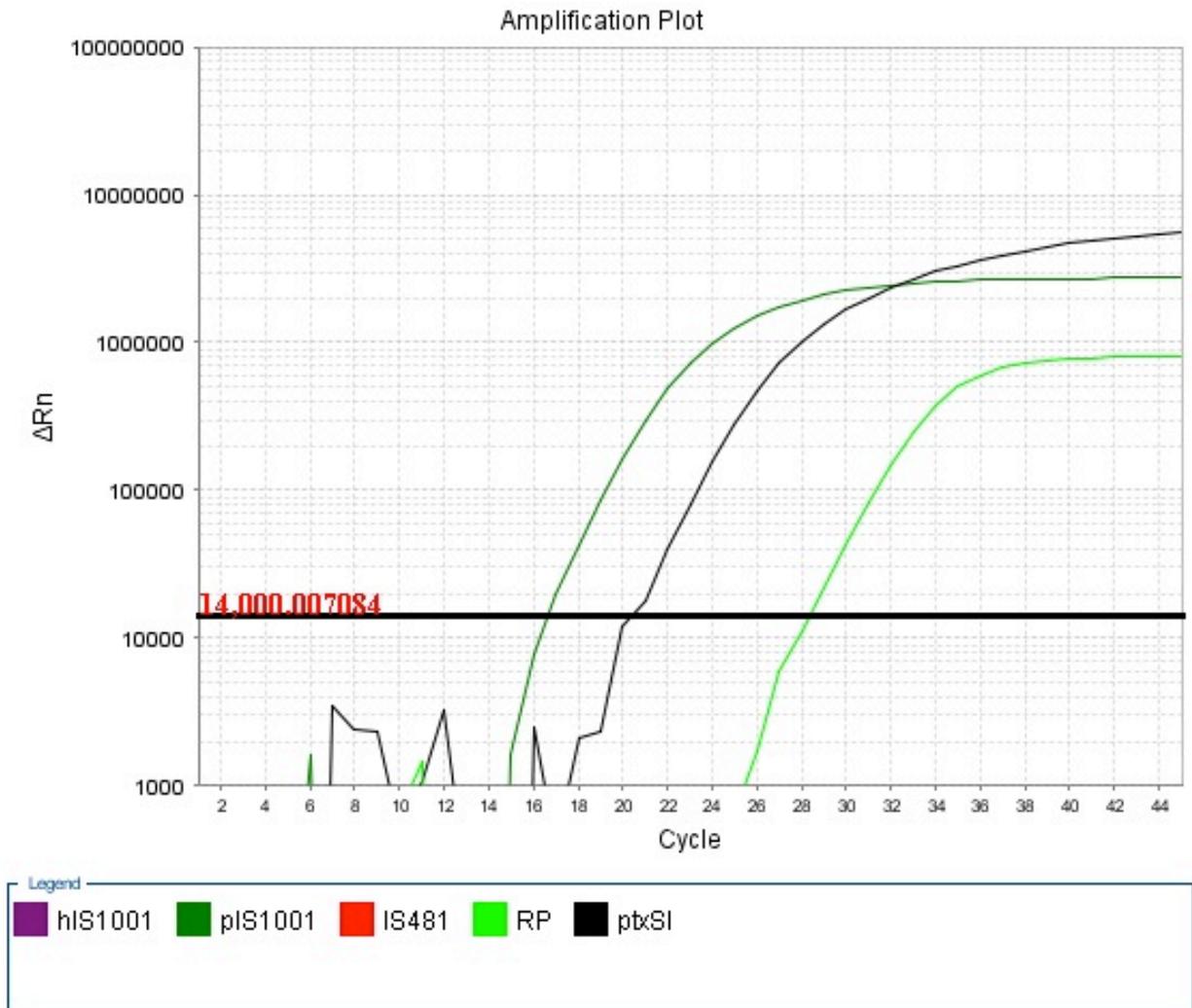


Figura 35. Muestra de paciente positiva a *Bordetella parapertussis*

Ahora nos ocupamos de la amplificación de una muestra de paciente positiva a *Bordetella Holmessi* (ver figura 36), en donde el termociclador nos envía las siguientes señales: Amplificación para primers exclusivo de la especie holmesii (curva morada), amplificación de la curva color rojo (primer IS481, el cual también se amplifica con la presencia de *Bordetella pertussis*) y el control interno de la prueba o RP (curva verde).

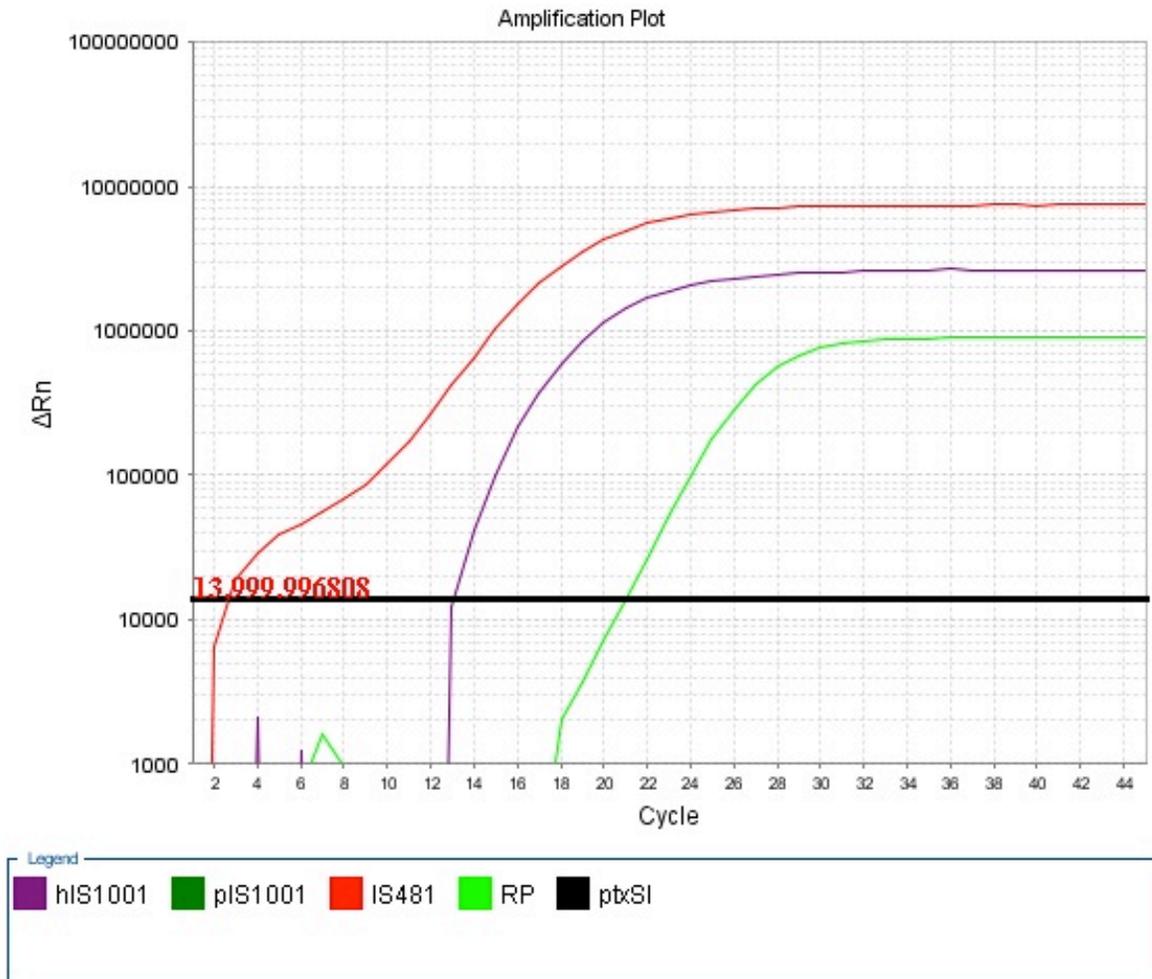


Figura 36. Muestra de paciente positiva a *Bordetella holmesii*.

La gráfica emitida por el termociclador cuando estamos frente a una muestra de paciente negativa a cualquier especie de *Bordetella* se muestra en la figura 37, estas muestras negativas solamente amplifican el segmento de ADN correspondiente al gen de la RNAasa P humana y que nos indica el origen de la muestra, es decir que se tomó de un paciente y la muestra se considera adecuada para su análisis (control interno de la prueba). Las curvas de amplificación para los primers de RP de las muestras deberán tener un Ct entre los ciclos 15 y 37 para considerarlas como una muestra adecuada.

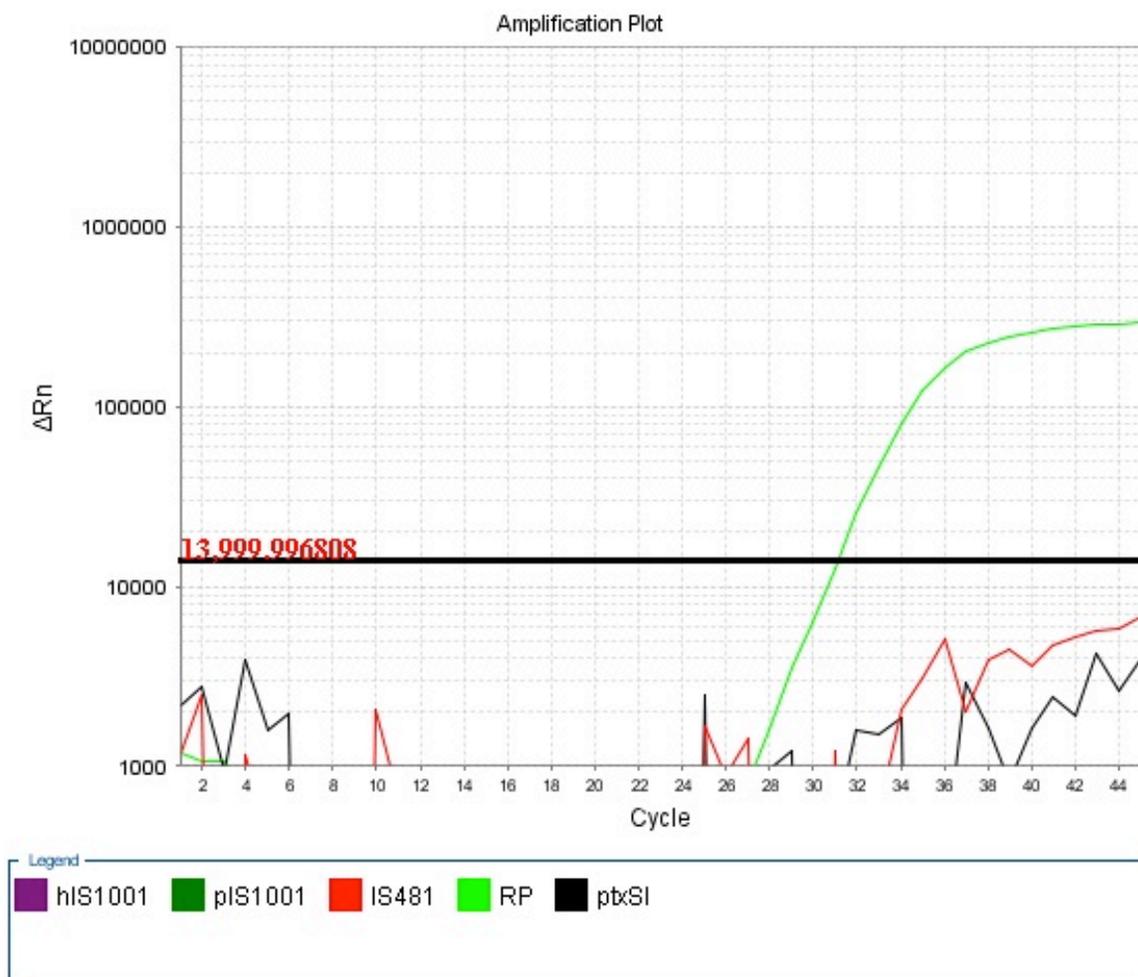


Figura 37. Muestra de paciente negativa a las tres especies de Bordetella.

El cuadro 28 aunque es tomado de la fuente del InDRE lo pudimos corroborar al hacer nuestras curvas de regresión lineal, ya que el primers ptxS1 amplifica en Ct muy altos como 40 aunque cabe mencionar que a estos Ct tan altos, la prueba ya no es cuantificable aunque si cualitativa. Y nuestro propósito al implemetar este método en el LESPEQ es para fines culitativos. Es importante decir que se le está dando mayor relevancia a la amplificación de este primer pues sólo hay una copia de éste en cada bacteria por lo que amplifica en menor cantidad que los otros primers que tienen hasta más de 200 secuencias de inserción (IS481) por bacteria.

CUADRO 28. Criterios de interpretación de PCR-tr multiplex para la identificación de Bordetella.

Fuente: InDRE, 2014.

IS481	pIS1001	hIS1001	PtxS1 *	INTERPRETACIÓN
Ct< 35 ciclos	Negativo	Negativo	Positivo	<i>B. pertussis</i>
Ct>=35 ciclos	Negativo	Negativo	Positivo	<i>B. pertussis</i> *
Ct>=35 ciclos	Negativo	Negativo	Neagtivo	Negativo
Ct< 35 ciclos	Negativo	Positivo	Negativo	<i>B. holmesii</i>
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>B. parapertussis</i>

* ptxS1 Ct< 40 es considerado como una reacción positiva.

El cuadro 28 es de gran utilidad para realizar la interpretación de resultados con las señales amplificadas de acuerdo a cada juego de primers y los valores de CT.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

IV.1. CURVA DE REGRESIÓN LINEAL

Como lo indicamos en la metodología se realizó una curva de regresión lineal para los primers IS481 y ptxS1, con la finalidad de encontrar el modelo de la ecuación, el límite de detección y el límite de cuantificación para la *Bordetella pertussis* .

IV.1.1. ESTUDIO DE REGRESIÓN PARA EL CONJUNTO DE PRIMERS IS481

CUADRO 29. Resultados de las lecturas de Ct para IS481.

Lecturas de Ct para IS481.					
No. de dilución	UFC/ μ L	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4
10^0	4,800,000	indeterminado	indeterminado	Indeterminado	Indeterminado
10^{-1}	480,000	4.8012	4.9090	5.3540	5.2190
10^{-2}	48000	9.4300	8.9530	9.4129	8.9670
10^{-3}	4800	13.3890	14.0270	13.8560	14.4020
10^{-4}	480	17.1990	17.6870	17.7570	17.1040
10^{-5}	48	20.3920	19.8970	20.5840	20.5950
10^{-6}	4.8	24.5480	23.7260	24.2900	24.2690
10^{-7}	0.48	28.0040	27.8780	27.4730	28.1540
10^{-8}	0.048	32.8840	31.8990	32.5080	31.5710
10^{-9}	0.0048	11.2814	0.0000	31.1726	0.0000
10^{-10}	0.00048	0.0000	0.0000	0.0000	27.8426

En el cuadro 29 observamos las lecturas de los Ct proporcionados por el termociclador, como respuesta a las lecturas de las diluciones, realizadas con la vacuna DIPERTIX, indicadas en el mismo cuadro. Como podemos observar a una concentración muy elevada no nos dio señal de Ct, al igual que a las concentraciones muy bajas, así que el modelo de regresión lineal se ajusta hasta la dilución 10^{-8} para el primers IS481. El Ct es inversamente proporcional al número de copias iniciales del

ADN muestra. Por tanto, graficamos el logaritmo de la cantidad inicial de ADN de estándares de concentración conocida (UFC/ μ L) versus el Ct y el resultado es una línea recta. En cada corrida de PCR en tiempo real analizamos muestras de concentración inicial conocida. Estos datos los analizamos con el Software estadístico Minitab y obtenemos el siguiente resumen de graficos:

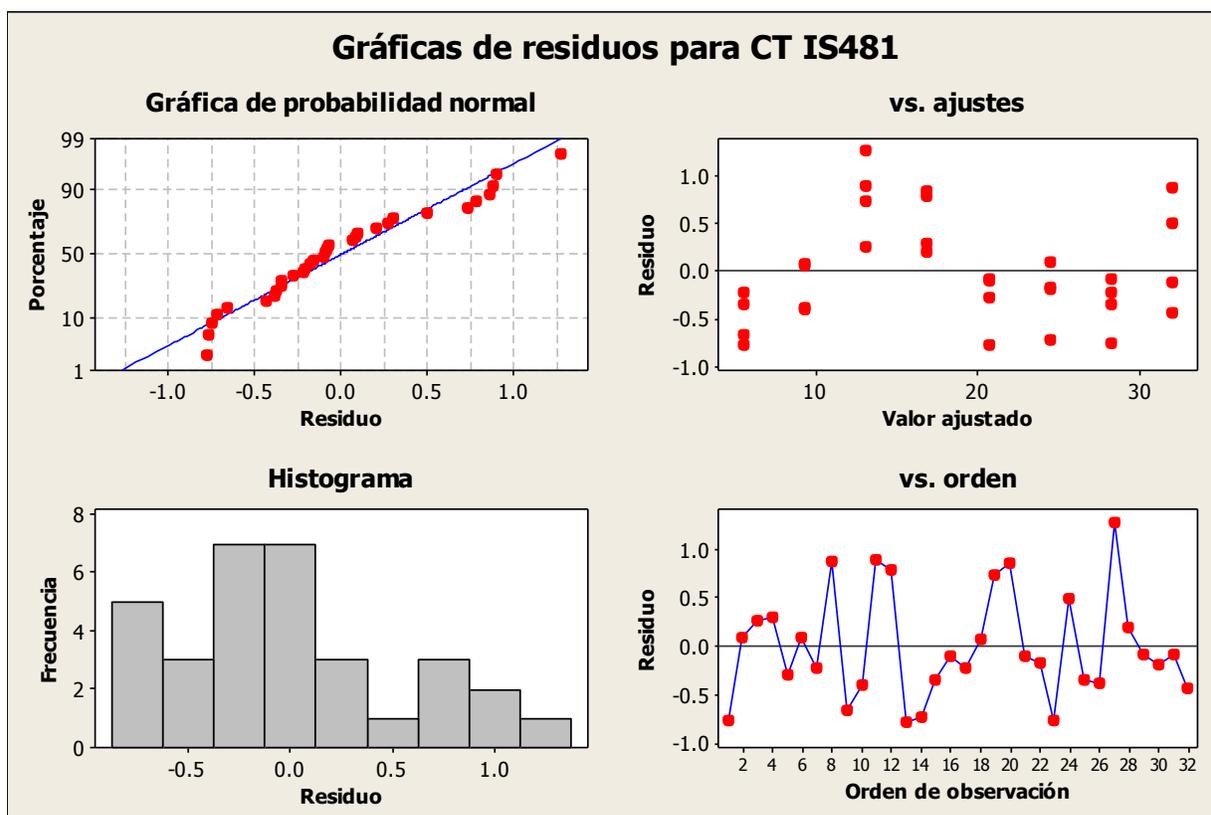


Figura 38. Análisis estadístico de los datos para primer IS481.

En la figura 38 podemos apreciar el análisis estadístico de los datos, que corresponden a los valores de Ct de la diluciones de la vacuna Dipertix, que leyó el termociclador. En donde podemos ver, que los datos tienen una distribución normal, representando también aleatoriedad en el orden de las observaciones y aceptable dispersión.

Posteriormente buscamos el modelo de la ecuación y la fuerza con que se relacionan los datos que podemos apreciar en la figura 39, donde graficamos en el eje de las X el logaritmo de la concentración de las diluciones en UFC/ μ L y en el eje de las

Y los valores de Ct que nos proporciona el termociclador para cada dilución y pudimos descubrir los límites de cuantificación y detección de los que hablaremos más adelante. de esta forma estamos determinando el rango dinámico de detección de nuestro método, requisito indispensable para publicar resultados de calidad.

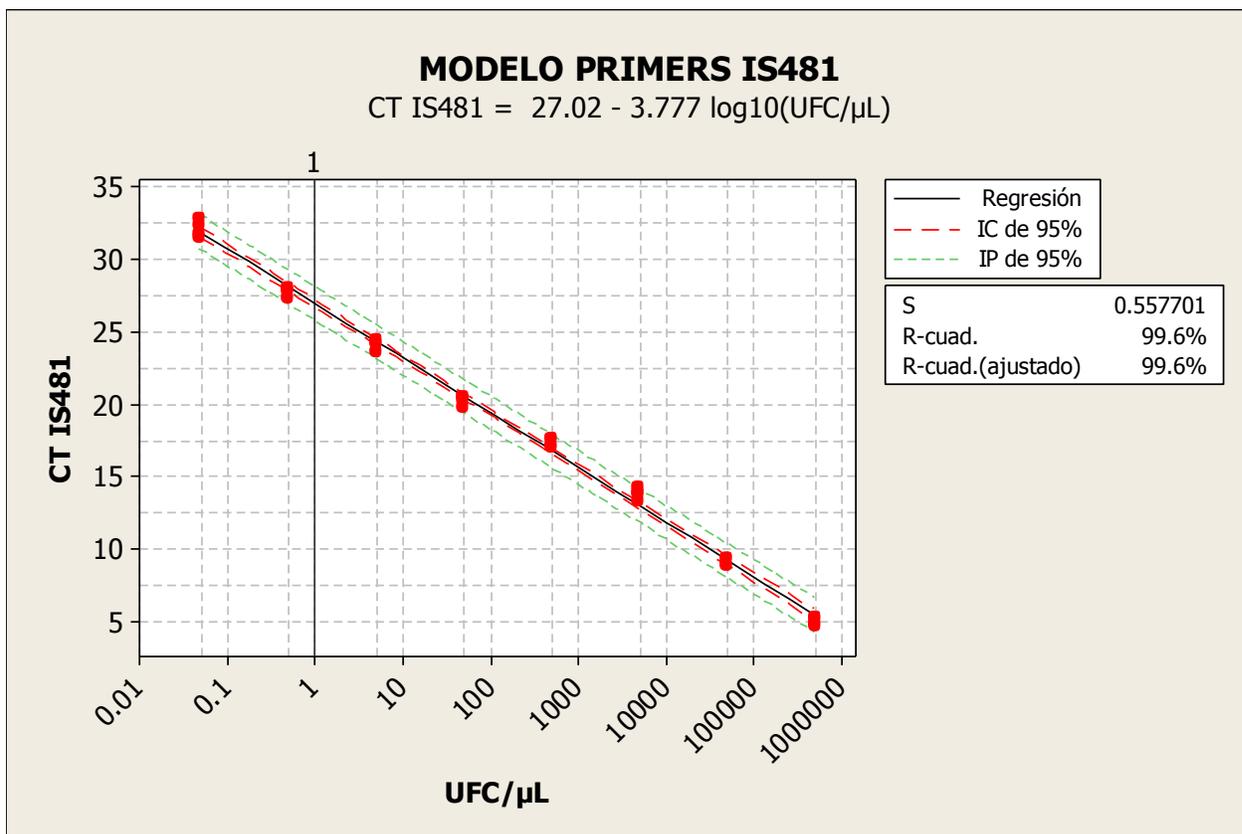


Figura 39. Modelo de Regresión lineal para el primer IS481.

En la gráfica 39 también apreciamos una pendiente negativa, pues el Ct es inversamente proporcional al número de copias iniciales de ADN de la muestra, el valor de la pendiente es 3.777 lo que nos habla de una eficiencia buena (cuando tenemos una pendiente alrededor de 3 la eficiencia de amplificación es aproximada a 100 %) y una ordenada al origen de 27.02, también vemos que la fuerza de relación de las variables es muy aceptable, pues el R cuadrado es de 99.6 %.

IV.1.2. ESTUDIO DE REGRESIÓN PARA EL CONJUNTO DE PRIMERS PTX1S.

CUADRO 30. Resultados de las lecturas de CT para ptx1S.

No. de dilución	UFC/ μ L	Lecturas de CT para ptx1S.			
		Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4
10^0	4,800,000	Indeterminado	indeterminado	indeterminado	Indeterminado
10^{-1}	480,000	14.6903	14.9792	14.8770	14.8730
10^{-2}	48000	18.1353	18.3230	18.2063	17.8772
10^{-3}	4800	21.0930	21.4390	21.6060	21.9300
10^{-4}	480	25.0390	24.9260	24.7550	24.4880
10^{-5}	48	28.1249	27.9800	28.1310	28.6650
10^{-6}	4.8	32.2460	31.9728	31.8000	31.9130
10^{-7}	0.48	0	0	35.52384186	0
10^{-8}	0.048	0	6.285925388	0	34.9527359
10^{-9}	0.0048	0	0	0	0
10^{-10}	0.00048	37.2041	0	0	37.6738

En la lectura del Ct en el termociclador para el análisis del primers ptx1S obtuvimos los resultados que se presentan en el cuadro 30, como podemos apreciar la coherencia en los resultados fue desde la dilución 10^{-1} a la dilución 10^{-6} , así que son estas diluciones las que tomamos en cuenta para graficar nuestro modelo de regresión y análisis de datos en el Software Minitab.

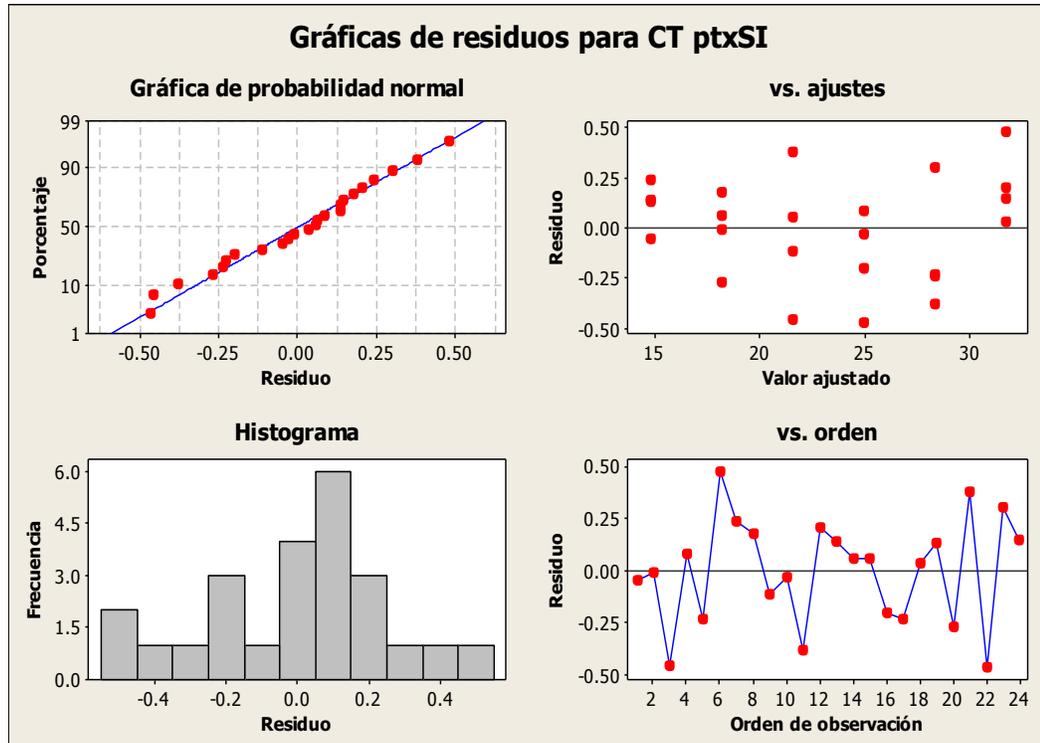


Figura 40. Analisis estadístico de los datos para primers ptxS1.

En la figura 40 que corresponde al análisis estadísticos de los valores de Ct del primer ptx1S, podemos ver que los datos se comportan como datos normales, además que tienen una buena aleatoriedad y no se encuentran patrones repetidos en la gráfica de residuos.

En la figura 41 como se puede apreciar graficamos en el eje de las X el logaritmo de la concentración de las diluciones de nuestra Vacuna las cuales fueron aumentando en número de dilución y por lo tanto disminuyendo en cantidad de UFC, así que entre menor sea la concentración, el Ct es más alto, es por esta razón que tenemos una pendiente negativa. En este modelo de la ecuación obtuvimos una pendiente de -3.406 y una ordenada al origen de 34.09, Una pendiente alrededor de 3.32 nos indica una eficiencia en la amplificación, del 100%.

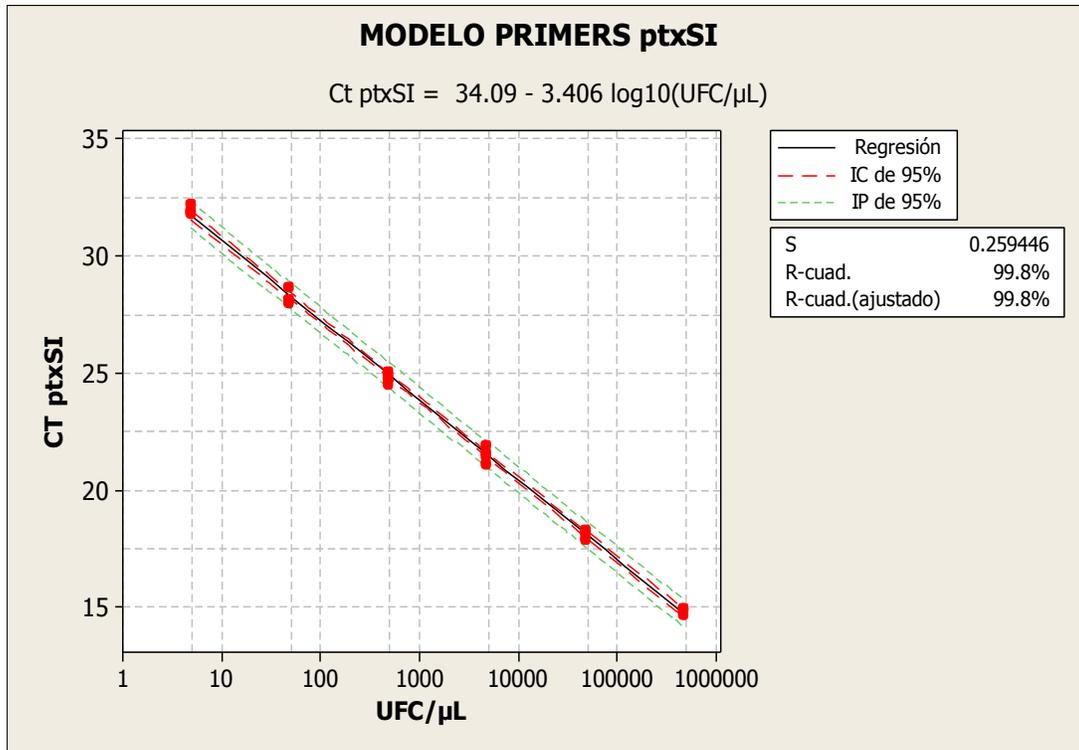


Figura 41. Modelo de Regresión lineal para el primer ptx1S.

También podemos observar que el valor de R cuadrada es excelente (99.8%) y por lo tanto la fuerza de relación de las variables es bastante aceptable.

Así pues los modelos de regresión lineal nos ayudan a determinar el rango óptimo de trabajo en el termociclador y en nuestro estudio encontramos que va desde 5 hasta 32 de Ct, es en este rango, donde nuestro modelo se comporta de manera lineal y podemos hacer predicciones de la concentración de cualquier muestra al conocer el Ct al cual amplifica o bien predecir el Ct si conocemos la concentración del templado. En este rango es donde trabajaremos nuestro método de prueba para determinar cuantitativamente, si las muestras de nuestros pacientes son positivas o negativas a Bordetella spp.

Es importante mencionar que para fines cualitativos hasta un Ct de 40 nos da señal satisfactoria de los primers para determinar la presencia o ausencia de la bacteria pero ya no se puede cuantificar sólo sería un resultado cualitativo.

Por otro lado, si sabemos que por cada unidad de Ct que cambia en el resultado de una amplificación, se incrementa al doble la concentración inicial de ADN (muestra o templado) entonces sabemos que todo el ADN se duplicó y la eficiencia de la reacción es 100% y para lograr una mayor exactitud en la cuantificación es necesario calcular la eficiencia real de la amplificación y así tenemos teóricamente que el indicador de la eficiencia toma los siguientes valores $1 \leq \epsilon \leq 2$; donde $\epsilon = 2$ (aunque los valores experimentales fluctúan entre 1.5 y 1.9) y significa una eficiencia del 100% de la reacción de PCR; en la práctica, un ensayo es aceptable hasta con un 92% de eficiencia (Rodríguez, G. M. y Rodríguez, L. W., 2006).

En el presente estudio obtuvimos una eficiencia de 92% para la reacción del primers IS481 y una eficiencia de 98% para el primer ptxSI.

IV.2. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN.

IV.2.1. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DEL PRIMER IS481.

CUADRO 31. Resultados de las lecturas de Ct para el límite de cuantificación del IS481.

		Lecturas de Ct para IS481.				
Nombre de dilución	UFC/ μL	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5
25% de 10^{-8}	0.012	32.542	33.77	31.571	32.858	32.605
15% de 10^{-8}	0.0072	32.8893	32.678	32.508	33.076	33.377
10% de 10^{-8} = 10^{-9}	0.0048	28.920	0	0	12.345	0

En el cuadro 31 apreciamos los resultados para límite de cuantificación del primer IS481, el cual se encontró en el tubo 8 (dilución 10^{-8}) cuantificando 0.048 UFC/ μ L de donde partimos como referencia para encontrar el punto de detección.

El límite de detección para los primers IS481 está en el 15% del tubo 8 (dilución 10^{-8}) en donde estamos detectando 0.0072UFC/ μ L y como usamos 3 μ L por lo tanto estamos detectando 0.0216UFC y tomando en cuenta que la secuencia IS481 es una secuencia de inserción que se encuentra en múltiples copias (50 a 238) por cada célula de *B. pertussis*. entonces estamos detectando entre 1.08 UFC/ μ L y 5.14 UFC/ μ L por este método.

IV.2.2. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DEL PRIMER PTX1S.

CUADRO 32. Resultados de las lecturas de Ct para el límite de cuantificación del ptx1S.

		Lecturas de Ct para ptx1S.				
Nombre de dilución	UFC/ μL	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Lectura 5
25% de 10^{-6}	1.2	33.165	33.231	33.548	34.0052	33.843
15% de 10^{-6}	0.72	33.857	34.376	34.274	33.947	34.703
10% de 10^{-6} = 10^{-7}	0.0048	35.906	0	34.707	0	0
10^{-8}	0.048	0	0	35.318	0	0

El límite de cuantificación para este primer se encontró en el tubo 6 (dilución 10^{-6}) cuantificando 4.8 UFC/ μ L, como lo observamos en el cuadro 32, de donde partimos como referencia para encontrar el punto de detección.

El límite de detección está en el 15% del tubo 6 en donde detectamos 0.72UFC/ μ L y como usamos 3 μ L y sólo hay una secuencia de ptx1S por cada bacteria de *Bordetella pertussis* , por lo tanto estamos detectando 2.16 UFC/ μ L.

IV.3. RESULTADOS DEL R&R.

Se realizó un análisis de Repetibilidad y Reproducibilidad largo y cruzado para cada uno de los primers (ptx1S y IS481) con dos operadores y 3 repeticiones de cada uno. Se hizo la lectura de los Ct (variable) indicados por el termociclador para cada una de las diluciones de la vacuna.

IV.3.1. R&R PARA EL PRIMER IS481.

CUADRO 33. Resultados de las lecturas de Ct para la prueba de R&R para el primer IS481.

No. de dilución	UFC/ μ L	Lecturas de Ct para IS481.					
		Lectura 1		Lectura 2		Lectura 3	
		Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2
10^{-1}	480,000	4.8012	4.1237	4.9095	4.2300	5.3544	4.1300
10^{-2}	48000	9.4297	11.7006	8.5530	11.1870	7.0283	10.1012
10^{-3}	4800	13.3890	14.8090	13.0706	14.8800	13.8555	14.2397
10^{-4}	480	17.1989	17.3570	16.5392	17.7080	17.1042	17.4330
10^{-5}	48	20.3922	20.7690	19.8972	20.8210	20.5842	20.5840
10^{-6}	4.8	24.5476	24.1570	23.7286	24.1100	24.2896	24.5434
10^{-7}	0.48	28.0037	26.7020	27.8780	26.1540	27.4234	25.626
10^{-8}	0.048	32.8841	30.6050	31.8992	31.659	32.5080	31.857

En el cuadro 33 mostramos las lecturas de los Ct que nos indicó el termociclador para 8 diluciones de la vacuna DIPERTIX en tres repeticiones realizadas por dos analistas, con estos datos es que realizamos el estudio de R&R y a continuación mostramos los resultados.

El análisis estadístico de los datos para el R&R se hizo en el software estadístico Minitab.

En la figura 42 se aprecian 6 gráficos que explicamos en seguida:

Componentes de variación: En esta primera gráfica observamos el porcentaje de contribución de la variación de cada una de los componentes de nuestro sistema de medición, Se aprecia que el porcentaje más alto de contribución (99.18 %) y variación del estudio (99.59%) lo tienen las partes, es decir, las diluciones de la vacuna DIPERTIX, pues son muy diferentes entre ellas y es efectivamente lo que esperamos. Por su parte el % de variación del estudio R&R (9.04%) es menor al criterio máximo de aceptación (10%), así que podemos concluir que tenemos un sistema de medición aceptable. Es importante hacer notar además el % de variación del estudio en cuanto a Repetibilidad es 4.37% que no aporta de manera significativa variación a nuestro sistema de medición al igual que la reproducibilidad con 7.91%.

CT IS481 por parte: La gráfica nos muestra todas las mediciones tomadas en el estudio, organizadas por parte junto con sus medias, se observa una tendencia creciente pues se comienza de una dilución alta = CT bajo hasta una dilución más baja = CT alto, también apreciamos que existe uniformidad en las lecturas de la misma dilución.

Gráfica R por operadores: En esta gráfica podemos observar la uniformidad de las mediciones de cada operador y apreciamos que el operador 2 tiene mayor variación que el operador 1, sin embargo, todos los datos de ambos operadores se encuentra dentro de los límites de control, por lo que el estudio esta bajo control.

CT IS481 por operadores (gráfico de caja): Esta gráfica nos muestra que tenemos medias similares en las mediciones de ambos operadores, la dispersión de los datos es aceptable.

Gráfica Xbarra por operadores: Esta gráfica nos muestra los puntos de las medias de cada parte (de cada dilución) y para cada operador, podemos ver que nuestras mediciones no entran en los límites de control de la gráfica debido a que la diferencia entre las partes es muy grande y es lo que esperamos pues la variación mayor del R&R está en las partes.

Interacción partes * operadores: En esta última gráfica vemos la interacción entre partes*operador y podemos apreciar que ambos operadores difieren ligeramente en los valores de las medias de 2 tubos: 2 y 7. Confirmando si esta interacción tiene significancia vemos la tabla de ANOVA (ver cuadro 34) donde tenemos un valor de $p=0.939$ para operadores lo cual nos indica que no aportan variabilidad significativa al sistema de medición, sin embargo, la interacción partes*operadores tiene un valor de $p=0.000$ esto nos indica que se va a analizar esta interacción en el estudio de R&R, donde encontramos de acuerdo al cuadro 35, un % de contribución de esta interacción de 0.63% lo que nos lleva a decir que la reproducibilidad es aceptable y la interacción partes*operadores no afecta de manera significativa a nuestro sistema de medición.

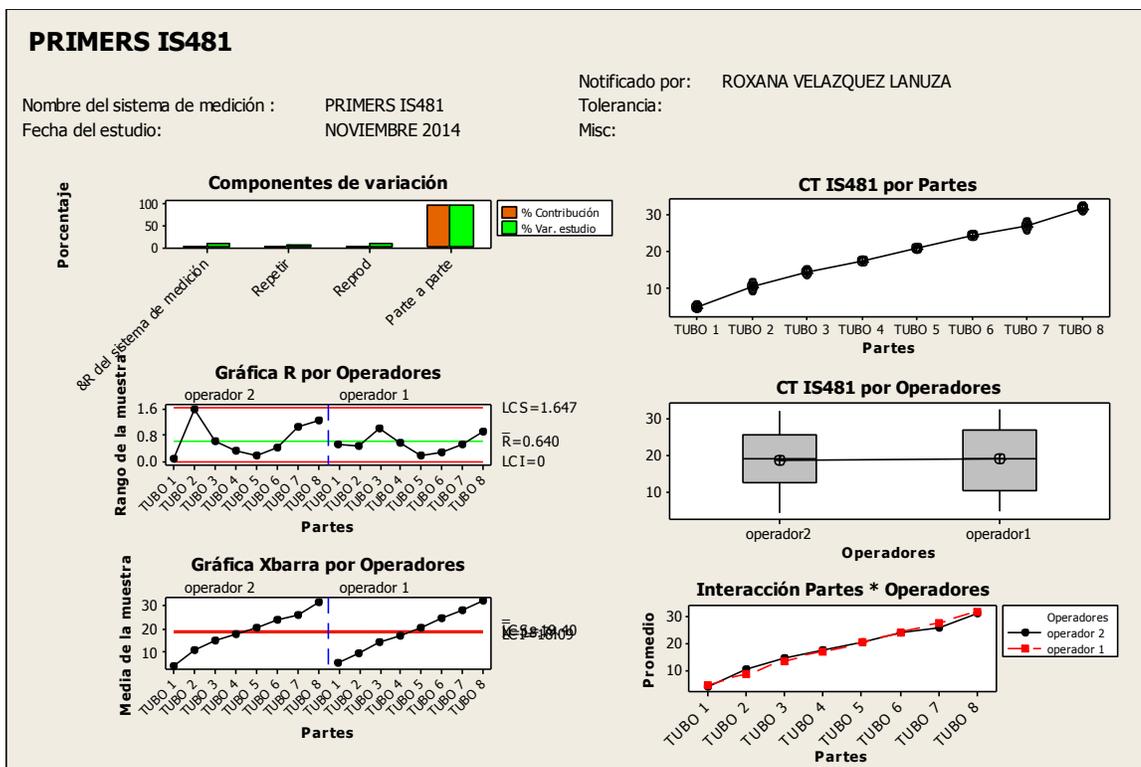


Figura 42. Estudio de R&R para el primer IS481

El cuadro 34 o tabla ANOVA nos aporta el análisis de varianza de dos factores con interacción y nos sirve para ver el nivel de significancia de esos factores con respecto al sistema de medición, los factores que intervienen son: Partes y Operadores con una interacción (partes*operadores), lo más valioso de la tabla es la última columna que nos muestra la significancia o no de los factores o interacciones con un nivel de confianza de 95% y podemos ver que el factor que si tiene significancia es las partes y la interacción no así los operadores.

CUADRO 34. Tabla ANOVA de dos factores con interacción para el primer IS481

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Partes	7	3402.87	486.125	288.413	0.000
Operadores	1	0.01	0.011	0.006	0.939
Partes*operadores	7	11.80	1.686	10.797	0.000
Repetibilidad	32	5.0	0.156		
Total	47	3419.68			

CUADRO 35. Estudio de R&R del sistema de medición para el primers IS481.

Nombre del sistema de medición: PRIMERS IS481.					
Fecha del estudio: NOVIEMBRE 2014					
Notificado por: ROXANA VELAZQUEZ LANUZA					
FUENTE	Componente de la variación	% de contribución (de ComponenteVariación)	Desviación estándar (DE)	variación del estudio (6*DE)	% Variación del estudio
Gage R&R total	0.6659	0.82	0.81603	4.8962	9.04
Repetibilidad	0.1561	0.19	0.39511	2.3707	4.38
Reproducibilidad	0.5098	0.63	0.71400	4.2840	7.91
Operadores	0.0000	0.00	0.0000	0.0000	0.00
Operadores *partes	0.5098	0.63	0.71400	4.2840	7.91
Parte a parte	80.7399	99.18	8.98554	53.9132	99.59
Variación total	81.4058	100.00	9.02251	54.1351	100.00

El cuadro 35 nos muestra los resultados del estudio de R&R realizado al primers IS481, hablaremos primero de la columna tres (% de contribución): el porcentaje de contribución del estudio R&R total, tenemos que es de 0.82 % al cual contribuyen con un 0.63 % la Reproducibilidad y con un 0.19% la Repetibilidad, al analizar estos datos con el cuadro 34 de análisis de ANOVA vemos que coinciden,

pues nos señala un valor de $p=0.939$ para operadores que está directamente relacionado con la reproducibilidad el cual no es significativo para nuestro sistema de medición. Por otro lado la aportación más importante al % de contribución es debida a las partes con un 99.18% lo cual es muy coherente pues cada una está diez veces más diluida que la anterior y lo corroboramos con el cuadro 34 donde ilustra un $P = 0.000$ para las partes que nos indica que es totalmente significativo en nuestro sistema de medición.

En el mismo cuadro 35 en la última columna vemos un porcentaje de variación de nuestro estudio R&R total de 9.04% el cual es aceptable, pues de acuerdo a Botero, A. et al (2007) un sistema de medición es aceptable si tenemos un % de variación menor a 10% y un % de contribución menor a 1%.

En lo que corresponde al número de categorías tenemos 15 lo que nos indica el número de grupos dentro de los datos del proceso en que el sistema de medición puede discernir y de acuerdo a la referencia de la Automotive Industry Action Group se necesitan al menos 5 categorías para tener un adecuado sistema de medición. Así que tuvimos un buen discernimiento de agrupación de datos.

IV.3.2.R&R PARA EL PRIMER ptx1S.

CUADRO 36. Resultados de las lecturas de Ct para la prueba de R&R para el primer ptx1S.

No. de dilución	UFC/ μL	Lecturas de Ct para ptx1S.					
		Lectura 1		Lectura 2		Lectura 3	
		Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2
10^{-1}	480,000	14.8730	14.4360	14.9792	15.5210	14.8770	15.3720
10^{-2}	48000	17.8772	18.4190	18.3230	19.3980	18.2063	19.1380
10^{-3}	4800	21.9300	21.3200	21.4390	21.9580	21.6060	21.9080
10^{-4}	480	24.4880	24.6010	24.9260	25.3240	24.7550	25.3400
10^{-5}	48	28.6650	28.0530	27.9800	28.5670	28.1310	28.1280
10^{-6}	4.8	31.9130	31.046	31.9728	31.2220	31.8000	31.5970

El cuadro 36 nos muestra las lecturas de los Ct que nos indicó el termociclador para 6 diluciones de la vacuna DIPERTIX en tres repeticiones realizadas por dos analistas, con estos datos realizamos el estudio de R&R que en seguida mostramos.

Utilizamos el software estadístico Minitab para el análisis estadístico de los datos y los resultados se muestran a continuación.

Comenzaremos explicando la figura 42 donde se aprecian 6 gráficos.

Componentes de variación: En esta primera gráfica observamos el porcentaje de contribución de la variación de cada uno de los componentes de nuestro sistema de medición, Se aprecia que el porcentaje más alto de contribución (99.50 %) y variación del estudio (99.75%) lo tienen las partes, es decir, las diluciones de la vacuna DIPERTIX, pues son muy diferentes entre ellas y esto es lo que se espera. Por su parte el % de variación del estudio R&R (7.07%) es menor al 10% máximo aceptable, así que podemos concluir que tenemos un sistema de medición apropiado. Es importante hacer notar además que el % de variación del estudio en cuanto a Repetibilidad es 5.47% y no aporta de manera significativa variación a nuestro sistema de medición, lo mismo para reproducibilidad que es de 4.48%.

CT IS481 por parte: En esta gráfica vemos todas las mediciones tomadas en el estudio, organizadas por parte junto con sus medias, se observa una tendencia creciente pues se comienza de una dilución alta = CT bajo hasta una dilución más baja = CT alto, también apreciamos que existe uniformidad en las lecturas de la misma dilución.

Gráfica R por operadores: Aquí podemos observar la uniformidad de las mediciones de cada operador y apreciamos que todos los datos de los dos operadores se mantienen dentro de los límites de control por lo que podemos decir, que el sistema de medición está bajo control.

CT IS481 por operadores (gráfico de caja): Esta gráfica nos muestra que tenemos medias y medianas similares en las mediciones de ambos operadores y la dispersión de los datos es aceptable.

Gráfica Xbarra por operador: La gráfica nos muestra los puntos de las medias de cada parte (de cada dilución) y para cada operador, podemos ver que nuestras mediciones no entran en los límites de control de la gráfica debido a que la diferencia entre las partes es muy grande, lo que por el origen de nuestro estudio así debe ser.

Interacción partes * operadores: En ésta última gráfica vemos la interacción entre partes*operador y podemos apreciar que ambos operadores coinciden en todas las mediciones de la gráfica excepto en dos puntos (tubo 2 y 6). Confirmando si esta

CUADRO 37. Tabla de ANOVA de dos factores con interacción para el primer ptx1S.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Partes	5	1137.85	227.570	663.848	0.000
Operadores	1	0.19	0.189	0.551	0.491
Partes*operadores	5	1.71	0.343	3.005	0.030
Repetibilidad	24	2.74	0.114		
Total	35	1142.49			

CUADRO 38. R&R del sistema de medición para el primer ptx1S.

Nombre del sistema de medición: PRIMERS ptx1S.					
Fecha del estudio: NOVIEMBRE 2014					
Notificado por: ROXANA VELAZQUEZ LANUZA					
FUENTE	Componente de la variación	% de contribución (de ComponenteVariación)	Desviación estándar (DE)	variación del estudio (6*DE)	% Variación del estudio
Gage R&R total	0.1903	0.50	0.43625	2.6175	7.07
Repetibilidad	0.1141	0.30	0.33774	2.0264	5.47
Reproducibilidad	0.0762	0.20	0.27613	1.6568	4.48
Operadores	0.0000	0.00	0.00000	0.0000	0.00
Operador*partes	0.0762	0.20	0.27613	1.6568	4.48
Parte a parte	37.8712	99.50	6.15396	36.9237	99.75
Variación total	38.0615	100.00	6.16940	37.0164	100.00

El cuadro 38 nos muestra los resultados del estudio de R&R realizado al primers ptx1S, hablaremos primero de la columna tres (% de contribución): el porcentaje de contribución del estudio R&R total, tenemos que es de 0.50 % al cual contribuyen con un 0.20 % la Reproducibilidad y con un 0.30% la repetibilidad, al analizar estos datos con el cuadro 37 de análisis de ANOVA vemos que coinciden, pues nos señala un valor de $p=0.491$ para operadores que está directamente relacionado con la reproducibilidad el cual no afecta a nuestros sistema de medición. Por otro lado la aportación más importante al % de contribución es debida a las partes con un 99.5% lo cual es esperado pues cada una, está diez veces más diluida que la anterior y lo corroboramos con el cuadro 37 donde ilustra un valor de $p = 0.000$ para las partes que nos indica que nuestro sistema de medición es válido.

Ahora analizaremos la última columna del cuadro 38 (% de variación del estudio), vemos un porcentaje de variación de nuestro estudio R&R total de 7.07% el cual es aceptable, pues de acuerdo a Botero, A. et al (2007) un sistema de medición es aceptable si tenemos un % de variación menor a 10% y un % de contribución menor a 1%, en esa misma columna tenemos un % de variación del estudio para repetibilidad de 5.47 % y reproducibilidad de 4.48% estos resultados nos hablan de operadores calificados.

En lo que corresponde al número de categorías tenemos 19 lo que nos indica el número de grupos dentro de los datos del proceso en que el sistema de medición puede discernir y de acuerdo a la referencia de la Automotive Industry Action Group se necesitan al menos 5 categorías para tener un adecuado sistema de medición. Así que tuvimos un buen discernimiento de agrupación de datos.

IV.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La totalidad de las muestras analizadas, una vez implementado el método, fueron 239 (ver figura 44) de las cuales 57.7 % fueron exudados nasofaríngeos (muestra ideal para búsqueda de *Bordetella spp*) tomados para análisis de influenza (Laboratorio de Diagnóstico Molecular) y que dieron negativos o no a este estudio, 38.5% corresponden a muestras de exudados nasofaríngeos enviados para búsqueda de *Bordetella pertussis* por cultivo (Laboratorio de Microbiología Clínica) y que dieron negativos o no a este estudio y 3.7 % corresponden a bacterias diferentes a *Bordetella* que pueden estar presentes en una infección de vías respiratorias (para la prueba de Selectividad).

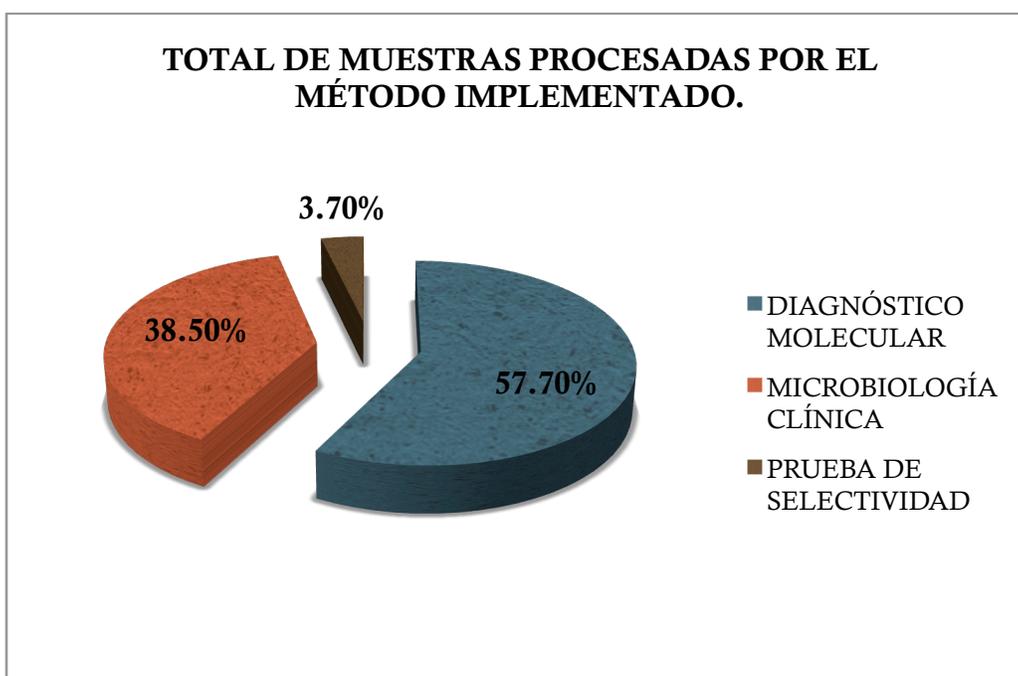


Figura 44. Total de muestras procesadas por el método implementado.

El porcentaje más alto lo tiene las muestras procedentes del Laboratorio de Diagnóstico Molecular seguida por las muestras del Laboratorio de Microbiología Clínica y finalmente las muestras de bacterias que pueden estar presentes en una infección de vías respiratorias.

Los resultados obtenidos de cada grupo de muestras se discuten a continuación.

IV.4.1. PRUEBA DE SELECTIVIDAD.

Esta prueba se realizó con la finalidad de ver como se comporta el método al analizar bacterias que se pueden encontrar en las vías respiratorias, estas bacterias pueden estar acompañando a la *Bordetella*, en la muestra. Todas las bacterias probadas no fueron detectadas por el método implementado, es decir no interfieren en la búsqueda de *Bordetella pertussis*. En el cuadro 39 podemos ver los resultados y los nombres de las bacterias que se probaron. Así pues, el método es selectivo o específico al detectar sólo las bacterias del género *Bordetella*.

CUADRO 39. Resultados de la prueba de selectividad.

BACTERIA	RESULTADO PCR-TR MULTIPLEX
<i>Staphylococcus aureus</i>	NEGATIVO
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NEGATIVO
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEGATIVO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NEGATIVO
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NEGATIVO
<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NEGATIVO
<i>Haemophilus influenza</i>	NEGATIVO
<i>Neisseria meningitidis</i>	NEGATIVO

Al comparar nuestros resultados con un estudio realizado por Pianciola, L. A. y colaboradores en el año 2012 (Desarrollo y validación de una PCR múltiple para el diagnóstico de *Bordetella* spp.) con respecto a la Exclusividad o prueba de selectividad en su totalidad las cepas que probaron, presentaron ausencia de señal para los dos fragmentos genómicos considerados, al evaluar la PCR, nos damos cuenta que obtuvimos resultados similares.

IV.4.2. MUESTRAS PROCESADAS DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.

- Casos.

Se analizaron 46 casos que ya habían sido analizados por el método de cultivo y obtuvimos mayor número de muestras positivas a *Bordetella spp* por PCR-tr multiplex, que por el análisis microbiológico, ver figura 45.

Las muestras consideradas como inadecuadas son muestras que posiblemente fueron mal tomadas o bien no se le tomó muestra al paciente, ya que el control interno no amplificó (marcador de RP) en éstas.

El porcentaje de positivos analizados por el método de cultivo es de 19.56 % mientras que de las mismas muestras se obtuvo un 47.8 % de positivos analizadas por PCR-tr multiplex lo cual demuestra la mayor sensibilidad del método implementado y por ende la oportunidad de detectar el patógeno.

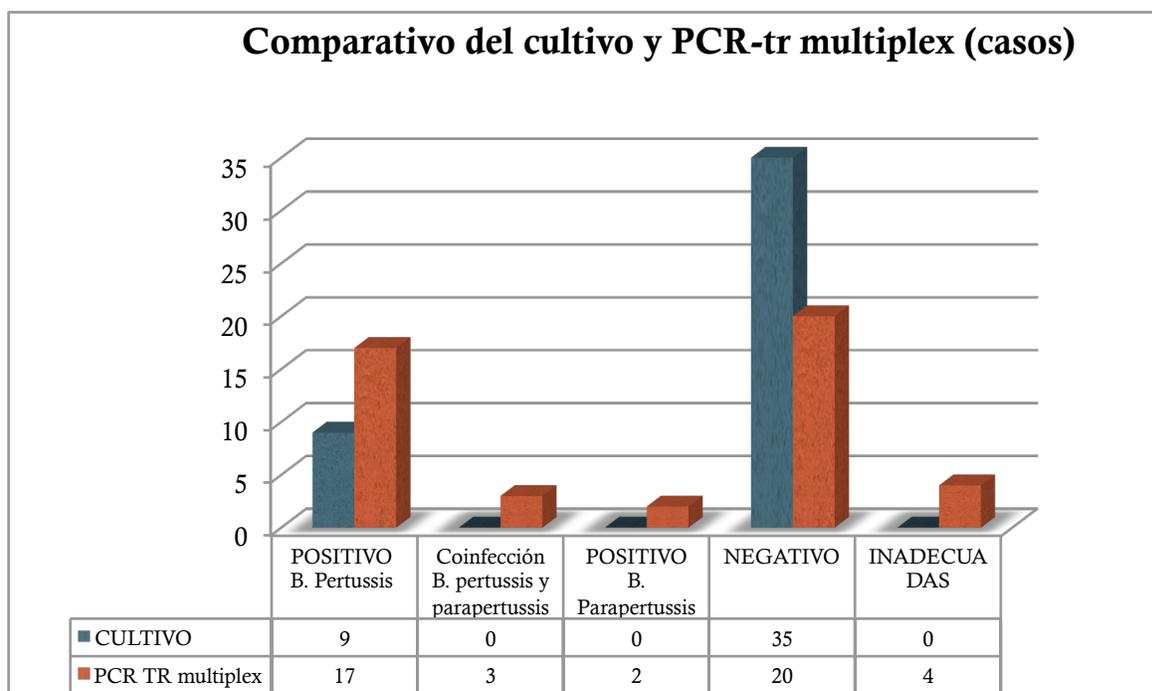


Figura 45. Comparativo del cultivo vs PCR del análisis de los casos.

Como podemos observar en la figura 45, sumado al hallazgo tan importante de mayor número muestras positivas a *Bordetella pertussis*, también encontramos la especie *parapertussis* y de igual manera descubrimos la presencia de tres muestras con coinfección de ambas especies antes mencionadas, lo cual no se pudo detectar por cultivo.

Otro de los beneficios a parte de la sensibilidad de la prueba de PCR-tr multiplex es que el paciente tiene su resultado en un día contra el cultivo que puede tardar hasta diez días para dar un diagnóstico.

La edad de los casos analizados fluctúa entre 20 días y 9 años y como podemos ver en la figura 46, el hallazgo con mayor frecuencia de *Bordetella pertussis* está presente en los pacientes menores de 1 año (pacientes que no tienen el esquema de vacunación nacional completo).

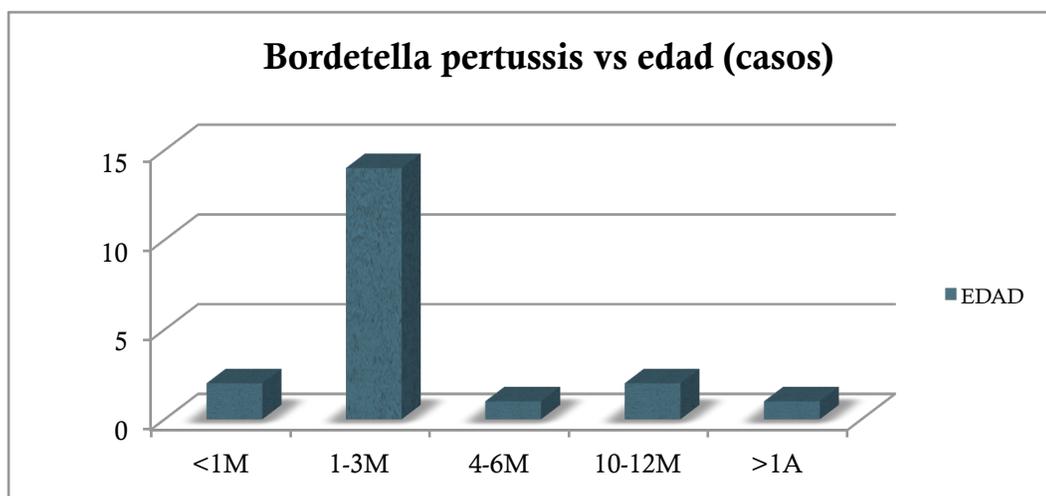


Figura 46. Presencia de *Bordetella pertussis* por edad (casos).

La figura 46 nos muestra, que la *Bordetella* está presente con mayor frecuencia en niños de 1 a 3 meses de edad, lo que se viene a confirmar con estudios previos como Nieto G. J, (2009) en donde nos indica, que la tosferina ha sido una enfermedad prevalente en Panamá y de un impacto no objetable, principalmente en la población de

lactantes menores de 3 meses que no han completado su esquema de vacunación, demostrándose en este grupo, la mayor tasa de hospitalización y letalidad.

- Contactos.

Cada muestra de caso sospechoso de esta enfermedad, debe venir acompañada de 5 muestras de contactos, sin embargo los hospitales mandan de manera variable el número de éstos. En el presente estudio se analizaron 46 contactos relacionados sólo con los casos que previamente habían arrojado resultados positivos, cabe mencionar que estos contactos también habían sido anteriormente analizados por el método del cultivo, nuestros resultados se pueden apreciar en la figura 47.

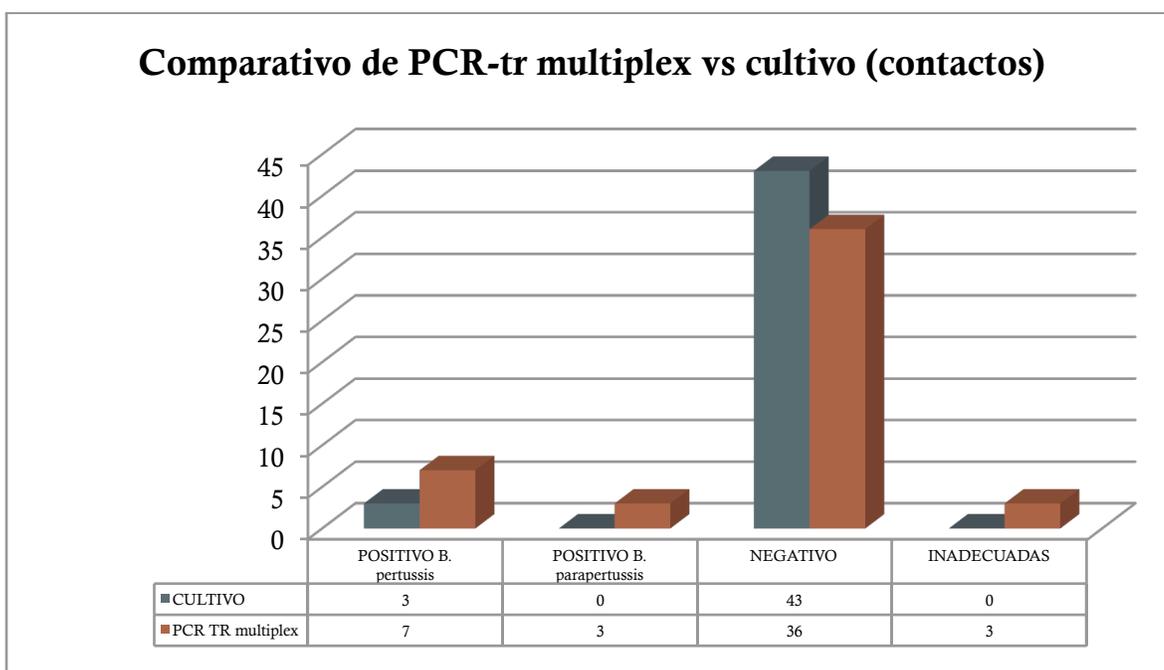


Figura 47. Comparativo de PCR vs cultivo (contactos).

Al igual que en el análisis de los casos también encontramos un mayor porcentaje de positividad por el método de PCR-TR multiplex, 21.7 % contra 6.52% que se había encontrado previamente por cultivo.

Se realizó un estudio en Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) de la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública (RNLESP) para Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) bacterianas (Chiapas, D.F. Nuevo León, San Luis Potosí y Sonora), de noviembre de 2011 a mayo de 2012 para la implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR TR) múltiple. En este estudio se procesaron un total de 463 casos probables de tos ferina por PCR TR y por cultivo de los cuales, 155/463 (33.5%) fueron positivos a *B. pertussis* por PCR TR y solamente 47/463 (10.1%) fue positivo a *B. pertussis*, por cultivo. También se analizaron, por ambas técnicas, un total de 1614 muestras de contactos resultando que el 1.0% (17/1614) fueron positivas por cultivo y el 6.3% (102/1614) positivas por PCR TR (InDRE, 2014).

Haciendo un comparativo de los resultados obtenidos (casos y contactos) en nuestro trabajo y los arrojados por el estudio anteriormente citado, realizado por Laboratorios de la RNLSP, decimos que en nuestro estado tenemos mayor prevalencia de *Bordetella pertussis* (Ver figura 48).

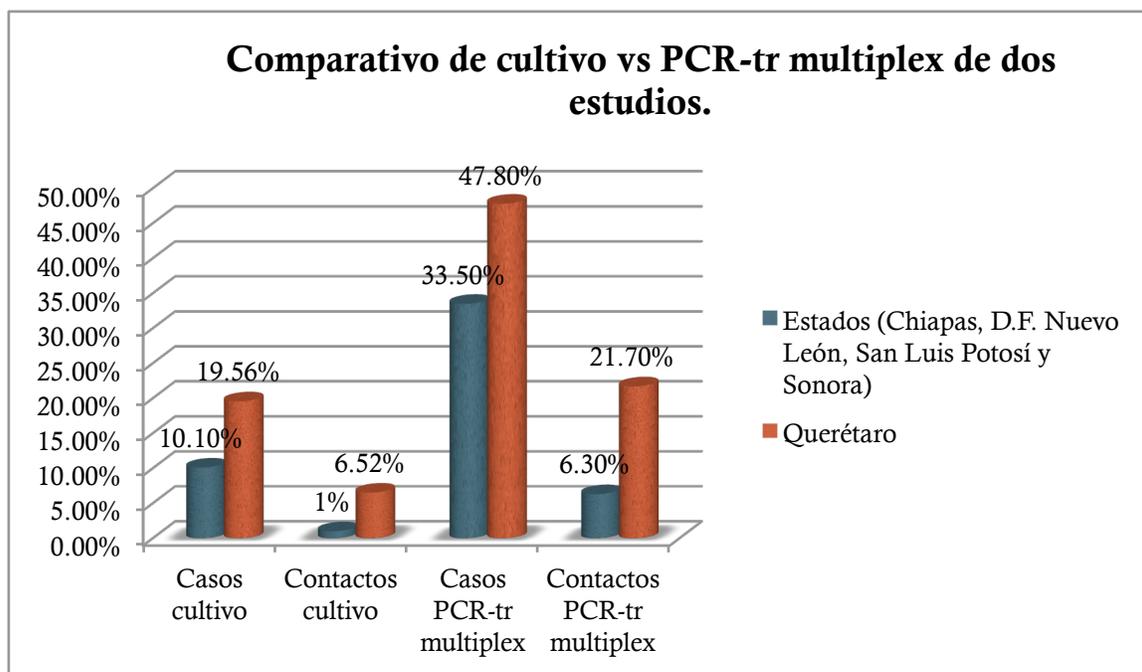


Figura 48. Comparativo de Cultivo vs PCR-Tr multiplex de dos estudios.

Es importante comentar que en el estudio realizado por los estados, la cantidad de muestras es mayor y además, en contactos analizaron todos los contactos y en nuestro estudio sólo analizamos los contactos que correspondían a los casos que previamente habían dado positivos, sin embargo a pesar de ello se obtuvieron resultados muy similares.

IV.4.3. MUESTRAS PROCESADAS DEL DEPARTAMENTO DE DIANÓSTICO MOLECULAR.

Se analizaron 138 muestras procedentes del Departamento de Diagnóstico Molecular; 84 que corresponden al año 2013 y 54 al año 2014 (ver figura 49). Estas muestras son exudados nasofaríngeos (muestra ideal para búsqueda de *Bordetella pertussis*) y que habían sido negativas o no a otros virus respiratorios e incluyen pacientes cuyas edades oscilan entre 18 días a 88 años.

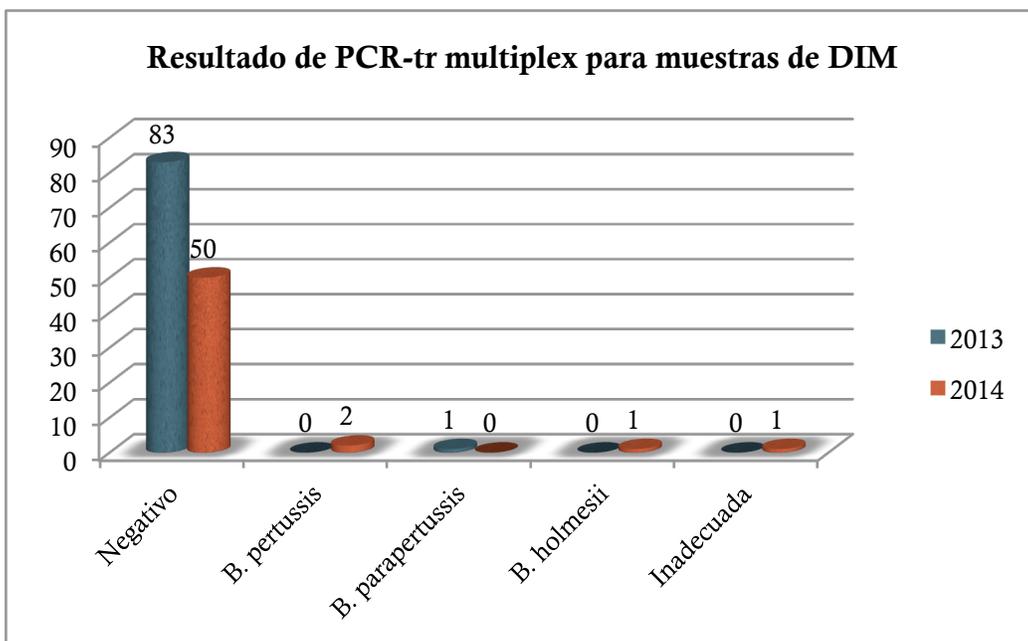


Figura 49. Resultado del análisis de muestras DIM.

En el análisis de estas muestras podemos concluir que verdaderamente el escrutinio clínico por parte del médico está bien inducido pues no son muestras que vinieran clínicamente dirigidas a análisis de *Bordetella pertussis*, sin embargo por el origen de la muestra (exudado nasofaríngeo) quisimos descartar la presencia de esta bacteria ya que al inicio de los síntomas, la tos ferina se puede confundir con un resfriado y afortunadamente para los pacientes encontramos pocas muestras positivas pues de 138 muestras sólo encontramos 2 muestras positivas a *Bordetella pertussis*, 1 positiva a *Bordetella parapertussis* y 1 positiva a *Bordetella holmesii* (Ver figura 49).

VI. CONCLUSIONES.

Es muy importante en temas de salud la detección oportuna del agente causal de la enfermedad para dar un tratamiento al paciente; oportuno y eficiente. Así pues a partir del presente estudio se logra tener un resultado para diagnóstico de *Bordetella pertussis* en un día, por el método de PCR-tr multiplex, dicho diagnóstico se obtenía en hasta 10 días por el método de cultivo.

Concluimos que la hipótesis es positiva pues, sí encontramos *Bordetella* en ambos grupos de muestras analizadas, con menor número de positivos en las muestras del área de Diagnóstico Molecular que corresponde a tan sólo 2.89%; mientras que en las muestras procedentes de Microbiología Clínica encontramos mayor porcentaje de *Bordetella*: 47.82 % en casos y 21.7 % en contactos. Comparando nuestros resultados con un estudio previo publicado por el InDRE (ver figura 48), vemos que coincide pues, también encontraron mayor número de positivos en PCR-tr que en cultivo.

Se implementó el método, además se validó con el procesamiento de muestras de pacientes; dirigidos y no dirigidos para este diagnóstico. El resultado es oportuno pues como ya se indicó, de 10 días de respuesta con la implementación de este método podemos entregar un resultado en tan sólo 1 día. Con esto ampliamos el marco analítico del LESPEQ con métodos de vanguardia y al mismo tiempo fortalecemos la vigilancia epidemiológica en el Estado de Querétaro y en éste caso particular de la *Bordetella pertussis*, logramos además ayudar a proteger a grupos tan vulnerables como los infantes.

Se determinó el modelo de la ecuación de regresión lineal para los primers IS481 y ptx1S, para lo cual, primero se midió la cantidad de UFC/ μ L de la vacuna Dipertix para continuar con las diluciones y finalmente con las lecturas de Ct para cada una de éstas y así graficar el modelo. Para ambos primers se encontró una fuerza de relación, bastante aceptable, entre las variables (UFC/ μ L vs Ct) pues obtuvimos un R^2 de 99.8 % para el primer ptx1S y 99.6 % para el primer IS481, pudimos observar que el primer ptx1S se comporta con mayor estabilidad en las lecturas que el primer IS481, pues, la secuencia IS481 es una secuencia de inserción que se encuentra en múltiples

copias (50 a 238) por cada célula de *Bordetella pertussis*, es decir, hay mucha variación en la cantidad detectada por bacteria. Mientras que para el ensayo de ptx1S, sólo se encuentra una copia por cada célula de *Bordetella pertussis*.

Determinamos los límites de detección y cuantificación para cada uno de los primers y encontramos para el primer IS481 que estamos detectando de 1.08 UFC/ μ L a 5.14 UFC/ μ L (tomando en cuenta que cada bacteria tiene de 50-238 secuencias de inserción) y para el primer ptx1S el límite de detección es de 2.16 UFC/ μ L, estos límites son importantes para fines cuantitativos del método y para conocer el comportamiento del mismo, es importante señalar que nuestro método actualmente es con fines cualitativos.

En el estudio de R&R para ver la evaluación de nuestras mediciones obtuvimos resultados muy óptimos en ambos primers, encontramos un % de variación del estudio R&R total para el primer IS481 de 9.04% y para el primer ptx1S de 7.07%. Vemos también que el mayor porcentaje de variación del estudio está dado por las partes (Variación del estudio por partes del primer ptx1S= 99.75% vs Variación del estudio por partes del primer IS481= 99.59 %) con esto concluimos que nuestro sistema de medición es aceptable de acuerdo a los criterios establecidos.

A través del proceso de este trabajo vimos que el primer ptx1S se comportó más estable en muchas etapas por ejemplo; en la uniformidad de los resultados, en la respuesta del resultado esperado incluso dio mejor reproducibilidad (Reproducibilidad del primer ptx1S=4.48% vs Reproducibilidad del primer IS481= 7.91 %) y concluimos que una de las razones, como ya hemos indicado con anterioridad, es que sólo se encuentra una copia por cada célula de *B. pertussis* mientras que la secuencia IS481 es una secuencia de inserción que se encuentra en múltiples copias (50 a 238) por cada célula de *B. pertussis*.

En la prueba de especificidad o selectividad, las bacterias analizadas no dan señal de fluorescencia, con los primers y sondas específicos para *Bordetella spp*, por lo que concluimos que el método es Selectivo y Específico para nuestro patógeno, nuestros resultados concuerdan con un estudio realizado por Pianciola, L. A. y colaboradores en el año 2012 (Desarrollo y validación de una PCR múltiple para el

diagnóstico de *Bordetella* spp.) pues, en su totalidad las cepas que probaron, presentaron ausencia de señal para los dos fragmentos genómicos considerados.

Sí se encontró la presencia de *Bordetella* spp en las muestras procedentes del laboratorio de Diagnóstico Molecular, sin embargo fue muy pequeño el número de positivas (2.89%), por lo que concluimos que el médico hizo un buen diagnóstico desde el inicio, al dirigir estas muestras para otro análisis.

Al analizar las muestras procedentes del departamento de Microbiología Clínica concluimos que; definitivamente el método de PCRtr multiplex tiene mayor sensibilidad que el método de cultivo para análisis de *Bordetella* spp. Encontramos que el porcentaje de positivos, en casos analizados por el método de cultivo fue de 19.56 % mientras que en las mismas muestras se obtuvo un 47.8 % de positivos analizadas por PCR-TR multiplex, lo cual demuestra la optimización del método implementado. Algo similar ocurre con el análisis de los contactos de estos casos, pues encontramos un mayor porcentaje de positividad por el método de PCR-tr multiplex, 21.7 % contra 6.52% que se había encontrado previamente por cultivo para las mismas muestras.

Con la implementación de este método se fortalece la vigilancia Epidemiológica en el Estado de Querétaro, además que se aumenta el marco analítico del Laboratorio Estatal de Salud Pública para contribuir en la Salud de la Población, dando un resultado más rápido y oportuno.

VII. RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta, que los estudios que se han realizado tanto en México como en otros países, nos indican que efectivamente la *Bordetella pertussis* está circulando en la Población Mundial, y presenta picos de incidencia cada 2 a 5 años, causando problemas de salud, sobre todo en los niños menores de 1 año con esquemas de vacunación incompleto y que sumado a esto, la protección no es para toda la vida, una vez completado el esquema de vacunación. Considero que es de suma importancia que las autoridades a nivel nacional tomen conciencia de la oportunidad de prevenir cifras más altas de infecciones en infantes por *Bordetella pertussis*, con acciones como:

- Cambiar el esquema Nacional de vacunación, administrando las dosis necesarias de vacuna a los adolescentes y adultos.

- Difundir la información sobre la vacuna a mujeres embarazadas en el tercer trimestre del embarazo para prevenir contagios al bebe (Operación capullo).

- Continuar con la vigilancia Epidemiológica con relación a esta bacteria para revisar sus cambios y tomar las medidas necesarias.

- Implementar estudios de seguimiento del comportamiento de la *Bordetella pertussis*, en relación a la población, en los años próximos.

En la actualidad, únicamente Austria, Australia, Canadá, Alemania y EUA recomiendan la vacuna contra pertussis en adolescentes como 5a o 6a dosis (Wagner, P. R., 2007) (Forsyth, K., 2005). En Latinoamérica, Argentina incorporó en 2009 una 6a dosis al esquema nacional de vacunación en el marco de los programas de salud escolar, a los 11 años de edad. En Costa Rica, en 2007 se introdujo la estrategia capullo de 1 dosis a las madres en el posparto inmediato (Ulloa, G. R., y Avila, A. M. 2008). En México en los centros de salud ya se está llevando a cabo esta operación de vacunar a las mujeres embarazadas en el posparto inmediato para proteger al bebe.

VII. DEFINICIONES Y GLOSARIO.

ADN. Ácido desoxiribonucleico.

ARN. Ácido ribonucleico.

Caso confirmado de tos ferina: todo caso que tenga aislamiento de *Bordetella pertussis* por cultivo o PCR en el caso per se o cualquiera de sus contactos, convivientes o personas con asociación epidemiológica. **Caso de tos ferina clínica:** todo caso con datos clínicos característicos y que no cuenta con muestra, independientemente de sus cinco contactos.

Caso de tos ferina atípico: todo caso sospechoso que tenga aislamiento de *Bordetella pertussis*.

Caso probable de tos ferina: persona de cualquier edad, con tos de 14 o más días de evolución y dos o más de las siguientes características; tos paroxística, en accesos, espasmódica o estridor laríngeo inspiratorio y uno o más de los siguientes datos; tos cianósante, hemorragia (conjuntival, petequias, epistaxis), leucocitosis con predominio de linfocitos; o historia de contacto con casos similares en las últimas 2 a 4 semanas previas al inicio del padecimiento. Nota: En esta definición se incluyen a los menores de 3 meses que pueden manifestar sólo episodios de apnea o cianosis con o sin tos.

Caso sospechoso de tos ferina: persona de cualquier edad con tos, sin importar los días de duración y con asociación con otros casos probables o confirmados. Esta definición se utiliza para la búsqueda activa de casos adicionales ante la presencia de casos probables, confirmados o atípicos, portadores, defunciones y en brotes.

Contacto: Personas que convinen con el caso de tos ferina y que pudieron haberlo contagiado, pueden ser familiares o cuidadores de guarderías, etc. Se toma muestra de cinco contactos por cada caso.

DGE. Dirección General de Epidemiología.

InDRE. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

LESPQ. Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Querétaro.

Límite de cuantificación (LC): se define como la concentración más baja de unidades genómicas por reacción del ácido nucleico diana que se puede determinar cuantitativamente con un nivel aceptable de precisión y exactitud a través de una validación.

Límite de detección (LD): se define como la concentración más baja de unidades genómicas por reacción del ácido nucleico diana que puede ser detectada de forma reproducible con un 95% de probabilidad.

mL. Mililitro

NTC. Control negativo (del inglés non template control)

OMS. Organización Mundial de la Salud.

OPS. Organización Panamericana de la Salud.

PCR-TR multiplex o PCR-tr multiplex. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, con más de un primers.

PCR-tr ó PCR-TR. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

Portador asintomático de *Bordetella pertussis* : toda persona sin signos o síntomas de enfermedad respiratoria a quien se tomó muestras por tener asociación epidemiológica con un caso probable o confirmado y cuyos resultados de cultivo o PCR son positivos a *Bordetella pertussis* .

PRIMERS. oligonucleótidos de material genético específicos y conocidos, que inician la replicación del ADN.

RNLSP. Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública. Está organizada de la siguiente manera: El InDRE tiene el laboratorio de infecciones respiratorias agudas

bacterianas y pertussis adscrito al departamento de bacteriología que encabeza a la Red Nacional de Laboratorios de diagnóstico de Tosferina (RNLSP-Tos), integrada por 26 Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los laboratorios de diagnóstico locales (centros de salud, jurisdicciones sanitarias, aunado a todos los laboratorios públicos y privados que realicen las técnicas de cultivo y PCR -TRMultiplex) para el diagnóstico de la tosferina por el laboratorio.

RP. Gen de la RNAasa P humana y que nos sirve como control interno en las pruebas de PCR y desde luego para el presente método. Es una ribonucleoproteína compuesta de una molécula de RNA y al menos diez subunidades protéicas. La no amplificación del marcador RP, indica que la toma de la muestra, preparación de reactivos, extracción de ADN o el proceso de amplificación fue inadecuado

µL. Microlitro

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1983). Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York.

Altunaiji, S., Jukuruzovic, R., Curtis, N., and Massie, J. (2007): Antibiotics for whooping cough (pertussis), Cochrane Database Sist rev.

Bej, A.K., M.H. Mahbubani y R.M. Atlas. (1991). Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. Critical Guía práctica sobre la técnica de PCR 539 Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 26:301-334

Birkebaek, N. H., Kristiansen, M., Seefeldt, T., Degn, J., Moller, A., Heron, I., Andersen, P.L., Moller, J.K. and L. Ostergard (1999) *Bordetella pertussis* and chronic cough in adults, Clin. Infect. Dis. 29, 1239-1242.

Bisgard, K. B. Pascual, K. Ehresmann, C. Miller, C. Cianfrini, C. Jennings (2004). Infant pertussis: Who was the source?. Pediatr Infect Dis J, 23, pp. 985-989.

Botero, A., Arbelaez, S., y Mendoza, V. (2007). Método Anova utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. Scientia Et Technica. XIII:37, pp.: 533-537.

CDC (2014): Centro para el Control y la Prevención de enfermedades. CDC en español. Atlanta, EEUU.

Chavez m.M., luque m. R., anaya p. M., lópez a. M. (2007) Instrumentación y Metrología. Universidad de Sonora, Depto. Ingeniería Industrial.

Clark, T. A. (2012). Cambio de la tos ferina epidemiología: todo lo viejo es nuevo otra vez. Journal Infect Dis. Doi. 10.1093

Clark, T. A., Messonier N. E. y Hadler S. C. (2014). La tos ferina de control: es hora de algo nuevo?. Tendencias Microbiológicas. Doi 10. 1016.

Colegio de Medicos de Filadelfia, (2015). La historia de las Vacunas. Lugar de nacimiento de Medicina de América. Imagen Dennis Kunkel.

Cone, T. E. J. (1970) Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640, *Pediatrics* 46, 522.

Costa J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22:5. 299-305

Cotter, P., and Miller, J.(2001) *Bordetella*. In: Groisman EA, *Principles of bacterial pathogenesis*. San Diego, CA: Academic Press. p. 619-74.

Forsyth, K., Nagai, M., Lepetic, A. y Trindade, E. (2005). Pertussis immunization in the global pertussis initiative international region: recommended strategies and implementation considerations. *Pediatr Infect Dis J*;24:S93-97.

Gibello, A., Blanco, M., Domínguez, L., Fernandez, F. J., (2001). Utilización de la PCR para el diagnóstico en Ictiopatología, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. España.

Gutierrez P. H. y De La Vara S. R. (2009). *Control Estadístico de la Calidad y Seis Sigma. Calidad de Mediciones*. 2ª ed. Mexico, D.F.: Mc Graw Hill.

Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*;88:7276-80.

Hoppe, J.E. (1995). *Bordetella*, p. 614-623. In. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

InDRE (2014): Lineamientos para la vigilancia Epidemiológica de tos ferina y síndrome coqueluchoide. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

Kaneshiro, M. D. y Neil, K. (2014): Clinical Assistant Professor of Pediatrics, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA. Also reviewed by David Zieve, MD, MHA, Bethanne Black, and the A.D.A.M. Editorial team.

Ledermann, W. D. (2004) Breve historia de la *Bordetella pertussis* , una elusiva damisela, *Rev. Chil. Infect.* 23, 241-246.

LESPEQ, (2014): Laboratorio Estatal de Salud Publica, Gráficas de PCR para los primers de identificación de *Bordetella spp.* Querétaro. México.

Loeffelholz M J. (2003). Molecular diagnosis of Pertussis. En Symposium: The role of new diagnostic tests in clinical practice. 43th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy-ICAAC, Chicago.

Luo, W., Yang, H. Rathbun, K., Pau, C., y Ou, C. (2005). Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43: 1851-1857.

Mathews, C. K.; Van Holde, K. E et Ahern, K. G. (2003). Bioquímica 6, 3 edición, págs. 204 y ss. ISBN 84-7892-053-2.

McNeil, B. E., Ohi, C., Calderwood S., Kaplan S y Baron E. (2011): Pathogenesis and epidemiology of *Bordetella pertussis* infection.

Molina, L. J., (2014): Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Mooi, F. R., and de Greeff, S. C. (2007) the case for maternal vaccination against pertussis, *Lancet Infect Dis.* 7, 614-624.

Muñoz, F. M. (2006) La tos ferina en lactantes, niños y adolescentes: Diagnóstico, tratamiento y prevención. Seminario pediátrico de enfermedades infecciosas.

Murray, R. P. (2005): Microbiología Médica, Tercera Edición, Ed. Elsevier Mosby.

Niesters H. G. (2004). Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*;25:414-29.

Nieto, G. J., Luciani A. K, Montes de Oca M. M. Y Matos D. D. (2009): Hospitalizaciones por *Bordetella pertussis* : Experiencia del Hospital del niño de Panamá, período 2001-2008. *Anales de pediatría*. Panamá.

Nikitina, T. V., Nazarova, N., Tishchenko, L. I., Tuohimaa, P. and Sedova, V. M (2003). Use of real time RT- PCR method for investigation of small stable RNA expression level in human epidermoid carcinoma cells A431.

OMS(2007): Challenges in global immunization and the Global Immunization Vision and Strategy 2006–2015. *Wkly Epidemiol. Rec.*; 87: 190–5.

OPS, (2012). Organización Panamericana de la Salud. Alerta Epidemiológica. Tos Ferina (Coqueluche). Organización PAHO.

Pianciola, L. A., Mazzeo, M. L., Flores, D. y Hozbor, D. F. (2012). Desarrollo y validación de una PCR múltiple para el diagnóstico de *Bordetella* spp. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. Facultad Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

PlotkinS. (2005): The global pertussis initiative: process overview. *Pediatr Infect Dis J*, 24, pp. 7-9.

Preston, A., Thomas, R., and Maskell, D. J. (2002) Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* wlb LPS biosynthesis locus, *Microb Pathog* 33 (3), 91-95.

Roche, (2008). Inserto de estuche, MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Versión Diciembre.

Roche. Inserto de estuche, MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Versión Diciembre 2008.

Rodríguez, G. M. y Rodríguez, L. W. (2006) Métodos Fisicoquímicos en Biotecnología, PCR en tiempo real 33, pp. 7-31.

Rodríguez N. y Barrios M. A., (2009): Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas. Laboratorio de Ingeniería Genética, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela.

Rosenblad, M., Dávila, M., Piccinelli, P., y Samuelsson, T. (2006). Inventario y análisis de las subunidades de proteínas de la ribonucleasa P MRP. *Nucleic Acids Research*. Vol. 34, No.18: 5145-5156.

Saiki, RK., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, KB., Horn, GT., Erlich, HA., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Dec 20;230(4732):1350-4.

Sambrook, J and D W. Russel, D. W (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. edición, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5.

Sato, Y., Kimura, M. and H. Fukumi. (2008) Development of a pertussis component vaccine in Japan, *Lancet* 8369, 122-126.

Schnek C. y Massarini B. (2007). *Biología*. Cap. 9. Las bases químicas de la herencia: el DNA y su replicación. 7ª ed. Médica Panamericana.

Tartof S. Y., Lewis M., Kenyon C., Blanco K., Osborn A., Liko J., Zell E., Martin S., Messonier N. E., Clark T. A. y Skoff T. H.(2013). Disminución de la inmunidad a la tos ferina después de 5 dosis de DTaP. *Pediatría*. 131 (4): e1047-52. doi: 10.1542

Tomé, S. P., Torres, A. L., Romero, Q. G., Guiscafré, G. H. (2008): *Bordetella pertussis* in adolescents students in Mexico City. *Rev Saúde Pública*;42:679-683.

Tozzi, A. E., Celentano, L. P., Ciofi, M. L., Salmaso S. (2005). Diagnosis and management of pertussis. *CMAJ*;172: 509-515.

Ulloa, G. R., y Avila, A. M. (2008): Pertussis in Latin America: current situation and future vaccination challenges. *Expert Rev Vaccines; Anales de Pediatría*: Barcelona, España. 7:1569-1580.

Wagner, P. R., Korinek, M. P., Stanek, G., Khanakah, G., Kollaritsch, H. (2007) Impact of a pertussis booster vaccination program in adolescents and adults on the epidemiology of pertussis in Austria. *Ped Infec Dis J* ;26:806-810.