



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Ministerio
de SALUD



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy

Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Tesina de grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas
Profundización en Microbiología

Genes de virulencia de relevancia epidemiológica en aislamientos de *Bordetella pertussis* de Uruguay

Lucía Cristófalo Sírtori

Orientadora: Dra. Gabriela García Gabarrot

Lugar de ejecución: Unidad de Bacteriología, Departamento de
Laboratorios, Ministerio de Salud Pública

Montevideo, Uruguay
Mayo de 2018

ÍNDICE

1.- RESUMEN.....	3
2.- INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 Microorganismo objeto de estudio y su importancia clínica.....	4
2.2 Principales factores de virulencia de <i>B. pertussis</i>	6
2.3 Vacunas Anti- <i>Bordetella Pertussis</i>	9
2.4 Sensibilidad frente a antibióticos.....	11
2.5 Epidemiología de la tos convulsa.....	12
3.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	13
4.- OBJETIVOS.....	14
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Materiales.....	15
5.1.1 Material biológico.....	15
5.1.2 Reactivos y equipos.....	16
5.2 Métodos.....	17
5.2.1 Métodos fenotípicos.....	17
5.2.1.1 Observación morfológicas de las colonias.....	17
5.2.1.2 Tinción de Gram.....	17
5.2.1.3 Prueba de oxidasa.....	17
5.2.1.4 Crecimiento en Agar Sangre.....	18
5.2.1.5 Aglutinación con antisueros específicos.....	18
5.2.2 Métodos genotípicos.....	19

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6.1 Análisis del gen <i>ptxS1</i>	24
6.2 Análisis del gen <i>prn</i>	25
6.3 Correlación de los resultados obtenidos con datos generados por electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	27
7.- CONCLUSIONES.....	31
8.- PERSPECTIVAS.....	33
9.- REFERENCIAS.....	34
10.- ANEXOS.....	39
Anexo I.....	39
Anexo II.....	41
Anexo III.....	43

1.- RESUMEN

La tos convulsa es una enfermedad inmunoprevenible, sin embargo continúa siendo causa de morbilidad, fundamentalmente en lactantes que no han recibido vacunación completa. El principal agente etiológico es *Bordetella pertussis*, un cocobacilo Gram negativo estrictamente aerobio, que infecta adolescentes y adultos vacunados en la niñez, actuando como vía de transmisión a los lactantes.

Actualmente hay dos tipos de vacunas, una a célula entera y la otra acelular, cuya fórmula generalmente contiene 3 factores de virulencia de *B. pertussis*, como por ejemplo la toxina pertussis, la pertactina y la hemaglutinina filamentosa. Muchos países han sustituido una vacuna por otra, o han desarrollado estrategias de vacunación utilizando ambas vacunas como es el caso de Uruguay.

Desde la década de los años 90, se observa una reemergencia de la tos convulsa a nivel global, aunque de menor incidencia que en la era pre-vacunación. Como consecuencia, se está investigando el o los motivos de este fenómeno ya que las causas podrían variar de un país a otro. Una de las hipótesis que se plantea es la adaptación del patógeno a las vacunas.

En este trabajo se analizó una colección de aislamientos (n=68) recuperados en Uruguay entre los años 2004 y 2015, periodo en el que ocurrieron dos brotes de enfermedad (años 2007 y 2011/12). Luego de confirmar la identificación de los aislamientos se procedió al análisis por secuenciación de dos genes de virulencia de *B. pertussis*: *ptxS1* y *prn*, que codifican para la toxina pertussis y la pertactina respectivamente, con el fin de conocer la distribución de los alelos presentes en nuestra colección y compararlos con los alelos de las cepas vacunales.

El análisis de las secuencias mostró que todas las cepas aisladas en Uruguay entre 2004-2015 son *ptxS1A/prn2*, estos alelos son diferentes a los presentes en las cepas vacunales. Estos resultados son similares a los que presentan otros países con alta cobertura de vacunación.

Siendo este trabajo el primer estudio molecular de cepas aisladas en Uruguay, contribuye a establecer una línea de base para poder identificar nuevas tendencias a futuro.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1-Microorganismo objeto de estudio y su importancia clínica

Bordetella pertussis es una bacteria Gram negativa, estrictamente aerobia que oxida aminoácidos pero no fermenta carbohidratos (Loeffelholz, 2003). Tiene como único reservorio al hombre, y se localiza en las células ciliadas de la nasofaringe donde prolifera y se disemina hacia las células ciliadas de la tráquea y bronquios.

B. pertussis es el agente causal de la tos convulsa o tos coqueluchoide, enfermedad del tracto respiratorio humano, inmunoprevenible y distribuida mundialmente. Afecta aproximadamente a 50 millones de personas por año (WHO, 2014). En el pasado, la transmisión de esta enfermedad era de niño a niño en edad escolar, sin embargo, tras la introducción de las vacunas se produjo un cambio epidemiológico y la transmisión es actualmente de adolescentes y adultos a lactantes no vacunados (figura 1).

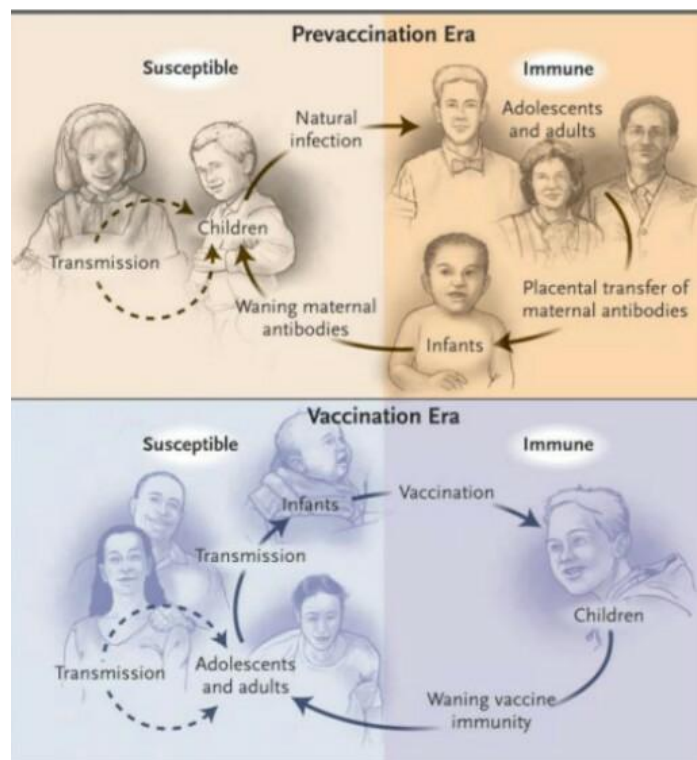


Figura 1: Transmisibilidad de *B. pertussis* en la era pre y post vacunal (Hewlett, 2005).

Esta patógeno era observado desde 1900, y fue aislado por primera vez en 1906 por Bordet y Gengou (Bouchez, 2015). Es una bacteria de crecimiento muy lento, generalmente se necesitan entre tres y cuatro días para un cultivo positivo y siete días para confirmar un cultivo negativo. También es muy exigente desde el punto de vista nutricional, necesita para su crecimiento requerimientos especiales. Para su cultivo se puede utilizar el medio Agar Bordet-Gengou o preferentemente el medio Agar Carbón Regan-Lowe (Ledermann, 2004). En Agar Carbón Regan-Lowe las colonias se observan de un color gris perlado, brillantes y abovedadas. La temperatura óptima de crecimiento para esta bacteria es de 35-37 °C.

La tos coqueluchoide es una enfermedad muy contagiosa, que se transmite de persona a persona mediante gotas excretadas por la tos o por contacto directo con secreciones de las vías respiratorias de la persona enferma (Melvin, 2014). Se puede observar una incidencia cíclica con picos de frecuencia cada 2 a 5 años.

La enfermedad en el niño consta de tres etapas (American Academy of Pediatrics, 2012) (figura 2):

Fase catarral

Comienza con síntomas parecidos a la gripe, sin embargo, luego de cinco o seis días, en lugar de disminuir la tos, ésta aumenta en intensidad y frecuencia. Esta similitud al inicio es lo que hace difícil su detección temprana. Esta fase tiene un período de duración de aproximadamente dos semanas.

Fase paroxística

Se caracteriza por una serie de episodios de tos violenta, entre 20 y 30 generalmente, frecuentemente seguido de vómitos. Entre los episodios, al niño se le dificulta el respirar y posteriormente se produce la tos y la inspiración característica. La fiebre es nula o mínima; esta etapa dura de dos a cuatro semanas.

Fase de convalecencia

Es la última y más larga etapa (de uno a tres meses) y es la fase donde se reducen los síntomas.



Dra. Nicole Guiso, CNR Institut Pasteur, Paris

Figura 2: Evolución de la enfermedad mostrando sus fases

Puede haber complicaciones secundarias como neumonía, otitis media, convulsiones, encefalopatías, entre otras (Mattoo, 2005).

En el adulto, la tos persistente puede ser el único síntoma, por lo que en muchos casos no se diagnostica.

2.2.- Principales factores de virulencia de *B. pertussis*

La toxina pertussis (TP) y la pertactina (PRN) además de ser los principales factores de virulencia de *B. pertussis*, son componentes de las vacunas acelulares.

La **TP** es una exotoxina de 106 kDa, exclusiva de *B. pertussis* que favorece la adherencia a las células del tracto respiratorio e inhibe la migración de células que expresan receptores de quimioquinasa acoplados a proteína G (neutrófilos, monocitos y linfocitos) (Babu, 2001). Esta toxina está implicada en el establecimiento de la infección ya que suprime la inflamación e inhibe las moléculas bactericidas generadas por las células hospederas. (Melvin, 2014).

Tiene una estructura típica AB, compuesta de cinco polipéptidos, nombrados de S1 a S5. S1 forma la subunidad A; esta subunidad es la parte enzimática activa de la toxina y tiene actividad ADP- ribosiltransferasa, es decir que aumenta el AMPc de la célula (Mattoo,

2005). S1 está codificada por el gen *ptxS1* y tiene cuatro alelos: *ptxS1A*, *ptxS1B*, *ptxS1D* y *ptxS1E* (Mooi, 2000). La subunidad B está compuesta por los polipéptidos S2, S3, S4 y S5 y se encarga de unir a la toxina a la superficie de la célula hospedera blanco (Figura 3). El operón *ptx*, el cual codifica para la toxina, es ayudado por el operón *ptl*. Éste último codifica para ocho genes, *ptlA-ptlH*. Ambos operones están controlados por el promotor de la toxina Ptox (Babu, 2001).

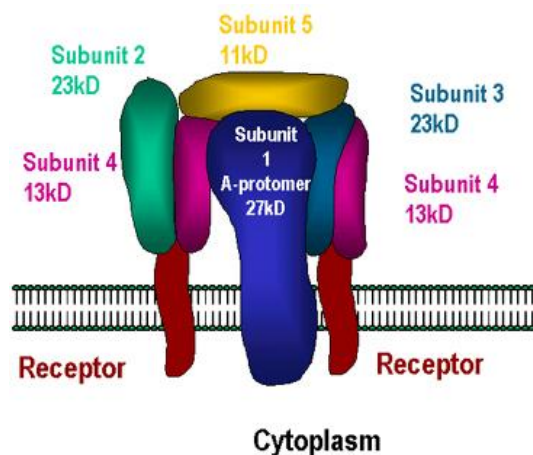


Figura 3: Estructura de la Toxina pertussis (Mattoo, 2005).

Una vez que la toxina está adherida, la subunidad A es liberada y traslocada al citosol gracias a la unión de ATP a la subunidad B. Se propuso que su secreción se da en dos etapas, la primera, en donde se produce el anclaje de la toxina pertussis a la membrana externa bacteriana; y en la segunda etapa, en donde se interactúa con el sistema *ptl*. Esto último provoca la salida de la toxina al medio extracelular (Farizo, 2002).

A pesar de que las cepas que no presentan a la toxina pertussis son raras, se encontraron dos aislamientos que son TP negativos (TP -), uno en Francia en 2007 y el otro en EUA en 2013. Ambos niños eran menores a un año y no estaban vacunados. En ambos casos se observó que había una delección en el operón *ptx*, con lo cual los resultados de las PCRs dieron negativas (Bouchez, 2009; Williams, 2016).

La **PRN** es un autotransportador responsable de la adhesión de la bacteria a las células de la tráquea del hospedero. La proteína madura tiene dos secuencias Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RDG) que permiten la adhesión a células fagocíticas y también receptores en las células diana (Babu, 2001). El gen que la codifica, *prn*, presenta dos regiones, llamadas región 1 y 2 (Mooi, 1998). Hasta el momento presenta 13 alelos,

siendo *prn1* y *prn2* los principales (Mooi, 2010). Tiene una estructura formada por 16 hojas β hélice paralelas y por loops que unen las regiones β , en estos loops se encuentra la región RDG (Figura 4).

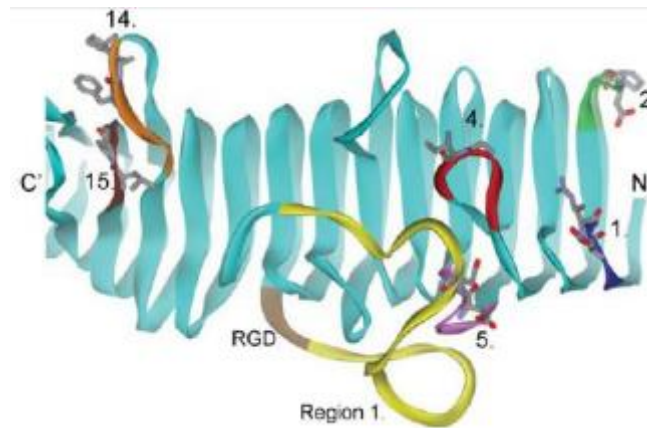


Figura 4: Estructura de la proteína pertactina (Hijnen, 2007).

Estudios sugieren que esta proteína es la adhesina más importante de *B. pertussis* (Cherry, 1998). Sin embargo, con la presión de selección impuesta por la vacuna acelular, se han encontrado cepas que son PRN negativas (Bouchez, 2009; Pawloski, 2013). En Francia se encontraron a partir de 2007 mientras que la primera cepa PRN negativa en EUA fue aislada en el 2008, y a partir de ese momento se ha incrementado el número de aislamientos con esta característica (Lam, 2014).

Ambos factores de virulencia están regulados por el **regulón de virulencia de *Bordetella*** (*Bvg* por sus siglas en inglés), codificado por el locus *bvg* AS. Este regulón también controla la expresión de otros factores de virulencia como: la hemaglutinina filamentosa (FHA) y las fimbrias (FIM) también presentes en las fórmulas de vacunas acelulares, la toxina adenilato ciclasa (TAC), la toxina dermonecrótica (TD) y el sistema de secreción de tipo III (SSTT) (Babu, 2001; Bottero, 2010) (Figura 5).

En respuesta a cambios en las condiciones ambientales, pueden haber dos fases fenotípicas diferentes, Bvg^+ (fase virulenta) y Bvg^- (fase avirulenta). Este regulón codifica para dos proteínas, BvgA, proteína de unión al ADN encargada de regular; y BvgS, la cual es una proteína capaz de censar el medio. En conjunto, forman un sistema proteico de transferencia de grupos fosfatos (Mattoo, 2005).

El factor de virulencia que causa la tos característica (tos paroxística) de la tos convulsa, es la citotoxina traqueal (CT). Es un tetrapéptido de 921 Da, cuyo blanco son las células epiteliales ciliadas del tracto bronquial, causa ciliostasis y estimula la IL-1, lo cual aumenta la temperatura corporal. Es el único factor de virulencia que es independiente del regulón *Bvg* (Mattoo, 2005). Esta toxina puede actuar sobre los neutrófilos, impidiendo la quimiotaxis e inhibiendo su metabolismo (Mills, 2001).

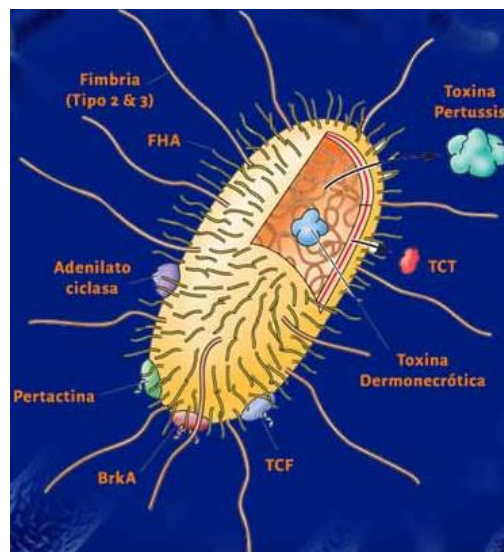


Figura 5: Ilustración de los factores de virulencia de *B. pertussis*

2.3.- Vacunas anti-*B. pertussis*

En la actualidad existen dos tipos de vacunas para tratar de controlar la tos convulsa: la vacuna a célula entera (incluida en la triple bacteriana: Difteria-Pertussis-Tétanos: DPT) y la vacuna acelular (Difteria-Pertussis acelular-Tétanos: dpaT) que generalmente contiene 3 antígenos de *B. pertussis* (todas las fórmulas contienen la toxina pertussis). Además, ambas se pueden administrar en una vacunapentavalente que también incluye *H. influenzae* b y Hepatitis B. Con ninguna de las dos vacunas la inmunidad conferida es de por vida.

La vacunación contra la tos convulsa comenzó en 1909 y en 1913 fue la primera vez que se utilizó en una epidemia ocurrida en Túnez. La vacuna utilizada en esa ocasión, fue una

emulsión de cultivo en agar sangre con papa de *B. pertussis* y posteriormente lavada hasta a una solución salina de 400 millones de bacterias por gota (Ledermann, 2004). Es decir que las primeras vacunas contenían el organismo entero, por lo que, la toxicidad de esta vacuna estaba directamente relacionada a la cantidad de bacterias que contenía (Mattoo, 2005). En los años 30, la vacuna se usaba tanto para la prevención como para el tratamiento. Fueron varias las vacunas probadas en esos años, generando algunas de ellas una respuesta inmunológica suficientemente eficiente (Cherry, 1996). Hacia mediados de 1940 se patentaron las primeras vacunas que se comenzaron a administrar a niños, disminuyendo con éstas, entre el 70% y el 90% de los casos de la enfermedad (CDC, 1997). En la década de los años 50, se observó que la vacuna era reactogénica para los adultos, además se notificaron pacientes con eventos neurológicos severos y muertes que se asociaron con la vacuna. Se planteó entonces la necesidad de desarrollar una vacuna acelular con algunos de los factores de virulencia como la toxina pertussis, la pertactina y las fimbrias para los que se utilizaron las variantes más frecuentes de acuerdo a los datos disponibles (Mooi, 2013). El desarrollo de la vacuna acelular tuvo lugar en la década de los 80 y para 1990 el uso de la misma se extendió en la mayoría de los países desarrollados y algunos subdesarrollados (King, 2010).

Muchos países han sustituido una vacuna por otra, mientras que otros han desarrollado estrategias de vacunación utilizando ambas vacunas (van Gent, 2015) (Tabla 1).

Tabla 1: Esquema del calendario de vacunación de europeos (Vaccine Scheduler, 2018)

País	Meses									Años					
	1	2	3	4	5	6	11	12	18	3	4	6	12	14	15
Finlandia			dpaT		dpaT			dpaT			dpaT			dpaT	
Francia		dpaT	dpaT	dpaT					dpaT				dpaT		
Holanda	dpaT		dpaT	dpaT			dpaT				dpaT				
Polonia		DPT		DPT		DPT			DPT			dpaT			
Reino Unido		dpaT	dpaT	dpaT						dpaT					

DTP - Vacuna a células enteras
 dpaT - Vacuna acelular

En Uruguay, la introducción de la vacuna celular tuvo lugar en el año 1966 con el comienzo de un incipiente programa de vacunaciones. Actualmente, el porcentaje de cobertura de vacunación es del 94% (Depto de Inmunizaciones CHLA-EP). Se administra a lactantes de 2, 4, 6 y 15 meses la vacuna pentavalente (Heberpenta®, CECMED, Cuba), que incluye la vacuna a células enteras (DPT). Posteriormente, a los 5 años se realiza un refuerzo con la misma vacuna. Desde el año 2013, se incorporó la vacuna dpaT (Boostrix™, GlaxoSmithKline, Bélgica) para los niños de doce años, que incluye los factores de virulencia: TP, PRN y FHA. Además, se estableció una estrategia de vacunación “en capullo” que consiste en vacunar a padres y/o cuidadores (hasta 4) de niños con un peso menor a 1500 gr. Desde marzo de 2015 se vacuna con dpaT a embarazadas a partir de la semana 20 de gestación, para inmunizar al feto por vía placentaria. El Ministerio de Salud Pública (MSP) recomienda que el personal de salud en contacto con niños menores de un año se vacune (MSP, 2016).

2.4.- Sensibilidad frente a antibióticos

Ante una infección por *B. pertussis*, se realiza un tratamiento con macrólidos, los cuales son una clase de antibióticos que inhiben la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S, es decir que detiene el crecimiento de la bacteria. El macrólido puede provocar un efecto bacteriostático o bactericida dependiendo de tres factores: la especie bacteriana atacada, la concentración del antibiótico alcanzada en el sitio de infección y la fase de crecimiento en que se encuentran las bacterias durante la administración del antibiótico.

A pesar de que no hay métodos estandarizados para determinar la sensibilidad de *B. pertussis*, el antibiótico más usado en el laboratorio es la eritromicina, aunque también se pueden utilizar nuevos macrólidos como la claritromicina y la azitromicina. Cabe destacar que el lento crecimiento de *B. pertussis* dificulta la determinación.

Desde que se reportó el primer caso de resistencia a la eritromicina en 1994 en Arizona, EUA, se han encontrado en ese país otros cuatro casos (Hill, 2000). En estos casos se utilizó trimetoprim-sulfametoxazol ya que los aislamientos que presentaron resistencia a la eritromicina, también presentaron resistencia a los otros macrólidos (Matoo, 2005). El primer aislamiento resistente en Europa se identificó en Francia en 2012 (Guillot, 2012).

También se aislaron microorganismos resistentes en China entre los años 2012 y 2013 (Wang, 2014).

1.5.- Epidemiología de la tos convulsa

La epidemiología de la tos convulsa ha tenido variaciones a lo largo de la historia. En la era pre-vacunación, la incidencia de esta enfermedad era muy grande, en EUA la incidencia anual estimada de casos era de 872 casos por 100.000 habitantes (Mattoo, 2005). Los principales afectados eran los niños escolares, ya que el 80% de los casos ocurría en niños mayores de 5 años y menos del 3% en mayores de 15 años. Al introducir la vacuna celular en el calendario obligatorio de vacunación disminuyeron los casos y muertes por tos convulsa, entre 0,5 y 1,0 casos por 100.000 habitantes en EUA (WHO, 2015; Mattoo, 2005).

En las últimas décadas, se observó la reemergencia de esta enfermedad; aunque su incidencia es notoriamente menor que en la era pre-vacunación (Wood, 2008), llegando a 3,1 casos por 100.000 habitantes en EUA en el año 2002 (Mattoo, 2005). Actualmente el mayor grupo de riesgo son los lactantes. Los adultos cursan la enfermedad sin los síntomas típicos, dificultando el diagnóstico, y transmiten la enfermedad a recién nacidos y lactantes sin vacunación completa.

Se está estudiando en diferentes lugares del mundo el motivo de esta reemergencia, surgiendo varias hipótesis. Por ejemplo, una mayor conciencia del problema y/o una mejora en el diagnóstico. Otras hipótesis pueden ser la disminución en el tiempo de la inmunidad inducida por la vacuna a célula entera, la disminución de la eficacia en el esquema de vacunación, el cambio de una vacuna celular a otra acelular menos efectiva o la adaptación del patógeno a las vacunas.

Además, la vacuna acelular está compuesta por proteínas polimórficas, para las que se seleccionó la variante más frecuente. La vacunación con estas variantes ejerce una presión de selección, especialmente sobre los más polimórficos como lo son la pertactina y la toxina pertussis (Mooi, 2001). Así, luego de la introducción de la vacuna, se pueden observar cambios en la distribución de los alelos. Un estudio realizado en conjunto Argentina-Francia mostró ese cambio, ya que la vacuna presenta los alelos *ptxS1B* y el *ptxS1D* de la toxina pertussis y el alelo *prn1* de la pertactina, mientras que el 100 % de las cepas estudiadas presentaban el alelo *ptxS1A* y el 93% presentaban *prn2* (Caro, 2007).

3.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Hasta el año 2007 en Uruguay, solo se realizaba una vigilancia de caso sospechoso de tos convulsa mediante la notificación semanal al MSP. A partir de ese año se lleva a cabo en el Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) una vigilancia centinela en dos períodos al año, uno en abril-mayo y otro en octubre-noviembre. En una primera instancia, en el Hospital Pereira Rossell (HPR); y posteriormente en dos hospitales con alta población pediátrica, el Hospital de Las Piedras (HLP) y la Médica Uruguaya (MU). En el marco de esta vigilancia se ha generado una colección de aislamientos de *Bordetella pertussis*, única en el país, ya que el cultivo de este microorganismo sólo se realiza en el DLSP.

En la última década, se registraron dos brotes de la enfermedad, el primero fue en el año 2007 y el segundo en 2011. Este último brote, en el cual incluso ocurrieron muertes de lactantes, provocó un incremento en la prevención de la enfermedad. Por ejemplo, se implementó una dosis de vacuna acelular a niños de doce años en el 2013 y una dosis a las embarazadas en 2015. Además, la denuncia de caso sospechoso de tos convulsa pasó de ser de notificación semanal a ser de notificación diaria.

Este trabajo propone estudiar los aislamientos de períodos de brote epidémico y de períodos inter-brote para estimar la diversidad genética de la colección en dos genes de virulencia: *ptxS1* y *prn*; y comparar los tipos de alelos que se encuentran en las cepas aisladas en nuestro país con los alelos que se encuentran en las vacunas.

La puesta a punto de las técnicas para la caracterización de estos factores de virulencia permitirá fortalecer la vigilancia epidemiológica de este microorganismo, generando una línea de base para evaluar los efectos de las intervenciones con vacunas.

4.- OBJETIVOS

- 1 Confirmar la identificación de aislamientos de *Bordetella pertussis* de Uruguay en el periodo 2004-2015.
- 2 Estudiar la distribución de dos factores de virulencia (toxina pertussis y pertactina) de los aislamientos de *B. pertussis*.
- 3 Correlacionar los resultados obtenidos con datos generados por electroforesis en campo pulsado (PFGE).
- 4 Establecer una línea de base que permita identificar tendencias o la introducción de nuevas variantes.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Materiales

5.1.1- Material biológico

Se analizaron todos los aislamientos (n=68) de *B. pertussis* de la colección de cepas de la Unidad de Bacteriología del DLSP, obtenidas entre los años 2004-2015 (Tabla 2). Estos aislamientos son el resultado de la búsqueda de *B. pertussis* en aspirados nasofaríngeos con sospecha clínica de tos convulsa. El período de estudio incluye aislamientos de los primeros esfuerzos en establecer una vigilancia centinela (2004-2005) y aislamientos obtenidos de la vigilancia, incluyendo los últimos dos brotes de esta enfermedad registrados en Uruguay. Se cuenta con el dato de la fecha de aislamiento, sexo y edad del paciente, dato clínico y estado vacunal (Anexo I).

Tabla 2: Distribución de aislamientos de *B. pertussis* por año y por edad del paciente

Edad	2004-2005	2007	2008-2009	2011-2012	2013-2015	Total
0-3 meses	4	21	4	9	3	41
4-6 meses	3	4	2	4	1	14
7-9 meses	1	0	0	4	1	6
10-13 meses	0	1	0	6	0	7
Total	8	26	6	23	5	68

En todos los casos las cepas fueron recuperadas de una alícuota conservada a -70 °C en leche desnatada (BBL). Posteriormente las mismas fueron sembradas en Agar carbón (Anexo II) y colocadas en un ambiente húmedo en la estufa durante 72 hs a 37 °C. Es importante que el ambiente sea húmedo para evitar la desecación a la cual *B. pertussis* es susceptible. Luego se procedió a realizar la confirmación de la especie y se pusieron a punto las PCR para realizar los estudios genotípicos.

Además se utilizaron dos cepas de referencia cedidas por el Instituto Carlos Malbrán (Buenos Aires, Argentina). Estas cepas son:

- La cepa Tohama I, originaria de Japón, aislada en el año 1954. Se caracteriza por ser *prn1* y *ptxS1B*. Esta cepa es la utilizada en la fórmula de vacuna acelular Boostrix™.
- La cepa 509 proviene de Holanda y fue aislada en el año 1950. Presenta un gen *prn7* y un gen *ptxS1D*.

La cepa 509, es una de las tres cepas vacunales con las cuales se genera la vacuna celular utilizada en nuestro país contra *B. pertussis*. Las otras dos cepas usadas son la cepa 134, la cual es *prn1* y *ptxS1B* y la cepa 165, que presenta el alelo *prn1* y *ptxs1D*.

5.1.2.- Reactivos y equipos

- Reactivos para PCR (Roche y invitrogen), agarosa I (Amresco), TBE (10X Thermo Scientific) , tampón de carga (10X Takara), agente fluorescente para detección de ADN (GelRed Dropper Bottle, Olerup SSP).
- Kit de extracción de ADN (Quick-gDNA™ MiniPrep), Kit de purificación (GeneJet PCR purification Kit, Thermo Scientific).
- Flujo laminar de bioseguridad Class II/AB3 (Nvaire), termociclador (Biometra y Multigene Labnet international inc.), cuba electroforética (FisherBiotech), centrífugas (Spectrafuge 24D, Labnet international inc.), equipo de lectura de geles (Pharmacia Biotech Image Master VDS).

5.2.- Métodos

5.2.1.- Métodos fenotípicos:

Se confirmó la identificación de cada aislamiento mediante:

5.2.1.1.- Observación morfológica de las colonias. En Agar carbón las colonias se observan de un color gris perlado, brillantes y abovedadas. La composición del medio se encuentra en el Anexo II.

5.2.1.2.- Tinción de Gram. Esta técnica permite agrupar las bacterias en Gram negativas y Gram positivas según la estructura y grosor de la pared de la bacteria. Las bacterias Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicano y las Gram negativas una capa delgada y una membrana externa.

Las células previamente fijadas por calor, se tiñen con solución de cristal violeta, se lavan y se tratan con lugol. El yodo de lugol forma un complejo con el cristal violeta que sirve para fijar éste a la célula. Luego se agrega un agente decolorante (alcohol o acetona) en el cual el complejo yodo-cristal violeta es soluble.

Las bacterias Gram –, al poseer una pared de peptidoglicano fina, permite que el solvente ingrese y se escape el cristal violeta. Es por este motivo que este tipo de bacterias se decoloran mientras que las Gram + no, ya que el alcohol produce que se deshidrate, cerrando los poros de la membrana y no permitiendo que el complejo salga.

Luego de la decoloración se aplica un colorante de contraste, generalmente safranina, que hace visibles las bacterias Gram – que habían sido decoloradas. Entonces, las bacterias Gram + se ven de color azul-violeta y las Gram – se ven rosadas.

5.2.1.3.- Prueba de oxidasa. La prueba de la oxidasa determina indirectamente la presencia de la enzima citocromo c oxidasa. Ésta, cataliza la oxidación del citocromo c reducido y transfiere electrones (hidrógeno) al oxígeno, con producción de agua o peróxido, según la especie bacteriana.

El reactivo empleado, el dihidrocloruro de tetrametil-parafenilendiamina, da un complejo morado en presencia de la enzima. Para esta prueba se utilizan discos

comerciales (Becton Dickinson) de P-aminodimetilanilina 0.9mg y se considera positivo el viraje a morado dentro de los 10-15 segundos y negativo cuando no hay viraje de color.

5.2.1.4.- Crecimiento en Agar Sangre: el crecimiento en Agar Sangre se utiliza para aislar y cultivar gran cantidad de microorganismos tanto aerobios como anaerobios nutricionalmente exigentes ya que la peptona y el almidón convierten a este medio en un medio muy rico. La adición de sangre, además de aportar nutrientes, permite observar si los microorganismos producen o no la lisis de glóbulos rojos o hemólisis. *B. pertussis*, no crece en Agar Sangre pero sí tiene la capacidad de hacer hemólisis en el medio Agar Bordet-Gengou.

El cultivo en Agar Sangre de *B. pertussis* se realiza una vez que se confirmó que la cepa pertenece al género *Bordetella*. Esto permite diferenciar a *B. pertussis* del resto de las especies debido a que como ya se mencionó, es la única que no crece en este medio.

Se siembra el microorganismo en placas de Agar sangre y se incuba a 37°C por 48 horas. Luego del tiempo de incubación, si no hay crecimiento, se considera una identificación presuntiva de *B. pertussis*.

5.2.1.5.- Aglutinación con antisueros específicos. Esta prueba está basada en el hecho de que los anticuerpos presentes en el suero, en respuesta a la exposición de los antígenos de *B. pertussis*, produce la formación de grumos macroscópicos (aglutinación).

Se utilizaron sueros específicos (Remel) anti- *B. pertussis* y anti- *B. parapertussis* y suero fisiológico para descartar que la cepa sea autoaglutinable. Como control de los sueros se utilizaron cepas de referencia mencionadas anteriormente.

5.2.2.- Métodos genotípicos

Los factores de virulencia que se estudiaron mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y su posterior secuenciación, fueron la pertactina y la toxina pertussis.

Se realizó la extracción de ADN mediante la utilización de un kit comercial (Quick-gDNATM MiniPrep) y por hervido.

Posteriormente se procedió a la optimización de los protocolos de las amplificaciones por PCR. Los protocolos detallados y sus modificaciones se encuentran en el Anexo III.

Para amplificar la región 1 del gen *prn* se utilizaron los cebadores AF, 5'-GCCAATGTCACGGTCCAA-3', y BR, 5'-CGGATTCAGGCGCAACTC-3'; mientras que los cebadores para *ptxS1* fueron, S1F, 5'-TAGGCACCATCAAAACGCAG-3', y S1R, 5'-TCAATTACCGGAGTTGGGCG-3' (Mooi, 2000). Posteriormente, los productos de PCR se purificaron (GeneJet PCR purification Kit, Thermo Scientific) y se enviaron a secuenciar a MacroGen Inc. (Seoul, Korea).

Para secuenciar la región 1 de la *prn*, se usaron los cebadores AF, 5'-GCCAATGTCACGGTCCAA-3' y AR, 5'-GCAAGGTGATCGACAGGG-3' y los cebadores de *ptxS1* son los mismos que se utilizaron para la amplificación primaria (Mooi, 2000).

Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa Vector NTI Advanced 11 y la herramienta BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov).

En el caso de las secuencias de *prn*, se recurrió al BLAST para obtener la secuencia peptídica, ésta nos permitió determinar qué tipo de *prn* es, observando la cantidad y tipo de repetidos que la misma presenta en la región 1 (figura 6).

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En función de los objetivos planteados, se procedió con la confirmación de los aislamientos de *B. pertussis* que se encontraban disponibles en la colección de cepas del DLSP, los cuales habían sido obtenidos a partir de aspirados nasofaríngeos extraídos de niños entre 1 y 15 meses.

Se confirmó la identificación de 68 aislamientos de *B. pertussis* a través de la observación de la morfología macroscópica, técnica de Gram, prueba de oxidasa, aglutinación con el suero específico anti-*B. pertussis* y el no desarrollo en Agar sangre (Figura 8).

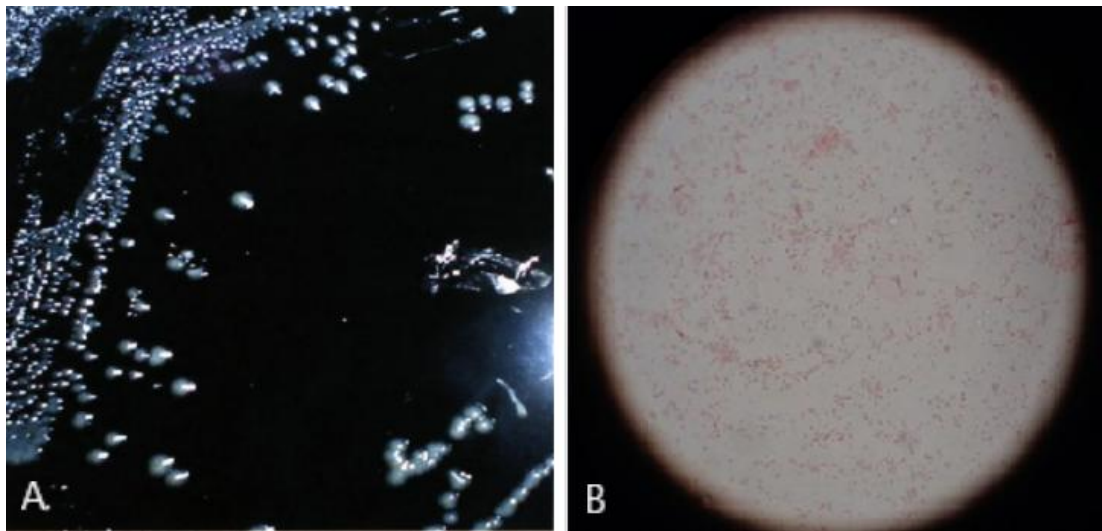


Figura 8: A: crecimiento de colonias en Agar Carbón. B: Coloración de Gram: cocobacilos Gram - pequeños

Luego de la confirmación de la identificación de las cepas *B. pertussis*, se sometieron por primera vez en Uruguay a estudios moleculares.

En este trabajo se empleó la técnica de PCR para la amplificación de los genes *S1* y *prn* en todas las cepas (Los resultados de algunos de los aislamientos se muestran en las figuras 9 y 10):

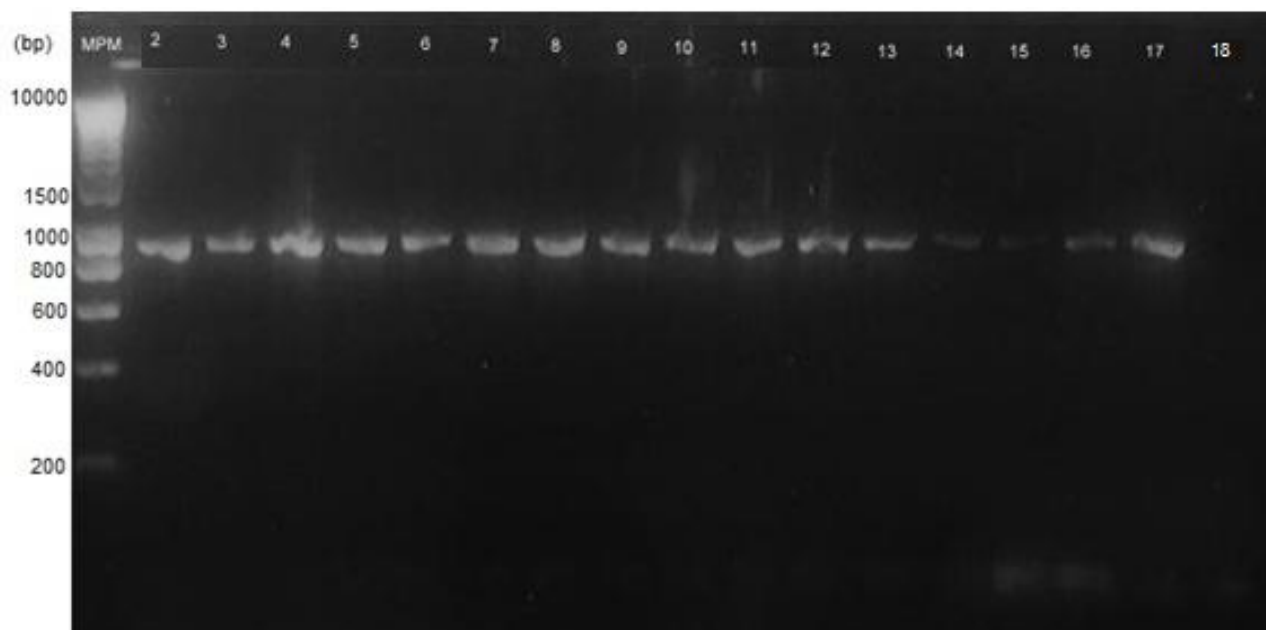


Figura 9: Amplificación del gen *ptxS1* de 9.3 kbp. Carril 1: Marcador de peso molecular HyperLadder I ; Carril 2: *Bp01*; Carril 3: *Bp16*; Carril 4: *Bp18*; Carril 5: *Bp26*; Carril 6: *Bp30*; Carril 7: *Bp42*; Carril 8: *Bp43*; Carril 9: *Bp46*; Carril 10: *Bp48*; Carril 11: *Bp68*; Carril 12: *Bp93*; Carril 13: *Bp226*; Carril 14: *Bp228*; Carril 15: *Bp230*; Carril 16: *Bp236*; Carril 17: *Bp84* (control positivo); Carril 18: Control negativo de la reacción.

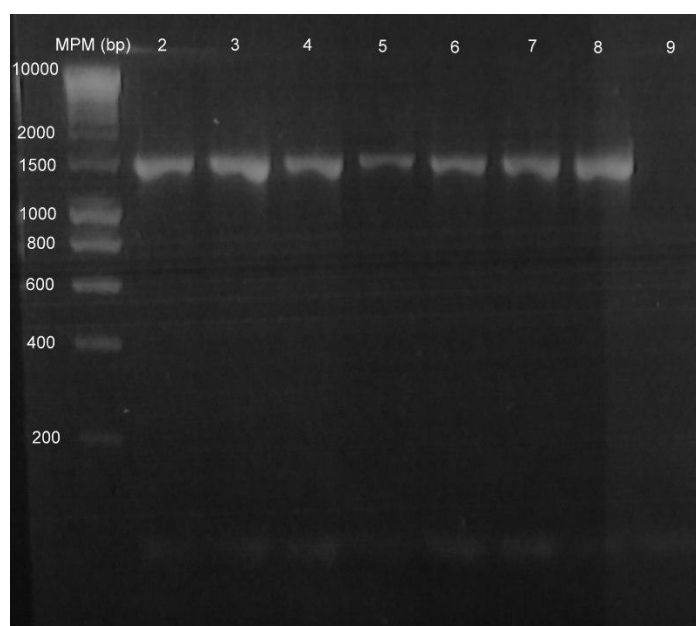


Figura 10: Amplificación del gen *prn* de 1.43 kbp. En el carril 1: Marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline). Del carril 2 al 7: Cepas problema: *Bp13*, *Bp14*, *Bp58*, *Bp63*, *Bp64* y *Bp67* respectivamente. Carril 8: Cepas *Bp84* (control positivo) y carril 9: control negativo de la reacción.

Posteriormente se secuenciaron y analizaron los productos de las PCRs para determinar qué alelos circularon en nuestro país en el periodo estudiado.

El análisis de las secuencias de los productos obtenidos, dio como resultado que el 100% de las cepas fueron *ptxS1A* y *prn2* (Tabla 3, Anexo I) ya que todos los casos presentaban en su secuencia génica el nucleótido A en la posición 684 y en la secuencia peptídica dos repetidos GGAVP y cuatro repetidos GGFGP, respectivamente (Figura 11 y 12).

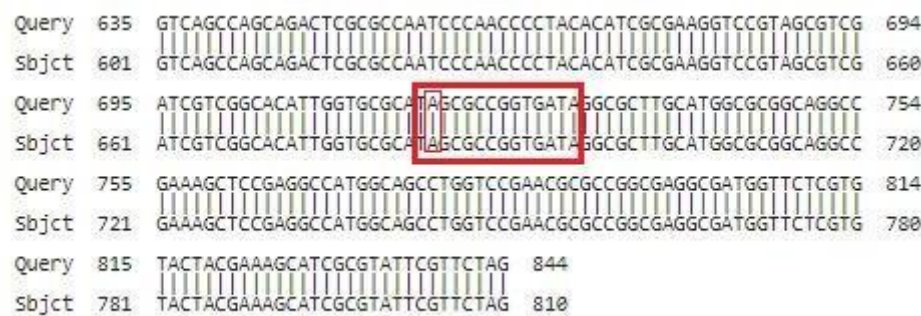


Figura 11: Fragmento de la secuencia obtenida del gen *ptxS1* que fue alineado por BLASTn con la secuencia de referencia del alelos *ptxS1A*. El recuadro de menor tamaño rojo corresponde a la posición 684 y el de mayor tamaño marca el motivo A-A-A (Figura 7).

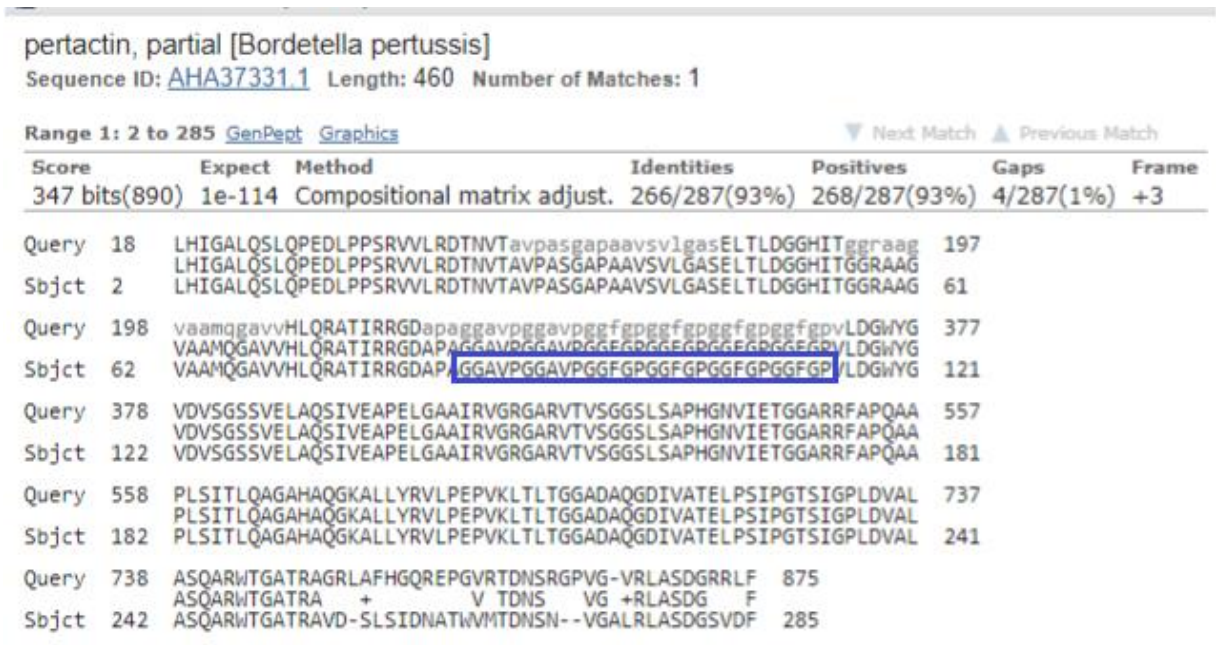


Figura 12: Análisis realizado por BLASTx, se señalan los repetidos que determinan que la cepa es *prn2*.

Esto significa que no se observaron diferencias en la presencia de alelos para los factores de virulencia estudiados ni entre las cepas de los últimos dos brotes registrados (2007-2011) ni con las cepas de los casos esporádicos.

Con los resultados obtenidos, se puede evidenciar además que todos los aislamientos difieren en los dos factores de virulencia estudiados al de las cepas vacunales ya que las mismas son: *prn1/ptxS1B* (*B. pertussis* 134 y Tohama I), *prn7/ptxS1D* (*B. pertussis* 509) y *prn1/ptxS1D* (*B. pertussis* 165) .

La colección de cepas disponible incluye aislamientos a partir del año 2004, con lo cual no se cuenta con cepas que hayan sido aisladas en años más cercanos al inicio de la vacunación como para poder ver la evolución en el tiempo como si se ha visto en otros países como Argentina, Holanda, EUA, Francia, Australia, Polonia, entre otros.

Análisis del gen *ptxS1*

Varias publicaciones muestran que en Europa la tendencia es el aumento de la presencia del alelo *ptxS1A*. En todos los países, se ve un predominio de los alelos *ptxS1B* y *ptxS1D* en las décadas del 60' y 70'. En Holanda, por ejemplo, hasta la década de los 60' el 59% de las cepas eran *ptxS1B* y el restante 41% era *ptxS1D* (Mooi, 2001), los cuales son los alelos presentes en la vacuna. Sin embargo, en la actualidad, todas las cepas son *ptxS1A* (van Gent, 2012). A partir de 1986, año en que se aisló la primera cepa *ptxS1A* en Reino Unido, este alelo comenzó a ser más frecuente, hasta llegar el 2009 donde todas las cepas fueron *ptxS1A*, esta tendencia continúa hasta la actualidad (Litt, 2009). En Francia, sucedió algo similar que en Reino Unido ya que a partir de 1991, todas las cepas analizadas hasta 2001 son *ptxS1A* (Godfroid, 2005). Al igual que en los otros países mencionados, en Finlandia, hasta mediados de las 60' el 100% de las cepas eran *ptxS1B* y luego de los 80' hasta la actualidad, son el 100% de las cepas *ptxS1A* (Elomaa, 2005). En Polonia, único país donde se continúa administrando la vacuna celular en niños y que recién en 2004 incluyó la vacuna acelular en adolescentes, hasta el año 1978 el alelo predominante era el *ptxS1B*, y posteriormente se observó que hacia el año 2003, el alelo predominante es *ptxS1A* (Gzyl, 2004). En la actualidad, todas las cepas aisladas en Polonia son *ptxS1A* (Mosiej, 2015).

En los países tomados como referencia en América del Norte, Estados Unidos y Canadá, se puede apreciar que tienen la misma tendencia que los países europeos. Hubo un cambio en la presencia de alelos, pasando de encontrarse en EUA, luego de los 70', mayoritariamente alelos *ptxS1B* y *ptxS1D* (95% en conjunto) a encontrarse mayoritariamente *ptxS1A* (78% pertenecen a cepas *ptxS1A* y el restante sólo a cepas *ptxS1B*) (Cassiday, 2000) y en la actualidad, el 100% de los aislamientos son *ptxS1A* (Schmidtke, 2012). Lo mismo sucede en Canadá, pasando de ser el 100% de las cepas *ptxS1B* en los 60'-70' a ser 100% *ptxS1A* luego de la década de los 80' (Shuel, 2013).

En cuanto al hemisferio sur: en Argentina se puede observar un rápido incremento del alelo *ptxS1A* a partir de la década de los 80' siendo la prevalencia del alelo *ptxS1A* del 94.9%. Dicho país no presenta datos del gen *ptxS1* de la época pre-vacunal (Botero, 2010). La evolución de este gen en Australia tiene un patrón similar: luego de los años 70' todas las cepas pasaron de ser *ptxS1B* a ser *ptxS1A* (Poynten, 2004).

Para la mayoría de los países donde se registró el alelo *ptxS1D*, el descenso de los porcentajes de su prevalencia se da a partir de mediados de los 70' (Mooi, 2001; Weber, 2001; Cassiday, 2000).

Análisis del gen *prn*

En relación al otro factor de virulencia estudiado, la pertactina, existe un aumento sostenido del alelo *prn2* desde su aparición en la época de los 60' con una fuerte presencia a partir de los 90'.

Dentro de Europa se puede observar que en Holanda, hasta los años 80' solo se aislaron *prn1*, luego de ese año se comenzaron a aislar cepas *prn2* y *prn3*. Hasta el año 1990, el porcentaje de aislamientos *prn2* fue del 15%, mientras que el de *prn3* fue del 16%. El resto de las cepas (69%) fueron *prn1* (Mooi, 2001). Luego de los 90', se observa un aumento pronunciado del alelo *prn2* y en la actualidad, todas las cepas son *prn2* (van Gent, 2011). En Reino Unido, hay una similitud con Holanda ya que antes de la década de los 60's, sólo se aislaron cepas *prn1*, a finales de los 80's y principios de los 90's, se puede observar que siguió siendo predominante el alelo *prn1* aunque en menor proporción (73% de los casos), aislándose también los primeros casos de aislamientos

prn2 y *prn3*. A principios del siglo XXI, manteniéndose hasta el día de hoy, el alelo *prn2* supera el 90% de los casos (Litt, 2009). En Francia, antes de los 90', todas las cepas eran *prn1* y después del año 1993 se empezaron a aislar cepas *prn2* y *prn3* (Weber, 2001). En la actualidad el 75% las cepas tienen alelos *prn2*, el restante porcentaje se divide entre cepas *prn1* (5%) y *prn3* (20%) (Godfroid, 2005). En Finlandia, hasta los años 70' todas las cepas eran *prn1*, y fue en el año 1999 donde se aisló la última cepa *prn1*. A partir de los 80' se aislaron nuevos alelos: *prn2*, *prn3* y *prn4*, siendo el primero el predominante (Elomaa, 2005). Pese a ser el único país en mantener la DTP en infantes, Polonia presenta la misma tendencia que el resto de los países, ya que antes de 1970 las cepas eran *prn1* y luego de los 90' comenzaron a aislarse cepas *prn2* y *prn4* (Godfroid, 2005). A pesar de observarse nuevos alelos, en la actualidad continúa apareciendo el alelo *prn1*. En los aislamientos colectados en ese país entre los años 2000 y 2013, el 50% de las cepas son *prn1* y el 50% de las cepas son *prn2* (Mosiej, 2015).

En EUA todas las cepas anteriores a los años 70' eran *prn1* y en 1975 se aislaron las primeras cepas *prn2*, conformando un 5% del total de las cepas aisladas. Las cepas *prn2* a partir de su aparición comenzaron a aumentar y para el año 2000 eran el 70% de los casos (Cassiday, 2000). Actualmente, cerca del 98% de las cepas son *prn2* (Pawloski, 2013). En Canadá, al igual que en EUA, hasta 1970 todos los aislamientos eran *prn1*. Hacia los años 80' esto cambió y se comenzaron a aislar cepas *prn2* y *prn3*, siendo mayoritario el aislamiento del primero, cuya presencia en el año 2006 era de un 82% (Sheul, 2013).

En Argentina se registra la presencia creciente desde la década de los 80' del alelo *prn2* (Bottero, 2010), mientras que en Australia se encontraron cuatro tipos de *prn*: *prn1*, *prn2*, *prn3* y *prn11*. Antes 1989, el 81% de las cepas eran *prn1* y el 19% era *prn11*. Luego del año 1989, aparecieron dos alelos nuevos, *prn2* en un porcentaje de 11% y *prn3* en un porcentaje de 42%, disminuyendo el porcentaje de *prn1* a un 47% (Poynten, 2004). En la actualidad, todas las cepas aisladas en Australia son *prn2* (Lam, 2014).

A partir del año 2000, comienzan a aparecer en Francia y EUA cepas que no presentan el gen *prn* o se encuentra mutado, lo que trae como consecuencia que estas cepas sean PRN negativas ("PRN -") (Bouchez, 2009; Pawloski, 2013). Después del año 2010, aparecieron también cepas PRN- en otros países como Japón y Australia (Otsuka, 2012;

Lam, 2014). Sin embargo, en Polonia, único país europeo que sigue utilizando la vacuna celular, no se han encontrado cepas PRN - (Mooi, 2015). La importancia de la ausencia de la proteína PRN radica en su contribución al escape de la bacteria frente a la presión ejercida por la vacuna. Estudios realizados en modelo animal con ratones inmunizados y otros no inmunizados con vacuna acelular, demostraron que las cepas PRN- presentaban mayor fitness que las cepas que producían PRN en cuanto a su habilidad para colonizar los pulmones y tráquea en los ratones inmunizados con dpaT (Safarchi, 2015).

Además, a pesar de que estas cepas PRN- no tienen su principal adhesina, *B. pertussis* cuenta con una gran cantidad de factores de virulencia, como por ejemplo las fimbrias y la hemaglutinina filamentosa, que le permiten poder infectar al hospedero (Lam, 2014).

Dados estos resultados en la diferencia de los alelos que circulan en las poblaciones de *B. pertussis* con los presentes en las vacunas y la aparición de cepas PRN-, se están planteando nuevas alternativas para las vacunas existentes. Algunas de las variantes sería modificar uno o más de los componentes de la vacuna acelular, para que coincidan con los antígenos de las cepas de *B. pertussis* circulantes, aumentar el contenido de la toxina pertussis, o cambiar el método de detoxificación de la toxina pasando de ser químico a genético. Además, se está evaluando la posibilidad de agregar nuevos antígenos, como puede ser la toxina adenilato ciclasa (Meade, 2014).

Correlación de los resultados obtenidos con datos generados por electroforesis en campo pulsado (PFGE)

En el DLSP se estudió la misma colección de cepas por PFGE (Varela S., comunicación personal). Esta técnica permite separar moléculas de gran tamaño en función de su capacidad para moverse a través de los poros del gel de agarosa, cuando éste es sometido a un campo eléctrico variable tanto en dirección como en intensidad. Esto genera que la velocidad en que migran las moléculas sea directamente proporcional al tamaño de las mismas.

Para realizar la digestión del ADN, se utilizó la enzima de restricción de corte poco frecuente XbaI (origen bacteriano *Xanthomonas badrii*, Thermo scientific) y el protocolo para la corrida electroforética por especificado Advani y colaboradores (2004). Dada la

homogeneidad genética del patógeno se consideraron como pulsotipos distintos aquellos que presentaran una o más bandas de diferencia (Advani, 2004 y Haghighi, 2014).

Al estudiar los aislamientos por PFGE, se identificó un pulsotipo mayoritario denominado A (42 de los 68 aislamientos, 61,8%), un pulsotipo A1 (21/68 casos, 30,9%) que presentaba 2 bandas de diferencia con el pulsotipo A y pulsotipos A2, A3, A4, A5 y A6, todos ellos representados por un único aislamiento (Varela S., comunicación personal). También se analizaron las mismas cepas de referencia utilizadas en este trabajo (Tohama I y Bp509), presentando perfiles diferentes a los encontrados en las cepas clínicas (Figura 13).

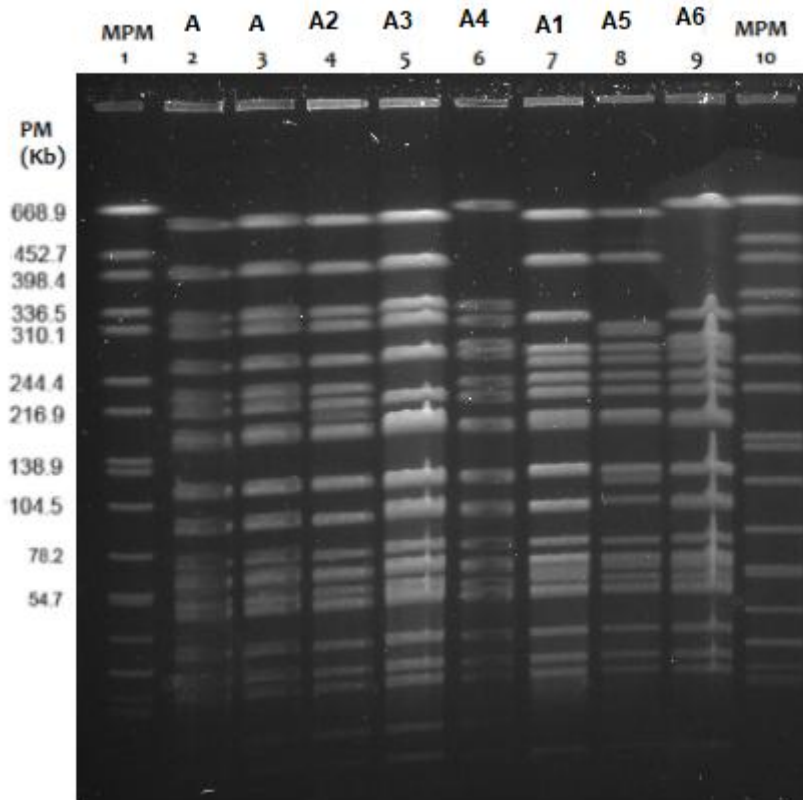


Figura 13: Análisis de aislamientos clínicos de *B. pertussis* mediante PFGE. Carril 1 y 10: Marcador de peso molecular, *S. braenderup*, serotipo H9812. Del carril 2 al 9: Cepas problema con sus respectivos pulsotipos: Bp67, Bp91, Bp93, Bp259, Bp385, Bp245, Bp162, Bp377.

Con los resultados generados se realizó un análisis de similitud y se construyó un dendrograma utilizando el programa GelCompar II 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica)

(Figura 14). En el dendrograma se puede ver que las cepas clínicas presentan una similitud del 89% entre ellas, mientras que con las cepas de referencia tienen una similitud menor a 70%. Si bien el análisis realizado por PFGE, revela mayor diversidad entre las cepas clínicas que la hallada por secuenciación, encontrándose 2 perfiles diferentes mayoritarios (2 bandas de diferencia entre sí), también se observa que las cepas clínicas son diferentes a las cepas de referencia no solo en los alelos de pertactina la toxina pertussis sino en sus perfiles genéticos.

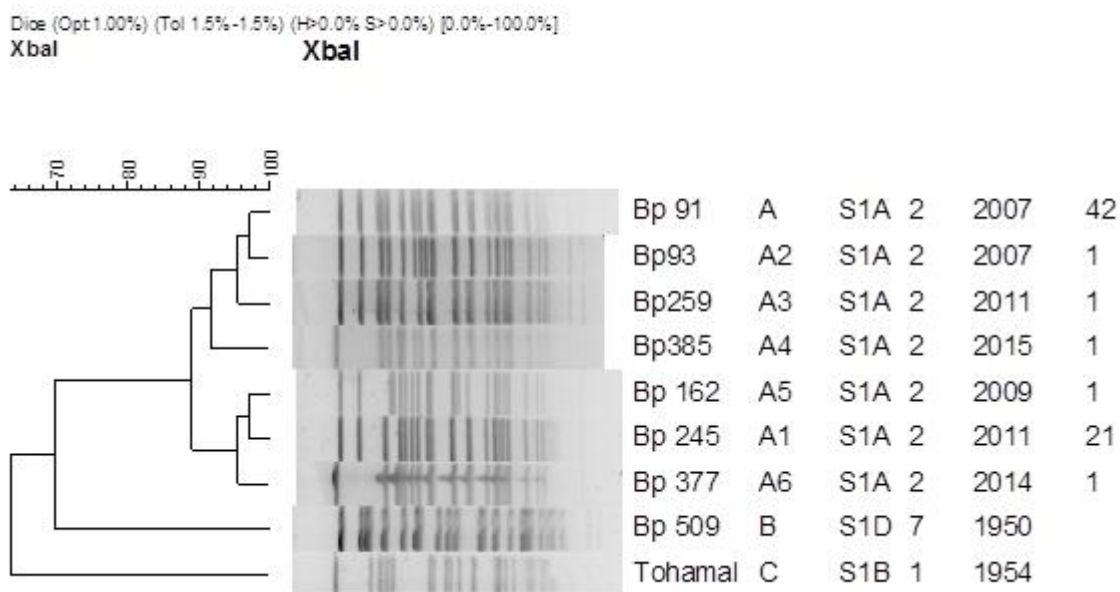


Figura 14: Dendrograma de *B. pertussis*. Primera columna: Cepas problema; segunda columna: perfil de pulsotipo; tercera columna: alelo *ptxS1*; cuarta columna: tipo de alelo *prn*; quinta columna: fecha de aislamiento; sexta columna: n° de aislamientos.

El pulsotipo mayoritario A, estuvo presente en todos los períodos a excepción del último, mientras que el pulsotipo A1 se encuentra en todo el período de estudio. Las cepas de los perfiles A2 y A3 se aislaron en los dos últimos brotes, 2007 y 2011-2012, respectivamente. Los otros tres perfiles, A4, A5 y A6, se obtuvieron de cepas aisladas en períodos donde no hubo brote; mientras que A5 estuvo presente en el período 2008-2009, tanto A4 como A6 fueron aislados en el período 2012-2013 (Figura 15).

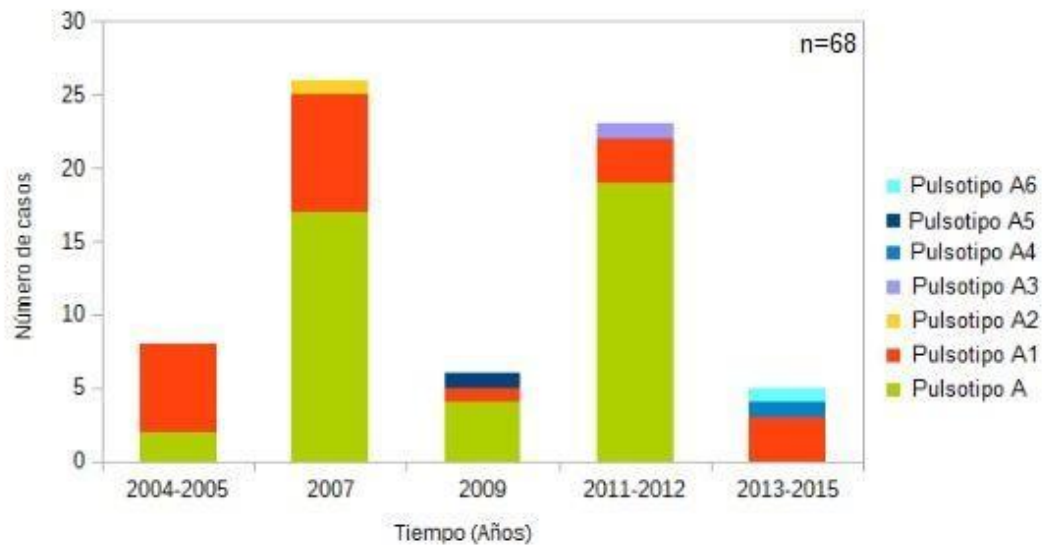


Figura 15: Gráfico que muestra los diferentes subtipos de pulsotipo A según los años donde fueron colectados.

Todas las cepas clínicas analizadas compartían el mismo pulsotipo y coincidían en los alelos para los factores de virulencia estudiados: pulsotipo A *ptxS1A/prn2*. Las cepas vacunales presentaron perfiles diferentes al de los aislamientos clínicos y diferentes entre sí: *Bp 509* (pulsotipo B) y *Tohama I* (pulsotipo C), y también difieren en cuanto a los alelos de *ptxS1* y *prn* (Figura 14). Estos resultados ponen de manifiesto una correlación entre los pulsotipos y los factores de virulencia estudiados.

Esta correlación entre la variación antigénica y PFGE ya se había visto en otros trabajos (Hallander, 2005; Bottero 2010), aunque la técnica de PFGE es más discriminativa. En este estudio se identificaron 7 pulsotipos (A-A6) con pequeñas variaciones (89% de similitud en el dendrograma) y una sola combinación de alelos para los factores de virulencia analizados.

7.- CONCLUSIONES

A pesar de que la tos convulsa es una enfermedad inmunoprevenible cuya vacuna tiene una alta cobertura en países desarrollados, se ha observado una reemergencia de la enfermedad. Esta reemergencia puede deberse a varios factores:

- Mayor conciencia del problema
- Mejora en el diagnóstico
- La disminución en el tiempo de la inmunidad inducida por vacuna.
- Disminución en la eficacia por cambios en el esquema de vacunación.
- Vacunas acelulares subóptimas.
- Adaptación del patógeno a las vacunas, lo que lleva a encontrar variantes genóticas de las cepas aisladas en la actualidad frente a las cepas aisladas en la era pre-vacunación.

La contribución de estos factores puede diferir entre países y continúa sujeto a debate.

No obstante de las hipótesis planteadas, luego de la vacunación masiva hubo un cambio epidemiológico de la enfermedad, ya que pasó de afectar a niños de edad escolar a afectar lactantes. Dentro del cambio epidemiológico también hubo un cambio en el reservorio, pasando de ser los niños en edad escolar a ser los adultos que transmiten la enfermedad a los lactantes sin vacunación.

Mediante este trabajo se estudiaron por primera vez en Uruguay, dos de los principales factores de virulencia de este patógeno, la toxina pertussis y la pertactina. Se observó que todas las cepas estudiadas que se encuentran en la colección del DLSP (n=68) presentaban los alelos *prn2* y *ptxS1A*, los cuales son diferentes a los alelos que se encuentran en las vacunas que se administran en Uruguay, los cuales son *prn1/prn7* y *ptxs1B/ptxs1D*.

La presencia de estos alelos en las cepas estudiadas se encuentra en concordancia con los datos publicados de países de todo el mundo con una alta cobertura de vacunación, donde además constatan que ha habido una sustitución de las variantes que se utilizan para la producción de vacunas.

Los mismos 68 aislamientos clínicos, fueron analizados también por electroforesis en campos pulsados (Varela S, comunicación personal). Se encontró que mediante esta técnica, *B. pertussis* también es un patógeno sumamente homogéneo ya que presenta un dos pulsotipos predominantes y cinco pulsotipos altamente relacionados. Además, se pudo observar que los pulsotipos son distintos a los perfiles observados en las cepas vacunales que se utilizaron como referencia.

Definir las causas de esta reemergencia y persistencia de *B. pertussis* es de gran importancia para poder mitigar este problema de salud pública.

La puesta a punto de las técnicas para la caracterización de estos factores de virulencia fortalece la vigilancia epidemiológica de este microorganismo, ya que se generó una línea de base que permitiría evaluar los efectos de las intervenciones con vacunas en el tiempo. Aunque los métodos para el diagnóstico de laboratorio de la tos convulsa han evolucionado y la PCR es el método más rápido y sensible, los laboratorios de referencia no deben dejar de aislar el microorganismo para poder analizar su evolución en respuesta a diferentes estrategias de vacunación y monitorear la sensibilidad a los antibióticos.

8.- PERSPECTIVAS

Los resultados de esta Tesina permitieron establecer una línea de base de las cepas aisladas en Uruguay. Partiendo de esta base, se podrá identificar tendencias o nuevas variables que puedan surgir.

Dado que las vacunas acelulares generalmente están compuestas de tres a cinco factores de virulencia, para complementar la información generada, se podría realizar el estudio de la distribución de otros factores de virulencia que se encuentran en la vacuna acelular como es el caso de la hemaglutinina filamentosa (FHA) o las fimbrias (FIM). En el caso de la FHA, hay cepas descritas con la proteína adhesiva y otras cepas sin ella (Locht, 1993) y en el caso de las fimbrias se han encontrado dos variables, FIM2 y FIM3 (Barkoff, 2014). Por otra parte, para complementar aún más la línea de base, se podrá utilizar la técnica de (MLST), la cual es una técnica para caracterizar especies bacterianas a través de la secuenciación de ADN, generalmente, se utilizan fragmentos de siete genes constitutivos. *B. pertussis*, es un patógeno particularmente homogéneo; debido a esta característica, se encontró que no había un polimorfismo considerable en los genes constitutivos, lo que llevó a la necesidad de recurrir a genes que codifican para proteínas de la superficie de la bacteria para poder realizar el análisis. Después del análisis con los genes *ptxS1*, *ptxS3* y *tcfA*, se caracterizaron 5 MLST. Los dos primeros, se correlacionan con la era pre-vacunal mientras que MLST-3 se encontró durante el período donde se aplicaba sólo la vacuna celular. Los otros dos perfiles, MLST-4 y MLST-5, aparecieron a partir de la década del 90' (van Loo, 2002).

9.- REFERENCIAS

- Advani A., Donnelly D. & Hallander H.** 2004. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol* **42(7)**: 2890-2897.
- American Academy of Pediatrics.** 2012. Summaries of infectious diseases: report of the committee on infectious diseases. In: Red Book. Ed Pickering LK Elk Grove Village, IL: Ame. Acad. Ped. pp. 553–566.
- Babu, M. M., Bhargavi, J., Saund, R. S., & Singh, S. K.** 2001. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Current Science***80(12)**: 1512-1522.
- Barkoff, A. M., Guiso, N., Guillot, S., Xing, D., Markey, K., Berbers, G., et. al.** 2014. A rapid ELISA-based method for screening *Bordetella pertussis* strain production of antigens included in current acellular pertussis vaccines. *J Immunol Meth***408**: 142-148.
- Bottero, D.** 2010. Bases moleculares para la prevención de una enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, un patógeno re-emergente. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- Bouchez, V., Brun, D., Cantinelli, T., Dore, D., Njamkepo, E., Guiso, N.** 2009. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. *Vaccine* **(27)**: 6034–6041.
- Bouchez, V., Guiso, N.** 2015. *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough. *Path and Dis* **73 (7)**.
- Caro, V., Bouchez, V., Guiso, N., Gatti, B., Agosti, M. R., & Ayala, S. E. G.** 2007. Pertussis in Argentina and France. *Vaccine* **25(22)**: 4335-4339.
- CDC.** 1997. Pertussis vaccination: Use of acellular Pertussis vaccines among infants and young children recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report* **46(RR-7)**: 1-25.
- Cassiday, P., Sanden, G., Heuvelman, K., Mooi, F., Bisgard, K. M. & Popovic, T.** 2000. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis***182(5)**: 1402-8.
- Cherry, J. D., Gornbein J., Heininger U. & Stehr K.** 1998. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* **16**: 1901–1906.
- Cherry, J. D.** 1996. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis* **174(3)**: 8259-63.
- Clark, T. A.** 2014. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis* **209(7)**: 978-981.
- Elomaa, A., Advani, A., Donnelly, D., Antila, M., Mertsola, J., Hallander, H. & He, Q.** 2005. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. *J Infect Dis* **43(8)**: 3681-3687.

- Farizo, M., K., Fiddner, S., Cheung, A., M., & Burns, D., L.** 2002. Membrane localization of the S1 subunit of pertussis toxin in *Bordetella pertussis* and implications for pertussis toxin secretion. *Infect Immun* **70(3)**: 1193-201.
- Fiett J., Letowska I., Gniadkowski M. & Hryniewicz W.** 2003. The new strategy for allele identification of the genes coding for pertussis toxin subunit S1 (*ptx* S1) and pertactin (*prn*) in *Bordetella pertussis*. *J Microbiol Met* **55**: 651-666.
- Godfroid, F., Denoël, P. & Poolman, J.** 2005. Are vaccination programs and isolate polymorphism linked to pertussis re-emergence? *Vaccine* **4(5)**: 757-778.
- Guillot, S., Descours, G., Gillet, Y., Etienne, J., Floret, D., and Guiso, N.** 2012. macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg Infect Dis* **18(6)**: 966–968.
- Gzyl, A., Augustynowicz E., Gniadek, G., Rabczenko, D., Grazyna, D., Slusarczyk, J.** 2004. Sequence variation in pertussis S1 subunit toxin and pertussis genes in *Bordetella pertussis* strains used for the whole-cell pertussis vaccine produced in Poland since 1960: Efficiency of the DTwP vaccine-induced immunity against currently circulating *B. pertussis* isolates. *Vaccine* **22**: 2122-2128.
- Haghighi F., Shahcheraghi F., Abbasi E., Eshraghi S. S., Zeraati H., Javad Mousavi S. A., et al.** 2014. Genetic profile variation in vaccines strains and clinical isolates of *Bordetella pertussis* recovered from Iranian patients. *Avicenna J Med Biotech* **6(3)**: 178-184.
- Hallander, H. O., Advani, A., Donnelly, D., Gustafsson, L., Carlsson, R. M.** 2005. Shifts of *Bordetella pertussis* variants in Sweden from 1970 to 2003, during three periods marked by different vaccination programs. *J Clin Microbiol* **43(6)**: 2856-65.
- Hardwick T. H., Cassiday P., Weyant R. S., Bisgard K. M., Sanden G. N.** 2002. Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of *Bordetella pertussis* isolates in the United States, 1935 to 1999. *Emerg Infect Dis* **8**: 44-9.
- Hewlett E.L. & Edwards K.M.** 2005. Pertussis- not just for kids. *N Engl J Med* 352:12.
- Hijnen, M., de Voer R., Mooi F. R., Schepp R., Moret E. E., van Gageldonk P. et al.** 2007. The role of peptide loops of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin in antibody recognition. *Vaccine* **25**: 5902-14.
- Hill, B. C., Baker, C. N. & Tenover, F. C.** 2000. A Simplified Method for Testing *Bordetella pertussis* for Resistance to Erythromycin and Other Antimicrobial Agents. *J Clin Microbiol* **38(3)**: 1151–1155.
- King, A. J., van Gorkom, T., van der Heide, H. G. J., Advani, A., van der Lee, S.** 2010. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift?. *BMC Genom* **11(64)**: 1471-2164.
- Lam, C., Octavia, S., Ricafort, L., Sintchenko, V., Gilbert, G. L., Wood, N., et al.** 2014. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis* **20(4)**: 626-633.

- Ledermann, D.** 2004. Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. Rev Chi Infect **21(3)**: 241-246.
- Litt, D. J., Neal, S. E. & Fry, N. K.** 2009. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. J Clin Microbiol **47(3)**: 680–688.
- Locht, C., Philippe Bertin, P., Menozzi, F. D. & Renauld, G.** 1993. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella spp.* Mol Microbiol **9(4)**: 653-660.
- Loeffelholz, M. J.** 2003. *Bordetella*. En: Manual of Clinical Microbiology. Ed. Patrick R. Murray. Washington DC: American Society for Microbiology, pp: 780-788.
- Meade, B., Plotkin, S.A., Locht, C.** 2014. Possible options for new pertussis vaccines. JID **209** (suppl 1): S24-S27.
- Mattoo, S. & Cherry, J. D.** 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev **18(2)**: 326-382.
- Mills, K. H.** 2001. Immunity to *Bordetella pertussis*. Microbes and infect **3(8)**: 655-677.
- Melvin, J. A., Scheller, E. V., Miller, J. F. & Cotter, P. A.** 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. Nat Rev Microbiol **12(4)**: 274-288.
- Mooi, F., R.** 2010. *Bordetella pertussis* and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen. Infect Gen and Evol **(10)**: 36–49.
- Mooi, F. R., Hallander H., Wirsing von König C. H., Hoet B. & Guiso N.** 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. Eur J Microbiol Infect Dis **19**: 174-181.
- Mooi, F. R., Van Der Maas, N. A. T. & De Melker, H. E.** 2013. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation – two sides of the same coin. Epidemiol Infect **(142)**: 685–694.
- Mooi, F. R., Van Loo, I. H. & King, A. J.** 2001. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence?. Emerg Infect Dis **7(3 Suppl)**: 526.
- Mooi, F. R., Van Oirschot, H., Heuvelman, K., van der Heide, H. G., Gaastra, W. & Willems, R. J.** 1998. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P. 69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Infect Immun **66(2)**: 670-675.
- Mooi, F. R., Zeddeman, A., & van Gent, M.** 2015. The pertussis problem: classical epidemiology and strain characterization should go hand in hand. J Ped **91(4)**: 333-338.
- Mosiej, E., Zawadka, M., Krysztopa-Grzybowska, K., Polak, M., Augustynowicz, E., Piekarska, K., Lutyńska, A.** 2015. Sequence variation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from Poland in the period 1959-2013. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **34(1)**: 147-152.

<http://www.msp.gub.uy/comunicado> 5 de enero de 2016. Situación epidemiológica de la infección por *Bordetella pertussis* (Tos convulsa) y recomendaciones para su manejo.

http://www.who.int/immunization/documents/diseases/who_ivb_14.03/en. 2014. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*. Guillot ,S., Guiso, N., Riffelmann, M. & Heinz Wirsing von Koning, C. World Health Organization document production service. Geneve, Switzerland.

<http://www.who.int/wer>. 2015. Weekly epidemiological record: Pertussis vaccines: WHO position paper, **90(35)**: 433-460.

<https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Scheduler>. Vaccine schedules in all countries of the European Union. Pertussis. Último acceso: 03/18.

Otsuka, N., Han H. J., Toyoizumi-Ajisaka, H., Nakamura, Y., Arakawa, Y., Shibayama, K. & Kamachi, K. 2012. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS One **7(2)**: e31985.

Pawloski, L. C., Queenan, A. M., Cassiday, P. K., Lynch, A. S., Harrison, M. J., Shang, W. & Messonnier, N. 2013. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. Clin Vaccine Immunol **21(2)**: 119-125.

Poynten, M., McIntyre, P. B., Mooi, F. R., Heuvelman, K. J. & Gilbert, G. L. 2004. Temporal trends in circulating *Bordetella pertussis* strains in Australia. Epidemiol Infect **132(2)**: 185-93.

Proenza-Alfonzo, L., Marrero-Domínguez, K., & Fando-Calzada, R. 2013. PCR alelo-específica para identificar los alelos *ptxA* K9/G129 vs. R9/E129 y *prn1* vs. *prn2* en *Bordetella pertussis*. Revista CENIC Ciencias Biol **44 (1)**

Safarchi, A., Octavia, S., Don Wai Luu, L., Yen Tay, C., Sintchenko, V., Wood, N. et. al. 2015. Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. Vaccine

Schmidtke, A. J., Boney, K. O., Martin, S. W., Skoff, T. H., Tondella, M. L., & Tatti, K. M. 2012. Population Diversity among *Bordetella pertussis* Isolates, United States, 1935–2009. Emerg Infect Dis **18(8)**: 1248-55.

Shuel, M., Jamieson, F. B., Tang, P., Brown, S., Farrell, D., Martin, I., et. al. 2013. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. Internal. J Infect Dis **17(6)**: e413-e417.

van Gent, M., Bart, M. J., van der Heide H. G., Heuvelman, K. J., Mooi, F. R. 2012. Small mutations in *Bordetella pertussis* are associated with selective sweeps. PLoS One **7(9)**: e46407.

van Gent, M., Heuvelman, C. J., van der Heide, H. G., Hallander, H. O., Advani, A., Guiso, N., et al. 2015. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical Isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. J Clin Microbiol Infect Dis **34**: 821-830.

van Gent, M., van Loo, I. H., Heuvelman, K. J., de Neeling, A. J., Teunis, P., Mooi, F. R. 2011. Studies on Prn Variation in the Mouse Model and Comparison with Epidemiological Data. PLoS One **6(3)**: e18014.

van Loo, I. H, Heuvelman, K. J., King, A. J., Mooi, F. R. 2002. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. J Clin Microbiol**40(6)**:1994-2001.

Wang, Z., Cui, Z., Li, Y., Hou, T., Liu, X., Xi, Y., Liu, Y., Li, H., He, Q., et al. 2014. High prevalence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in Xi'an, China. Clin Microbiol Infect**20(11)**: 825-30.

Weber, C., Boursaux-Eude, C., Coralie, G., Caro, V., & Guiso N. 2001. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. J Clin Microbiol **9(12)**: 4396-403.

Williams, M. M., Sen, K. A., Weigand, M. R., Skoff, T. H., Cunningham, V. A., Halse, T. A. & Tondella, M. L. 2016. *Bordetella pertussis* strain lacking pertactin and pertussis toxin. Emer Infect Dis**22(2)**: 319-322.

Wood, N. & McIntyre, P. 2008. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. Ped Res Rev **9(3)**: 201-212.

10.- ANEXOS

ANEXO I: Tabla 3: Lista de cepas de *B. pertussis* en Uruguay entre los años 2004 y 2015

Cepa	Sexo	Edad	Fecha	Vacunación	Pulsotipo	RESULTADOS	
						Pertactina	Toxina pertussis
Bp 01	F	4m	2/04/04	1 dosis	A1	prn 2	S1 A
Bp 13	M	8m	10/08/04	2 dosis	A1	prn 2	S1 A
Bp 14	F	4m	3/09/04	N/C	A	prn 2	S1 A
Bp 16	F	1m22d	8/09/04	N/C	A1	prn 2	S1 A
Bp 18	M	1m1d	20/10/04	N/C	A1	prn 2	S1 A
Bp 26	M	6m	6/12/04	1 dosis	A1	prn 2	S1 A
Bp 30	F	3m	29/12/04	S/D	A1	prn 2	S1 A
Bp 39	F	2m	17/07/05	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 42	M	1m19d	30/10/07	N/C	A	prn 2	S1 A
Bp 43	M	52d	30/10/07	N/C	A1	prn 2	S1 A
Bp 46	M	2m	9/11/07	S/D	A1	prn 2	S1 A
Bp 48	M	2m	12/11/07	S/D	A1	prn 2	S1 A
Bp 51	M	28d	14/11/07	N/C	A1	prn 2	S1 A
Bp 56	F	2m25d	20/11/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 58	F	10m	22/11/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 61	F	4m	23/11/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 63	F	5m11d	27/11/07	S/D	A1	prn 2	S1 A
Bp 64	F	3m	29/11/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 67	F	1m26d	30/11/07	N/C	A	prn 2	S1 A
Bp 68	F	1m	30/11/07	N/C	A	prn 2	S1 A
Bp 69	F	3m	3/12/07	S/D	A1	prn 2	S1 A
Bp 71	F	3m	5/12/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 73	M	1m	5/12/07	N/C	A	prn 2	S1 A
Bp 75	F	3m24d	8/12/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 82	M	1m	18/12/07	N/C	A	prn 2	S1 A
Bp 84	F	1m	22/12/07	N/C	A	prn 2	S1 A
Bp 85	F	3m	22/12/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 86	F	5 m	24/12/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 90	F	2m	26/12/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 91	M	4m	26/12/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 93	M	4m	27/12/07	S/D	A2	prn 2	S1 A
Bp 94	M	2m	27/12/07	S/D	A	prn 2	S1 A
Bp 95	F	3m	27/12/07	S/D	A1	prn 2	S1 A

S/D- Sin datos

N/C- No corresponde por edad

Cepa	Sexo	Edad	Fecha	Vacunación	Pulsotipo	RESULTADOS	
						Pertactina	Toxina pertussis
Bp 97	M	1m	28/12/07	N/C	A1	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 110	M	4m	30/04/08	S/D	A1	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 112	F	2m	5/05/08	S/D	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 114	F	3m	14/05/08	S/D	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 139	F	3m13d	12/12/08	S/D	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 162	F	2m	1/12/09	S/D	A5	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 201	F	13m	4/10/11	S/D	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 205	F	22d	7/10/11	N/C	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 223	F	1m15d	15/11/11	N/C	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 226	F	1m	17/11/11	N/C	A1	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 228	M	5m	18/11/11	N/C	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 230	F	11m	21/11/11	2 dosis	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 231	M	1a	21/11/11	Si	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 236	F	2m	23/11/11	S/D	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 241	F	1a 3m	25/11/11	3 dosis	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 242	M	4m24d	28/11/11	2 dosis	A1	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 245	M	3m	30/11/11	S/D	A1	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 246	M	7m	30/11/11	3 dosis	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 247	F	24d	2/12/11	N/C	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 250	F	1a	7/12/11	S/D	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 253	M	3m	9/12/11	S/D	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 254	F	7m	12/12/11	1 dosis	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 255	F	7m	12/12/11	3 dosis	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 257	F	8m	13/12/11	2 dosis	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 259	M	4m	15/12/11	S/D	A3	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 267	F	3m	23/12/11	1 dosis	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 270	M	1a	27/12/11	vacunado	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 273	M	5m	29/12/11	2 dosis	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 331	M	3m12d	26/11/12	S/D	A	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 335	F	7m	3/01/13	2 dosis	A1	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 377	F	2m	2/06/14	N/C	A6	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 380	F	2m	5/11/14	No	A1	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 385	F	3m	11/03/15	1 dosis	A4	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 386	M	4m	12/03/15	1 dosis	A1	<i>prn 2</i>	S1 A
Bp 509 Hol.						<i>prn 7</i>	S1 D
Bp Tohama I						<i>prn 1</i>	S1 B

S/D- Sin datos

N/C- No corresponde por edad

ANEXO II

Medio Agar Carbón

Composición:

Concentración del medio por litro	
Peptona bacteriológica	10,0 gr.
Extracto de carne	10.0 gr.
Almidón soluble	10.0 gr.
Carbón vegetal	4.0 gr.
Cloruro de sodio	5.0 gr.
Ácido nicótico	0.01 gr.
Sangre desfibrinada de caballo	10 %
Penicilina	-
Agar	12.0 gr.
pH final 7.4 ± 0.2	

El almidón y el carbón absorbe los ácidos grasos tóxicos, los radicales y peróxidos. El ácido nicótico es una vitamina que favorece el crecimiento de la bacteria. La sangre de caballo proporciona factores de crecimiento complejos y reduce aún más el efecto tóxico de los peróxidos.

En este medio, al ser enriquecido, pueden crecer todo tipo de microorganismos, se añade penicilina como agente selectivo para suprimir parcialmente la flora normal de las vías respiratorias ya que actúa sobre las paredes celulares de las bacterias al inhibir la transpeptidación, lo que impide la síntesis de las mismas.

Medio Agar Sangre

Composición:

Concentración del medio por litro	
Tripteína	15.0 gr.
Peptona de soya	5.0 gr.
Cloruro de sodio	5.0 gr.
Agar	15.0 gr.
pH final 7.4 ± 0.2	

La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya aporta también carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Adicionado con 5-10 % sangre, se logra un medio enriquecido y adecuado para observar la posible presencia de hemólisis.

Este medio permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, *Bordetella pertussis* tiene la particularidad de no crecer en este medio. Esta característica es lo que permite diferenciar esta especie de otras de su género.

ANEXO III

A) Protocolo de amplificación del gen *prn*:

En un principio, para la amplificación del gen *prn*, se utilizaron reactivos Invitrogen y la temperatura de alineamiento era de 55 °C.

Estas primeras PCRs amplificaron pero tenían bandas inespecíficas, por este motivo, se realizaron cambios en el protocolo: inicialmente se aumentó la temperatura de alineamiento (hasta 5 °C). Como continuaba la detección de bandas inespecíficas, se decidió cambiar la marca de los reactivos, utilizando a partir de ese momento reactivos Roche, y se adicionó también dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %, ya que esta sustancia mejora el rendimiento de la PCR y la especificidad de la reacción (Proenza-Alfonzo, 2013). Con estos cambios se logró conseguir la banda específica de 1.43 kbp y eliminar las bandas inespecíficas.

Cebadores:

prn AF: 5' - GCCAATGTCACGGTCCAA - 3'

prn BR: 5' - CCGGATTCAGGCGAACTC - 3'

Programa de amplificación:

95° C 3 min

30	95 °C	20 seg
ciclos	55 °C	30 seg
	72 °C	1 min

72 °C 7 min

Almacenar a 4 °C

Mezcla de reacción (volumen final 50 µL):

10mM Tris-HCl (10X): 5 µL	1 X
MgCl ₂ (25 mM): 7 µL	2.5 mM
dNTP mix (2.5 mM cada uno): 4 µL	0.25 mM
prn AF: 4 µL (10mM)	0.8 mM
prn BR: 4 µL (10mM)	0.8 mM
DMSO 10%: 5 µL	
Taq: 0.4 µL	
H ₂ O: 20.6 µL	
ADN: 4 µL	

B) Protocolo de amplificación del gen *S1*

En relación a la amplificación del gen *ptxS1*, también encontrábamos bandas inespecíficas en las primeras PRCs realizadas, por eso se cambiaron los reactivos Invitrogen por reactivos Roche y se agregó DMSO al 5% (Proenza-Alfonzo, 2013). Además, se aumentó la temperatura de alineamiento, de 55°C a 59°C. Con estas modificaciones, realizadas de una por vez, se consiguió la amplificación de una banda única de 9.3 kbp y eliminar las bandas inespecíficas.

Cebadores:

S1 F2: 5' - CCCCCTGCCATGGTGTGATC - 3'

S1 R2: 5' - AGAGCGTCTTGCGGTCGATC - 3'

Programa de amplificación:

95 °C 3 min

30	95 °C	15 seg
ciclos	59 °C	15 seg
	72 °C	1 min

72 °C 10 min

Almacenar a 4 °C

Mezcla de reacción (volumen final 50 µL):

10mM Tris-HCl (10X): 5 µL 1 X

MgCl₂ (25 mM): 7 µL 2.5 mM

dNTP mix (2.5 mM cada uno) 4 µL 0.25 mM

S1 F2: 4 µL (10mM) 0.8 mM

S1 R2: 4 µL (10mM) 0.8 mM

DMSO 5%: 2,5 µL

Taq: 0.4 µL

H₂O: 23,1 µL

ADN: 4 µL