



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA,
Y
SECRETARÍA DE SALUD MICHOACÁN,
LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA



**“Situación del Diagnóstico de
Bordetella pertussis por Laboratorio en
Michoacán, periodo 2009-2012”**

TESIS

Para obtener el título de Química Farmacobióloga.

Presenta:
PQFB. Judith Correa Tamayo

Asesor:
Biólogo Juan Luis Jaime Sánchez



Morelia, Michoacán, noviembre 2015

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a DIOS, quién me tomó de su mano, me permitió ser su instrumento y me mostró el mundo tan hermoso de la Microbiología. A mi Padre Baltazar Correa y mis Hermanas Leticia Correa y Guadalupe Correa, quiénes ahora estoy segura están festejando conmigo por este momento tan especial. A mi Madre Leticia Tamayo, mi fortaleza y ejemplo, por no haberse rendido conmigo y haberme apoyado. A Serafín Ortiz, mi persona favorita, mi Pa, por sus abrazos, su apoyo y por impulsarme para seguir mis sueños, por haber formado parte de esta experiencia, que espero no sea la única. A mi querido Asesor Juan Luis Jaime, un día me dijeron que usted me impulsaría hacia al conocimiento y fue así. A mi Familia y Amigos del 16, por su apoyo e inmenso Amor que me dieron, por estar al pendiente del progreso del trabajo.

A cada uno se los dedico por ser pilares en mi vida, por su confianza, cariño y esfuerzo para conmigo, por haber estado ahí en los tiempos más difíciles y haber creído en mí siempre, que DIOS me los resguarde y bendiga siempre a cada uno y a sus respectivas familias.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por permitirme ser parte de esta experiencia, por poner en mi camino a todas las personas participes en el trabajo, quienes me regalaron de su conocimiento y me ayudaron crecer y creer en mí misma. Por tener tan poco que pedirle y tanto que agradecerle.

A la Maestra en Salud Pública Wendy Vianey Padilla Cabrera, Coordinadora de Vigilancia Epidemiológica del Laboratorio Estatal de Salud Pública, por permitir el desarrollo este tipo de trabajo para promover hacia un avance.

A la Maestra en Salud Pública Gloria Alicia Figueroa Aguilar, Directora del Laboratorio Estatal de Salud Pública, por su confianza, conocimientos, anuencia y por promover la búsqueda de Información más allá de los resultados del proceso, para la realización de este trabajo.

A la Química Farmacobióloga Sandra Suarez Moreno, por ser un gran ejemplo a seguir, por su apoyo incondicional y su confianza, por la lectura y las correcciones para la realización de este trabajo.

Al Maestro en Educación Médica José Luis Martínez Toledo, por sus conocimientos y aportación para el enriquecimiento del trabajo, por su apoyo en la lectura y las correcciones para el desarrollo del trabajo.

A la Maestra en Ciencias María Rebeca Tinoco Martínez, por permitirme el honor de aprender de ella, por su apoyo y confianza en el proceso para preparación de antisuero *Bordetella pertussis* y lectura de serologías mediante en Microplacas en forma de "U", por su tiempo y aportación en la lectura y correcciones del presente trabajo.

Al Químico Farmacobiólogo Juan Manuel Barajas Magallón, por su confianza, comentarios y apoyo para la realización de este trabajo.

A mi Asesor, el Biólogo Juan Luis Jaime Sánchez, por compartir conmigo todos sus conocimientos y tiempo, por brindarme la confianza, la fortaleza y el esfuerzo para ayudarme a creer que todo es posible, por todo el aprendizaje de corazón gracias.

A la Química Farmacobióloga María Vicenta Luna Oliva por compartir conmigo sus conocimientos y por su apoyo incondicional en la búsqueda de *Bordetella pertussis* durante el proceso del trabajo.

Al Biólogo Texca Tatevari Méndez López, por todo su apoyo, conocimiento y confianza durante el transcurso del trabajo.

A las Químicas Farmacobiólogas Diana Casares Orozco y Mariana Palomino Pérez, por la confianza brindada, por el apoyo y colaboración en la realización del trabajo.

A las Químicas Farmacobiólogas Flor Yazmin Hernández, Tanía Montes, Ana Alicia Rivera, Paulina Saray León y la Maestra en Ciencias Angélica Escamilla, por brindarme su apoyo y desvelo, por estar ahí al pendiente para apoyarme siempre.

A Serafín Ortiz Olvera, especial mi Pa, por creer en mí, por su desveló, esfuerzo y cariño durante este proceso, por su brazo en el tiempo difícil, por todo lo que me ha regalado, por ser mi pilar.

A Judith Viridiana, Edith y Amelia, por escucharme y apoyarme en cada momento, por estar ahí siempre cuando las eh necesitado.

A mi familia y amigos del 16 de marzo, por estar al pendiente de este proyecto, por escucharme y brindarme su cariño y fortaleza para continuar, a cada uno les agradezco.

ÍNDICE

Índice de Gráficos

Índice de Imágenes

Índice de Figuras

Índice de Tablas

RESUMEN

ABSTRACT

	Pág
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Tos Ferina.....	1
1.2. Epidemiología.....	2
1.2.1. Incidencia Mundial.....	3
1.2.2. Incidencia en México.....	5
1.2.3. Reemergencia por Tos Ferina.....	7
1.3. Género <i>Bordetella</i>	8
1.3.1. <i>Bordetella pertussis</i>	11
1.4. Manifestaciones Clínicas de la Tos Ferina.....	12
1.4.1. Tos Ferina Clásica.....	13
1.4.1.1. Fase catarral, inicial o prodrómica.....	13
1.4.1.2. Fase paroxística, convulsiva o espasmódica.....	14
1.4.1.3. Fase convaleciente o de convalecencia.....	15
1.4.1.4. Complicaciones de la Tos ferina clásica.....	15
1.4.2. Tos Ferina Grave.....	16
1.4.3. Tos Ferina Atípica.....	17
1.5. Patogénesis.....	17
1.6. Diagnóstico de la Tos Ferina.....	19
1.6.1. Diagnóstico por Laboratorio.....	21
1.6.2. Toma de Muestra.....	23
1.6.3. Transporte de Muestras.....	24
1.6.4. Cultivo.....	26
1.6.5. Inmunoflorecencia Directa (IFD).....	29

1.6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Rt-q-PCR).....	29
1.6.7. Serología.....	31
1.7. Tratamiento contra <i>Bordetella pertussis</i>	33
1.8. Inmunidad por <i>Bordetella pertussis</i>	35
1.9. Vacunas para la Tos Ferina.....	36
1.9.1. Vacuna Antitosferínica de células enteras.....	37
1.9.2. Vacuna Antitosferínica acelular.....	38
1.9.3. Vacuna Antitosferínica acelular de baja carga antigénica.....	38
2.0. JUSTIFICACIÓN.....	39
3.0. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo General.....	39
3.2. Objetivos Específicos.....	39
4.0. HIPÓTESIS.....	39
5.0. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
5.1. Estudio Estadístico.....	40
5.2. Clínica.....	41
5.3. Cultivo.....	41
5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Rt-q-PCR).....	42
5.5. Serología.....	43
5.5.1. Aglutinación de anticuerpos mediante Técnica de Manclark.....	43
5.6. Análisis de Sensibilidad y Especificidad.....	44
6.0. RESULTADOS.....	45
6.1. Universo de muestra	45
6.2. Clínica.....	51
6.3. Cultivo.....	52
6.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Rt-q-PCR).....	52
6.5. Serología.....	53
6.6. Análisis de Sensibilidad y Especificidad.....	55
7.0. DISCUSIÓN.....	57
8.0. CONCLUSIONES.....	59
9.0. BIBLIOGRAFÍA.....	62

9.1. Referencias web.....	94
ANEXOS.....	104
ANEXO I Estudio Epidemiológico de Tos Ferina.....	105
ANEXO II Procedimientos para Toma de Muestra.....	108
ANEXO III Medios de Transporte para <i>Bordetella pertussis</i>	111
ANEXO IV Preparación de Medios de Cultivo.....	113
ANEXO V Procedimientos para identificación y diferenciación de <i>B. pertussis</i>	118
ANEXO VI Conservación a corto plazo de <i>Bordetella pertussis</i>	120
ANEXO VII Preparación de Antígeno “O” para <i>Bordetella pertussis</i>	121
ANEXO VIII Manejo e inoculación de Conejos.....	121
ANEXO IX Determinación de anticuerpos, Técnica de Manclark.....	123
ANEXO X Sistema Básico de Tiple Embalaje.....	124
ANEXO XI Algoritmo Diagnóstico de <i>Bordetella</i> spp mediante PCR- TR Multiplex.....	125
ANEXO XII Algoritmo de procesamiento de muestras para Tos Ferina.....	126
ABREVIATURAS.....	127
GLOSARIO.....	129

Índice de Gráficos

Gráf. 1	Casos e incidencia de tos ferina en México 2000-2011.....	6
Gráf. 2	Casos e Incidencia de tos ferina por estado, México 2011.....	6
Gráf. 3	Casos y contactos para Síndrome coqueluchoide, 2009-2012.....	45
Gráf. 4	Muestras rechazadas durante 2009-2012.....	45
Gráf. 5	Frecuencia de casos y contactos por año.....	46
Gráf. 6	Distribución por definición operacional.....	47
Gráf. 7	Distribución de casos por Género.....	47
Gráf. 8	Muestras por edad (Meses).....	48
Gráf. 9	Distribución estacional de muestras.....	48
Gráf. 10	Distribución de muestras remitidas por jurisdicción.....	49
Gráf. 11	Distribución por estado de vacunación.....	49
Gráf. 12	Administración de Tratamiento.....	50
Gráf. 13	Resultados, Lectura de serologías a 48 horas de incubación.....	55
Gráf. 14	Análisis de Sensibilidad y Especificidad.....	56

Índice de Imágenes

Imág. 1	Morfología Microscópica de <i>Bordetella pertussis</i>	10
Imág. 2	Taxonomía del género <i>Bordetella</i>	11
Imág. 3	Morfología Macroscópica de <i>Bordetella pertussis</i>	12
Imág. 4	Toma de muestra, Exudado nasofaríngeo.....	23
Imág. 5	Medio de transporte de Solución salina con Cefalexina (40 µg/ml).....	25
Imág. 6	Pruebas de diferenciación de especies del género <i>Bordetella</i>	27
Imág. 7	Cultivo axónico de <i>Bordetella pertussis</i>	28
Imág. 8	Serología de aglutinación en microplaca en “U”.....	31
Imág. 9	Reaislamiento de cultivos positivos para <i>Bordetella pertussis</i>	52
Imág. 10	Lecturas séricas de Microplacas de Manclark, 48 horas.....	53

Índice de Figuras

Fig. 1	Diagrama de evolución clínica de tos ferina “clásica”	14
Fig. 2	Desarrollo de la tos ferina en menores de tres meses de vida.....	15
Fig. 3	Factores de virulencia de <i>Bordetella pertussis</i>	17
Fig. 4	Desarrollo de inmunidad contra <i>Bordetella pertussis</i>	35
Fig. 5	Tabla de contingencia para evaluar pruebas diagnósticas.....	44

Índice de Tablas

Tabla 1	Especies del Género <i>Bordetella</i>	9
Tabla 2	Factores de virulencia en especies del género <i>Bordetella</i>	18
Tabla 3	Pruebas utilizadas para diagnóstico de tos ferina.....	20
Tabla 4	Material adecuado para toma de muestra de tos ferina.....	24
Tabla 5	Envío de muestras para diagnóstico de tos ferina.....	24
Tabla 6	Características de identificación de <i>Bordetella</i> sp.....	27
Tabla 7	Algoritmo de PCR para identificación de especies de <i>Bordetella</i> spp....	30
Tabla 8	Macrólidos empleados en el tratamiento de la tos ferina.....	33
Tabla 9	Resultados mediante Clínica, Cultivo, PCR-RT y Serología.....	51

RESUMEN

La tos ferina es una enfermedad altamente infecto-contagiosa de las vías respiratorias ocasionada por *Bordetella pertussis*, un bacilo corto Gram negativo que se transmite directamente mediante estornudos. Actualmente continúa como un problema de salud pública a nivel mundial presentándose más reciente como reemergente. Su diagnóstico continúa con dificultades, ya que no se puede utilizar solo un procedimiento para la obtención de un resultado rápido y fiable. Por lo que realizar una evaluación del diagnóstico es oportuno y necesario para un seguimiento epidemiológico de la Tosferina por Laboratorio que permita un margen de confiabilidad amplio en el estado.

El estudio es de tipo observacional, retrospectivo y experimental. Se procesaron muestras de pacientes con diagnóstico de Tos ferina durante el periodo del 2009 al 2012 mediante cultivo, Rt-q-PCR y serología en microplaca de Manclark.

Aunque el cultivo presentó alta especificidad, su baja sensibilidad lo pone en desventaja coincidiendo con Sanz en 2002. La sensibilidad y especificidad observada por el Rt-q-PCR permite la toma de decisiones de forma precoz, pero sin embargo, los altos costos de la infraestructura y el equipo necesario la sitúan en desventaja para la utilización de manera rutinaria en los laboratorios, además de no permitir el seguimiento de los cambios que sufre *Bordetella pertussis*. La serología mostró ser una herramienta útil en el diagnóstico, especialmente en los casos sin vacunación, casos graves y pacientes adultos; además ofrece resultados en 48 horas, pero presenta una baja especificidad.

Por lo anterior el empleo de las tres técnicas es complementario y puede abundar en cuanto al diagnóstico apoyando al médico en el manejo y tratamiento, siempre que las condiciones del paciente y la muestra coadyuven con las técnicas mencionadas.

Palabras clave: *Bordetella pertussis*, Tos ferina, diagnóstico, serología, cultivo.

ABSTRACT

Whooping cough is a highly contagious disease of the respiratory tract caused by *Bordetella pertussis*, a Gram negative short bacillus that is directly transmitted through sneezing. He continues as a public health problem worldwide presenting a reemerging latest. Diagnosis continues to struggle, as no one can use a procedure for obtaining a quick and reliable result. So make a diagnostic evaluation is appropriate and necessary for an epidemiological monitoring Laboratory Pertussis by allowing a wide margin in the state reliability.

The study is observational, retrospective and experimental. Patient samples were processed diagnosed with whooping cough during the period from 2009 to 2012 by culture, RT-q-PCR and serology Manclark microplate.

Although the crop presented high specificity, low sensitivity puts you at a disadvantage coincide with Sanz in 2002. The sensitivity and specificity observed by RT-q-PCR allows decisions early, but nevertheless, the high costs infrastructure and equipment necessary to place it at a disadvantage in the use routinely in laboratories, in addition to not allow monitoring of the changes undergone by *Bordetella pertussis*. Serology proved to be a useful tool in the diagnosis, especially in cases without vaccination, serious cases and adults; also it provides results in 48 hours, but has low specificity.

Therefore the use of the three techniques are complementary and may abound in diagnosis supporting the physician in the management and treatment, provided that the conditions of the patient and the sample contribute to the above techniques.

Keywords: *Bordetella pertussis*, whooping cough, diagnosis, serology, culture.

1.0 INTRODUCCIÓN

Con la introducción de las vacunas contra la tos ferina hace más de 50 años en todo el mundo, se produjo una disminución en los casos de la enfermedad, pero no su desaparición^{1, 2, 3, 4}, además de acompañarse de una subestimación de *Bordetella pertussis* como un problema clínico de importancia^{5, 6, 7}.

En los últimos años, *B. pertussis* ha marcado nuevamente su importancia clínica, manteniendo prevalencia y más recientemente como patógeno reemergente con un cambio en su patrón de infección, siendo adolescentes y adultos que han recibido vacunación entre los afectados^{7, 8}. Entre las posibles causas de su propagación, se considera a la dificultad diagnóstica como el principal motivo, ya que al presentarse un cuadro atípico de la enfermedad se puede confundir con facilidad con otras enfermedades de las vías respiratorias^{9, 11, 12, 22, 164}.

1.1. Tos Ferina

La tos ferina (TF), es una enfermedad altamente infecciosa de las vías respiratorias, exclusiva de humanos y con una prevalencia a nivel global^{4, 10}. Es de origen bacteriano, ocasionado por *Bordetella pertussis*, un bacilo corto o diminuto Gram negativo que tiene un tropismo especial por las células ciliares del epitelio nasofaríngeo^{15, 245, 326}. Se transmite por contacto directo de persona a persona siendo en extremo contagiosa con tasas del 90% al 100% entre individuos susceptibles no vacunados^{16, 242}. Se considera desde la antigüedad como un padecimiento de la infancia^{131, 150, 151, 152}, sin embargo, puede presentarse a cualquier edad aunque no con los mismos síntomas^{153, 154}; entre el grupo de adolescentes, adultos y ancianos, los síntomas pueden reducirse solo a una tos persistente u ocasional, o de forma asintomática, por lo que son considerados como portadores de transmisión entre la comunidad^{155, 229, 236}.

Es conocida desde el siglo XVII y descrita inicialmente por Baillou quién la denominó como *tussis Quintín* después de una epidemia en París en 1578 y posteriormente por Sydenham en 1679 como *pertusis*, que del latín significa *per*, intensa y *tussis*, tos^{17, 18, 19, 337}. Sin embargo, se le ha denominado con diversos nombres a través de las épocas y lugares donde se ha presentado, para diferenciarla de otras enfermedades como: coqueluche (francés), enfermedad de los 100 días (Japonés), tos en quintas,

el canto del gallo, tos convulsa (España), tosse comprida (Brasil), pertussis o tos ferina como es conocida en nuestro país, que significa “tos de una fiera”^{13, 20, 21, 367, 368}. Fue aislada por primera vez en 1906 a partir de una muestra de esputo de un paciente por Bordet y Gengou y sus primeros ensayos para la inmunidad fueron realizados entre 1914 y 1923 por Hess, Luttinger y Madsen. Siendo que la primera vacuna desarrollada contenía células de la bacteria de forma inactiva, la cual, se introdujo hacia el país de Estados Unidos en 1940. Pero la presencia de reacciones adversas, llevó hacia la búsqueda de nuevas vacunas más puras introduciéndose inicialmente en Japón en 1981²². Un padecimiento que se presenta con menor gravedad es el Síndrome coqueluchoide, enfermedad que implica agentes del género *Bordetella*, otras bacterias y virus¹².

1.2. Epidemiología

La infección por *Bordetella pertussis* es un importante problema de salud pública a nivel mundial^{20, 23, 24, 242}. Se encuentra con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo donde ha condicionado mortalidad y es menos frecuente en los países donde se han alcanzado buenas coberturas de vacunación^{25, 219, 326}.

Su prevalencia es en cualquier época estacional, incidiendo en los meses de frío y con aparición en picos de cada dos a cinco años, independientemente de la latitud y/o la inmunización adquirida por las vacunas^{19, 27, 28, 29, 30}. Se le considera en extremo contagiosa con tasas que van del 50 al 80% en los ámbitos escolares y del 90% hasta el 100% entre los contactos no inmunizados, argumentando además, que la fuente de contagio suele ser la madre (33%), o el padre (16%) en la mayoría de los casos^{3, 234, 235, 249, 338}. Principalmente afecta a los menores de un año y con mayor riesgo de complicaciones e incluso mortalidad entre los neonatos vulnerables de seis meses o menores que no han recibido una dosis de la vacuna^{31, 32, 33, 34}. El Centro para Control y Prevención de Enfermedades (CDC) argumenta, que son los menores quienes alcanzan 20 veces más la incidencia, de los cuales, dos tercios son hospitalizados²⁶.

En los últimos años, los brotes epidemiológicos reportados entre los adolescentes y adultos, han permitido aclarar la comprensión de este grupo, como portadores y

principales medios de transmisión hacia los menores, que por razones aún desconocidas, los casos continúan ocurriendo más frecuentemente entre el género femenino y en pacientes con problemas de obesidad ^{3, 28, 34, 36, 37}.

1.2.1. Incidencia Mundial

Durante las décadas de 1920 y 1930, la tos ferina fue una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo ^{18, 35, 237}. En Estados Unidos de América, el número de incidencia por la enfermedad se encontraba mayor a 175,000 casos que originaban 8,000 defunciones anuales. Registrándose para 1994, 40 millones de casos con 360,000 defunciones en todo el mundo ^{38, 39}.

Para 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) había llegado a la conclusión de encontrarse lejos de la erradicación de la enfermedad, ya que los casos que se habían reportado en ese entonces, correspondían a los menores de un año (62%), siendo el 32% los menores de tres meses de vida. De los cuales, dos tercios de los casos habían sido contagiados dentro de su ámbito familiar (padre, madre o hermanos) ^{18, 237}, y en aumento para el 2002 con un número de defunciones de 294,000 a nivel mundial. El número de casos registrados durante el periodo de 1982 al 2002 correspondió a 3,1 casos por 100,000 habitantes.

En el 2005, los países pertenecientes a la región Oriental mostraban un aumento de la enfermedad siendo el registro de mayor frecuencia para Iraq con 1,050 casos y 3,128 casos para el 2006 ^{40, 41, 143}. Considerando para el 2008, de acuerdo a la OMS el registro de tos ferina fue de 16 millones de casos con presencia de 195,000 defunciones a nivel mundial ^{20, 42, 237, 328}.

En la región de las Américas, el número de los casos evidenciaban una tendencia a su disminución con un registro de 3,883 casos para el 2004. Época durante la cual la cobertura vacunal había sido del 80 al 95% entre los menores de un año de vida con DPT; y del 93% para el 2009 en la misma edad. Pero a pesar de la extensa vacunación estimada, en los últimos años se ha observado la prevalencia de *B. pertussis* con aumento en su incidencia. Durante el periodo del 2000 al 2010 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) registro un total de 226,185 casos

que indicaban el incremento a partir del 2007; año en el cual el país de Costa Rica emitió una emergencia sanitaria en una de sus comunidades por la muerte aparente de bebés ³⁵², notificando 14 casos para el año de 2011 y 18 casos para el 2012. Así mismo para el 2012 en Perú, se registraron 769 casos con incremento de 20 veces más al presentado en el 2011, de los cuales el 67% correspondieron a casos confirmados ^{278, 344, 345}.

Durante el 2012, la OPS emitió alertas epidemiológicas hacia todos los países de las Américas, donde el registró en el reporte fue de 20,000 a 30,000 casos, siendo los países de Argentina, Colombia, Chile, Brasil, Guatemala, Paraguay, Estados Unidos de América y México quienes presentaron un incremento notorio por tos ferina ^{43, 329, 330, 357}.

En los Estados Unidos de América, el estado de Washington declaró epidemia por la presentación de más de 4,000 casos ^{44, 229, 341, 346}. El país de Argentina, registro 7,967 casos para el 2011 y de 3,245 casos por cada 100,000 habitantes para el 2012 ^{19, 339, 355}; y el país de Chile, 2,275 casos para el 2011, año en el que la mortalidad fue para más de la mitad de los casos entre los menores de un año ^{338, 348}. En Colombia, la notificación fue 1,373 casos para el 2012. Notificándose un total de 226,185 casos durante el periodo 2000- 2012 ^{326, 330, 347, 366}. En Brasil, se notificaron 2,000 casos con 47 defunciones para el 2011 y 1,723 casos con 33 defunciones para el 2012 ³⁵⁷. En Uruguay, el registro fue de 636 casos presentando 8 muertes por la enfermedad durante el 2011 ²². En Venezuela, el registro total fue de 401 casos para el año 2012 ³³⁶ y para Canadá, de 4,800 casos para el 2012 ^{35, 230}. El registro hasta el mes de noviembre del 2013, fue de 4,184 casos por tos ferina a nivel global ³⁵⁴.

Las estimaciones más recientes de la OMS estiman que se presentan de 40 a 50 millones de casos que originan 300,000 defunciones anuales por tos ferina en todo el mundo, aunque las cifras pueden ser mayores dado que su presentación clínica suele confundirse con facilidad con otras enfermedades respiratorias ^{43, 45, 46, 47, 279}. Así mismo, se considera que tos ferina ocupa el quinto puesto en mortalidad infantil causada por una enfermedad que es prevenible por vacunación ^{4, 22, 34, 48, 330, 367}.

1.2.2. Incidencia en México

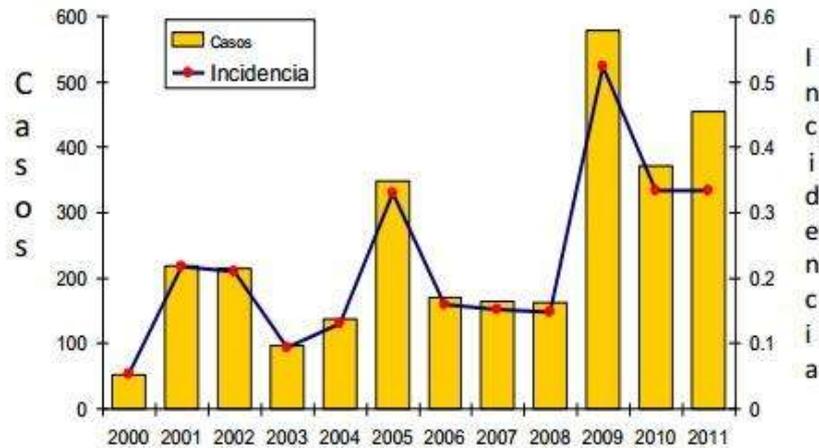
En México, durante los años de 1929 y 1931 la infección por *B. pertussis* fue considerada como la tercera causa de muerte entre los menores de 5 años de vida. Esto, por la frecuencia con la que los menores adquirirían el agente antes de que pudieran comenzar su estancia preescolar, causando más de un cuarto de millón de defunciones, siendo el 40% entre los menores de un año de vida los que se consideraban como inadmisibles ³³¹. Los primeros registros sobre la enfermedad fueron durante los años 60 y 70 mediante encuestas epidemiológicas donde se notificaba una seropositividad de *B. pertussis* del 15.3% para 1965; del 24.7% para 1966 y del 33% para el año de 1973. La última seroencuesta registrada fue durante 1987 donde se determinaron aglutininas de 25,666 muestras mediante serología de niños de entre 1 a 15 años de edad obteniéndose una frecuencia de aglutininas acumulada del 66.5%, siendo más frecuente en los títulos de 1:16 con 24.9% ^{49, 50}. Pero con la introducción de la vacuna en México, se llevó a una disminución progresiva de la enfermedad a partir de 1980 con 10 casos por 100,000 habitantes ^{16, 241}.

En relación al registro de casos por estados, durante 1988, Veracruz presentó un brote por tos ferina donde evidenciaron a 85 (18%) de los casos mediante la técnica de serología; perteneciendo al grupo de edad entre los siete y 11 meses de edad. Mientras que en Jalisco, un estudio de 103 casos de síndrome pseudo-*pertussis*, evidenció al 16.5% como tos ferina, siendo el 60% confirmado por laboratorio; frecuencia en la cual el grupo de edad más afectado se encontró entre los menores de tres a 11 meses de edad ⁴⁶. En la Ciudad de México, durante el 2003, se realizó un estudio transversal entre escuelas secundarias, donde se registró durante el periodo del mes de septiembre del 2002 a marzo de 2003, la confirmación de *B. pertussis* en 32.8% de los 61 estudiantes estudiados, considerándose al 10.6% (20 casos) positivos mediante técnica de PCR ^{50, 51}.

Durante el 2009, se informó la presencia de brote por tos ferina en Michoacán, argumentando dos casos en el municipio de La Piedad, y 15 casos en Uruapan ³⁵¹. Sin embargo, a partir del año 2008, se encontraban notables incrementos en el número de casos con 162 casos a nivel nacional y una incidencia de 0.15% por

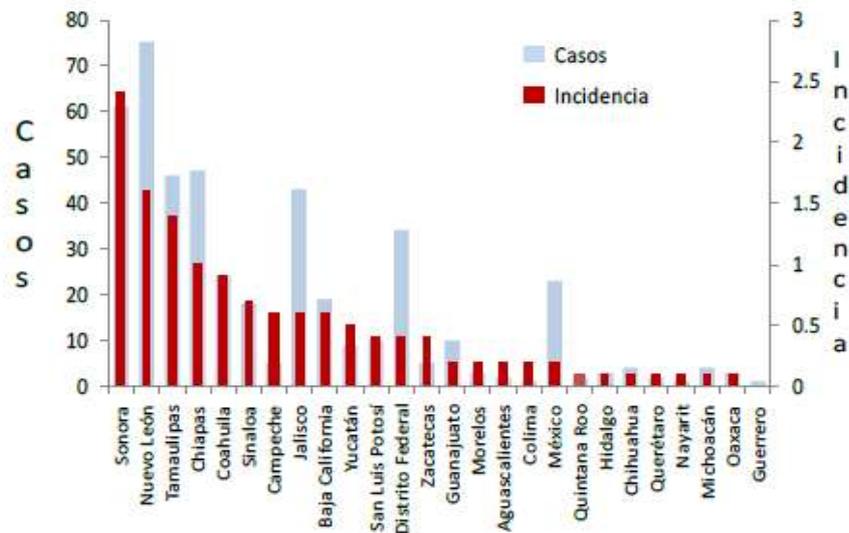
cada 100,000 habitantes. Siendo el 2005 (tres casos) y 2009 (cinco casos) los años con mayor incidencia por tos ferina en México ^{4, 41}.

Gráfica 1. Casos e incidencia de tos ferina en México 2000-2011.



Fuente: Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2012. Aviso epidemiológico de Tos ferina: Incremento de casos de tos ferina en América. CoNaVe/2012/02/TOS FERINA.

Gráfico 2. Casos e Incidencia de tos ferina por estado. México 2011.



Fuente: Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2012. Aviso epidemiológico de Tos ferina: Incremento de casos de tos ferina en América. CoNaVe/2012/02/TOS FERINA.

De acuerdo a los informes por parte del Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica (DGE), durante el 2009 la notificación de los casos fue de 2,375 casos probables, 579 casos confirmados, y 44 defunciones, de los cuales el 57% pertenecieron a los menores de un año; y así mismo, para el 2011 el incremento de

los casos fue de 19% al registrado para el 2010 (Gráfico 1) ³⁵. El 16% de los casos registrados fueron identificados mediante PCR, siendo los estados de Sonora (61 casos); Nuevo León (75 casos); Tamaulipas (46 casos); Chiapas (47 casos) y Jalisco (43 casos) los más afectados ^{334, 356}. Estas entidades concentraron el 60% de los casos del país, correspondiendo el 85% a los lactantes menores de un año (Gráfico 2).

Pese a la poca información sobre la epidemiología actual de la enfermedad en México, tos ferina continúa como un problema importante de salud pública. De acuerdo al aviso epidemiológico emitido por la CoNaVe durante el 2012, donde se argumenta el no encontrarse incremento notorio en los casos por la enfermedad a los emitidos por los demás países de las Américas, se considera que la carga real de la enfermedad se encuentra subestimada, ya que solo dos casos son registrados como tos ferina de 10 casos con síndrome coqueluchoide; considerando a la baja sospecha clínica o la dificultad de su confirmación como las principales causas ^{28, 326}.

1.2.3. Reemergencia de la Tos Ferina

Con la reemergencia que presenta la tos ferina en los últimos años, por el incremento de casos entre adolescentes y adultos con antecedentes de vacunación y presentaciones atípicas a la enfermedad, se puso en evidencia el creciente carácter persistente y la importancia de *Bordetella pertussis* en todo el mundo ^{6, 7, 10, 19}.

El incremento en su prevalencia entre las personas de mayor edad, es de las características destacadas y principal factor de su resurgimiento entre la población, determinando además que son quienes conforman los reservorios importantes del patógeno y principales fuentes de transmisión hacia los niños sin o parcialmente vacunados ^{52, 333}. Aunque la localización de *B. pertussis* en ellos, es considerado aún como desconocido.

Entre los argumentos sobre la reemergencia de la tos ferina, puede mencionarse como posible causa un cambio genético que *B. pertussis* ha sufrido en la cepas circulantes, lo que pudiera justificar la disminución en la eficacia de las vacunas ^{34, 38}.

39, 41, 53, 332. Otra de las aparentes causas, es la Inmunoselección entre las cepas más virulentas formuladas en base a la colección para elaboración de las vacunas^{18, 56}. Esto determinaría la capacidad de inmunización que presentan las vacunas actuales contra las cepas circulantes, ya que presentan variaciones pleómorficas con respecto a las presentes en las vacunas. Además de que pese a las altas coberturas que se pretende establecer, aun se quedan demasiados lactantes menores sin una sola dosis de vacuna, lo que argumenta la posibilidad en el incremento de contraer de mayor forma la enfermedad.

La baja eficacia que presentan las vacunas, se piensa que es una de la causas por las que el grupo afectado de adolescentes y adultos que ya fueron vacunados durante su infancia, tiendan a sufrir de una reinfección por *B. pertussis*, y que a su vez se presenten de forma asintomática, atípica o severa^{24, 46, 51}. Además de mencionar la existencia del aumento en el índice de sospecha, esto sobre todo en los adultos, ya sea por la manifestación de los síntomas de manera más precisos y/o por lo avances en los métodos para su diagnóstico como la PCR y serología^{57, 58}.

1.3. Género *Bordetella*

Las especies que constituyen el género *Bordetella* son β -proteobacterias pertenecientes a la familia *Alcaligenaceae*^{59, 60, 247, 252}. Su taxonomía más reciente, reconoce a nueve especies dentro del género: *B. pertussis*, *B. parapertussis*_{hu}, *B. parapertussis*_{ov} (adaptada a ovejas), *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. avium*, *B. trematum*, y *B. petrii*^{34, 37, 42, 61, 62, 63, 246}; y a una especie más aislada en el año 2005 pero con una descripción formal aun pendiente: *B. ansorpii* (Cuadro 1)^{64, 65, 66, 67}. Siendo de las especies que se encuentran dentro del género: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. holmesii* y *B. avium* las asociadas en producir patógenesis infectando el tracto respiratorio de mamíferos^{59, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 340}.

Tabla 1. Especies del Género *Bordetella*

ESPECIE	PRIMER AISLAMIENTO	DESCUBIERTA	HÜESPEDES	ENFERMEDAD	ARTICULADO
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1896	-	Mamíferos	Rinitis atrófica, Traqueo bronquitis Infecciosa canina (TIC)	Matto, S, <i>et al</i> 2005 Rosales, ME, <i>et al</i> 2003 Basurto, FJ, <i>et al</i> 2005 Piancola, LA, <i>et al</i> 2012
<i>Bordetella parapertussis</i>	1938	Estados Unidos de América	Humanos y Ovejas	Tos	Healy, MC, <i>et al</i> 2011 OMS, <i>et al</i> 2010 INS (México) <i>et al</i> 2011
<i>Bordetella pertussis</i>	1906	-	Humanos	Tos	Legrand, JC, <i>et al</i> 2007 CDC, <i>et al</i> 2010 Elahi, S, <i>et al</i> 2005
<i>Bordetella holmesii</i>	1983	-	Humanos	Tos	Nei, T <i>et al</i> 2012 Weyant, RS, <i>et al</i> 1995 Reischl, U, <i>et al</i> 2001 Piancola, LA, <i>et al</i> 2012 Yih, Wk, <i>et al</i> 1999
<i>Bordetella avium</i>	1967	Canadá	Aves y Pavos	Bordetelosis	Spears, PA, <i>et al</i> 2003 Noguera <i>et al</i> 2001 Harrington, AT, <i>et al</i> 2009
<i>Bordetella hinzii</i>	1995	Francia	Aves y Humanos	Bacteriemia	Juyipong, T, <i>et al</i> 2013 Register, KB, <i>et al</i> 2003 CDC, <i>et al</i> 2013 Hayashimoto, N, <i>et al</i> 2008
<i>Bordetella trematum</i>	1996	-	Humanos	Infecciones ópticas y de oído, úlceras de pie diabético	Daxboeck, F, <i>et al</i> 2004 Shah, NR, <i>et al</i> 2013 Murray, PR, <i>et al</i> 2007 Sacco, RE, <i>et al</i> 2000 Koneman, <i>et al</i> 2008
<i>Bordetella petrii</i>	2001	-	Humanos	Infecciones Oído, mandíbula, fibrosis quística	von Wintzingerode <i>et al</i> 2001 Zelazny AM, <i>et al</i> 2013
<i>Bordetella ansorpii</i>	2005	-	Humanos	Infección de heridas	Soo Ko, K, <i>et al</i> 2005 Fry, NK, <i>et al</i> 2007 Mooi, FR, <i>te al</i> 2007

Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

Se encuentran estrechamente relacionadas en su fisiología, pero con variaciones en sus propiedades genéticas, fenotípicas e inmunológicas^{34, 75, 76}. Fueron cultivadas por primera vez en carbón de leña-medio a base de Pollack en 1947 y se trata de bacilos cortos o diminutos Gram negativos (Imagen 1) que presentan una tendencia

bipolar en su colonización; son catalasas positivas, aerobios estrictos, anaerobios facultativos, con metabolismo respiratorio no fermentativo; siendo varias de las especies en extremo fastidiosas ya que requieren de aminoácidos para su reproducción como la nicotiamida, cisteína y nitrógeno orgánico ^{75, 77, 333}.

Imagen 1. Morfología Microscópica de *Bordetella pertussis*.



a) Tinción gram de *B. pertussis*.

Fuente: <http://www.idimages.org/images/organismdetail/?imageid=1858&altimageid=1882>.

Para su aislamiento mediante cultivo, requieren de medios enriquecidos como el tradicional Bordet-Gengou ó Regan-Lowe, donde se desarrollan en forma de colonias pequeñas, lisas, brillantes casi transparentes con presencia de hemólisis ⁷⁸. Son muy parecidas morfológicamente a *Haemophilus influenzae*, es por ello que en su pasado, el género se encontró clasificado junto con otros agentes bacterianos que incluían a *Brucella*, *Alcaligenes* y *Haemophilus influenzae* ⁷⁹, pero después de extensos estudios realizados, la hibridación de DNA y RNA confirmaron la filogenia común que existe con especies de *Alcaligenes*, pasando así a ser parte de la familia *Alcaligenacea* (Imagen 2), donde actualmente reside en la subdivisión *B₂* junto con los géneros *Achromobacter*, *Sutterella*, *Pelistega* y *Taylorella* ^{29, 80, 81, 82}.

Imagen 2. Taxonomía del género *Bordetella*.

Domain *Bacteria*
Phylum BXII. *Proteobacteria*
Class II. *Betaproteobacteria*
Order I. *Burkholderiales*
Family III. *Alcaligenaceae*
Genus III. *Bordetella*
Bordetella pertussis
Bordetella avium
Bordetella bronchiseptica
Bordetella hinzii
Bordetella holmesii
Bordetella parapertussis
Bordetella petrii
Bordetella trematum

Fuente: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes, 2nd Edition.

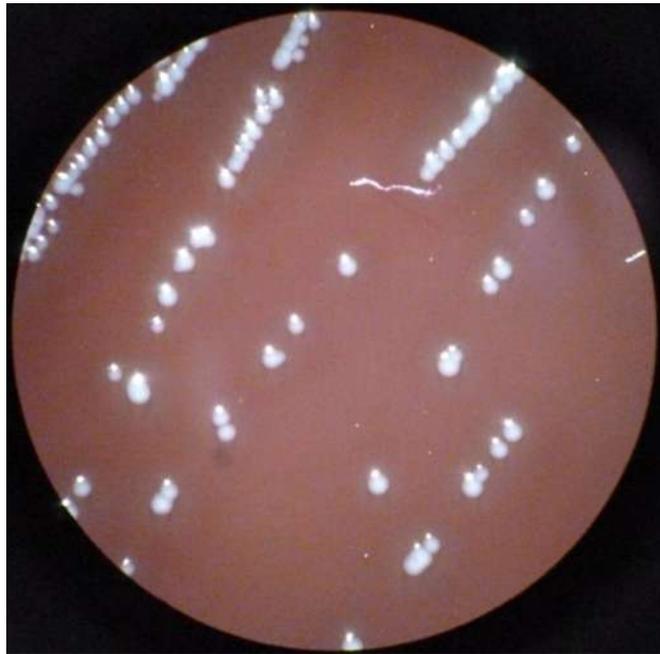
1.3.1. *Bordetella pertussis*

El agente causal de la tos ferina ^{9,131, 234,2 36, 247}. Pertenece a uno de los primeros microorganismos descritos en la época de la Microbiología con más de 100 años ¹³². Se trata de un bacilo corto o diminuto Gram negativo con una afinidad muy especial por tracto respiratorio de humanos con ningún animal conocido o reservorio ambiental, aunque hay menciones que puede infectar a roedores, primates y lechones en condiciones experimentales ^{37, 133}. Tiene un tamaño de 0,2 a 0,3 µm de largo por 0,5 a 1,0 µm de ancho ^{63, 75, 134}. Su nombre *Bordetella pertussis* en honor al bacteriólogo de origen belga, Jules Bordet ^{135, 337}. Es un aerobio estricto y anaerobio facultativo, inmóvil, de metabolismo oxidativo, que se encuentra de forma aislada o en pares y raras veces en cadenas cortas; considerado como la especie dentro del género que presenta mayor necesidad nutricional para su crecimiento ^{63, 70, 136, 137, 138, 139, 219, 237}.

De cultivo difícil ^{242, 361}. Es en extremo exigente ya que es muy sensible ante algunas sustancias y metabolitos tóxicos presentes en medios de cultivo como ácidos grasos insaturados, iones metálicos, sulfuro coloidal y peróxidos por lo que sus medios deben encontrarse enriquecidos por almidón, carbón vegetal, albúmina, sangre o alguna sustancia que pueda protegerla ^{76, 140, 333}. Posee un número importante de

factores de virulencia que están relacionados con su capacidad de infectar al paciente ^{141, 369}. Crece en medios selectivos de Bordet-Gengou donde se desarrolla en forma lenta apareciendo a partir del 3 al 7-15 día como colonias lisas, convexas, brillantes translúcidas como perlas pequeñas con semejanza a gotitas de mercurio rodeadas por una zona β -hemolisis estrecha (Imagen 3), sobre todo después de una incubación prolongada ^{5,137,142}. Es susceptible al frío y a la desecación por lo que debe mantenerse el medio en alta humedad ¹⁴⁰.

Imagen 3. Morfología Macroscópica de *Bordetella pertussis*



a) Colonias de *B. pertussis* visto en Estéreo microscopio, 32x.

Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

1.4. Manifestaciones Clínicas de la Tos Ferina

La presentación de síntomas son resultado de la infección por *B. pertussis* en el paciente ¹⁴³. Estos dependen de factores como la edad, la vacunación previa a la infección, la presencia de anticuerpos desarrollados de forma pasiva a la vacuna y la administración de antibióticos previos a la infección ^{144, 145, 146}. En los menores de edad con vacunación parcial, puede presentarse de forma alterada en su presentación, verse complicada por infecciones virales simultáneas del tracto respiratorio o ser confundida con otras enfermedades como asma, sinusitis, rinitis alérgica, neumonía, tuberculosis y epilepsia ^{47, 134, 146}.

B. pertussis se transmite por contacto directo de persona a persona, a través de pequeñas partículas de saliva que son diseminadas en el aire por tos o estornudos que se ingieren y le permiten hospedarse con mayor facilidad mediante la producción y liberación de toxinas ^{147, 148, 247, 248, 353}. No se conoce el contagio de esta enfermedad por vías como fómites u otros ^{145, 149, 237}.

Su periodo de su incubación es de siete a 10 días, donde el paciente poco a poco va desarrollando síntomas que son específicos de la enfermedad ^{156, 231, 232, 247, 353}. En los niños pequeños, los únicos síntomas que pueden presentarse son apnea (Interrupción de la respiración) y/o la cianosis (Coloración azul de la piel) ²³⁶. Existen tres estadios de la enfermedad, desarrollándose en tos ferina clásica, grave o atípica de acuerdo su estado de gravedad ^{17, 131, 145, 157}.

1.4.1. Tos Ferina Clásica

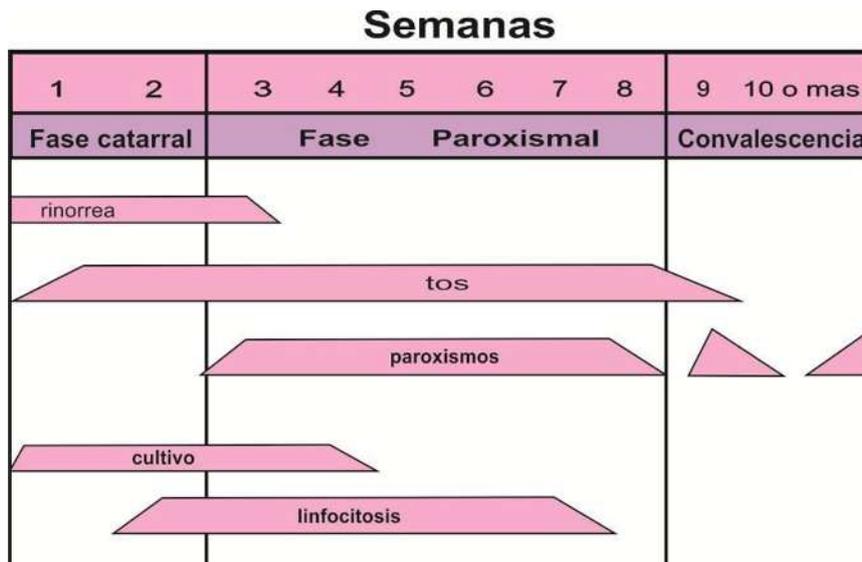
Clásicamente dura cerca de seis a 12 semanas, durante el cual, principalmente los niños no vacunados desarrollan tres fases de acuerdo a los síntomas con relevancia como fase catarral, paroxística y de convalecencia ^{149, 159, 160, 353}.

1.4.1.1. Fase catarral, inicial o prodrómica

De comienzo insidioso, por lo regular del quinto al doceavo día después de la adquirir a *B. pertussis* ^{3,149}. Se caracteriza por presentar síntomas que son inespecíficos y que pudieran confundirse fácilmente como un “resfriado común” o “gripe”.

Durante este estadio, se encuentra malestar como catarro, estornudos, tos leve, inflamación de la mucosa, descarga nasal, lagrimeo, además de anorexia y tos nocturna que evoluciona a diurna e incluso puede presentarse una discreta conjuntivitis ^{19, 96, 158, 161}. La temperatura del paciente es normal o ligeramente elevada de vez en cuando ^{37, 146, 219}. Su tasa de contagio durante esta fase es muy elevada al igual que la posibilidad de aislar a la bacteria por abundancia del microorganismo en el epitelio ^{18, 333}. Esta fase puede durar de una a dos semanas (Figura 1) ^{63, 236, 353}.

Figura 1. Diagrama de evolución clínica de tos ferina “clásica”



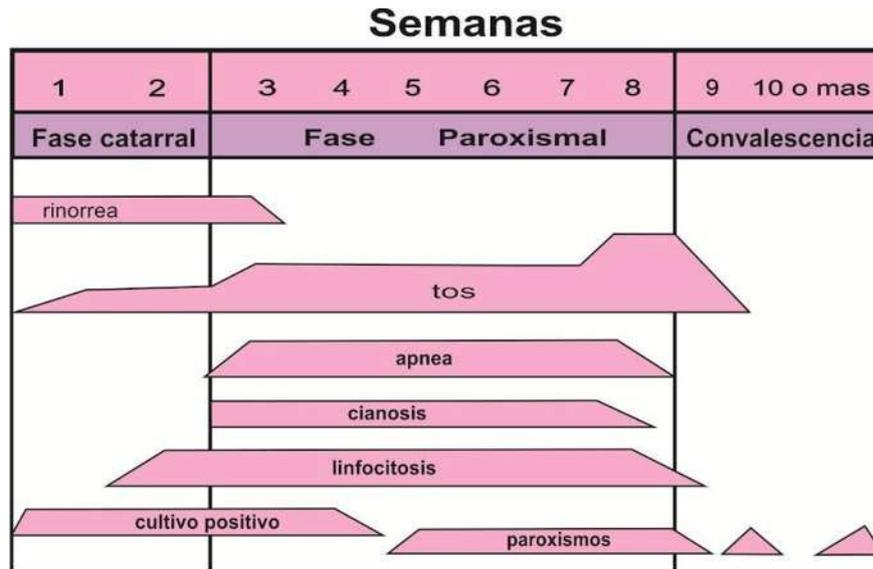
Tomado y modificado de: Sapián López LA. 1991. *Bordetella pertussis* Microbiología y Diagnóstico. Secretaria de salud. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Publicación Técnica del InDRE No. 5. México D. F.

1.4.1.2. Fase paroxística, convulsiva o espasmódica

Es la evolución después del séptimo al catorceavo día después de la primera fase ¹⁴⁵. Se conoce como tos en quintas o tos en estaccata por la aparición de cinco a 15 golpes de tos fuertes y repetidos que se presentan con múltiples expectoraciones violentas que pueden dejar al paciente en un estado de completa confusión o incluso llegar a la asfixia ^{335, 365}. Autores argumentan que las crisis pueden durar hasta 30 minutos ^{267, 367} pero que clásicamente terminan en un silbido inspiratorio prolongado que se escucha al finalizar una crisis de tos conocido como “el canto de un gallo” ^{53, 149, 162, 349}. Puede presentarse vómito y ocasionalmente pérdida del conocimiento.

Durante esta fase, se observa cianosis, salivación, lagrimeo, ojos saltones, protrusión de la lengua y sudoración profunda; en los niños con dosis de vacunación la presencia de la tos parece ser menor que en los que no han recibido vacuna ^{25, 92}. También, se encuentra un aumento de leucocitos que pueden rebasar los 50 000/mm³, con un predominio en los linfocitos de hasta del 90% (Figura 2) ^{24, 158, 161, 163, 164}. Esto, por la actividad que presentan las toxinas que libera *B. pertussis* en tráquea y bronquios, las cuales le permiten diseminarse con facilidad en el paciente.

Figura 2. Desarrollo de la tos ferina en menores de tres meses de vida



Tomado y modificado de: Sapián López LA. 1991. *Bordetella pertussis* Microbiología y Diagnóstico. Secretaria de salud. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Publicación Técnica del InDRE No. 5. México D. F.

El “silbido inspiratorio” es causado por la inspiración del aire a través de la glotis tumefacta y estrechada. Probablemente, por ello se justifica la aparición de complicaciones que provocan neumonías, que son la verdadera causa de la mortalidad por esta enfermedad o en menor frecuencia, la aparición de lesiones cerebrales. El desarrollo de esta fase puede ser muy grave, por ello, es necesaria la asistencia ventiladora entre los menores de un año.

1.4.1.3. Fase convaleciente o de convalecencia

Comienza por lo general después de las cuatro semanas del inicio durante el cual, existe la disminución de la frecuencia de los ataques de tos paroxísticas ¹⁴⁹. La gravedad de las crisis y a un ritmo más lento, la tos va desapareciendo junto con el vómito. El cultivo para *B. pertussis* o las pruebas en Reacción en cadena de la polimerasa (Rt-q-PCR) resultan negativo en este estadio. Los leucocitos y linfocitos van disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar sus niveles normales ¹⁵⁸. Puede durar de uno a tres meses ^{3, 355}.

1.4.1.4. Complicaciones de la Tos ferina clásica

Las complicaciones aparecen entre el 5-6 % de los casos ^{236, 330} causando en su mayoría defunción entre los neonatos en su primer año de vida. Entre las más

comunes se pueden encontrar a la encefalopatía con pérdida de conciencia, convulsiones, atelectasia pulmonar, neumonía, enfisema mediastinal, neumotórax, bronquiectasias y otitis media ^{143, 145, 157, 165, 236}. La neumonía puede ser un evento primario generado por la infección por *B. pertussis* o puede resultar de una infección secundaria por otros patógenos (*S. aureus*, *S. pneumoniae*) la cuál es causante del 90% de las muertes por la enfermedad ^{134,143, 144, 162}. La convulsiones son secuelas generadas por la acción toxigénica de *B. pertussis* en la que algunas ocasiones puede encontrarse asociada a una laringitis aguda ^{92, 136}. La causa de la encefalopatía no está claramente explicada debido a la falta de un animal apropiado, pero los mecanismos sugeridos incluyen a la anorexia secundaria a los paroxismos de tos, la hipoglucemia secundaria a los efectos tóxicos de la toxina pertussis (PT) y hemorragia intracerebral, que se inducirían a esta complicación.

1.4.2. Tos Ferina Grave

Se define como tos ferina grave a los casos que presentan insuficiencia respiratoria (hipoxemia refractaria), apneas, convulsiones, hiperleucocitosis (>100 000 leucocitos) y/o fallo renal principalmente entre los menores de tres meses de vida ^{131, 153, 162, 166, 167, 168}. Los lactantes que padecen la infección, en su mayoría con esquemas de vacunación incompleta pueden desarrollar falla respiratoria grave complicada por hipertensión pulmonar (HTP) progresando rápidamente a un shock cardiogénico refractario e irreversible hasta la mortalidad ^{169, 170, 171}. Particularmente son severas pero con un riesgo en muerte cercano al 3%. En estos casos, el síntoma inicialmente observado suele ser la apnea y las convulsiones debidas a la hipoxia resultante de la apnea. Las convulsiones pueden durar de 15 a 60 segundos y en los menores de seis años de edad puede existir el riesgo de un paro respiratorio. Un rápido aumento en los leucocitos debe tomarse como índice para introducir al lactante en cuidados intensivos ^{19, 22, 335}. La HTP es consecuencia de un síndrome de hiperviscosidad y trombosis arteriolar que se produce por acción directa y liberación de toxinas de *B. pertussis* ^{10, 172, 173, 342}. Las terapias de soporte vital para la tos ferina grave se trata con óxido nítrico inhalado, inodiladores (miltriona), Vasodilatadores (Sildenafil) y oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) pero estas son poco efectivas ^{174, 175, 176, 343}. La mayoría de los casos de mortalidad

por *B. pertussis* ocurren en los menores de cinco años, especialmente mientras cursan su primer año de vida ³¹.

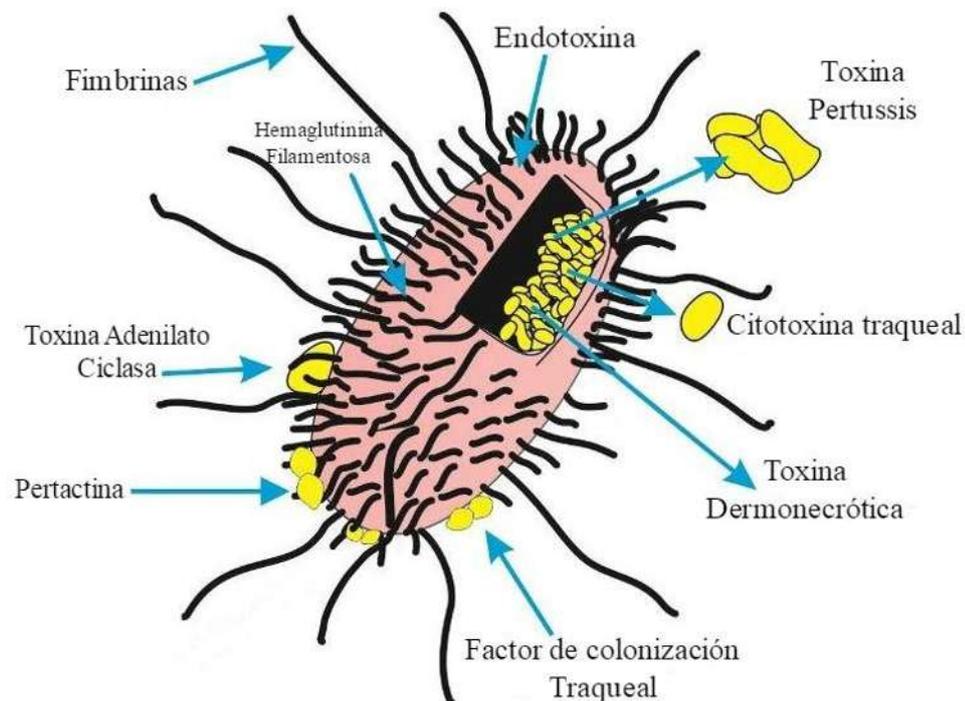
1.4.3. Tos Ferina Atípica

La tos ferina atípica o asintomática entre los contactos familiares es común ^{19, 37, 177, 178}, debiéndose al hecho de haber recibido dosis de vacunación en su infancia, por lo que la memoria inmunitaria que se queda en el paciente conduce a una enfermedad poco severa pudiendo ser confundida con otras causas de tos crónica como asma, sinusitis o goteo postnasal ^{179, 180, 181, 129}. Puede ser responsable de entre 12% y el 32% de la tos crónica en adultos ^{182, 269}.

1.5. Patogénesis

El proceso de infección de *B. pertussis* y la evolución de la enfermedad se encuentran regulados por la interacción de los factores de virulencia con los reguladores específicos del huésped (adhesión al epitelio), la evasión hacia los sistemas de defensa, el daño tisular y su lucha de persistencia dentro del paciente ^{19, 22, 37, 183}.

Figura 3. Factores de virulencia de *Bordetella pertussis*.



Tomado y modificado de: <http://fyeahmedlab.tumblr.com/post/18603035599/owltian-mia-bordetella-pertussis-the>

El proceso comienza con la adherencia de *B. pertussis* a las células ciliares del epitelio nasofaríngeo ^{78, 270}. Proceso implicados por sus diversos factores de virulencia como la Toxina pertussis (PT), la Hemaglutinina Filamentosa (FHA), Aglutinógenos (Fim), Pertactina (Prn), Endotoxina (LPS), Toxina Dermonecrótica (TD) y Citotoxina traqueal (TCT) quienes le permiten la unión específica a las células al epitelio para su posterior colonización (Imagen 3) ^{157, 182, 184, 185, 236, 359}. La expresión de estos factores se encuentra bajo el control de los genes de virulencia *Bvg*, el cual es un sistema de traducción de señales ¹⁸⁶.

Tabla 2. Factores de virulencia en especies del género *Bordetella*

FACTOR DE VIRULENCIA	ABREVIATURA	PESO MOLECULAR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	ESPECIES DEL GENERO PRODUCTORAS			
				<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. pertussis</i>	<i>B. avium</i>
Toxina pertussis	PT	115-117 kDa	Adhesión	-	-	+	-
Hemaglutinina filamentosa	FHA	220 kDa	Adhesión	+	+	+	-
Toxina dermonecrótica	TD	140 kDa	Lesiones necróticas	+	+	+	+
Toxina adenilato cilicosa	ACT	177 kDa	Colonización al pulmón	+	+	+	-
Aglutinógenos	Fim	.	Adhesión	+	+	+	+
Citotoxina traqueal	TCT	921 kDa	Cilioestasis	+	+	+	+
Hemolisina	HYL	-	-	+	+	+	-
Endotoxina	LPS	-	Toxicidad	+	+	+	+
Pertactina	Prn	69 kDa	Adhesión	+	+	+	+

Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

Casi todas las especies del género poseen estos factores (Tabla 2) y son inducibles bajo determinadas condiciones de temperatura, pH, concentración de sales e iones ^{72, 92, 187}. *B. pertussis* no requiere atravesar el epitelio nasofaríngeo para expresar su patogenicidad, ya que es capaz de multiplicarse en la superficie por la abundancia de las proteínas que produce con función adhesina por lo que no hay bacteriemia. En estudios realizados con cultivos celulares y con modelos animales, se sugiere a la FHA como la más potente e importante, pero en datos relativos de dos ensayos de eficacia de vacunas se cerciora que no es necesaria si existe la presencia de las otras moléculas adhesinas ^{12, 37}.

La etapa de evasión hacia las defensas se lleva a cabo por la PT y ACT ²³⁶. Donde en específico, la ACT inhibe las funciones fundamentales en las células del sistema inmune como la fagocitosis, es decir, entra a neutrófilos y cataliza la producción excesiva de AMPc que intoxica a las células de tal manera que la fagocitosis se ve comprometida ^{188, 188, 189}. La PT también suprime diferentes procesos asociados a neutrófilos y macrófagos, así como la migración de linfocitos a la zona de infección. Debido a este mecanismo patogénico se entiende la falta de la eficacia que presenta el tratamiento con antibiótico cuando es administrado tardíamente y por tanto, la variedad de las reacciones asociadas con estas toxinas que generan la imposibilidad por parte del sistema inmunológico de eliminar al microorganismo ^{136, 242}.

El daño tisular o ciliostasis está causado principalmente por la actividad de la TD y por la ACT ²⁷⁷. Estas proteínas generan la intoxicación de las células del epitelio respiratorio provocando la interrupción de funciones celulares esenciales. De misma manera se cree factible que las alteraciones tisulares del tracto respiratorio sean las responsables de la tos paroxística ^{12, 28, 190}. Se ha determinado que el daño del epitelio respiratorio junto con la ciliostasis y la acumulación de mucus dificultan la eliminación del patógeno. Postulándose además que *B. pertussis* puede persistir dentro del huésped especialmente después de la fase aguda de la enfermedad. El fenómeno de su invasión y sobrevivencia intracelular se propone como uno de los mecanismos de persistencia siendo capaz de invadir y sobrevivir dentro de los macrófagos, neutrófilos y células epiteliales respiratorias ^{37, 242}.

1.6. Diagnóstico de la Tos Ferina

El diagnóstico inicial de una posible tos ferina descansa sobre dos pilares. El primero, ante la sospecha clínica de infección, es decir, las manifestaciones que se desarrollan en forma lenta y que son características de la enfermedad; así como del aumento en leucocitos y linfocitos, los cuales, deben ser el principal motivo de sospecha de infección por *B. pertussis*; y el segundo, son los procedimientos correspondientes a seguir mediante el laboratorio para la búsqueda y confirmación de la bacteria en el paciente ^{12, 136}. Sin embargo, la inespecificidad que las manifestaciones clínicas en ocasiones presenta la enfermedad, hacen conveniente la realización de un diagnóstico diferencial del Síndrome coqueluchoide ⁷⁸.

Padecimiento de forma menos grave producido tanto por agentes virales como bacterianos. Entre los virus causantes más frecuentes pueden encontrarse: Adenovirus (ADV), V. Respiratorio Sincicial (VRS), V. Influenzae A y B, V. Parainfluenzae 1-4, Rinovirus, Citomegalovirus, V. Epstein-Barr; y entre los agentes bacterianos: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Pneumocystis carinii*, *Mycoplasma pneumoniae* (en preescolares y escolares) y *Chlamydia trachomatis* (en lactantes bajo dos meses de edad y neonatos)^{37, 144, 149, 161, 171, 217, 218, 231}. En particular, el diagnóstico de *B. pertussis* mediante laboratorio continúa presentando limitaciones^{5,149}. Esto, por el papel renuente que juega la bacteria, ya que tiende a desaparecer del paciente cuando los síntomas se encuentran de forma más específicos y frustrando los intentos por aislarla⁴⁹. Se estima que sólo del un al 36% de los casos se notifican del número real³⁶.

Tabla 3. Pruebas utilizadas para diagnóstico de tos ferina

PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	TIEMPO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Cultivo	12-60%	~ 100%	<2 semanas posterior al inicio de la tos	Muy específico (~ 100%) Útil en fase catarral	Aún estándar de oro Muy baja sensibilidad Poco útil en fase paroxística Resultados tardíos: 7-10 días
IDF	30-71%	variable	2-4 horas	Resultados rápidos En general buena especificidad	Poco estandarizado Requiere amplia experiencia Requiere microscopía de fluorescencia Reactividad cruzada
RT-PCR	70-99%	86-100%	<4 semanas posterior al inicio de la tos	Diagnóstico rápido 4-5 h Altamente sensible Altamente específico (usando multianodas) Muy útil en fase catarral y paroxística	No estandarizado entre laboratorios Depende del formato utilizado, así como los blancos genómicos Requiere equipo y personal capacitado Costo
Serología única (IgG)	36-76%	99%	>2 semanas	Útil en fases paroxísticas y sobre todo en convalecencia Útil posterior a uso de antibióticos Útil para demostrar estatus postvacunal	No estandarizado (en vías de estandarización) No se encuentra como parte de la definición de caso
Serología pareada (IgG)	90-92%	99%	Segunda muestra 4-6 semanas después de la inicial	Útil en fases paroxísticas y sobretodo en convalecencia Altamente sensible y específica Mejor evidencia de respuesta de inmune (método indirecto)	Diagnóstico tardío No estandarizado (en vías de estandarización) No se encuentra como parte de la definición de caso No diferencia entre respuesta a vacuna o por infección natural

Tomado y Modificado de: Andrade, AA, G. Martínez, y AC. Ranero. 2011. Aspectos genómicos de *Bordetella pertussis* y el camino hacia el nuevo estándar de oro en el diagnóstico de tos ferina. Rev Enf Inf Ped 24(96): 139-146.

En la actualidad, se han desarrollado una variedad de procedimientos empleados para su diagnóstico, pero que han presentado limitaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad (Tabla 3); agrupándose en dos categorías, encontrándose como métodos directos e indirectos^{139, 235, 241}. Los métodos directos, se basan en el aislamiento e identificación de *B. pertussis* mediante cultivo o en la detección de uno de sus componentes celulares mediante inmunofluorescencia directa o reacción en cadena de la polimerasa (Rt-q-PCR); y los indirectos, basados en la respuesta inmunitaria específica del paciente ante la infección mediante serología^{5, 12, 219, 330}. De los cuales, la Rt-q-PCR, el cultivo y la serología son los procedimientos avalados por la OMS para el diagnóstico de la tos ferina³³⁰.

Los criterios de elección para el procesamiento diagnóstico dependen de la evolución de la enfermedad, la edad y el estado inmunológico del paciente^{241, 355}, la OMS recomienda su empleo de la siguiente manera:

1. En menores de dos meses de edad, técnicas de cultivo y Rt-q-PCR.
2. En mayores de dos meses a 12 años, cultivo o Rt-q-PCR si no existe inmunización reciente.
3. En adultos, cultivo si la toma se realiza en fase catarral o inicio de fase paroxística. La serología y Rt-q-PCR se recomiendan en pacientes con fase tardía de la enfermedad.

1.6.1. Diagnóstico por Laboratorio

La clínica por laboratorio se establece en base a los síntomas desarrollados durante la infección. La NOM-017-SSA2-2012 para la vigilancia epidemiológica, la NOM-031-SSA2-1999 para atención a la salud del niño y la NOM-036-SSA2-2002 para prevención y control de enfermedades establecen como caso al individuo de una población en particular que, en un tiempo determinado, es sujeto de una enfermedad o evento bajo estudio o investigación. Y de acuerdo a la OMS, el tipo de caso frente a la tos ferina se establece de la siguiente manera^{220, 241, 250, 280, 326, 334, 373}:

Caso confirmado. Paciente con cuadro clínico de tos paroxística de más de dos semanas de duración, acompañada de las siguientes características: tos en

accesos, paroxística, espasmódica o con estridor laríngeo inspiratorio, tos cianosante, estridor inspiratorio o vómito posterior sin alguna otra causa aparente

Caso sospechoso. Paciente que cumple con los criterios de la definición clínica de caso, sin importar los días de duración y que se encuentre asociado con otros casos probables o confirmados. Se utiliza en la búsqueda activa de casos adicionales ante la presencia de casos probables, confirmados o atípicos, portadores, defunciones y brotes.

Caso probable. Paciente que cumple con los criterios de la definición clínica de caso y tiene dos o más de las siguientes características, tos paroxística, en accesos, espasmódica y/o estridor laríngeo inspiratorio y uno o más de los siguientes datos: cianosante, hemorragia (conjuntival, petequias, epistaxis) biometría hemática con leucocitos con predominio de linfocitosis o haber estado en contacto con casos similares en las últimas dos a cuatro semanas previas al inicio del padecimiento. Se incluyen a menores de tres meses que pueden presentar sólo episodios de apnea o cianosis con o sin tos.

Caso Compatible. Caso probable al cual no se le tomó muestra, no se conservó o se procesó en forma inadecuada con resultados consecuentemente negativos y no se le pudo demostrar la asociación epidemiológica con un caso confirmado.

Caso confirmado por anexo epidemiológico. Caso que cumple con los criterios de la definición clínica de caso y que está epidemiológicamente ligado a un caso confirmado por el laboratorio.

Caso confirmado por laboratorio. Caso probable confirmado por el laboratorio mediante cultivo, Rt-q-PCR y/o serología con un resultado positivo a *B. pertussis*.

Caso descartado por laboratorio. Caso probable al que se le tomó, se conservó y se procesó en forma adecuada una muestra para el diagnóstico por laboratorio y el resultado fue negativo en cultivo, Rt-q-PCR o serología.

Caso de tos ferina atípico. Caso sospechoso que tenga aislamiento de *B. pertussis*.

Portador. Persona sin signos o síntomas de enfermedad respiratoria a quien se tomó muestra por tener asociación epidemiológica con un caso probable o confirmado y cuyos resultados de cultivo o Rt-q-PCR son positivos a *B. pertussis*.

1.6.2. Toma de Muestra

Bordetella pertussis se adhiere a las células cilíndricas del epitelio nasal, por lo que preferentemente crece en la nasofaringe. Por otro lado, la microbiota que presenta la faringe es mayor y presenta más variedad que en las fosas nasales, por lo que las muestras tomadas en este sitio dificultan el éxito para su aislamiento ²⁵¹. La toma de muestras se realiza de acuerdo al Anexo II.

Los procedimientos para toma de muestra de la tos ferina lo constituyen el aspirado nasofaríngeo y/o el exudado nasofaríngeo ^{162, 236, 247}. Se recomienda que la muestra sea tomada durante la fase inicial de paciente o a inicios de su fase paroxística, favorablemente antes del inicio de un tratamiento antimicrobiano considerando que sea suspendido tres días antes de la toma de muestra. Se requiere de la toma del caso y de cinco de sus contactos para la búsqueda de *B. pertussis* ^{218, 250}.

Imagen 4. Toma de muestra, Exudado nasofaríngeo.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Laboratorio Estatal de Salud Pública. Michoacán, 2013.

Preferentemente se recomienda la toma de dos muestras de exudados nasofaríngeos para su procesamiento mediante técnicas de cultivo y Rt-q-PCR; y una muestra de suero para serología. No se recomienda utilizar los hisopos con punta de alginato de calcio para exudados nasofaríngeos para la detección basada en Rt-q-PCR, ya que se puede inhibir a *B. pertussis* y obtener resultados falsos

negativos (Tabla 4) ²⁸⁴. La toma de muestra de suero se recomienda que sea de 2-3 mL en pacientes menores de 5 años y de 5-6mL en adolescentes y adultos a partir de las dos semanas de iniciada la tos paroxística con un máximo de ocho semanas o en pacientes sin esquemas de vacunación aparente ^{16, 221, 222}.

Tabla 4. Material adecuado para toma de muestra de tos ferina.

CULTIVO	PCR
Alginato de calcio	Rayón
Rayón	
Dacrón	

Fuente: Lineamientos para la vigilancia de tos-ferina y síndrome coqueluchoide por laboratorio. 2013. DGE-InDRE-RNLSP. Pag. 20-21.

El aspirado nasofaríngeo (ANF), se recomienda en pacientes que se encuentran hospitalizados, en el cual, la aspiración debe hacerse a través de las fosas nasales por medio de una sonda estéril y colocarlo en un medio de transporte de Regan-Lowe. De ser posible, la muestra debe transportarse de forma inmediata al laboratorio para ser procesada. Este procedimiento debe ser empleado por un médico o personal altamente capacitado.

1.6.3. Transporte de Muestras

El transporte inmediato de la muestra al laboratorio puede aumentar el éxito en el aislamiento de *B. pertussis*. Para su diagnóstico, deben transportarse en red fría, en las condiciones y tiempos de transporte adecuados (Tabla 5).

Tabla 5. Envío de muestras para diagnóstico de tos ferina.

TIPO DE MUESTRA	MEDIO/CONTENEDOR/FORMA DE ENVÍO	TÉCNICA
Exudado nasofaríngeo	Tubos de 5.0 ml de medio de transporte Regan Lowe, en tiempo máximo 48-72 horas en red fría	Cultivo

Aspirado nasofaríngeo	Contenedor estéril, envió en tiempo máximo de 24 horas en red fría	Cultivo
Exudado nasofaríngeo	Medio de transporte de solución salina con cefalexina; 40 µg/ml, en tiempo máximo de 24 a 72 horas en red fría	PCR
Aspirado nasofaríngeo	Contenedor estéril en tiempo máximo de 24 horas en red fría	PCR
Suero	Tubo estéril con o sin gel separador, en tiempo máximo de 24 horas en red fría (si el tiempo es mayor, congelación de muestra)	Serología (ELISA para detección de Acs. Anti-toxina pertussis)
Cepas	Medio de AMIES en tiempo máximo de 48-72 horas en red fría	Cultivo y/o PCR

Tomado y modificado de: Lineamientos para la vigilancia de tos-ferina y síndrome coqueluchoide por laboratorio. 2014. DGE-IndRE-RNLSP. Pag. 20-21.

Imagen 5. Medio de transporte de Solución salina con Cefalexina (40 µg/ml)



Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Laboratorio Estatal de Salud Pública. Michoacán 2013.

Los medios empleados como transporte de *B. pertussis* lo constituyen el Regan-Lowe, medio de transporte empleado para procesamiento mediante técnica de cultivo y el medio de Solución Salina con Cefalexina para procesamiento mediante

Rt-q-PCR ^{16, 284}. El cual contiene 0.5 a 1 ml de solución salina estéril con Cefalexina a una concentración de 40 µg/ml a temperatura ambiente y debe ser enviado en un tiempo de 24 a 72 horas en red fría. Este medio de transporte se utiliza para casos y contactos (Imagen 5). El contenido de la Cefalexina favorece la conservación de *B. pertussis* inhibiendo a su vez a los microorganismos Gram positivos ^{16, 241}. Su preparación se realiza de acuerdo al Anexo III.

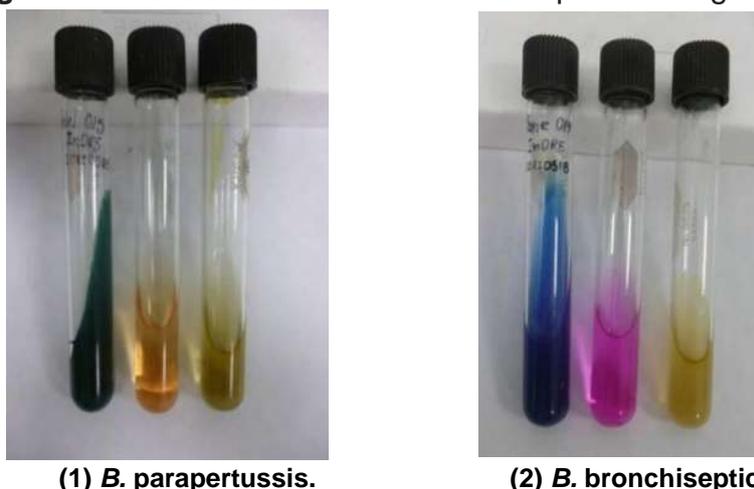
Las muestras deben ser enviadas al laboratorio con oficio de solicitud de estudio epidemiológico completo de caso de tos ferina y contactos intradomiciliarios o copia de Formato del Sistema Nacional de Salud de estudio epidemiológico de caso por tos ferina (Anexo I).

1.6.4. Cultivo

El aislamiento de *B. pertussis* mediante cultivo es aún considerado como el procedimiento de referencia o patrón de oro por la OMS para la confirmación de casos por tos ferina ^{5, 96, 149, 236, 241}. Requiere de un tiempo de tres a 7-15 días para un resultado definitivo. Es una prueba cuya especificidad llega a 100% y permite trabajar directamente con el agente bacteriano, pero el retraso en la obtención de muestra, las condiciones del medio de transporte y el tratamiento previo con antibióticos puede limitar su sensibilidad (a menos de 60%) ^{140, 182, 223, 330}; recomendándose el uso de la serología en estos casos ^{68, 178, 182}. Después de pasado cuatros días de la administración de antibióticos se puede detectar a *B. pertussis* sólo en un 56% de los pacientes, después de los siete días puede ser negativo por completo ²⁸³.

Se basa en la identificación de la bacteria a partir de su morfología macroscópica y microscópica mediante el aislamiento y pruebas de identificación como: Tinción Gram, prueba de oxidasa y catalasa; y pruebas de diferenciación de especie: desarrollo en medios agar Sangre, agar MacConkey, hidrólisis de urea, citrato y nitratos ^{136, 223} (Imagen 6). Su aislamiento primario es obtenido a partir de material nasofaríngeo o muestras de secreciones nasofaríngeas ¹⁸¹. Se recomienda la siembra de muestra de forma directa una vez que ha sido obtenida ¹³⁷.

Imagen 6. Pruebas de diferenciación de especies del género *Bordetella*



(1) *B. parapertussis*.

(2) *B. bronchiseptica*.

Fuente: Laboratorio de Bacteriología, Laboratorio Estatal de Salud Pública. Michoacán, 2013.

Se dispone de varios medios selectivos para las especies del género *Bordetella* (Tabla 6). Estos requieren de agregado de carbón, resinas de intercambio iónico o sangre al 15-20% para neutralizar ácidos grasos insaturados, peróxidos y metales pesados que pueden inhibir el desarrollo de la bacteria.

Tabla 6. Características de identificación de *Bordetella* sp.

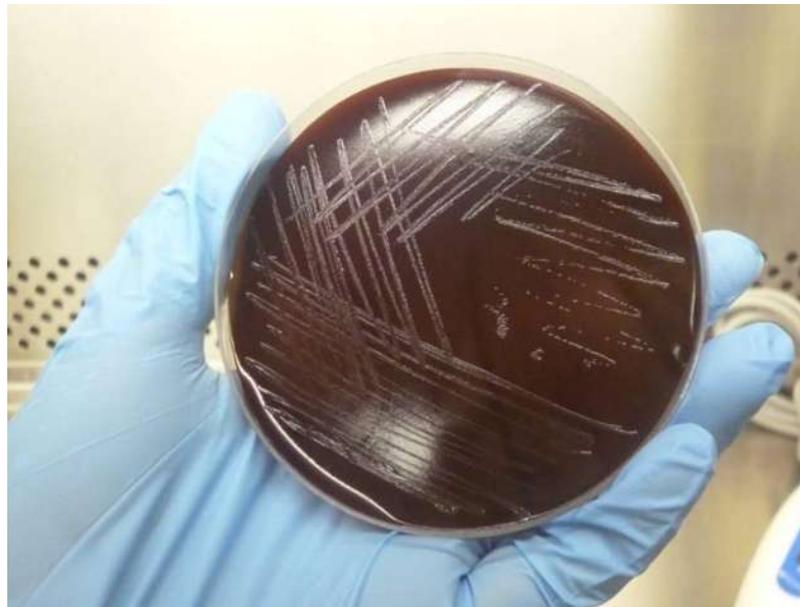
Prueba	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmessi</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>
catalasa	+	+	+	+	+	+
oxidasa	+	-	+	+	+	-
motilidad	-	-	+	+	+**	-
R. NO3	-	-	+	-	-	-
ureasa	-	+(24hrs)	+	-	-	-
citrato	-	+	+	-	+	ND
pigmento marrón*	-	+	+	+	+	+
Medios						
Regan-Lowe	3-6 días	1-3 días	1-2 días	2 días	2 días	2 días
Charcoal	4-7 días	1-3 días	1-2 días	2 días	2 días	2 días
Bordet-Gengou	3-6 días	1-3 días	1-2 días	2 días	2 días	2 días
Sangre	-	+	+	+	+	+
MacConkey	-	+	+	+	+	ND
Chocolate	-	1-3 días	1-2 días	2 días	2 días	2 días
Hemólisis	β -hemolisis	Ω -hemolisis	Ω -hemolisis	-	ND	ND

DN: sin determinar ; * En agar infusión de corazón con L-Tirosina (1g/L); ** Motilidad más prolongada a 25°C

Tomado y Modificado de: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Departamento de Bacteriología. Métodos de Laboratorio para el Aislamiento e Identificación de *B. pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. Pág. 31-36. México D.F. 2008. Salud, INDR.

El medio Regan-Lowe, elaborado a base de carbón activado, glicerol, peptonas y sangre de caballo desfibrinada al 10% y 0,04 g de cefalexina por litro, donde las colonias de *B. pertussis* aparecen como pequeñas, de color blanco grisáceo, con cúpula y brillantes generalmente dentro de 72 horas^{75, 140, 247}. El medio Charcoal, un eficiente sustituto de Bordet-Gengou donde las colonias de *B. pertussis* se desarrollan después de cuatro a siete días como pequeñas, convexas, redondas y de color blanco con una superficie brillante, similares a pequeñas gotas de mercurio que miden de 1 a 2 mm^{75, 224}.

Imagen 7. Cultivo axónico de *Bordetella pertussis*.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

El clásico Bordet-Gengou (gelosa sangre y papa glicerada) con antibióticos (metilina 2.5 µg/ml o penicilina 0.5 U/ml o cefalexina 40µm), que inhiben el crecimiento de la flora asociada⁶³; donde las colonias se desarrollan en forma lenta apareciendo a las 72 horas, pequeñas, lisas, convexas, brillantes casi transparentes y de color perlado con semejanzas a gotitas de mercurio o gotitas de rocío rodeadas por una zona de hemólisis no definida (Imagen 7). Para su incubación se requiere de colocar las placas en bolsas de plásticos o en cámara húmeda¹⁴⁰. El tiempo prolongado que requiere esta técnica para la obtención de una lectura definitiva, llevó al desarrollo de otros procedimientos para la detención de *B. pertussis* a partir del material nasofaríngeo^{34, 283}.

1.6.5. Inmunofluorescencia directa (IFD)

La IFD es una técnica rápida de diagnóstico presuntivo que permite visualizar las bacterias fluorescentes debido a la reacción de sus antígenos de pared con anticuerpos específicos (policlonales o monoclonales) ¹⁴⁰. Es una técnica que proporciona teóricamente, un diagnóstico inmediato, pero no obstante, es un procedimiento sugestivo con resultados variables con relación a su sensibilidad (52%) y especificidad (70%) ^{34, 137, 161, 223}. Es altamente operador-dependiente, donde se han descrito falsos positivos con *B. bronchiseptica*, *Haemophilus influenzae* y difteroides ^{142, 156, 235}. Requiere de un tiempo óptimo de dos semanas después del inicio de los síntomas. Su sensibilidad se correlaciona directamente con el número de células de *B. pertussis* en la muestra, además de depender considerablemente de la edad del paciente. El potencial de reactividad cruzada con la flora respiratoria también puede ser muy alto dando lugar a poca especificidad, por lo que, no se acepta como un método diagnóstico para tos ferina. Sin embargo, con un operador experimentado, es una técnica útil especialmente en los lactantes menores ²²³.

La muestra es un frote fijado por calor o por algún otro medio, que se cubre con los anticuerpos marcados y se incuba en atmósfera húmeda. Después de varios lavados se observa en un microscopio con fuente de luz ultravioleta. Una prueba positiva es la que muestra bacilos diminutos con fluorescencia verde ¹⁵⁷. El uso de anticuerpos monoclonales mejora la especificidad, pero no significativamente la sensibilidad ¹³⁶. En caso de optar por este procedimiento, no debe considerarse una alternativa al cultivo sino que debe ser empleado como complemento de éste ⁵.

1.6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Rt-q-PCR)

La Rt-q-PCR es la técnica con mejores resultados hasta ahora por la correlación clínica para descartar y confirmar casos probables. Es una prueba rápida, muy sensible y específica que ha sido de gran utilidad ante el diagnóstico de tos ferina por poseer las ventajas de distinguir entre las distintas especies del género *Bordetella* y ayudar en la toma de decisiones terapéuticas y preventivas ¹⁴³. Puede realizarse con las mismas muestras que las utilizadas para el cultivo ³⁵⁷. La especificidad de acuerdo a algunos autores es de 97.1-99.7% ^{5,164, 229}. Las muestras pueden ser tomadas cuatro semanas después de inicio de síntomas. Pero no

obstante, su rendimiento puede disminuir la sensibilidad después de 72 horas por varios factores como son la evolución de la enfermedad, el tratamiento previo con antibióticos y/o la administración de dosis de inmunización ^{36, 349}. Estos factores pueden generar falsos positivos si no hay estándares adecuados en la toma y procesamiento de la muestra por lo que es necesario establecer un riguroso control de calidad pero de alto coste ^{34, 141, 157, 235}.

Tabla 7. Algoritmo de PCR para identificación de especies de *Bordetella* spp.

ESPECIE	ptxS1	IS481	hIs1001 MULTIPLEX	pIS1001
<i>B. pertussis</i>	+	+	-	-
<i>B. parapertussis</i>	+	-	-	-
<i>B. holmesii</i>	-	+	+	-
<i>B. parapertussis</i> y <i>B. pertussis</i>	+	+	-	+
<i>B. pertussis</i> y <i>B.</i> <i>holmessi</i> *	+	+	+	-

Tomado y Modificado de: Diagnóstico de tos ferina mediante PCR en tiempo real multiplex. Presentación Power point. SiNAVE et al 2012.

Las muestras recomendadas para el procesamiento mediante Rt-q-PCR son el exudado y/o aspirado nasofaríngeo ^{284, 287}. El tiempo de transporte de la muestra no debe exceder de tres días. Respecto a las zonas ADN blanco que se utilizan para la amplificación, se emplean diferentes oligonucleótidos derivando cuatro regiones cromosómicas del genoma de *B. pertussis*, las más utilizadas son: una secuencia de inserción altamente repetida ISI 481 para *B. pertussis* y *B. holmesii*; una secuencia de la región promotora de la toxina pertusis; el gen de la adenilato ciclasa y parte del gen de una porina (Tabla 7) ^{68, 156, 225, 241}. Aunque no es específico para la *Bordetella pertussis* ^{104, 108}. Para *B. parapertussis* se utiliza la inserción IS1001 ^{226, 227, 228}. Las muestras se procesan de acuerdo al algoritmo del Anexo XII.

1.6.7. Serología

Los métodos serológicos son los procedimientos más antiguos utilizados para precisar la infección por *Bordetella pertussis*. Se basan en la medición por incremento en la concentración de anticuerpos IgA, IgG e IgM contra antígenos específicos como la PT, FHA, Prn, Fim tipo 2 y 3, ATC y de ciertas porinas y chaperoninas. De éstos, la PT es el más empleado hasta ahora por ser el específico de *B. pertussis* y por ser considerado como marcador serológico de la enfermedad 164, 297, 305.

Imagen 8. Serología de aglutinación en microplaca en “U”.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

Inicialmente fueron diseñados para evaluación de anticuerpos contra componentes de la vacunas, pero en la actualidad, han sido de gran utilidad para confirmar el diagnóstico de tos ferina, especialmente en resultados en los que tanto Rt-q-PCR y cultivo no se encuentran claros. Otra ventaja, es que no se afecta por determinantes como el tratamiento previo e incluso resultado útil si el paciente ha recibido inmunización reciente (un año previamente) ³⁰⁶. Existen variedad de métodos como son: inmunoblot, microaglutinación, aglutinación (Imagen 8), inmunofluorescencia directa y enzimoimmunoanálisis en fase sólida (ELISA), siendo este último el más aceptable hasta ahora por considerarse más sensible que el cultivo y por tener una mejor estandarización ^{78, 295, 333}. Sin embargo, el empleo e interpretación de estas técnicas debe ser de manera cautelosa y siempre respaldada por el estudio epidemiológico del paciente ya que su rendimiento puede variar dependiendo del

antígeno a emplear, la clase de inmunoglobulina a investigar y/o las dosis de vacuna. Uno de los inconvenientes son la dificultad que se presenta en los resultados al ser comparados en diferentes ensayos aún si se ha empleado el mismo antígeno ^{5, 317}.

Los anticuerpos IgG son los medidos más frecuentemente y su presencia a niveles altos en el suero son indicados como infección entre los pacientes no vacunados ^{8, 297, 306}. Éstos, se encuentran dirigidos fundamentalmente hacia a la PT y HAF. Mientras que al administrarse la vacuna celular, la actividad es dirigida hacia a la Fim y proteínas de membrana externa ³¹⁷. Para el diagnóstico serológico de la infección natural se recomienda el uso como antígenos de TP y HAF. Los IgG-TP e IgG-FHA son detectables después de la infección natural y estos tienden a desaparecer aproximadamente en 5 años ³⁸⁶. Su detección es muy sensible en pacientes con enfermedad clásica, en cuadros menos característicos con dosis de vacunación resulta menos útil ³¹⁶. Los anticuerpos dirigidos a TP son específicos para *B. pertussis* mientras que la IgG-HAF, IgG-Prn, IgG-Fim, y IgG-ACT son menos específicas debido a la reactividad cruzada con otros antígenos microbianos como otras especies de *Bordetella*, especies de *Haemophilus*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Escherichia coli* ^{11, 295}. Sin embargo los IgG-Fim 2 y 3 pueden ser de gran utilidad entre los pacientes adultos ³¹¹. Los anticuerpos de la clase IgA van dirigidos para los diferentes antígenos de *B. pertussis* y raramente aparecen tras la vacunación, es por ello que se les ha empleado como indicadores de infección ^{11, 317}. Su utilidad es mayor en niños mayores y adultos; en los lactantes es posible no ser detectada principalmente por su inmadurez inmunológica ²²³. La detección de IgM carece de una adecuada especificidad y su empleo como elemento de diagnóstico debe ser revisado ³²⁰.

La confirmación utilizada tradicionalmente de la serología se lleva a cabo mediante una seroconversión clara ^{5, 311, 313}; sin embargo, su empleo se ve detenido por la dificultad que se presenta para obtener una segunda muestra de suero una vez que se ha conseguido la resolución clínica tras el tratamiento específico. Además de considerarse que en una segunda muestra el título de anticuerpos presentes impiden realizar una seroconversión ⁵.

1.7. Tratamiento contra *Bordetella pertussis*

El tratamiento previo contra la tos ferina lo constituye la administración de antibióticos. Entre los neonatos menores de seis meses se sugiere la internación hospitalaria al padecer la infección, ya que son los pacientes más vulnerables a sufrir desnutrición por los frecuentes vómitos en un ataque de tos y por el aumento en el riesgo de sufrir complicaciones ¹⁹.

El consenso de antibióticos frente a la tos ferina lo constituyen los macrólidos (Tabla 8) ^{164, 232, 240, 355}. Su principal efecto es el de acortar la gravedad de los síntomas durante la fase catarral y la paroxística inicial, donde pueden reducir la intensidad y duración de la sintomatología y la contagiosidad ^{231, 335}. Es conocido que la tasa de contagio durante la fase paroxística es mayor y que los antibióticos tienen un menor impacto sobre su evolución clínica durante esta fase, sin embargo pueden limitar su propagación si se inician en un transcurso de 21 días a partir del desarrollo de su presentación ^{28, 136, 349}.

Desde el pasado la droga antimicrobiana de elección para el tratamiento para tos ferina ha sido la eritromicina ^{13,180, 253}, empleado en forma de estolato (40mg/kg/día) o etilsuccinato (50-60mg/kg/día) ^{254, 279, 361}. Considerado como antibiótico de primera opción clásicamente por su bajo costo ¹⁶⁴. Siendo eficaz para contrarrestar a la bacteria disminuyendo la gravedad y duración del padecimiento, sin embargo, se articula, puede encontrarse acompañado de efectos secundarios molestos como son hipertrofia pilórica, arritmias cardíacas y estenosis hipertrófica de píloro (cuando se emplea en menores de un mes de vida) ^{34, 255, 256, 257, 258}.

Tabla 8. Macrólidos empleados en el tratamiento de la tos ferina.

	ERITROMICINA	CLARITROMICINA	AZITROMICINA	COTRIMOXAZOL	TRIMETROPIM-SULFAMETOXAZOL
< 1 mes	Uso discutible*	No recomendable (no datos)	10 mg/kg/24 hs, 5 días (datos limitados)	Contraindicado en menores de 2 meses	No recomendada en <2 meses
1 a 5 meses	40- 50 mg/kg/d cada 6 hs, 14 días	15 mg/kg/d, cada 12 hs, 7 días (datos limitados)	10 mg/kg/hs, 5 días (datos limitados)	> 2 meses: 8-40 mg/kg/día, en 2 dosis, 14 días	4/20mg/kg/d 7 días

6 meses a 14 años	40-50 mg/kg/d, cada 6 hs (máx. 2 gr/día) 14 días	15 mg/kg/d, cada 12 hs (máx.: 1 gr/día), 7 días	1er día: 10mg/kg (máx.: 500 mg/día) 2°-5° día: 5 mg/kg/d (máx.:250 mg/día)	8-40 mg/kg/día, en 2 dosis, 14 días	4/20mg/kg/d (máx.: 250mg/d) cada 6 hs (máx.: 1g/d) 7 días
Adultos	500 mg/6hs, 14 días	500 mg/12hs, 7 días	1er día: 500 mg 2°-5° día: 250 mg/día	160-800 mg/12 horas, 14 días	160/800 mg 7días

* Uso discutible dado que han descrito casos de estenosis hipertrófica de píloro relacionados con su empleo a esta edad.

Fuente y modificación de: Recomendaciones de los Centers for Disease Control and Prevention [CDC] 2005.

Los efectos secundarios ocasionados por la eritromicina, llevo a la implementación de macrólidos más nuevos como la azitromicina y la claritromicina, los cuales, impulsaron a su utilización ante la sospecha clínica por *B. pertussis* ya que presentaban ser igual de eficaces con una menor duración en su tratamiento y menos efectos secundarios gastrointestinales que la eritromicina ^{15, 159, 73, 259, 260}. Cualquier de los tres macrólidos son empleados a partir del mes de vida; aunque, existen datos más limitados sobre la azitromicina ^{231, 258}.

En estudios no comparativos abiertos, se ha utilizado a los macrólidos de azitromicina y claritromicina como tratamiento para infección por *B. pertussis* y elimina con éxito al microorganismo del aparato respiratorio, sin embargo el equilibrio en base a la experiencia clínica sugieren la obtención de los mismos resultados con la eritromicina ^{160, 238, 261}.

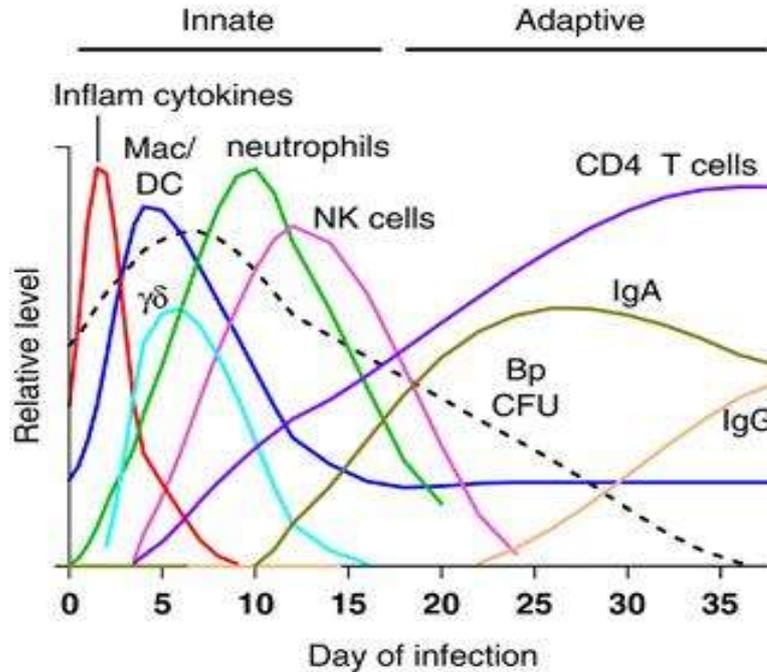
La Trimetoprim-sulfametoxazol es una alternativa cuando existe la presencia de alergia o intolerancia a alguno de los macrólidos que por lo regular son casos muy raros. Se emplea principalmente en mayores de dos meses de vida, encontrándose contraindicada en los menores o puede emplearse en neonatos sin presencia de ictericia ^{14, 144, 262}. Considerada como alternativa en el tratamiento de infección en adolescentes y adultos ²⁴⁶.

Cabe mencionar que al final, el médico tratante es quien decide el manejo del paciente, y debe cuidar siempre no inducir en medida de lo posible la resistencia a los antibióticos.

1.8. Inmunidad por *Bordetella pertussis*

El desarrollo de la inmunidad contra *B. pertussis* se comprende a partir del reconocimiento de los componentes bacterianos por las células del sistema de inmunidad innata y la adquirida a través de la producción de mediadores solubles y mediante el reclutamiento y activación de moléculas y células efectoras ^{19, 268} (Figura 4).

Figura 4. Desarrollo de inmunidad contra *Bordetella pertussis*.



Fuente: Higgs, R, SC. Higgins, PJ. Ross and KHG. Mills. 2012. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosa Immunology* doi: 10.1038.

Cuando *B. pertussis* se adhiere a las células del epitelio nasofaríngeo es reconocida y capturada por células del sistema inmune innato como los macrófagos (MØ), las células dendríticas (DC), las células *natural killer* (NK), o células T *naive* (NT) ^{188, 268, 289}. Las DC procesan los antígenos bacterianos y los presentan a los linfocitos T. Una vez ocurrido el reconocimiento antigénico, los MØ, DC y NT producen las interleucinas IL-12 e IL-18 que desencadenan una respuesta de células T subtipo Th1 que median la liquidación de la bacteria en el tracto respiratorio ^{281, 286, 288, 294}. Las citoquinas proinflamatorias, IL-1 y TNF- α , y el óxido nítrico (NO) producidos por MØ inducidos por las toxinas bacterianas, colaboran en el reclutamiento de fagocitos profesionales ^{239, 290}.

Por otro lado, el interferón gamma (IFN- γ) secretado en la fase temprana de la infección por las células NK y NT, y luego por las células Th1, causaría el reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos. Asimismo el IFN- γ actuaría sobre los linfocitos B estimulándolos a secretar anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento ^{291, 377}. Las bacterias opsonizadas podrían ser fagocitadas por neutrófilos y eliminadas por NO o intermediarios reactivos del oxígeno. Por su parte, los anticuerpos anti-*B. pertussis* cumplen acciones esenciales en la protección contra esta infección. Anticuerpos contra ciertos antígenos de *B. pertussis* presentan la capacidad de evitar la adhesión a las células epiteliales a través del bloqueo de adhesinas, neutralizar toxinas bacterianas como también promover la opsonofagocitosis ²⁶⁴.

Los recién nacidos adquieren los anticuerpos maternos, los cuales son transferidos a través de la placenta materna ²⁹². Se han detectado anticuerpos IgG frente a la FHA, PT y Fim 2 y 3 en el suero del cordón umbilical y en sueros de niños antes de recibir la primera dosis de inmunización ^{296, 298}. No se ha demostrado protección materna en lactantes por lo que no parece que estén protegidos frente a la tos ferina durante sus primeros años de vida, aun si se produce una transferencia placentaria de anticuerpos ^{235, 264}. Sin embargo, estudios epidemiológicos extensos han demostrado que la lactancia materna es eficiente para reducir las tasas de mortalidad infantil ^{292, 296}. Se sabe que la enfermedad no produce una inmunidad permanente por la existencia de infección en adultos vacunados o que tuvieron la enfermedad en su infancia¹²⁹.

1.9. Vacunas contra la Tos Ferina

Antes de la introducción de las vacunas contra las tos ferina en el mundo, se consideraba a *B. pertussis* como una de las principales causantes de muerte entre los menores de cinco años por la facilidad con la que contraían la enfermedad antes de iniciar su estancia escolar ²⁹⁹. La primera vacuna desarrollada frente a la tos ferina apareció en 1914, la cual contenía a la bacteria de forma entera e inactivada por calor y se puso a disposición 30 años más tarde en combinación de los antígenos contra difteria y tétanos (DPT) ^{220, 293, 327}. Pero la presencia de reacciones adversas acompañas de dolor y fiebre hasta complicaciones tales como

encefalopatía e incluso la muerte entre los menores (1 de cada 310,000 vacunados) llevo a la búsqueda de nuevas y más puras vacunas^{19, 264}. Aunque ningún estudio científico ha confirmado el vínculo entre las vacunas de células enteras y la encefalopatía³⁶⁹. El resultado, fue la aparición de las vacunas acelulares, la cual se inició su utilización en Japón y más tarde hacia los países industrializados^{220, 303, 381}.

En todos los países de América, existen dos tipos de vacunas: Vacunas de células enteras (wP) y vacunas acelulares (aP)^{8, 302, 377, 389}. En México, se sigue empleando la vacuna acelular, la cual se administra en conjunto con los toxoides tetánico y diftérico (DTPa) y con el polisacárido de *Haemophilus influenzae* serotipo b (DTPa + VIP+ Hib)³⁸². De acuerdo al Calendario Nacional de Vacunación esta clase de vacunas se aplica en cinco dosis administradas a los dos, cuatro, seis, 18 meses, cuatro y seis años de edad^{325, 388}. La eficacia de estas vacunas se correlaciona con el número de dosis que se administre: aproximadamente 18% para una única dosis, 48% para dos dosis, 58% para tres dosis y 78% para cuatro o más dosis. Considerando que todos los menores incluyendo los que son VIH-positivos, deben aplicarse la vacunación³⁶⁸.

La inmunidad proporcionada después de la vacunación disminuye con el tiempo^{162, 220}. En el caso de las vacunas celulares, su inmunidad tiende a disminuir después de los tres a cinco años¹²⁹. Mientras que el de las vacunas acelulares, la inmunidad adquirida declinaría después de cuatro a cinco años, lo que argumenta, que aportarían a la facilidad con la que los adolescentes y adultos adquieran la enfermedad nuevamente y a su vez complicando el problema, ya que actúan como portadores y vías de infección hacia los lactantes aun vacunados¹⁹.

1.9.1. Vacuna Antitosferina de células enteras

Contienen *B. pertussis* inactivada por formol^{18, 381} en una cantidad que se oscila entre 15 y 20 millones de bacilos diminutos^{136, 220, 368}. Su inmunogenicidad es superior al 80% tras la aplicación de la primera dosis, pero la duración de su inmunidad es muy variable ya que comienzan a descender los anticuerpos después de dos años de la primera aplicación y de siete a 12 años después de la cuarta aplicación. La protección desaparece en un 50% de los vacunados. Su indicación es

para todos los niños a partir de los dos meses de vida. Se administran tres dosis a los dos, cuatro y seis meses y una cuarta dosis de refuerzo a los 12 meses de la tercera y una quinta dosis entre los tres y seis años. La dosis estándar es de 0,5 mililitros ⁸.

1.9.2. Vacuna Antitosferínica acelular

En la actualidad, se disponen de varias vacunas que combinan antígenos purificados con los toxoides tetánico y diftérico (DTPa = Difteria + Tétanos + Pertussis acelular). Todas contienen uno o varios antígenos de la toxina pertussis (TP), la pertactina (Prn), la hemaglutinina filamentosa (FHA) y a las Fimbrinas (Fim) tipo 2 y 3 ^{19, 220 381}; según el antígeno de *B. pertussis* que se incluya, estas preparaciones pueden ser: monovalentes (contiene solo PT detoxificada; dPT), bivalentes (dPT y FHA), trivalentes (dPT, FHA y Prn), tetravalentes (dPT, FHA, Prn y Fim) y pentavalentes (dPT, FHA, Prn, Fim2 y Fim3) ^{34, 299}. Las distintas vacunas acelulares están combinadas con la vacuna de la difteria y tétanos (DTP) y a su vez, pueden estar combinadas con la vacuna contra *H. influenzae* (Hib) (tetravalentes); con Hib y vacuna de polio inactivada VPI (pentavalente); y con Hib, VPI y vacuna antihepatitis B (HB) (hexavalentes) ^{325, 377}.

Su inmunogenicidad es similar a la producida por las de células enteras. Sugiriéndose que su eficacia es de alrededor del 85-95% ^{19, 301} Después de 10 años de la última dosis de vacuna el paciente suele ser muy susceptible.

1.9.3. Vacuna Antitosferínica acelular de baja carga antigénica

Recientemente se han comenzado a utilizar preparaciones acelulares de refuerzo que presentan en su formación cantidades menores de antígeno pertussis y toxoide diftérico a partir del 2005 ³⁸⁷. Esta vacuna se aplica exclusivamente en adolescentes y/o adultos, en los cuales se cree, que se logrará disminuir la incidencia de la enfermedad y el riesgo de contagio hacia los menores no vacunados ²²⁰. Su respuesta inmune es similar a los niveles obtenidos con las vacunas de difteria y tétanos de adulto (dT).

2.0. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de *Bordetella pertussis* en Michoacán actualmente es un problema que no se ha resuelto, pudiendo tener diferentes causas que de no ser corregidas derivaran en casos sin diagnóstico, pacientes con complicaciones y posiblemente defunciones. Por lo que realizar una evaluación del diagnóstico es oportuno y necesario a fin de detectar los casos, confirmar los sospechosos y tener un seguimiento epidemiológico de la Tosferina por Laboratorio con resultados robustos que permitan un margen de confiabilidad amplio en el estado. Por lo anterior se plantean lo siguiente:

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la situación del diagnóstico de *Bordetella pertussis* por laboratorio en Michoacán durante el periodo del 2009 al 2012.

3.2. Objetivos Específicos

- Analizar la calidad de las muestras y los datos del estudio epidemiológico de pacientes con diagnóstico de tos ferina.
- Detectar la presencia de *B. pertussis* mediante cultivo, Rt-q-PCR y serología de pacientes con diagnóstico de Síndrome coqueluchoide.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de la opinión clínica, cultivo y serología; frente a la Rt-q-PCR como estándar de oro.

4.0. HIPÓTESIS

El diagnóstico de *Bordetella pertussis* por laboratorio en Michoacán es un problema no resuelto.

5.0. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo observacional, retrospectivo y experimental. Durante el periodo del 2009 al 2012, se recibieron un total de 635 muestras con diagnóstico de Síndrome coqueluchoide, de los cuales, el 71% (453) de las muestras pertenecieron a contactos y el 29% (182) de las muestras a casos. Con respecto a los 182 casos de Síndrome coqueluchoide, 61 casos presentaban la clínica para tos ferina clásica, de los cuales para el estudio, se procesaron 31 casos y un contacto mediante cultivo (31 exudados nasofaríngeos), Rt-q-PCR (14 exudados nasofaríngeos en solución salina con cefalexina (40 µg/ml)) y serología (29 sueros).

Se consideró como criterios de inclusión a los pacientes que cumplieron inicialmente con la definición de caso de acuerdo la NOM-017-SSA2-2012 para la vigilancia epidemiológica, la NOM-031-SSA2-1999 para la atención a la salud del niño, la NOM-036-SSA2-2002 para prevención y control de enfermedades, aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano ^{271, 272, 274} y de acuerdo a la definición operacional de caso para tos ferina por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ^{250, 373}, siguiendo los criterios de los lineamientos para el procesamiento de las muestras por Laboratorio emitidos por el InDRE en donde se sugiere que las muestras sean exudados nasofaríngeos en medios de transporte de solución salina con cefalexina (40 µg/ml) y muestras de suero no lipémicos ni hemolíticos con dos a tres mililitros de muestra acompañado por estudio epidemiológico del caso. Como criterios de exclusión se consideró a las muestras que no cumplían con la definición operacional de caso, que rebasaron el tiempo de 72 horas para procesamiento, muestras de suero con cantidad menor a dos mililitros y muestras de casos con estudio epidemiológico incompleto o ausencia del mismo.

5.1. Estudio estadístico

Para el análisis estadístico se recopiló la información disponible de los 182 casos y de sus respectivos contactos (453) remitidos al programa de Síndrome coqueluchoide a partir del estudio epidemiológico para determinar el estatus del paciente, los antecedentes de lactancia materna y la duración de los síntomas durante la infección. Se realizó distribución de los datos obtenidos mediante variables dependientes en cuanto a género, edad, caso o contacto, fecha de toma

de la muestra, fecha de recepción de muestra, procedencia, diagnóstico inicial, tipo de muestra recibida, estado de inmunización y tratamiento antimicrobiano previo. De los 182 casos de Síndrome coqueluchoide, se realizó una segunda distribución en cuanto a casos para tos ferina (61 casos) para establecer en caso probable, caso sospechoso y caso confirmado ^{274, 250}. El análisis estadístico se realizó mediante la utilización del programa Microsoft Office Excel 2007 registrando los porcentajes obtenidos mediante gráficos.

El universo muestral del estudio, fue de tipo observacional para el procesamiento de muestras mediante las técnicas de cultivo, serología y posterior procesamiento y confirmación mediante Rt-q-PCR en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de México (InDRE).

5.2. Clínica

Se recopiló la información disponible de los casos positivos mediante opinión clínica para tos ferina en base al censo nominal del Laboratorio de Bacteriología, del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán.

5.3. Cultivo

De los 182 casos remitidos por las Jurisdicciones, hospitales y centros de salud del estado, se procesaron por cultivo 31 muestras de exudados nasofaríngeos (ExNF) de casos mediante cultivo de Agar Chocolate y Agar Sangre para diagnóstico diferencial del Síndrome coqueluchoide, buscando bacterias como *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae* y mediante medio selectivo de Bordet-Gengou para aislamiento de *Bordetella pertussis*. Todas las muestras de ExNF fueron procesadas en campana de Bioseguridad tipo II.

La siembra en Bordet-Gengou fue mediante la técnica de estrías cruzadas por agotamiento para favorecer el desarrollo de colonias sugestivas de *B. pertussis*. Se rotularon con el respectivo número de la bitácora de tos ferina, nombre de programa, fecha de procesamiento y posteriormente, fueron colocadas en bolsas herméticas para conservación de un ambiente húmedo y llevadas a incubación de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 horas; revisando las placas cada 24 horas, buscando colonias grisáceas

pequeñas con aspecto perlado o semejantes a gotitas de mercurio ⁵ con un Estéreo microscopio Carl-Zeiss (Stemi: DV4) a 32x. Al no observarse el desarrollo de colonias sugestivas se llevaron a re incubación hasta completar 96 horas. A los cultivos con presencia de colonias afines a *B. pertussis*, se les realizó reaislamientos para su recuperación y Tinción Gram para identificación morfológica de la bacteria. La observación de bacilos diminutos gram negativos permitió la realización de pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, Agar Urea, Agar Citrato, Caldo Nitratos, desarrollo en medios de cultivo de Agar MacConkey y Agar Mueller-Hinton para determinar y diferenciar entre *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. pertussis*.

Los aislamientos de *B. pertussis*, fueron enviados al InDRE para confirmación. Los cultivos sin desarrollo de colonias sospechosas al cabo de 96 horas fueron reportados con resultado negativo a *B. pertussis*. Así mismo, fueron enviadas las muestras de ExNF con tiempo de 24-72 horas al InDRE mediante el sistema básico de triple embalaje y en refrigeración para procesamiento y confirmación mediante Rt-q-PCR.

Como control positivo de *B. pertussis*, se utilizaron cepas de referencia donadas por el InDRE pertenecientes a especies de *B. pertussis* (ATCC 8467), *B. parapertussis* (trazable BpA) y *B. bronchiseptica* (Bbrch 10580). El procesamiento de las cepas fue mediante el mismo procedimiento empleado para las muestras procedentes de los casos, preservando la cepa a las 96 horas.

5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Rt-q-PCR)

De 30 muestras de casos y un contacto recibidas de ExNF en medios de transporte de solución salina con cefalexina a una concentración de 40 µg/ml, se enviaron 14 muestras al InDRE. Muestras que cumplieron con el criterio de aceptación (no mayor a 10 días posteriores al inicio de los síntomas), con cuadro sugestivo de tos ferina y con estudio epidemiológico completo, para procesamiento y confirmación de *Bordetella pertussis* mediante técnica de biología molecular (Rt-q-PCR).

5.5. Serología.

Inicialmente se elaboró el antígeno a partir de un cultivo puro de *B. pertussis* (ATCC 8467) mediante la técnica de preparación de antígeno “O” (somático) bacteriano ²²⁸. Seguido por la inoculación de conejos para obtención de antisuero anti-*B. pertussis*, procedimiento que se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) durante el 2013.

Se procesaron 28 sueros de casos y un suero de un contacto, además de una muestra control del antisuero anti-*Bordetella pertussis* mediante la técnica de aglutinación de anticuerpos en microplaca de Manclark ²²⁷. Muestras de suero no lipémicos ni hemolíticos, sin inmunización y con cantidad de dos a tres mililitros de suero para el estudio. Siendo las primeras muestras tomadas al paciente y recibidas en el programa, ya que es difícil obtener una segunda muestra dado comúnmente a que los pacientes no son llevados a las unidades por su segunda toma de muestra.

5.5.1. Aglutinación de anticuerpos mediante Técnica de Manclark

Se procesaron las 29 muestras de suero y la muestra control mediante microplaca con pozos de fondo en “U”, de Manclark ⁴⁹. Se incluyeron muestras cuya inmunización de los pacientes no fue informada o se desconocía y una muestra de caso con esquema de inmunización completo para determinar el comportamiento de los reactivos aglutinantes (Caso 27). El procedimiento fue en campana de Bioseguridad tipo II. Cuyo procesamiento fue el siguiente:

1. Se agregaron 50 µl de solución salina al 0.85% del pozo dos al 10 en microplaca.
2. Se agregaron al pozo uno, 100 µl de suero problema.
3. Del pozo uno, se tomaron 50 µl del suero problema y se pasaron al pozo dos realizándose tres lavados, así sucesivamente hasta el pozo 10.
4. En pozo 10, se tomaron 50 µl y se desechó.
5. Se colocaron de pozo uno al 10, 50 µl de antígeno preparado de *B. pertussis*.
6. Al pozo 11, se agregaron 50 µl de solución salina + 50 µl antígeno (Control Negativo).

7. Al pozo 12, se agregaron 50 µl de suero de referencia + 50 µl de antígeno (Control Positivo).
8. Se selló la placa con cinta adherente transparente,
9. Se rotuló con fecha y clave de bitácora e Incubó a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas.
10. Al cumplimiento de 24 horas se revisó la formación de reacción de antígeno-anticuerpo mediante la formación de malla y se llevó nuevamente a incubación hasta cumplimiento de 48 horas.
11. Al terminó de 48 horas, se dejaron la placas dos horas en refrigeración,
12. Se leyeron, buscando formación de malla en la superficie del pozo y se reportaron lecturas de aglutinación.

Se consideró como positivo al pozo con formación de malla por reacción del antígeno con títulos $>1:16$, y como negativo la formación de botón en el fondo de la microplaca con títulos $<1:16$ ^{227, 228}.

5.6. Análisis de Sensibilidad y Especificidad

El análisis se realizó de las 31 muestras procesadas mediante cultivo, las 14 por Rt-q-PCR y las 29 por serología mediante la aplicación de la tabla 2x2 para el diagnóstico epidemiológico para determinar sensibilidad y especificidad de las técnicas (Figura 5) ^{307, 385}. Para la obtención de la sensibilidad, se determinaron como verdaderos positivos a los casos confirmados con un resultado positivo para *Bordetella pertussis*. Para su especificidad, se determinó como verdaderos negativos a los casos confirmados como negativos mediante Rt-q-PCR.

Figura 5. Tabla de contingencia para evaluar pruebas diagnósticas.

Prueba diagnóstica	Estándar de oro		Total
	Positivo	Negativo	
Positiva	(a)	(b)	(a+b)
Negativa	(c)	(d)	(c+d)
Total	(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

Sensibilidad = $a/(a+c)$ VPP = $a/(a+b)$
 Especificidad = $d/(b+d)$ VPN = $d/(c+d)$
 Exactitud = $(a+d)/(a+b+c+d)$

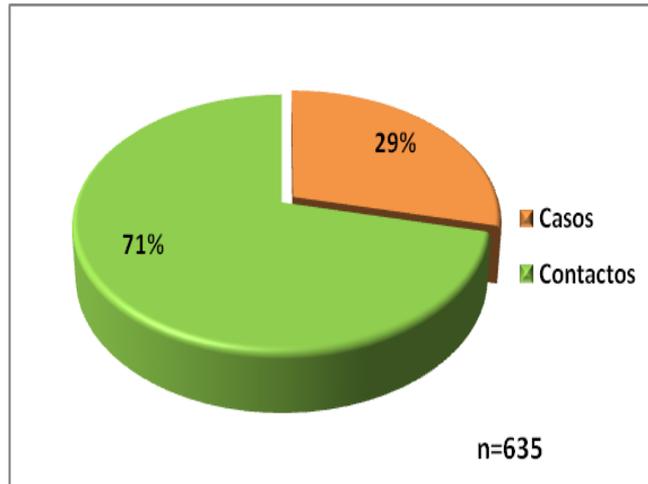
Tomado de: Álvarez, HE, y E. Pérez. 2009. Utilidad Clínica de la tabla 2x2. Rev. Eviden Invest Clin 2(1):22-27.

6.0. RESULTADOS

6.1. Universo de muestra

Durante el periodo del 2009 al 2012, se recibieron un total de 635 muestras de pacientes con un diagnóstico inicial de Síndrome coqueluchoide, perteneciendo el 71% (453) a los contactos y el 29% (182) casos (Gráfica 3).

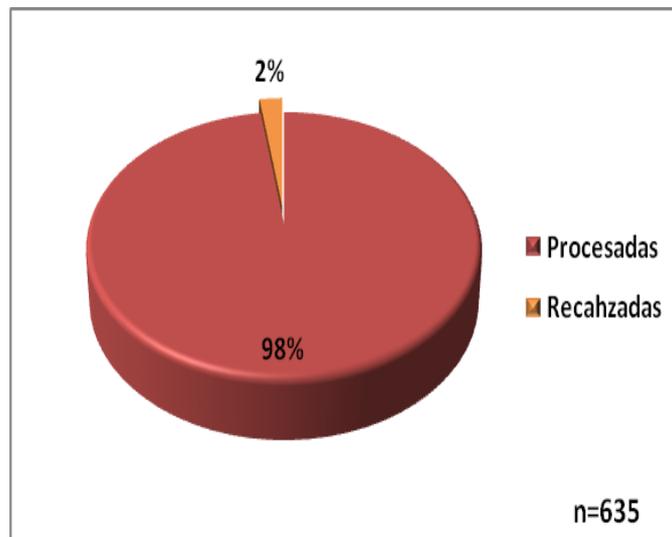
Gráfica 3. Casos y contactos para Síndrome coqueluchoide, 2009-2012.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

Periodo durante el cual, se mostró el 2% (14 muestras) de rechazó por incumplimiento en el tipo de muestra y/o el medio de transporte empleado para el envío al laboratorio (Gráfica 4).

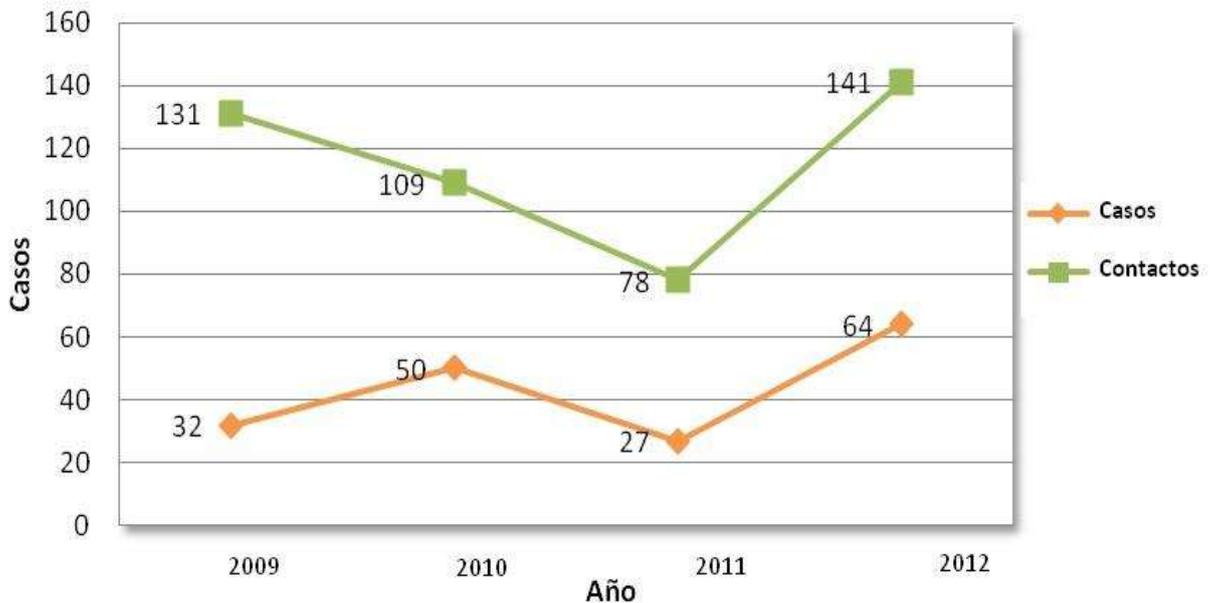
Gráfica 4. Muestras rechazadas durante 2009-2012.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

Así mismo, durante este periodo, se obtuvo una disminución en la cantidad de muestras esperadas de contactos por cada caso registrado en el programa, siendo mayor durante el 2010 y el 2012 donde se registra el aumento en el número de casos reportados, correspondiendo para el 2010, 141 muestras faltantes y para el 2012, 179 muestras de contactos (Gráfica 5).

Gráfica 5. Frecuencia de casos y contactos por año.

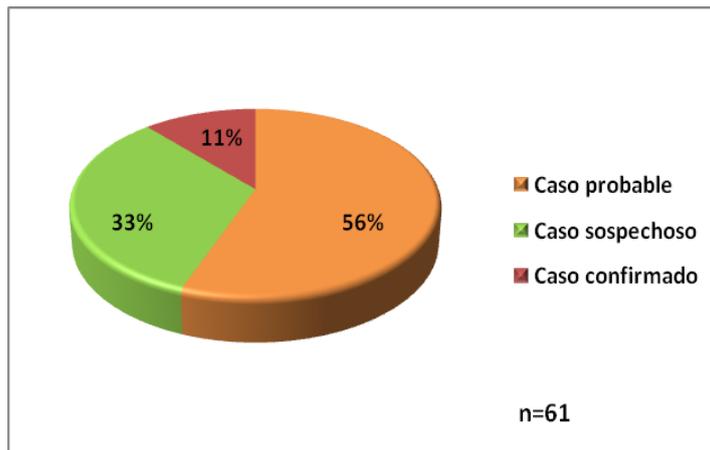


Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

El total de muestras recibidas durante el 2009 al 2012 tanto de casos y contactos fue de 743, perteneciendo el 50% a ExNF, el 34% a sueros y el 16% restantes pertenecían a otro tipo de muestras como exudados faríngeos, exudados rinofaríngeos y muestras de sangre total para biometría hemática.

De los 182 muestras de los casos, el 34% (61) fueron remitidos con el estudio epidemiológico y con datos requeridos por los lineamientos para establecer el tipo de caso que presentaba el paciente; obteniéndose escasa información sobre la administración de dosis de vacunas y escasa información sobre antecedentes de lactancia materna. El registro de casos para tos ferina fue de 34 (56%) casos probables, 20 (33%) casos sospechosos y 7 (11%) casos confirmados (Gráfica 6).

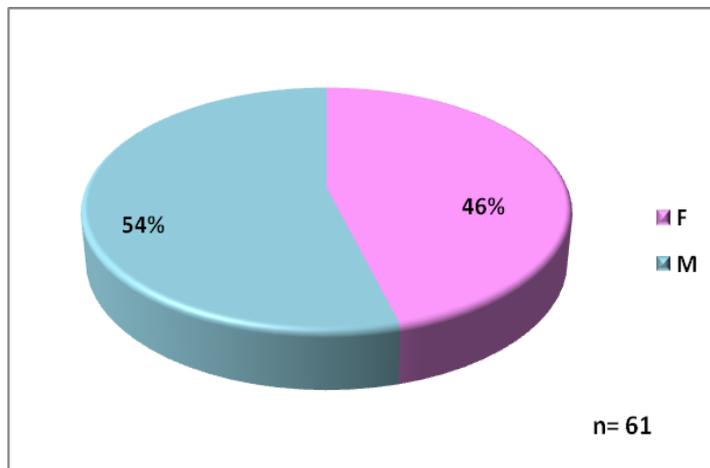
Gráfica 6. Distribución por definición operacional.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

El registro en base al género de casos y contactos fue del 57% (360) para el sexo femenino y del 43% (275) para el sexo masculino durante el periodo del estudio; mientras que de los casos con criterios de inclusión para el estudio, el género frecuente en el sexo masculino con el 54% (33) y el 46% (28) al sexo femenino (Gráfica 7).

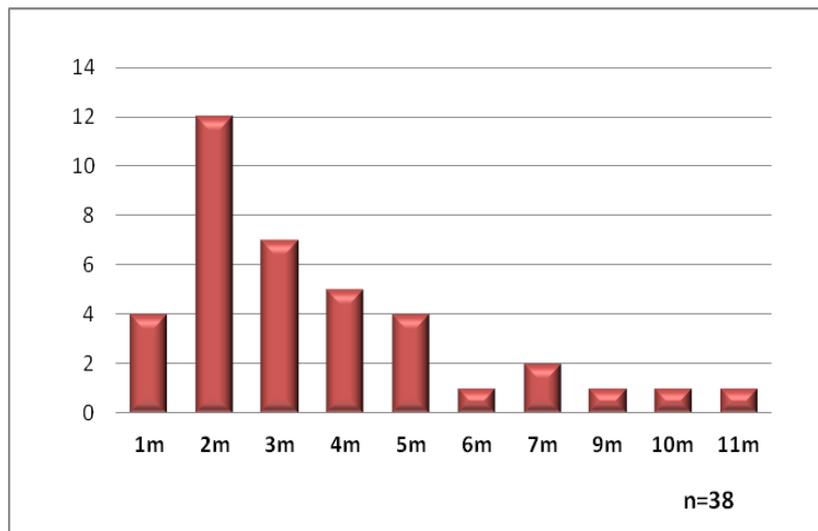
Gráfica 7. Distribución de casos por Género.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

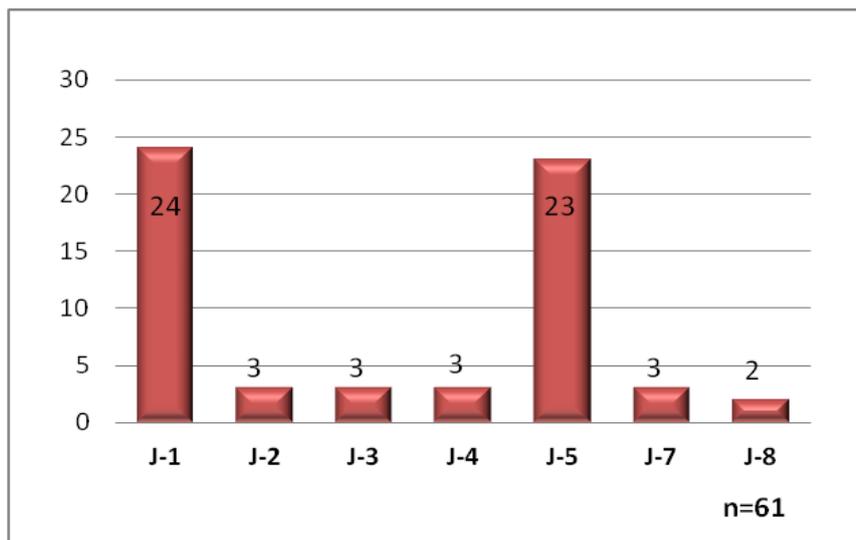
El número de casos entre los pacientes adultos fue del 18% (11) y mayor entre los menores de 5 años de vida con el 82% (55), observándose frecuencia entre los lactantes de 2 meses de vida con el 32% (12) seguido por los menores de 3 meses de vida con el 18% (7) (Gráfica 8).

Gráfica 8. Muestras por edad (Meses).



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

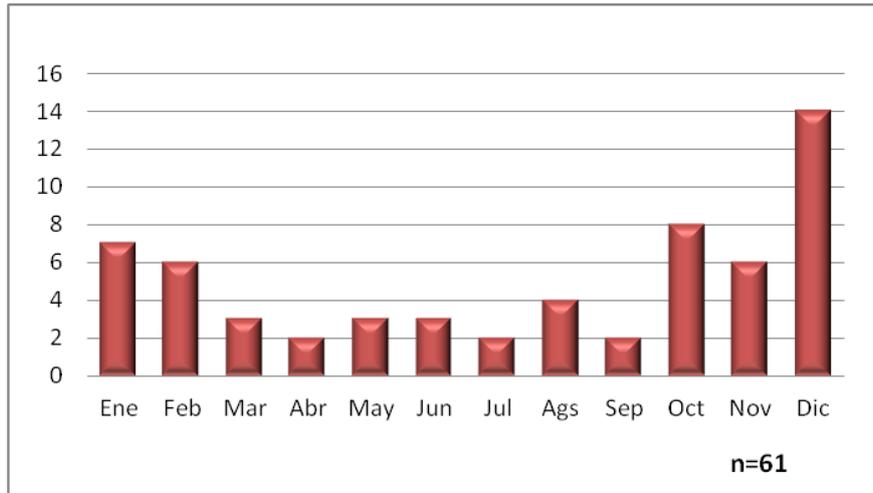
Gráfica 9. Distribución estacional de muestras.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

En cuanto a los casos registrados por Jurisdicción del Estado, se obtuvo una frecuencia de notificación del 39% (24), seguido por la Jurisdicción no. 5 con el 38% (23) (Gráfica 9). La estación de año con mayor número de casos fue durante los meses de octubre (8 casos) y diciembre (14 casos) (Gráfica 10).

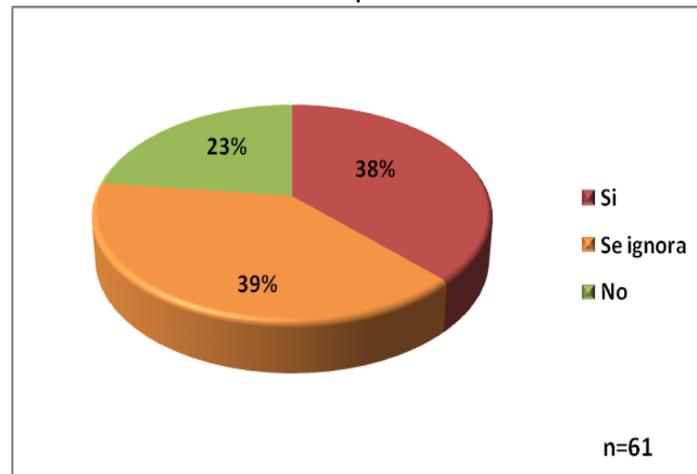
Gráfica 10. Distribución de muestras remitidas por Jurisdicción.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

De los cuales, el 38% de los casos de tos ferina provenían con vacuna, solo el 23% no habían recibido ninguna dosis y el 39% restante se desconocía o no recordaban si fueron vacunados (Gráfica 11). En cuanto a los casos procesados para el estudio (29 casos y contacto), el 55% provenían sin datos disponibles de la vacunación, el 42% no habían recibido vacuna y el 3% había recibido su esquema completo en base al estudio epidemiológico del caso.

Gráfica 11. Distribución por estado de vacunación.

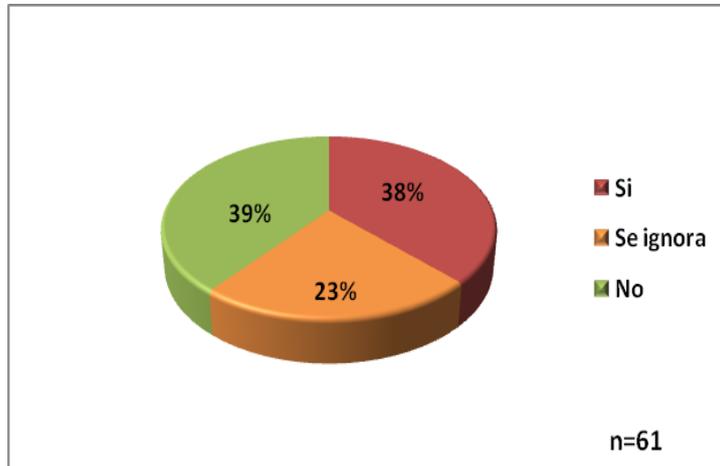


Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

El 38% (23) de los casos, en base a el estudio epidemiológico recibieron algún tratamiento con antibióticos, el 39% (24) de los casos no habían recibido tratamiento y el 23% (14) restante no se encontraba determinado en el estudio epidemiológico

(Gráfica 12); el macrólido más empleado durante el periodo en los casos fue la eritromicina (52% de los casos), seguido por la claritromicina (42% de los casos) y azitromicina (14% de los casos).

Gráfica 12. Administración de Tratamiento.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

6.2. Clínica

En base al registro del censo nominal, siete de los 29 casos y contacto fueron positivos a tos ferina clínica; siendo el caso No. 15 positivo a *Bordetella pertussis* mediante la clínica, cultivo, serología y posteriormente confirmación mediante Rt-q-PCR; los casos No. 31 y No. 32 fueron concordantes mediante cultivo y Rt-q-PCR y los casos No.17 y 21 positivos mediante serología (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados mediante Clínica, Cultivo, PCR-RT y Serología.

NO.	SITUACIÓN	EDAD	SEXO	VACUNACIÓN	RESULTADOS			
					CLÍNICA	CULTIVO	PCR RT	SEROLOGÍA
1	CASO	3m	M	NO	-	NEGATIVO	-	NEGATIVO
2	CASO	4m	F	IN	-	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO: 1:32
3	CASO	1a 2m	F	S/D	-	NEGATIVO	-	NEGATIVO
4	CASO	26a	F	S/D	-	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:32
5	CASO	26a	M	S/D	-	NEGATIVO	-	NEGATIVO
6	CASO	32a	F	S/D	-	NEGATIVO	-	NEGATIVO
7	CASO	3m	F	NO	-	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:16
8	CASO	3m	M	NO	-	NEGATIVO	-	NEGATIVO
9	CASO	3m	M	IN	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	CASO	1a	M	S/D	-	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:64
11	CASO	4m	F	IN	-	NEGATIVO	-	NEGATIVO
12	CASO	54a	F	NO	-	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:64
13	CASO	7m	M	S/D	-	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:64
14	CASO	2m	F	NO	-	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:32
15	CASO	6m	M	NO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO: 1:64
16	CASO	1m	M	NO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO: 1:1024
17	CASO	2m	F	S/D	POSITIVO	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:1024
18	CASO	2m	F	NO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO: 1:1024
19	CASO	1m	M	NO	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
20	CASO	5m	M	S/D	-	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:64
21	CASO	22d	F	NO	POSITIVO	NEGATIVO	-	POSITIVO: 1:32
22	CASO	2m	M	S/D	-	NEGATIVO	-	NEGATIVO
23	CASO	2m	M	S/D	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
24	CASO	1m	M	S/D	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	CASO	45d	M	S/D	-	NEGATIVO	-	NEGATIVO
26	CASO	5m	M	NO	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
27	CASO	4m	F	SI	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	JERO CONTRA	-	-	-	-	-	-	POSITIVO: 1:1024
29	CONTACTO (01	S/D	F	S/D	-	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO: 1:256
30	CASO	37a	F	S/D	-	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO: >1:64
31	CASO	10m	F	NO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	.*
32	CASO	2m	F	NO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	.*

* No presento muestra de suero

Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

6.3. Cultivo

De los 182 casos remitidos al programa, 61 casos cumplieron con los lineamientos para caso de tos ferina, siendo 30 de los casos y un contacto procesados mediante cultivo (Tabla 9). Obteniéndose, de los casos No. 15, 31 y 32 aislamientos positivos para *Bordetella pertussis* (Imagen 9) con aspecto de colonias pequeñas, grisáceas color perlado en medios enriquecidos de Bordet-Gengou en un tiempo de 72 horas de incubación y confirmación mediante técnicas de pruebas bioquímicas para diferenciación de especies del género. Los cultivos fueron enviados y confirmados posteriormente por InDRE como positivos para *B. pertussis*. Veintisiete de las muestras dieron un resultado negativo en el transcurso de 96 horas, así mismo, se obtuvo un aislamiento positivo para *Haemophilus influenzae* en Agar Chocolate perteneciente a la muestra del caso No.13.

Imagen 9. Reaislamiento de cultivos positivos para *Bordetella pertussis*.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

6.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Rt-q-PCR)

De 14 muestras de exudados nasofaríngeos en solución salina con cefalexina (40 $\mu\text{g/ml}$) enviadas al InDRE, se recibieron resultados de 8 muestras positivas para *Bordetella pertussis* pertenecientes a los casos No. 2, 15, 16, 18, 29, 30, 31 y 32; y 6 muestras negativas mediante el procesamiento de Rt-q-PCR. Confirmando los resultados obtenidos mediante cultivo de los casos No. 31 y 32 y mediante serologías positivas pertenecientes a los casos No. 2, 16, 18, 29 y 30. Se obtuvo la confirmación del caso No. 15 positivo mediante el cultivo y serología además de la clínica (Tabla 9).

6.5. Serología

De 29 muestras de suero procesadas, al cumplimiento de 48 horas se registraron lecturas de 15 resultados positivos mediante serología frente al antisuero anti-*Bordetella pertussis* (Imagen 10). Determinándose como positivas a las serologías con formación de malla por reacción del antígeno-anticuerpo a partir de lectura de títulos de 1:16.

Imagen 10. Lecturas séricas de Microplacas de Manclark, 48 horas.

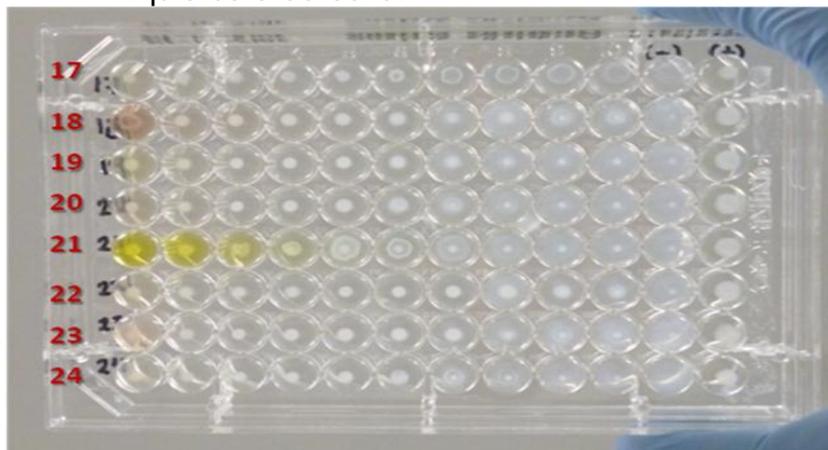


- (1) Microplaca de Manclark, se observa formación de malla en pacientes No. 02, 04 y 07 reportándose como positivos a las 48 horas. Vista por debajo, donde se muestran las diluciones de izquierda a derecha.

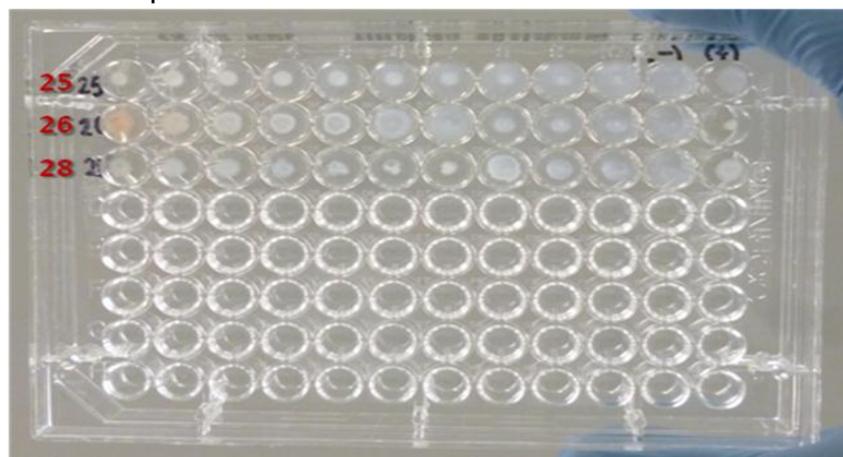


- (2) Microplaca de Manclark, se observa formación de malla en pacientes No. 10, 12, 13, 14, 15 y 16 reportándose como positivos a las 48 horas. Vista por debajo, donde se muestran las diluciones de

izquierda a derecha.



(3) Microplaca de Manclark, se observa formación de malla en pacientes No. 17, 18, 20 y 21 reportándose como positivos a las 48 horas. Vista por debajo, donde se muestran las diluciones de izquierda a derecha.

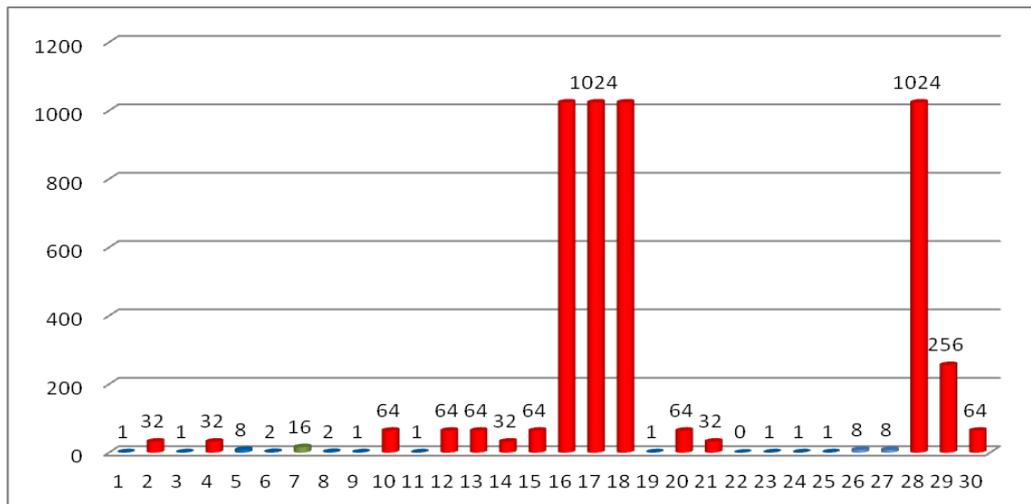


(4) Microplaca de Manclark, se observa formación de malla en muestra control, No. 28 reportándose como positivos a las 48 horas. Vista por debajo, donde se muestran las diluciones de izquierda a derecha.

Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

Del 20% (3) de los casos procesados mediante serología, se registró un título de anticuerpos de 1:1024 perteneciendo de los casos No. 16, 17 y 18, las cuales posteriormente fueron confirmadas como positivas a *B. pertussis* mediante Rt-q-PCR. En el procesamiento del suero control del antígeno, el título de anticuerpos reportado fue de 1:1024 (Gráfica 13).

Gráfica 13. Resultados, Lectura de serologías a 48 horas de incubación.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

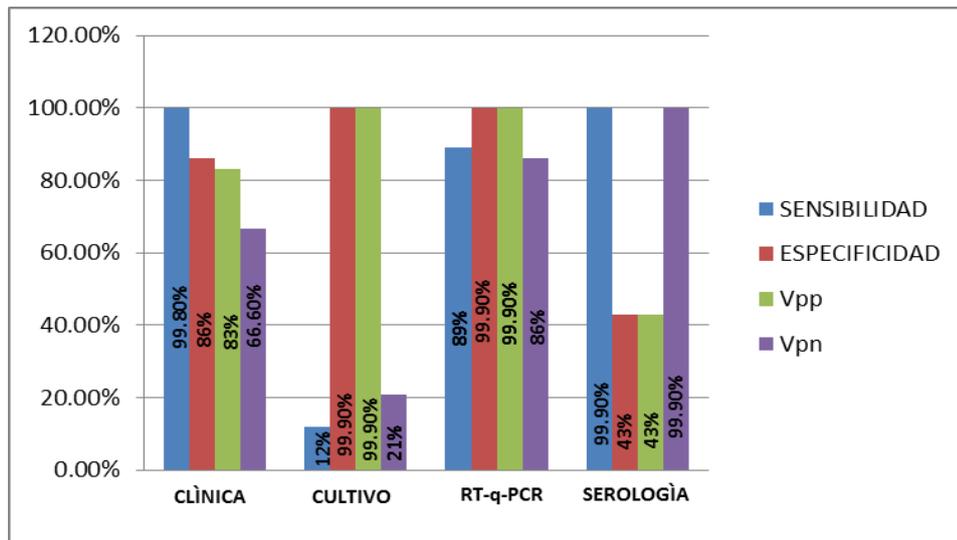
El 7% (1) de los títulos de anticuerpos reportados fueron de 1:256, el 40% con títulos de anticuerpos de 1:64 pertenecientes a los casos No. 10, 12, 13, 15, 20, 30; Siendo que el caso No. 10 y 12 quienes provenían iniciada la administración con eritromicina y claritromicina combinada. Lo que justificaría la disminución en el éxito para aislar al agente mediante cultivo. Los cuatro casos restantes no tenían determinada la iniciación de antibióticos. Solo el caso No. 15 y 30, fueron confirmados mediante Rt-q-PCR. Del 27% de las muestras, los títulos de anticuerpos fueron de 1:32 y 6% con títulos de anticuerpos de 1:16. Durante el estudio, se procesó un caso con dosis de vacunación completo, siendo el caso No. 27, del cual se reportó resultado negativo frente a las tres técnicas empleadas.

6.6. Análisis de Sensibilidad y Especificidad

En este estudio, se consideró la técnica de Rt-q-PCR como prueba de referencia para evaluar la sensibilidad y especificidad de las técnicas dado que el cultivo mostró una baja utilidad para su consideración como el estándar de oro. La sensibilidad y especificidad obtenida para el diagnóstico en este estudio fue para los 7 casos positivos para tos ferina clínica, los 31 casos procesados mediante cultivo, los 14 resultados de procesamiento mediante Rt-q-PCR y los 29 sueros procesados mediante serología. Los resultados se muestran en la Gráfica 14, donde se obtiene una sensibilidad por la clínica del 99.8%, una especificidad del 86% y una eficacia del 68.7%. Mientras que del cultivo, la sensibilidad fue del 12% y una especificidad

del 99.9% presentando una eficacia del 29% en este estudio. En lo que al PCR-TR respecta, su sensibilidad obtenida fue del 89% con una especificidad del 99.9% y con una eficacia del 93%. Por último la sensibilidad obtenida por la serología fue del 99.9%, con una especificidad de 43% y una eficacia de la prueba del 70%.

Gráfica 14. Análisis de Sensibilidad y Especificidad.



Fuente: Laboratorio de Bacteriología. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán 2013.

7.0. DISCUSIÓN

La baja sospecha clínica sobre la enfermedad se considera como una de las principales limitantes que impiden la búsqueda de *Bordetella pertussis* entre la población ^{12, 22, 28}; siendo la presencia de cuadros atípicos lo que permite confundirla fácilmente con otras infecciones de las vías respiratorias ^{22,164} o por el desconocimiento de la enfermedad, que permite la desatención por parte del paciente o sus familiares.

Los estudios epidemiológicos, orientan sobre el estatus del paciente, sin embargo, en este estudio, se observó que carecían de datos de importancia como la administración de antibióticos, vacunas, si se realizó biometría Hemática, el tiempo de evolución de la enfermedad o inicio de los síntomas, la lactancia materna, entre otros; lo que hace relevante destacar que esta información es necesaria, no solo que se plasme en dichos informes; sino que además orienta y facilita la elección de técnicas en el laboratorio, inclusive la muestra y el medio de transporte que se debe utilizar para los pacientes. Además de que el plasmar esta información es de carácter obligatorio de acuerdo a los lineamientos ^{272, 274 373}. La falta de datos en el llenado del estudio epidemiológico, así como el envío de muestra solo en un medio de transporte limita a procesar solo por una técnica y disminuye la detección de casos mediante la recuperación o detección de la bacteria en el paciente.

Desde el pasado, el cultivo se considera como la prueba patrón o estándar de oro ^{236, 241} por la alta especificidad que esta presenta, ya que hasta hoy, es la única técnica que permite trabajar directamente con la bacteria, sin embargo, de acuerdo a lo reportado sobre dicha técnica y por los resultados obtenidos mediante este estudio, su sensibilidad se vio afectada por diversos factores, como la administración de antibióticos previo a la toma de muestra ^{178, 283}, una muestra tomada fuera del tiempo en que se puede aislar o detectar el agente, preservación de la muestra en condiciones inadecuadas, el envío de la muestra óptimo para procesamiento o el medio de transporte inadecuado ^{144, 223} lo que hace que su rendimiento disminuya hasta en un 60%, por lo obtenido en el estudio, la sensibilidad se mostró afectada hasta el 12% para recuperar a la bacteria del paciente, por lo que se puede ver la

necesidad de incorporar una prueba alternativa en compañía de su procesamiento para descartar posibles falsos negativos. Sin embargo, cabe mencionar que se le considera una técnica única y de gran importancia para su procesamiento, ya que además de permitir aislar, identificar y realizar esquema de susceptibilidad a los antibióticos a *B. pertussis*, también permite seguir de cerca los cambios que va sufriendo en el medio la bacteria.

El empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (Rt-q-PCR) ofrece buenos resultados frente al diagnóstico de la tos ferina ²³⁵, principalmente por que proporciona una alta sensibilidad y especificidad ²²⁹ además del tiempo optimo para obtener los resultados. Pero a pesar de poseer estas grandes ventajas su dificultad de disposición principalmente siendo su alto costo y los rigurosos controles de calidad ³⁴ que requiere, continúan afectando su disponibilidad para incorporarla ante el diagnóstico. Además de mencionar que solo detecta el material genético y no la vitalidad de la bacteria. En el estudio, solo pudieron procesarse 14 de las muestras de los 31 casos establecidos mediante dicha técnica debido principalmente a que se las muestras de ExNF provenían en medios de transporte Regan-Lowe o por el tiempo que habían sido tomadas (exceso de días de tránsito) requerido para su procesamiento. Sin embargo, por lo obtenido en el estudio, se observa la gran utilidad que presenta, pudiéndose considerar a la Rt-q-PCR como una técnica auxiliar para la confirmación de la bacteria en el paciente cuando el cultivo se encuentre tardío o vaya con un resultado negativo.

La serología presenta ser una herramienta útil de acuerdo a lo reportado por Sanz Moreno JC *et al* 2002, quienes en su estudio realizan una descripción de las principales técnicas destinadas hacia el diagnóstico de laboratorio de tos ferina⁵. A pesar que la técnica de Manclark se ha dejado de emplear por ofrecer una baja especificidad por la reacción cruzada con otras especies del género *Bordetella*, *Haemophilus*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Escherichea coli* ^{11, 295}, la alta sensibilidad que está proporciona puede ser de gran utilidad y ventaja frente al diagnóstico de Síndrome coqueluchoide, ya que un título elevado de anticuerpos permite dar información necesaria para contrarrestar el proceso de complicación en el paciente

siempre que la clínica se encuentre de forma clara, además de considerar que entre una posible reacción cruzada puede dar inicio para la sospecha y búsqueda de casos de *Bordetella*. En este estudio, la serología resultó ser útil, ya que su sensibilidad mostrada (99.9%) permitió observar un panorama sobre la situación que presentaba el paciente frente a la infección y a su vez revisar de forma cautelosa el procesamiento del cultivo para la recuperación de la bacteria. Cabe mencionar que resulta ser útil sobre todo en los pacientes provenientes sin esquemas de vacunación o en los adultos en los que la cobertura de vacunación ha disminuido y desapareciendo paulatinamente. Además de su bajo coste, resulta ser complementaria con el cultivo cuando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa no se encuentre disponible ^{306, 387}.

8.0. CONCLUSIONES

Con la reemergencia que presentó la tos ferina en los últimos años por el aumento en el número de casos entre los adolescentes y adultos con vacunación en su infancia ^{19, 302}, *Bordetella pertussis* volvió a marcar su importancia clínica en todo el mundo, y con ella la necesidad de la búsqueda de mejoras entre los procedimientos ya existentes que permitan evidenciarla durante la infección, ya que su propagación hacia los menores de edad va en aumento debido a cuadros atípicos o asintomáticos entre el grupo de adolescentes y adultos en quienes se confunde con mayor facilidad con otras enfermedades de las vías respiratorias ^{22, 164}.

Entre las posibles causas de su propagación entre los adolescentes y adultos, la dificultad diagnóstica continúa siendo la limitante número uno para conocer la situación epidemiológica actual de la enfermedad ^{11, 12, 22}. Observándose en este estudio la necesidad de notificar los casos frente a la sospecha de infección y estableciendo que es necesario enviar las muestras de ExNF y suero correspondientes en dichos lineamientos para alcanzar mayor éxito en evidenciar a *B. pertussis* durante su infección.

La baja sensibilidad del cultivo en el estudio, sugiere la necesidad de incorporar otra técnica auxiliar que permita continuar con el diagnóstico frente a *Bordetella pertussis*

cuando la clínica se encuentra de forma más clara y su resultado sea negativo. Sin embargo, su importancia se ve relevante para seguir incorporándola en el diagnóstico para tos ferina, ya que es la única que permite confirmar el diagnóstico de casos esporádicos y aportar la información necesaria que permita seguir de cerca los genéticos que va sufriendo *B. pertussis*.

La Rt-q-PCR, es una gran alternativa para la identificación de *Bordetella pertussis*, la alta especificidad y sensibilidad ^{5, 164} observada durante el estudio, permite la toma de decisiones de forma rápida sobre el paciente ¹⁴³. Pero no obstante, sus limitaciones aún presentes para su disposición en los laboratorios impiden optarla como única prueba de rutina para la tos ferina, además de considerar que es de relevante importancia el trabajar de forma directa con *B. pertussis*. Por los resultados obtenidos, puede ser de gran utilidad para la evidenciar a la bacteria en el paciente cuando el cultivo sea negativo. El incremento de sensibilidad de la Rt-q-PCR respecto a la serología es menos evidente y es por ello que se recomienda su uso en combinación de estas técnicas.

En cuanto al empleo de la serología mediante la técnica en Microplaca de Manclark frente al diagnóstico de *B. pertussis*, resulta ser una prueba muy sensible pero inespecífica. Sin embargo, presenta ser de gran utilidad en el laboratorio ante el diagnóstico de la tos ferina⁵. Pese a la aparente reacción cruzada con otras bacterias ^{11, 295}, su alta sensibilidad resulta ser una ventaja, ya que los títulos elevados de anticuerpos, permiten aportar la información necesaria en un tiempo de 48 horas en diferencia con el cultivo ante los casos que se encuentran de forma graves o en convalecencia; además de que puede ser empleada sobre todo en los casos no vacunados o en pacientes adolescentes y adultos en quienes son susceptibles por la declinación de la vacuna y hoy en día se encuentran en aumento. Su eficacia mediante la técnica del Dr. Manclark puede ir en mejora empleándose sólo en pacientes no vacunados, adultos y exigiéndose un llenado completo de los estudios epidemiológicos.

Por lo anterior, se considera que las técnicas empleadas en el estudio frente al diagnóstico de la tos ferina resultan ser complementarias. Observándose que si se

usan las tres en combinación la sensibilidad aumenta y pueden arrojar resultados que aborden al diagnóstico de la enfermedad en el paciente y por consiguiente en su salud, además del apoyo al médico y la vigilancia epidemiológica.

En el seguimiento de *Bordetella pertussis* por los sistemas de salud, se sugiere y es necesario implementar capacitación desde el primer nivel de atención hasta el laboratorio.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Ferrer, A, FA. Moraga, M. Olsina, M. Campins, y I. Planells. 2003. Tos Ferina Confirmada por Cultivo en un Hospital Terciario. *An Pediatr* 58(4): 309-15.
2. Meza, A, R. Rodarte, y JL, Vázquez. 2010. Panorama Clínico-Epidemiológico de Tos Ferina en un Hospital de Referencia. *Pediatría de México* 12(1): 6-10.
3. Osses, R, OP. Díaz, F. Salidas. 2010. Infección por *Bordetella pertussis*: Una causa emergente de tos prolongada en adolescentes y adultos. *Rev Chil Resp* 26: 30-36.
4. Suárez, L, I. Herbas, CM. Gómez, y CV. López. 2012. “Tos ferina, un problema vigente de salud pública en México. Planteamiento de la necesidad para introducir una nueva vacuna” *Bol Med Hosp Infant Mex*; 69 (4):314-320.
5. Sanz JC, M. Fernández, MJ, Sagües, R. Ramírez, R. Castañeda, D. Barranco, y O. Fernando. 2002. Comparación de tres técnicas de ELISA para evaluar la seroprevalencia de IgG frente a *Bordetella pertussis* en niños vacunados con tres dosis de DTPe. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20(1):10-5.
6. Crowcroft, NS, and J. Britto. 2002. Whooping cough-a continuing problem. *BMJ* 324(7353): 1537-1538.
7. González, M, P. Dall’Orso, E. Cantirán, A. Verón, y J. Quian. 2010. Tos convulsa: estudio clínico y de laboratorio de una enfermedad reemergente en lactantes pequeños y adolescentes. *Rev Méd Urug* 26(3): 154-160.
8. World Health Organization. 2010. *Weekly Epidemiological*. Vacunas antitosferínicas: Documento de posición de la OMS. 40 (85): 385-400.
9. Von-Spechi, M. Dra., S. Grenon, Dra., P. Tagliaferri, Dra., O. López, Dr., M. Requeira, Dra., S. Fosatti, Dra., G. Weltman, Dra., y D. Hozbor, Dra. 2009. Tos convulsa: características clinicoepidemiológicas de 20 casos confirmados atendidos en el Hospital Pediátrico de la provincia de Misiones. *Arch Argent Pediatr* 107(5): 449-458.

10. Ruiz, J, A. Hernández. 2012. Casos clínicos comentados en patología infecciosa. En AEPap ed. Curso de Actualización Pediatría 2012. Madrid: Exlibris Ediciones; p. 129-45.
11. Segura, J, JC. Sanz, MJ, Gascón, E. Ramos, F. Ory, y M. Fernández. 2002. Brote de tos ferina en una comunidad insuficientemente vacunada. Med Clin (arc) 119(16): 601-4.
12. Dotres, C, Dr., D. Vega, Dra., CG. Toraño, Dr., M. Alvarez, Dra., A. Bonche, Dr., 2012. Síndrome Coqueluchoide y Tos Ferina. Hospital Pediátrico Docente “Juan Manuel Márquez”. La Habana, Cuba.
13. Quian, J, A. Cerisola, F. Russomano, A. Fernández, M. Cappeta, R. Uriarte, C. Mogdacy, C. Romero, MJ. Carugain, y R. Rüttiman. 2006. Infecciones por *Bordetella pertussis* en niños menores de un año hospitalizados y sus contactos del hogar. Arch Pediatr Urug 77(3): 229-236.
14. Elliott, M, DO, MS, and E. Couchene, MD. 2007. Wich patients with suspected exposure to pertussis should receive prophylaxis? The Journal of Family Practice. 56(5): 399 -400.
15. Tornero, SP, MJ. Carpio, D. Nehme, J. Romero, y P. Terol. 2006. Tos ferina en niña correctamente inmunizada. Vox Pediátrica 14(2): 38-39.
16. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos InDRE (México). 2013. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de tos ferina y síndrome coqueluchoide. DGE-InDRE-RNLSP (1): 1-92.
17. Vega, LA, y Escobar EE. Tosferina. Informe de un caso. Rev Mex Pediatr 2002; 69(5); 206-207.
18. Morón, LS, J. Moreno, M. Garcia, ME. Realpe, y GL. Peña. 2008. Estado d portadores de *Bordetella pertussis* en adolescentes de 12 a 19 años en el departamento de Tolima, Colombia, 2007. Investigaciones Andina 17(10): 10-104.
19. Álvarez, J. 2013. “*Biotecnología y vacunas. Proteómica aplicada a la identificación de factores de virulencia e inmunógenos presentes en el fenotipo infectante de Bordetella pertussis*”. Tesis Dr. Argentina, Univ.

Nacional de la Plata, Fac. Cien Agr. 221p.

20. Moraga, FA, y Campins M. 2011. Nuevas perspectivas de la tos ferina en el siglo XXI. ¿Estamos fracasando en su control? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29 (8): 561-563.
21. Arellano, M, Dr. E. Aranda, Dr. y LL. López, Dra. 2013. Tos ferina diagnosticada clínica y bacteriológicamente en seis casos. *Acta Pediatr Mex.* 34:127-131.
22. Quian, J. 2012. Tos ferina: vieja enfermedad, nuevos desafíos. *Biomedicina*, 7(3): 22-27.
23. Ruiz, J, A. Martínez, y O. Ordóñez. 2013. Síndrome pertusoide. *Guía-ABE_Síndrome pertusoide* 1(2): 1-5.
24. Gentile, A, VS. Romano, M. valle Juárez, MF. Lución, MA. Marques, y AS. Mistchenko. 2014. Epidemiología de *Bordetella pertussis* en un hospital pediátrico. *Arch Argent Pediatr* 112(1):26-32.
25. Fathima, S, C. Ferrato, BE. Lee, K. Simmonds, L. Yan, SN. Mukhi, V. Li, L. Chui, and SJ. Drews. 2014. *Bordetella pertussis* in sporadic and outbreak settings in Alberta, Canada, July 2004-December 2012. *BMC Infect Dis* 14:48.
26. Healy, MC, MA. Rench, and CJ. Baker. 2011. Implementation of Cocooning against Pertussis in a High-Risk Population. *Clin Infect Dis* 52(2):157-162.
27. Kattar, MM, JF. Chavez, AP. Limaye, SAL. Rassoulian-Barrett, SL. Yarfitz, LC. Carlson, Y. Swanzy, BL: Wood, BT. Cookson. 2000. Aplicación de la secuenciación del 16S rRNA gen para identificar *Bordetella hinzii* como el agente causal de la septicemia fatal. *J Clin Microbiol* 38: 789-794.
28. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 2006. Control de la difteria, tos ferina, tétanos, *Haemophilus influenzae* tipo b y hepatitis B. Washington, D,C.: OPS. Guía Práctica. Publicación Científica y Técnica No. 604. Pág. 12-54.

29. Koneman. 2008. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color. Especies de *Bordetella*. 6ª Edición. Ed. Médica Panamericana. Pág. 487-500. Capítulo 9.
30. Jardine A, SJ. Conaty, M. Staff, H. vally. 2009. Who gives pertussis to infants? Source of infection for laboratory confirmed cases less than 12 months of age during an epidemic, Sydney, 2009. Pree-reviewed article. CDI 34(2): 116-121.
31. Bisgard, K. DVM, MPH, FB. Pascual, MPH, KR. Ehresmann, RN, MPH, C.A. Miller, MS, C. Cianfrini, MPH, C.E. Jennings, BS, C.A. Rebmann, MPH, J. Gabel, DVM, MPH, SL. Schauer, PhD, and S.M. Lett, MD, MPH. 2004. Infant Pertussis *Who was the Source?*. *Pediatr Infect Dis J* 23: 985-989.
32. Guiso, N, L. Bassinet, & P. Reinert. 2004. Coqueluche du nourrisson, de l'enfant et de l'adulte. *Pédiatrie/Maladies infectieuses* 4-355-A-05.
33. Pacheco, CE. 2009. “*Estudio de Factibilidad Técnico-Económico de una planta productora de Kits de Diagnóstico Clínico por PCR en Tiempo*”. Tesis Lic. Santiago de Chile, Univ. de Chile, Fac. Cien. Fisi y Maté. 55p.
34. Nosedá, DG. 2011. “*Biofilm como forma de vida de Bordetella en su hospedador. Diferencias fenotípicas y en la capacidad de adhesión y formación de biofilm entre cepas de referencia y aislados clínicos. Identificación de moléculas de Quórum Sensing*”. Tesis Dr. Cien. Argentina, Univ. Nacional de la Plata, Fac. Cien. Agr. 240p.
35. Hernández, M, M. Cuervo, MA. Miguel, T. Delgado, y M. Lecuona. 2013. *Bordetella trematum* como agente colonizados en úlcera de pie diabético. *Rev Esp Quimioter* 26(1): 72-73.
36. Forsyth, K, M. Campins, J. Caro, JD. Cereza, D. Greenberg, N. Guiso, U. Heining, J. Schellekens, T. Tan, and W. von König, S. Plotkin. 2004. New Pertussis Vaccination Strategies beyond Infancy: Recommendations by the Global Pertussis Initiative. *Clin Infect Dis* 39(12): 1802-1809.

37. Mattoo, S, JD Cherry. 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.
38. Campins, M, FA. Moraga. 2002. Tos ferina. Situación epidemiológica y nuevas estrategias de vacunación. Vacunas 3: 108-13.
39. Cherry, JD. MD. 2012. Epidemic Pertussis in 2012-The resurgence of a Vaccine-Preventable Disease. N Engle Med 367;9.
40. WHO. 2008. *Vaccine-preventable diseases: monitoring system*. Geneva, World health organization, 2008.
41. Esteves, A, CM. Gómez, M. Esparza, VLR. López. 2012. Vacunación de refuerzo contra *Bordetella pertussis* en mujeres embarazadas. Ginecol Obstet Mex 80(5): 341-347.
42. Pérez, ML, Y. Lamberti, WL. Van de Pol, O. Yantorno, and ME. Rodriguez. 2006. Adenylate cyclase influences filamentous haemagglutinin mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells. FEMS Immunol Microbiol 48:140-147.
43. Arrasco, J, J. Avila. 2013. Situación actual de la Tos ferina en el Perú 2012. Bol Epide (lima). 22(06) 098:101.
44. Warfel, JM, JF. Papin, RF. Lobo, LI. Zimmerman, y TJ. Merkel. 2014. Maternal and Neonatal Vaccination Protects Newborn Baboons From Pertussis Infection. [Abstract] J Infect Dis doi: 10.1093/infdis/Jiu090.
45. Diavatopoulos, DA, CA. Cummings, HG. Van der Heide, M. van Gent, S. Liew, DA. Relman, and FR. Mooi. 2006. Characterization of a Highly Conserved Island in the Otherwise Divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* Genomes. J Bact 188(24): 8385-8394.
46. Vidal P, J. Reyna, VR. López, CM. Gómez, E. Sánchez, y J. Hernández. 2010. Infección por *Bordetella pertussis* en lactantes. Perspectiva de la prevención por medio de inmunización maternal con DTP acelular. Enf Inf Microbiol 30(2): 59-62.
47. Moreno, S, Bl. Morales, CA. Serrano, O. Dominguez, O. Camaño, R. Rojas, E. Calderón. 2012. Caso Clínico Patológico. Lactante de 4 meses

- con falla respiratoria aguda secundaria a infección por *Bordetella pertussis*. Bol Med Hosp Infant Mex 2012; 69(6): 487-501.
48. Yli-Hannuksela KG, J. Vuononvirte, AM. Barkoff, M. Viander, O. van Der Meeren, J. Mertsola, and Q. He. 2012. Gene Polymorphism in Toll-Like Receptor 4: Effect on Antibody Production and Persistence After Acellular Pertussis Vaccination During Adolescence. J Infe Diasses 205: 1214-9.
 49. Sapián, LA, QFP., MC., JL. Valdespino, MC., B. Salvatierra, MC., R. Tapia, MC. MSP, G. Gutiérrez, MC., MSP., J. Macedo, Ing., y J. Sepúlveda, MC., MSP. 1992. Seroepidemiología de la tos ferina en México. Salud Pública de México 34(2): 177- 185.
 50. Tomé P, LP, Torres, G. Romero, H. Guiscafré. 2008. *Bordetella pertussis* en estudiantes adolescentes de la Ciudad de México. Rev Salud Pública 42(4): 679-83.
 51. Vázquez, PV, JR, Figueroa, VR. López, CM. Gómez, E. Sánchez, J. Hernández. 2010. Infección por *Bordetella pertussis* en lactantes. Perspectiva de la prevención por medio de inmunización maternal con DPT acelular. Enf Inf Microbiol 30(2):59-61.
 52. Fina, F, L. Alemany, y M. Campins. 2004. Epidemiología del tétanos, la difteria y la tos ferina. Emergencias 16:S47-S53.
 53. Mooi, FR, IHM. Van Loo, and AJ. King. 2001. Adaptation of *Bordetella pertussis* to Vaccination: A Cause for ITS Reemergence? Emerging Infectious Diseases 7(3):526-528.
 54. Fry, NK, S. Neal, TG. Harrison, E. Miller, R. Matthews, and RC. George. 2001. Genotypic Variation in the *Bordetella pertussis* Virulence Factors Pertactin and Pertussis Toxin in Historical and Recent Clinical Isolates in the United Kindgom. Infect Immun 69(9): 5520-5528.
 55. Tonetto, I, Dra. y JM. del Pont. 2008. Situación actual de Coqueluche. Not Infec 1(2):1-2.
 56. Muyldermans, G, D. Piérard, N. Hoebrex, R. Advani, S. Van Amersfoorth, I. De Schutter, O. Soetens, L. Eeckhout, A. Malfroot, and S. Lauwers. 2004. Simple Algorithm for Identifications of *Bordetella pertussis* Pertactin Gene Variants. J Clin Microbiol 42(4):1614.

57. Cherry, JD. 2006. Epidemiology of pertussis. [Abstract] *Pediatr Infect Dis J.* 25:361-2.
58. Uriona, SM, X. Martínez, M. Campins, G. Codina, A. Ferrer, JA. Rodrigo, L. Pinós, R. Cebrian, y FA. Moraga. 2012. Estudio de contactos de casos pediátricos de tos ferina en un hospital de tercer nivel de Barcelona. *Me Clin (Barc)* 2320:1-6.
59. Nei, T, H. Hyodo, K. Sonobe, K. Dan, and R. Saito. 2012. First Report of Infectious Pericarditis Due to *Bordetella holmesii* in an Adult Patient with Malignant Lymphoma. *J Clin Microbiol* 50(5): 1815-1817.
60. Soloaga, RN, NA. Carrion, M. Almuzara, C. Barberis, JC. Pidone, LI. Guelfand y C. Vay. 2013. Endocarditis por *Bordetella holmesii* en un paciente asplénico. *Rev Argent Microbiol* 45(2): 86-88.
61. Fry, NK, J. Duncan, H. Malnick, M. Warner, AJ. Smith, MS. Jackson, and A. Ayoub. 2005. *Bordetella petrii* Clinical Isolate. *Emerg Infect Dis.* 11:1131-3.
62. Guiso, N. 2009. *Bordetella pertussis* and Pertussis Vaccines. *Clin Infect Dis* 49:1565-9.
63. Cano, EG, JT. Hernández, S. Grano, G. Aparicio. 2011. Bacteriología Médica Diagnostica. *Bordetella*. Instituto politécnico Nacional. Eds. Cuellar. Pág. 205-209. Capítulo 25.
64. Soo Ko, K, KR. Peck, WS. Oh, NY. Lee, JH, Lee, and JH. Song. 2005. New Species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., Isolated from the Purulent Exudate of an Epidermal Cyst. *J Clin Microbiol* 43(5): 2516-2519.
65. Fry, NK, J. Duncan, H. Malnick, and PM Cockcroft. 2007. The first UK isolate of '*Bordetella ansorpii*' from an immunocompromised patient. *J Med Microbiol* 56: 993-995.
66. Mooi, FR, He, Q., y Guiso, N. 2007. "Filogenia, evolución y epidemiología de *Bordetellae*". *Bordetella* Microbiología Molecular. Pág. 17-45.

67. Hayashimoto, N, M. Yusada, K. Goto, A. Takakura and T. Itoh. 2008. Study of a *Bordetella hinzii* Isolate from a Laboratory Mouse. J Clin Microbiol 58(5): 440-446.
68. Reischl, U, N. Lehn, GN. Sanden, and MJ. Loeffelholz. 2001. Real-Time PCR Assay Targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and Molecular Basis for Detecting *Bordetella holmesii*. J Clin Microbiol 39: 1963-1966.
69. Tanaka, M, CR. Viterk, FB. Pascual, KM. Bisgard, JE. Tate, and TV. Murphy. 2003. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. JAMA 2003; 290: 2968-2975.
70. Preston, A. 2005. *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. Can Med Assoc J 173: 55-62.
71. Diavatopoulos, DA, CA. Cummings, LM. Schouls, MM. Brinig, DA, Relman, and FR. Mooi. 2005. *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*. PLoSPathog 1(4): 373:383.
72. Molina, G, ME. Rosales, G. Bárcenas, y JA. Montanas. 2006. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. Vet Méx. 37(3):313-325.
73. Bailey & Scott. 2009. Diagnóstico Microbiológico. Forbes, B, DF. Sahn AS. Weissfeld. *Bordetella pertussis Bordetella pertussis y Bordetella parapertussis*. 12° ed. Buenos Aires. Médica panamericana. Capítulo 39. pág. 435-438.
74. Bart, MJ, M. van Gent, H. GJ. Van der Heider, J. Boekhorst, P. Hermans, J. Parkhill, y RF. Mooi. 2010. Genómica comparative de los previos a la vacunación y modern *Bordetella pertussis* cepas. BMC Gemonics 11(627): 1-10.
75. Suárez, V, y HR. Hernández. 2000. Pertussis. Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú). ISBN: 9972-857-02-6.
76. Murray, PR. PhD, KS. Rosenthal, PhD, MA, Pfäuer, MO. 2007. Microbiología Médica. Eds 5°. Elsevier Ed. Pág- 377-382. Capítulo 36. Madrid, España.
77. Valladares, B, C. Ortega, V. Velazquez, JL. Zamora, CG. Peñuelas, J.

- Castro, M. Talavera, MU. Alonso, A. Zaragoza. 2011. *Bordetella bronchiseptica* como un riesgo importante de salud pública. Estudio clínico patológico en conejos. Rev electrón Vet 12(10): 1-12.
78. Romero, G, P. Tomé, LP. Torres, H. Guiscafré. 2007. Identificación de un caso de tos ferina y estudio de sus contactos. Utilidad del PCR y del cultivo. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 45 (6): 623-627.
79. Kayser, FH, KA. Bienz, J. Eckert, and RM Zinkernagel. 2005. Medical Microbiology. Eds Thieme. Capitulo 4. Pág. 313-316.
80. Coenye, T, E. Vanlaere, E. Samyn, E. Falsen, P. Larsson, and P. Vandamme. 2005. *Advenella incenata* gen. nov., sp. Nov., a novel member of the *Alcaligenaceae*, isolated from various clinical samples. Int Joy Sys Evo Micobiol 55:251-256.
81. Stolz, A, S. Bürger, A. Kuhm, P. Kämpfer, and H. Jürgen. 2005. *Pusilimonas noertemannii* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Alcaligenaceae* that degrades substituted salicylates. Int Joy Sys Evo Micobiol 55:1077-1081.
82. Williams, BL, M. Horning, T. Parekh. 2012. Application of Novel PCR-Based Methods for Detection, Quantization, and Phylogenetic Characterization of *Sutterella* Species in Intestinal Biopsy Samples from Children with Autism and Gastrointestinal Disturbances. mBio 3(1):e00261-11.
83. Rosales, ME, AG. Fernández, G. Garza, G. Barcenas, JA. Montaraz. 2003. Actividad antimicrobiana sobre cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. AMMVEPE 14(4): 120-122.
84. Basurto, FJ, Hernández R. Verdugo A. Rosales ME, Montaraz JA. 2005. Clonación, secuenciación y expresión del gen prn de pertactina de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. Vet. Méx., 36(4): 425-436.
85. Pianciola, LA, ML. Mazzeo, D. Flores, y DF. Hozbor. 2012. Desarrollo y validación de una PCR múltiple para el diagnóstico de *Bordetella* spp. Acta Bioquím Clín Latinoam 46(4): 667-76.
86. Woolfrey, BF, y JA Moody. 1991. Human Infections Associated whit *Bordetella bronchiseptica*. J Clin Microbiol Rev 4: 243-255.

87. Ner, Z, LA. Ross, MV. Cuerno, TG. Keens, EF. McLaughlin, VA. Starnes and MS. Woo. 2003. *Bordetella bronchiseptica* Infection in pediatric lung transplant recipients. [Abstract] *Pediatr Transpl* 7(5):413-417.
88. Wernli, D, S. Emonet, J. Schrenzel, and S. Herbart. 2010. Evaluation of eight cases of confirmed *Bordetella bronchiseptica* Infection and colonization over a 15-years period. *Clin Microbiol Inf* 17(2):190-203.
89. Moissenet, D, E. Bingen, G. Arlet, H. Vu-Thien. 2005. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of “*Pseudomonas*-like” isolates from sputum of patients with cystic fibrosis. [Abstract] *Pathol Biol (Paris)* 53 (8-9): 500-502.
90. Spilker, T, AA. Liwienski, JJ. LiPuma. 2008. Identification of *Bordetella* spp. In respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect* 14:504-506.
91. Boss, AC, P. Beemsterboer, TFW. Wolfs, FGA. Versteegh, HGM. Arets. 2011. *Bordetella* species in children with cystic fibrosis: What do we know? The role in acute exacerbation and chronic course. *J Cystic Fibros* 10:307-312.
92. López, JS. 2012. “*Evaluación de la influencia de la señalización celular bacteriana entre Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica sobre cambios en el epitelio nasal de cornetes de conejo y sobre la expresión de algunos factores de virulencia.*” Tesis Mag. Cien. Bogotá, Colombia, Univ. Nac. de Colombia, Fac. Cien. Posgr Inter. Microbiol. 17-21p.
93. Quinn, PJ, and DK. Markey. 2002. *Veterinary microbiology and microbial Disease*. Blackwell, Osney Mead, UK. Second Edition.
94. Porter, JF, K. Connor, and W. Donachie. 1994. Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-Like bacteria from ovine lungs. *Microbiol* 140: 255-261.
95. Njamkepo, E, F. Delisle, L. Hagege, G. Gerband. And N. Guiso. 2000. *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. *Clin Microbiol Infect* 6:131-136.
96. Pianciola, L, M. Mazzeo, D. Flores, y D. Hozbor. 2010. Optimización del

- Procesamiento y la conservación de muestras clínicas destinadas al diagnóstico molecular de coqueluche. Rev Arg Microbiol 42: 108-113.
97. Wolfe, DN, GS. Kirimanjeswara, and ET. Harvill. 2005. Clearance of *Bordetella parapertussis* from the lower Respiratory Tract Requires Humoral and Cellular Immunity. Infect Immun 73(19):6508 doi: 10.1128/IAI.73.10.6508-6513.2005.
 98. Bottero, D, ME. Gaillard, A. Errea, G. Moreno, E. Zurita, L. Pianciola, M. Rumbo, and D. Hozbor. 2013. Outer membrane vesicles derived from *Bordetella parapertussis* as an acellular vaccine against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* infection. [Abstract]. Vaccine 31(45):5262-5268.
 99. Weyant, RS, DG. Hollis, RE. Weaver, M. Fadl, M, Amin, AG. Steigerwalt, SP. O'connor, AM. Whitney, MI. Daneshvar, CW. Moss and DJ, Brenner. 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov., a New Gram-Negative Species Associated with Septicemia. J Clin Microbiol 33(1):1-7.
 100. Shepard, CW, MI. Daneshvar, RM. Kaiser, DA. Ashford, D. Lonsway, JB. Patel, RE. Morey, JG. Jordan, RS. Weyant, and M. Fischer. 2004. *Bordetella holmesii* Bacteremia: A Newly Recognized Clinical Entity among Asplenic Patients. Clin Infect Dis 38(6): 799-804.
 101. Barrado, L, M. Barrios, F. Sanz, y F. Chaves. 2011. Bacteriemia por *B. holmesii* en una niña con anemia de células falciformes. 29(10): 778-786.
 102. Yih, WK, EA Silva, J. Ida, N. Harrington, SM Lett y H. George. 1999. *Bordetella holmesii*-Like Isolated from Massachusetts Patients with *Pertussis*-Like Symptoms. Emerg Infect Dis 5: 441-443.
 103. Guthrie, J, AV. Robertson, P. Tang, F. Jamieson, and SJ. Drews. 2010. Novel Duplex Real-Time PCR Assay Detects *Bordetella holmesii* in Specimens from Patients with *Pertussis*-Like Symptoms in Ontario, Canada. J Clin Microbiol 48(4): 1435-1437.
 104. Njamkepo, E, S. Bonacorsi, M. Debruyne, SA. Gibaud, S. Guillot and N. Guiso. 2011. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in Nasopharyngeal Samples from French Patients with Suspected *Pertussis*. J Clin Microb 49(12): 4347-4348.

105. Kamiya, H, N. Otsuka, Y. Ando, F. Odaira, S. Yoshino, K. Kawano, H. Takahashi, T. Nishida, Y. Hidaka, H. Toyozumi, K. Shibayama, K. Kamachi, T. Sunagawa, K. Taniguchi, and N. Okabe. 2012. Transmission of *Bordetella holmesii* during Pertussis Outbreak, Japan. *Emerg Infect Dis* 18(7): 1166-1169.
106. Zhang, X, LS. Weyrich, JS. Lavine, AT. Karanikas, and ET. Harvill. 2012. Lack of Cross-protection against *Bordetella holmesii* after Pertussis Vaccination. *Emerg Infect Dis* 18(11): 1771-1779.
107. Monnier, S. A. Therby, B. Couzon, F. Doucet, A. Greder. 2010. Bactériémie à *Bordetella holmesii* chez un patient drépanocytaire. [Résumé]. 40(5): 299-301.
108. Mooi, FR, S. Bruisten, J. Linde, F. Reubsæet, K. Heuvelman, S. van der Lee, and AJ. King. 2011. Characterization of *Bordetella holmesii* isolates from patients with pertussis-like illness in the Netherlands. *FEMS Immun Med Microbiol* 64:289-291.
109. Planet, PJ, A. Narechania, SR. Hymes, C. Gagliardo, RC. Huard, S. Whittier, P. Della, and AJ. Ratner. 2013. *Bordetella holmesii*: Initial genomic analysis of an emerging opportunist. 67(2): 132-135.
110. Morris, JT, y M. Myers. 1998. Bacteremia due to *Bordetella holmesii*. *Clin Infect Dis* 27:912-3.
111. Spears, PA, LM. Temple, DM. Miyamoto, DJ. Maskell, and PE. Orndorff. 2003. Unexpected Similarities between *Bordetella avium* and Other Pathogenic *Bordetellae*. *Inf an Immun* 71(5): 2591-2597.
112. Gentry-Weeks, CR, BT Cookson, E. Goldman, RB. Rimler, SB. Porter y R. Curtiss III. 1988. Dermonecrotic Toxin and Tracheal Cytotoxin, Putative Virulence Factors of *Bordetella avium*. *Infect Immun* 56: 1698-1707.
113. Vichi, J, M. Colas, I. Espinoza y S. Martínez. 2011. Isolation of *Bordetella avium* in whiteleghorn hens in cuba: first report. *Rev Salud Anim*. Vol. 33, n. 2, pp. 136-136. ISSN 0253-570X.
114. Harrington, AT, JA. Castellanos, TM. Ziedalski, JE. Clarridge III, and BT. Cookson. 2009. Isolation of *Bordetella avium* and Novel *Bordetella* Strain from patients with Respiratory Disease. *Emerging Infectious Diseases*

- 15(1): 72-74.
115. Lawrence, J, y MD. Rhea. 1915. The Comparative Pathology of the Tracheal and Bronchial lesions producen in man by *B. pertussis* (Whooping-cough) and those produced in dogs by *B. bronchisepticus* (canine distemper). Received for publication May I, 1915.
 116. Vandamme, P, M. Heyndrickx, M, Vancanneyt, B. Hoste, P. de Vos, E. Falsen, K. Kersters, and KH. Hinz. 1996. *Bordetella trematum* sp. nov., Isolated froma Wounds and Ear Infections in Humans and Reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983. Int J Syst Bacteriol 46: 849-858.
 117. Sacco, RE, KB. Register and GE. Nordholm. 2000. Restriction enzyme analysis and ribotyping distinguish *Bordetella avium* isolates. Epidemiol Infect 124: 83-90.
 118. Noguera, DC, D. Infante AJ. León, JG. Fernández, M. Rolo, I. Avila y A. Herrera. 2001. Primer Aislamiento e Identificación del agente causal de Bordetelosis aviar y reproducción de la enfermedad en Venezuela. Veterinaria Trop 26 (1): 35-46.
 119. Register, KB, RE. Sacco, and GE. Nordholm. 2003. Comparison of Ribotyping and restriction Enzyme Analysis for Inter-and Intraspecies Discrimination of *Bordetella avium* and *Bordetella hinzii*. J Clin Microbiol 41(4):1512-1519.
 120. Register, KB, E. Randy y EN. Gwen. 2005. Analytical Verification of a PCR Assay for Identification of *Bordetella avium*. J Clin Microbiol 43(11): 5567.
 121. Temple, LM, DM. Miyamoto, M. Mehta, CM. Capitini, SV. Stetina, HJ. Barnes, VL. Christensen, JR. Horton, PA. Spears, and PE. Orndorff. 2010. Identification and Characterization of Two *Bordetella avium* Gene Products Required for hemagglutination. Inf Imm 78(6): 2370-2376.
 122. Register KB. 2013. Development of a PCR for Identification of *Bordetella hinzii*. [Abstract] Avian Diseases 57(2): 307-3010.
 123. Vandamme, P, J. Hommez, M. Vancanneyt, M. Monsieurs, B. Hoste, B. Cookson, CH. Wirsing von König, K. Kersters, and PJ.

- Blackall. 1995. *Bordetella hinzii* sp. nov., Isolated from Poultry and Humans. *Int J Syst Bacteriol* 45(1): 37-45.
124. Funke, G, T. Hess, A. von Graevenitz and P, Vandamme. 1996. Characteristics of *Bordetella hinzii* Strains Isolated from a Cystic Fibrosis Patient over a 3-Year. *J Clin Microbiol* 34(4): 966-969.
125. Arvand, M, R. Feldhues, M. Mieth, T. Kraus, and P. Vandamee. 2004. Chronic Cholangitis Caused *Bordetella hinzii* in a Liver Transplant Recipient. *J Clin Microbiol* 42(5): 2335-2337.
126. Fry, NK, J. Duncan, MT. Edwards, RE. Tilley, D. Chitnavis, R. Harman, H. Hammerton, and L. Dainton. 2007. A UK clinical isolate of *Bordetella hinzii* from a patient with myelodysplastic syndrome. *J Med Microbiol* 56: 1700-1703.
127. Palacián, MP, MA. Vasquez, y Al. Lopez. 2013. Infección respiratoria por *Bordetella hinzii*. *Arch Bronconeumol* 49(9):408-412.
128. Daxboeck, F, Goerzer, E. Apfalter. P. Nehr, M. y Krause, R. 2004. Aislamiento de *Bordetella trematum* de un diabético úlcera de la pierna. [Resumen] *Medicina diabética* , 21: 1247-1248. doi: 10.1111/j.1464-5491.2004.01310.
129. Shah, NR. Moksa, M. Novikov, A. Perry, MB. Hirst, M. Caroff, M. and Fernandez, RC. 2013. Draft Genome Sequences of *Bordetella hinzii* and *Bordetella trematum*. *Genome Annouc* 1(5): e00838-13.
130. Iglesias, E, Y. Plasencia, T. Morales, y L. Izquierdo. 2000. Conservación por congelación de *Bordetella pertussis* y *Corynebacterium diphtheriae*, empleados en la producción de vacunas para uso humano. Insituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana Cuba.
131. Machín, C, A. Serra, C. Olagüe, A. Menchaca. 2011. Protocolo de tratamiento de la tos convulsa grave en la Unidad de Cuidados Intensivos de Niños (UCIN) del Centro Hospitalario Pereira Rossell. *Arch Pediatr Urug* 82(3): 174-176.
132. Gross, R, K. Keidel, and K. Schmitt. 2010. Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. [Abstract]. *Med Microbiol and*

- immun 199(3):155-163.
133. Elahi, S, R. Brownlie, J. Korzeniowski, R. Buchanan, B. O'Connor, MS. Peppter, SA. Halperin, SF. Lee, LA. Babiuk, and V. Gerdts. 2005. Infection of Newborn Piglets with *Bordetella pertussis*: a New for Pertussis. *Infect Immun* 73(6): 3636-3645 doi: 10.1128/IAI.73.6.3636-3645.2005.
 134. Senturk, E, S. Sen y M. Telli. Epinema por *Bordetella pertussis* en un paciente adulto con cáncer de pulmón. 2012. *Arch bronconeumol* 48(7): 261-264.
 135. Legrand, JC. 2007 Jules Bordet, the Discoverer of *Bordetella pertussis*: The Father of Belgian Microbiology? *CHU de Charleroi, Belgium CID* 44 (1 may).
 136. Bernalola E, L. Lerrasesúmaga. 2004. “Vacuna de la Tos Ferina”. *Ped Rur Ext* 17, 34 (319): 153- 162.
 137. Ledermann, WD. 2004. Pertussis Chemoprophylaxis. *Rev Chil Infect* 21(1): S31-S33.
 138. Prats, G. 2005. *Microbiología Clínica/Guillem Prats*. Buenos Aires. Madrid. Médica Panamericana. Pág. 41. ISBN 978-84-7903-971-4.
 139. Muñoz, FM. 2006. La tos ferina en lactantes, niños y adolescentes: Diagnóstico, tratamiento y prevención. [Resumen] *Semin Pediatr Infect Dis* 14:14-19. Doi: 10.1053.
 140. Cacho, JB, MA. Meseguer, A. Oliver, y J. Puig. 2007. Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Bacterianas del tracto respiratorio Inferior. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. ISBN-978-84-611-8^a35-9.
 141. Atkinson, W, C. Wolfe, J. Hamborsky, and L. McIntyre. 2012. eds. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. The Pink Book: Course Textbook, 12th edition Second Printing*.
 142. Ulloa-F, MT. 2008. “*Bordetella pertussis*. Retrato Microbiológico”. Programa de Microbiología-Micología; Instituto de Ciencias Biomédica; Facultad de Medicina, Universidad de Chile. *Rev Chil Infect* 25 (2):115.
 143. David, A, E. Kouris, M. Álvarez, MT. Márquez, y A. Martín. 2005. *Bordetella pertussis*: Caracterización Epidemiológica y Diagnóstico. *Arch*

- Venz Puerricul Pediatr 68(4): 164.169.
144. Gentile, A. Dra. 2010. Infección por *Bordetella pertussis*. Pediatría práctica. Arch Argent Pediatr 108(1): 78-81.
 145. Donoso, A, D. Arriagada, P. Cruces, y F. Díaz. 2012. Coqueluche grave: Estado del arte. Rev Chil Infectol 29(3): 290-306.
 146. Moreno, L, P. Montanaro, E. Bujedo, J. Cámara, C. Abilar, M. Terzoni, M. Romano, I. Marqués, D. Quiroga, A. Orecchini, J. Jacome, F. Ferrero. 2013. Predictores de coqueluche al ingreso en lactantes Hospitalizados con infección respiratorio aguda baja. Rev Facul Cien Med 70(2): 63-69.
 147. Cofré, JG. 2006. Quimioprofilaxis en coqueluche: ¿Sacar agua de canastos? Rev Chil Infect 23(1): 60-68.
 148. Tibayrenc, M. 2007. Encyclopedia of Infectious Diseases. Modern Methodologies. Eds. Wiley. Pág. 192-193. United States of America. ISBN 978-0-471-65732-3.
 149. Mejía, SH. 2013. Coqueluche en niños. Rev Soc Bol Ped 52(1): 24-6.
 150. Crowcroft, NS, R. Booy, T. Harrison, L. Spicer, J. Britto, Q. Mok, P. Heath, I. Murdoch, M. Zambon, R. George, E. Miller. 2003. Severe and unrecognized: pertussis in UK infants. Arch Dis Child 88:802-806.
 151. Romano, MJ, MD. Weber, E. Weisse, and BL. Siu. 2004. Pertussis Pneumonia, Hypoxemia, Hyperleukocytosis, and Pulmonary Hypertension: Improvement in Oxygenation After a Double Volume Exchange Trasfusion. Pediatrics 114(2): e264-e266.
 152. Heininger, U, WJ. Kleemann, JD. Cereza, y SS. Group. 2004. A Controlled Study of the Relationship Between *Bordetella pertussis* Infections and Sudden Unexpected Deaths Among German Infants. Pediatrics 114(1): e9-e15.
 153. Serra, A, C. Gutiérrez, A. Menchaca. 2013. Tos convulsa grave y su correlación anatomopatológica. Arch Pediatr urug 84(2): 136-142.
 154. Saavedra, J, MJ. Sierralta, S. Salazar, M. Pettinelli. 2010. Tos ferina en Lactante: Enfoque Diagnóstico a propósito de un caso. Rev Anacem 4: 90-92.

155. Kretzschmar, M, PFM. Teunis, y RG. Pebody. 2010. Incidencia y la reproducción Números de tos ferina: Estimaciones serológicas y social del contacto datos en cinco países europeos. PLoS Med 7(6):e1000291.
156. Miranda, C, A. Wozniak, C. Castillo, E. Geoffroy, C. Zumarán, L. Porte, JC. Román, y P. García. 2013. Presencia de *Bordetella holmesii* en brote epidémico de coqueluche en Chile. Rev Chil Infectol 30(3). 237-243.
157. Sapián, LA. 1991. *Bordetella pertussis* Microbiología y Diagnóstico. Secretaria de salud. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Publicación Técnica del InDRE No. 5. México D. F.
158. Cano, EG, JT. Hernández, S. Grano, G. Aparicio. 2011. Bacteriología Médica Diagnostica. Diagnóstico de tos ferina. Instituto politécnico Nacional. Eds. Cuellar. Pág. 211-217. Capitulo 26.
159. Steele, RW. 2007. Clinical Handbook of Pediatric Infectious Disease. Third Edition. Informa Healthcare USA, Inc. Pág. 114. New York, NY.
160. Wood, N,P. McIntyre. 2008. Pertussis: revisión de la epidemiología, diagnóstico, manejo y prevención. [Resumen] Paediatr Respir Rev 14:201-211.
161. Cano, MA, MA. Durazno, R. Dorame, N. Gómez. 2012. Abordaje Diagnóstico del Síndrome Coqueluchoide y Tos ferina. Bol Clin Hosp Infant Edo Son 2012; 29(2); 85-87.
162. Olivares, JO, M. Bueno. 2011. Tos ferina. Revisión clínica a propósito de un caso. Rev Pediatr Aten Primaria.13:575-84.
163. Kocak, Ü, MD. C. Sanli, MD. M. Albayrak, MD. RE. Bulduk, MD, and S. Saygy, MD. 2006. Pertussis; Still a clinical diagnosis. Gazi Medical Journal 17(1):56-58.
164. Campins, M, D. Moreno, AG. De Miguel, F. González, FA. Moraga, J. Arístegui, A. Concé, JM, Bayas, y L. Salleras. 2013. Tos ferina en España. Situación epidemiológica y estrategias de prevención y control. Recomendaciones del Grupo de Trabajo de Tos ferina. Enferm Infecc Microbiol Clin 31(4):240-253.
165. Schaechter, M. 2004. The Desk Encyclopedia of Microbiology. Eds.

- Elsevier Academic Press. Pág. 1056. San Diego, California.
166. Donoso, A, M. Ramírez, J. León, G. Rojas, C. Valverde, B. Oberpaur, y R. Ares. 2002. Coqueluche: una causa de hipertensión pulmonar fatal. *Rev Chil Infectol* 19(4): 226-230.
 167. Bénédict, M, I. Llana, MT. García de Alvaro, M. Fernández, S. Jimeno. 2012. Malignant Pertussis in the Young Infant: a Case Report. *Arch Dis Child* 97(suppl 2): A1-A539.
 168. Taffarel, P, Dr., G. Bonetto, Dr., y A. Haimovich, Dr. 2012. Coqueluche grave, evolución y exanguinotransfusión como tratamiento alternativo. Serie de casos. *Arch Argent Pediatr* 110(4): 323-337.
 169. Cruces, P, M. González, B. Maldonado, y K. Cruces. 2005. Coqueluche grave con hipertensión pulmonar tratado con exanguineotransfusión. *Rev Chil Pediatr* 76(5); 513-517.
 170. Paddock, CD, GN. Sanden, JD. Cherry, AA. Gal, C. Langston, KM, Tatti, KH. Wu, S. Goldsmith, PW. Greer, JL. Montague, MT. Eliason, RC. Holman, J. Guarner, WJ, Shieh, and SR. Zaki. 2008. Pathology and Pathogenesis of Fatal *Bordetella pertussis* Infection in Infants. *Clin Infect Dis* 47:328-38.
 171. Nieves, D, MD, J. Singh, MD, N. Ashouri, MD, T. McGuire, MD, FC. Adler-Shohet, MD, and AC. Arrieta, MD. 2011. Clinical and Laboratory Features of Pertussis in Infants at the Onset of a California Epidemic. *J Pediatr* 159:1044-6.
 172. Lupi, E, J. Sandoval, E. Chuquiure, A. Carrillo. 2006. El análisis del poder cardíaco “pulmonar” en hipertensión arterial pulmonar primaria y secundaria. Observaciones iniciales, su posible utilidad en la clínica. *Arc Cardiol Mex* 76(2): 140-150.
 173. Correa, RA, MV. Souza, JM. Silva, E. Viana, LC. Santos, JR. Lambertucci. 2011. Tratamento da hipertensão pulmonar esquistossomótica. *J bras pneumol* 37(2): 272-276.
 174. Rite, S, JA. Ruiz, J. Sanchez, MI. Molina, AM. Tello, S: Rite. 1999. Oxido nítrico inhalado en el tratamiento de la hipertensión pulmonar persistente del RN. *An Esp Pediatr* 51(2): 181-185.

175. Maderuelo, E, E. Sanz, ML, Franco, B. Bernardo, y M. Sanchez. 2005. Óxido nítrico inhalado como rescate en insuficiencia respiratoria del recién nacido inmaduro. *An Pediatr (Barc)* 62(1): 68-71.
176. Rowlands, H, AP. Goldman, K. Harrington, A. Karimova, J. Brierley, N. Cross. S. Skellett, and MJ. Peters. 2010. Impact of Rapid Leukodepletion on the Outcome of Severe Clinical Pertussis in Young Infants. *J Pediatrics* 126(4): e817-e827.
177. Deora, R. 2002. Differential Regulation of the *Bordetella bipA* Gene: Distinct Roles for Different BvgA Binding Sites. *J Bacteriol* 184(24): 6942-6951.
178. Astudillo, M, MSc, VE. Estrada, MSc, M. Fernández, BSc, y LA. Moreno, BSc. 2011. Infección por *Bordetella pertussis* en contactos domiciliarios de casos de tos ferina en el suroriente de la ciudad de Cali, Colombia 2006-2007. *Colomb Med* 42 (2): 184-90.
179. Segura del Pozo, J, JC. Samz, MJ. Gascón, E. Ramos, F. de Ory, y M. Fernández. 2002. Brote de tos ferina en una comunidad insuficientemente vacunada. *Med Clin (Barc)* 119(816): 601-4.
180. Van Esso, DL. 2003. Infección por *Bordetella pertussis*. Situación actual de la profilaxis antibiótica. *Vacunas* 4: 146-9.
181. Núñez, A. 2003. Síndrome pertusoide y *Moraxella catarrhalis*: problemas en el diagnóstico diferencial. *Rev Pediátrica d Atención Primaria* V(20): 132-133.
182. Kent, A, and PT. Heath. 2013. Pertussis. *Bacterial Infections*. 42(1): 8-10.
183. Cotter, PA, y JF. Miller. 2001. *Bordetella*, Principios de la patogénesis bacteriana. Ed. EA Groisman, p. 619-674. Academic Press, Ltd., Londres, Reino Unido.
184. Kerr, JR, y Matthews RC. 2000. *Bordetella pertussis* Infección: patogénesis, Diagnóstico, Manejo, y el Papel de la inmunidad protectora. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:77-88.
185. Guiso, N, P. Reinert. 2006. La Coqueluche: physiopathologie et immunologie. *mt pédiatrie* 9(3):155-159.
186. Decker, KB, TD. James, S. Stibitz and DM. Hinton. 2012. The *Bordetella*

- pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiology* 158:1665-1676.
187. Boursaux, C, and N. Guiso. 2000. Polymorphism of Repeated Regions of Pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect & Immun* 68(8): 4815-4817.
 188. Dunne, A, PJ. Ross, E. Pospisilova, J. Masin, A. Meaney, CE. Sutton, Y. Iwakura, J. Tschopp, P. Sebo, and KHG. Mills. 2010. Inflammasome Activation by Adenylate Cyclase Toxin Directs Th17 Responses and Protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 185:1711-1719.
 189. Subrini, O, AC. Sotomayor, A. Hessel, J. Spiaczka, E. Selwa, N. Sapay, R. Veneziano, J. Pansieri, J. Chopineau, D. Ladant, and A. Chenal. 2013. Characterization of a Membrane-active Peptide from the *Bordetella pertussis* CyaA Toxin. [Abstrac] *J Biol Chem* 288: 32585-32598.
 190. Martínez, Y, A. Delgado, L. Proenza, R. Fando. 2013. Método para la detección de la actividad dermonecrótica de cepas de *Bordetella pertussis* en el modelo de ratón lactante. *Rev CENIC. Cien Biol* 44(2).
 191. Millen, SH, OD. Schneider, WE. Miller, JJ. Monaco, AA, Weiss. 2013. Pertussis Toxin B-Pentamer Mediates Intercellular Transfer of Membrane Proteins and Lipids. *PLoS ONE* 8(8): e72885. Doi: 10.1371/journal.pone.0072885.
 192. Caro, V, A. Elomaa, D. Brun, J. Mertsola, Q. He, and N. Guiso. 2006. *Bordetella pertussis*, Finland and France. *Emerging Infectious Diseases*. 12(6): 987-989.
 193. Verma A, and DL. Quemaduras. 2007. Requirements for Assembly of PtlH with the Pertussis Toxin Transporter Apparatus of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 75 (5): 2297-2306.
 194. Williamson YM, H. Moura, D. Schieltz, J. Rees, AR. Woolfitt, JL. Pirkle, JS. Sampson, ML. Tondella, E. Ades, G. Carlone, and JR. Barr. 2010. Mass Spectrometric Analysis of Multiple Pertussis Toxins and Toxoids. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1(1): 1-9.
 195. Pizza, M, A. Bartoloni, A. Prugnola, S. Silvestr, and R. Rappuoli. 1988. Subunit S1 of pertussis toxin: mapping of the regions essential for ADP-

- ribosyltransferase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:7521-7525.
196. Falero A, L. Proenza, y R. Fando. 2013. Aislamiento y purificación de la toxina de *Bordetella pertussis*. Rev CENIC Cien Biol 44(1).
 197. Schneider, OD, AA. Weis, and WE. Miller. 2007. Pertussis Toxin Utilizes Proximal Components of the T-Cell Receptor Complex To Initiate Signal Transduction Events in T Cells. Infect Immun 75(8):4040.
 198. Mazar, J, and PA. Cotter. 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. Molecular Microbiologu 62 (3): 641-654.
 199. Henderson, MW, CS. Inatsuka, HJ. Amanda, CL. Williams, DJ. Benaron, GM. Donato, MC. Gray, EL. Hemlett, and PA. Cotter. 2012. Contribution of *Bordetella* Filamentous hemagglutinin and Adenylate Cyclase Toxin to Suppression and Evasion of Interleukin-17-Mediated Inflammation. Infect Immun 80 (6):2061.
 200. Loch, C. 2010. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. International Microbiology 2(3):137-144.
 201. Matsuzawa, T, A. Fukui, T. Kashimoto, K. Nagao, K. Oka, M. Miyake, and Y. Horiguchi. 2004. *Bordetella* Dermonecrotic Toxin Undergoes Proteolytic Processing to Be Translocated from a Dynamin-related Endosome into the Cytoplasm in an Acidification-independent Manner. J Biol Chem 279: 2866-2872.
 202. Marzouqi, I, P. Richmond, S. Fry, J. Wetherall, and T. Mukkur. 2010. Development of improved vaccines against whooping cough: Current status. Human vaccines, 6(7):4163-4171.
 203. Basler, M, O. Knapp, J. Masin, R. Fiser, E. Maier, R. Benz, P. Sebo, and R. Osicka. 2007. Segments Crucial for membrane Translocation and Pore-forming Activity of *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin. J. Biol. Chem 282: 12419-12429.
 204. Vojtova, J, M. Basler, R. Osicka, O. Knapp, E. Maier, J. Cerny, O. Benada, R. Benz, and P. Sebo. 2009. Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella* adenylate cyclase toxin. The FASEB Journal 23(9):2831-2843.

205. Register, KB, PhD, N. Sukumar, PhD, EL. Palavecino, MD, BK. Rubin, MEngr, MD, MBA, and R. Deora, PhD. 2012. *Bordetella bronchiseptica* in a Pediatric Cystic Fibrosis Patient: Possible Transmission from a Household Cat. *Zoonoses Public Health* 59(4):246-250.
206. Masin, J, R. Fiser, I. Linhartova, R. Osicka, L. Bumba, EL. Hewlett, R. Benz, y P. Sebo. 2013. Differences in Purinergic Amplification of Osmotic Cell Lysis by the Pore-Forming RTX Toxins *Bordetella pertussis* CyaA and *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA: the Role of Pore Size [Abstract] *Infect Immun* 81(12): 4571-4582.
207. Zaretzky, FR. MC. Gray, and EL. Hewlett. 2002. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mole Microb* 45(6):1589-1598.
208. Karts, JC, R. Barker, U.Devi, MJ. Swann, M. Davi, SJ. Roser, D. Ladant, and A. Chenal. 2012. Identification of a Region That Assists Membrane Insertion and Translocation of the Catalytic Domain of *Bordetella pertussis* CyaA Toxin. *J Biol Chem* 287: 9200-9212.
209. Holubova, J, J. Kamanová, J. Jelinek, J. Tomala, J. Masin, M. Kosova, O. Stanek, L. Bumba, J. Michalek, M. Kovar, and P. Sebo. 2012. Delivery of Large Heterologous Polypeptides across the Cytoplasmic Membrane of Antigen-Presenting Cells by the *Bordetella* RTX Hemolysin Moiety Lacking the Adenylyl Cyclase Doman. *Infect Immun* 80(3):1181.
210. Eby, JC, MC. Gray, AR. Mangan, GM. Donato, and EL. Hewlett. 2012. Role of CD11b/CD18 in the Process of Intoxication by the Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 80(2):850.
211. Raymond, WT, AK. Lau, ML. Sill, SA. Halperin, PV. Caesele, F. Jamieson and E. Martin. 2004. Polymorphisms of the Fimbria *fim3* Gene of *Bordetella pertussis* Strains Isolated in Canada. *J Clin Microbiol* 42(11):5364-5367.
212. Gamelas, J, DJ. Philpott, MA. Nahori, M. Jéhanno, J. Fritz, LL. Bourhis, J. Viala, J. Pierre, M. Giovannini, J. Bertin, M. Lepoivre, D. Mengin, PJ. Sansonetti, y SE. Girardin. 2005. Murine Nod1 but not is human ortologue

- mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. EMBO reports 6, 1201-1207.
- 213.** Aussel, L, R. Chaby, K. Le Blay, J. Kelly, P. Thibault, MB. Perry, and M. Caroff. 2000. Chemical and serological characterization of the *Bordetella hinzii* lipopolysaccharides. FEBS Letters 485:40-46.
- 214.** Caroff, M, JR. Brisson, A. Martin, and D. Karibian. 2000. Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. FEBS Letters 477(1): 8-14.
- 215.** Kirimanjeswara, GS, Mann PB, Harvill ET. 2005. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections. Infect Immun 71:1719-1724.
- 216.** Inatsuka, CS, Q. Xu, I. Vujkovic-Cvijin, A. Wong, DS. Stibitz, JF. Miller, and PA. Cotter. 2010. Pertactin Required for *Bordetella* Species To Resist Neutrophil-Mediated Clearance. Infect Immun 78(7):2901.
- 217.** Chávez, A, P. David, X. Norambuena, C. Mendoza, y M. Jodorkovsk y. 2004. Neurological Clinical manifestations associated to *Mycoplasma pneumoniae* infection. Rev Chil Infec 21 (3): 223-228.
- 218.** Gómez, N, MG. García, G. Álvarez, L. Villalobos, I. Fonseca, MA. Cano, E. Vázquez, A. López. 2011. Tos Ferina y Síndrome Coqueluchoide en Niños Menores de 1 Año de Edad: factores de Riesgo Asociada a Mortalidad. Estudio Transversal Descriptivo de 48 Casos. Bol Clin Hosp Infant Edo Son 28(1):2-6.
- 219.** Grupo de Expertos en Vacunación contra Tos ferina. 2011. Consenso para el Diagnóstico clínico y microbiológico y la prevención de la infección por *Bordetella pertussis*. Salud Publica Mex 53:57-65.
- 220.** Pérez, C, L. Proenza, y R. Fando. 2012. La vacunación contra pertussis: Estado actual y perspectivas futuras. Rev CENIC Cien Biol 43(1): 29-36.
- 221.** Sloan LM, MK. Hopkins, PS. Mitchell, EA. Vetter, JE. Rosenblatt, WD. Scott, FR. Cockerill, and R. Patel. 2002. Multiplex LightCycler PCR Assay for Detection and Differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in Nasopharyngeal Specimens. J Clin Microbiol 40(1): 96-100.
- 222.** Cloud, JL, W. Hymas, and C. Carroll. 2002. Impact of Nasopharyngeal Swab Types on Detection of *Bordetella pertussis* by PCR and Culture. J

- Clin Microbiol 40(10): 38-38.
223. Loeffelholz, MJ, CJ. Thompson, KS. Long, and MJR. Gilchrist. 1999. Comparison of PCR, Culture, and Direct Fluorescent-Antibody Testing for Detection of *Bordetella pertussis*. J Clin Microb 37(9): 2872-2876.
 224. Acumedia Manufactures, Inc. Charcoal Agar. PI 7586, Rev 4, February 2011.
 225. Rojas, F. 2009. Reacción en Cadena de La Polimerasa (PCR) par *Bordetella pertussis*. Instituto Nacional de Salud. Proceso Redes en Salud Pública. INT-R01.001.5030.033 Versión No. 0. México, DF.
 226. Xu, Y, HQ. Yang, S. Zhang. 2010. Triplex real-time PCR assay for detection and differentiations of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. [Abstract]. APMIS 118(9):685-691 doi: 10.1111/j.1600-0463.2010 02644.
 227. Tinoco, VC. 1983. “Perfil inmunológico del recién nacido en el área metropolitana de Monterrey”. Tesis Mtro. Cien. Monterrey, N. L. Microbiología clínica, Fac. Med. U.A.N.L. 10p.
 228. Tinoco, R. 2012. Inmunología 1. Manual de Prácticas. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH. pag. 5-18.
 229. European Center for Disease Prevention and Control (CDC). 2012. External quality assurance scheme on PCR for *Bordetella pertussis*. On Bhalf of the EU-Labnet network Stockholm ECDC; 2012.
 230. Public Health Agency of Cannáda (PHAC). 2014. An Advisory Committee Statement (ACS) National Advisory Committee on Immunization (NACI). Update on Pertussis Vaccination in Pregnancy.] ISBN: 978-1-100-23146-4.
 231. Centers for Disease Control and Prevention. Recommended antimicrobial agents for treatment and post exposure prophylaxis of pertussis. 2005. CDC guidelines. MMWR 54(RR-14):1-16.
 232. Dodhia, H, NS. Crowcroft, JC. Bramley, and E. Miller. 2002. UK guidelines for use of erythromycin chemoprophylaxis in persons exposed to pertussis. Jor of Public health Medicine 24(3): 200-206.
 233. Hurtado, A. JM. Mayoral. D. Falcón, L. Merino, M. Sánchez e I. Obando.

2012. Características epidemiológicas y clínicas de la tos ferina en los lactantes hospitalizados en Sevilla durante el periodo 2007-2011.
- 234.** State Government of Victoria. 2005. Department of Human Services. The Blue Book. Guidelines for the Control of Infectious Diseases 2005. Copyright of Victoria. Pág. 155. Melbourne Victoria.
- 235.** Grupo de Trabajo sobre Tos ferina. 2001. Tos ferina en España: Aproximación a la incidencia de la enfermedad y a los efectos de la vacunación en adolescentes y adultos. Pág. 4- 25.
- 236.** Organización Mundial de la Salud (OMS), UNICEF, Banco Mundial. 2010. Vacunas e inmunización: situación mundial, tercera edición. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.
- 237.** Instituto Nacional de Salud (Colombia). 2013. Folleto, toma de muestra nasofaríngea para el diagnóstico de tos ferina.
- 238.** Altunauji, SM, RH. Kukuruzovic, NC. Curtis, and J. Massie. 2013. Antibióticos para la tos ferina (pertussis). [Revision Cochrane traduced]. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013 Issue 3. Art. N.: CD004404. DOI: 10.1002/14651858,CD004404.
- 239.** Byrne, P, P. McGuirk, S. Todryk, and KHG. Mills. 2004. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. Eur J Immunol 34:2579-2588.
- 240.** Wilson, JW, MD. Estes, Lynn L. PharmD. 2008. Mayo Clinic Antimicrobial Therapy. Eds. Quick Guide. Pág. 121. Drive, Florence.
- 241.** Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos InDRE (México). 2012. Procedimientos Básicos en la Toma de Muestras Biológicas para Diagnóstico. México. D.F.
- 242.** World Health Organization. 2010. Weekly epidemiological record *Revelé épidémiologique hebdomadaire*. WHO 85: 385-400.
- 243.** Granström, G, B. Wretkind, CR: Salenstedt and M. Granström. 1988. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. J Clin Microbiol 26(9):1818.

244. Pérez, C, LL. Proenza, and R. Fando. 2011. Epidemiology, reemergence of pertussis and vaccine development in Latin America: an overview. Rev CENIC Cien Biol 42(3): 153-158.
245. Romano, F, CB. Quintana, ML. Daher, L. Bogni, P. Thumas, M. Moreschi, A. Pérez, JM. Maravilla, J. Tlechea, M. Batistesa, G. Gallardo, P. Lamy, y A. Gentile. 2002. Brote de coqueluche en Esquel. Arch argent Pediatr 100(1): 11-18.
246. Heinz, C, W. von König, MD. 2005. Use of Antibiotics in the Prevention and Treatment of Pertussis. Pediatr Infect Dis J 24: S66-S68.
247. Instituto Nacional de Salud (México). 2011. Manual para la Identificación de *Bordetella* spp. Redes en Salud Pública. Referencia en Salud Pública. Versión 01. MNL-R01.001.5030-015.
248. Subsecretaría de Salud Pública de Chile. 2011. Vigilancia Epidemiológica y Medidas de Control de Coqueluche (Tos Ferina). Departamento de Epidemiología. Documento online. VSG/MGO/DRA-IDP/BGG. 05 de Julio del 2011.
249. Ministerio de Salud de Costa Rica. 2009. Epidemiología de prevención y control de la tos ferina en Costa Rica. Pag. 10-30.
250. Sistema de Vigilancia Epidemiológica (DGE). 2005. Enfermedades Prevenibles por Vacunación. Manuales Simplificados. Epidemiología.
251. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Departamento de Bacteriología. 2008. *Bordetella pertussis* (Bp). Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas. Métodos de Laboratorio para Aislamiento e Identificación de *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. Pag. 31-36. México D.F. Salud. InDRE.
252. Garrity, GM, JA. Bell and TG. Lilburn. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. Pag. 68. Release 5.0 May 2004.
253. Langley, JM, AH, Scott, FD, Boucher, and B. Smith. 2004. Azitromycin Is as effective as and better Tolerated Than Erythromycin Estolate for the treatment of Pertussis. Pediatrics 114(1): e96- e101.

254. Heinz, C, W. von König, MD. 2005. Use of Antibiotics in the Prevention and Treatment of Pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 24: S66-S68.
255. Patole, S, S. Rao, and D. Doherty. 2005. Erythromycin as a prokinetic agent in preterm neonates: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 90:F301-F306.
256. Maheshwai, N. 2007. Are young infants treated with erythromycin at risk for developing hypertrophic pyloric stenosis? *Arch Dis Child* 92:271-3.
257. Britton, P, and CA. Jones. 2012. Pertussis prophylaxis. *Aust Prescr* 35 (3): 82-4.
258. Albán, AM, FE. Arcos, FA. Barrios, JM. Vásquez, y JA. Mesa. 2012. Tos ferina neonatal, una enfermedad emergente.
259. Martinez, SM, CA. Kemper, MD, D. Haiduven, RN, PhD, S. Cody, MD, and SC. Deresinski, MD. 2001. Azithromycin Prophylaxis During a hospitalwide Outbreak of a Pertussis-Like Illness. *Infec Cont and Hosp Epidemiol* 22 (12): 781- 783.
260. Srinivasan, R, TH. Yeo. 2005. Are newer macrólidos effective in eradicating carriage of pertussis? *Arch Dis Child* 90:322-324.
261. Almaraz, GS, CM. Canós, FC. Rodilla, C. Ferrer. 1995. Nuevos Macrólidos ¿Superan a Eritromicina? *Farm Hosp* 19(5): 259-265.
262. Florax, A, K. Ehlert, K. Becker, J. Vormoor, and AH. Groll. 2006. *Bordetella pertussis* respiratory infection following hematopoietic Stem cell transplantation: time for universal vaccination? *Bone Marrow Transplantation* 38:639-640.
263. Graf, J, F. Stein. 2006. Traqueítis en el paciente pediátrico. *Pediatr Infect Dis* 17: 11-3.
264. Higgs, R, SC. Higgins, PJ. Ross, and KHG. Mills. 2012. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunology* doi: 10.1038.
265. Fry, N, O. Tzivra, YL. Ting, A. McNiff, N. Doshi, P. Maple, NS. Crowcroft, E. Miller, RC. George, y TG. Harrison. 2004. Diagnóstico de Laboratorio de las infecciones de tos ferina: el papel de la PCR y serología.
266. Tucortte, ML, D. Martin, BR. Brodeur, and MS. Peppler. 1997. Tn5-

- induced lipopolysaccharide mutations in *Bordetella pertussis* that affect outer membrane function. *Microbiology* 143:2381-2394.
267. Cherry, JD. 1999. Pertussis in the Preantibiotic and Prevaccine Era, with Emphasis on adult. Pertussis. *CID* 28: s107-s111.
 268. Pérez, ML. 2007. “Caracterización del Fenotipo Infectante de *Bordetella pertussis*. Microbiología celular e inmunoproteómica. Aplicadas al estudio de su interacción con el hospedador” Tesis Dr. Cien. Argentina, Univ. Nacional de la Plata, Fac. Cien. Agr.151p.
 269. Carletti, K, G. Dayan, F. Kataife, C. Man, R. Sanguinetti, A. Tarlovsky, y A. Gentile, Dres. 1998. Reactogenicidad de la vacuna DPT acelular y celular. *Arch Pediatr* 96:95-102.
 270. Braga, PC. 2001. Adhesión bacteriana a células humanas. Vía A, Gherardesca (Pisa) Italy. ISBN 88-87398-23-2 pág. 51.
 271. NORMA oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño. 8 de abril del 2014.
 272. NORMA oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica. DOF: 19/02/2013.
 273. NORMA oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos DOF: 26/10/2012.
 274. NORMA oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades, Aplicación de Vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano.
 275. Scott, HM, DI. Bernstein, B. Connelly, JI. Ward, S. Chang, and AA. Weiss. 2004. Antidoty-Mediated Neutralization of Pertussis Toxin-Induced Mitogenicity of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Infect Immun* 72(1):615. DOI: 10.1128/IAI.72.1.615-620.2004.
 276. Hildmann, C, M. Ninkovic, R. Dietrich, D. Wegener, D. Riester, T. Zimmermann, OM, Birch, C. Bernegger, P. Loidl, and A. Schwienhorst. 2004. A New Amidohydrolase from *Bordetella* or *Alcaligenes* Strain FB188 with Similarities to Histone Deacetylases. *Jor Bacter* 186(8): 2328-2339.

277. Anderton, TL, DJ. Maskell, and A. Preston. 2004. Ciliostasis is a key early event during colonization of canine tracheal tissue by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology* 150: 2843-2855. DOI: 10.1099/mic.0.27283-0.
278. Tendencia de las enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica en el Perú, al 14 de junio de 2012. *Bol Epidemiol (Limas)*. 2012; 21(28): 453-457.
279. World Health Organization. 2003. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. *Vaccines and Biological*.
280. Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Morbidity and Mortality Weekly Report. *Weekly* 6(28): 517- 543.
281. Goodnow, RA. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews*, 44(4): 722-738.
282. Donato, GM, HJ. Hsia, CS. Green, and EL. Hewlitt. 2005. Adenylate Cyclase Toxin (ACT) from *Bordetella hinzii*: characterization and Differences from ACT of *Bordetella pertussis*. *Jor Bacteriology* 187(22): 7579-7588.
283. Cofré, J. 2003. Coqueluche en adultos y adolescentes. *Rev Chil Infect* 20(1):S52-S58.
284. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). 2014. Lineamientos para la vigilancia de tos-ferina y síndrome coqueluchoide por laboratorio. DGE-InDRE-RNLSP. 1: 1:88.
285. Ryan, M. 1997. *Bordetella pertussis* infección respiratoria en niños se asocia con la activación preferencial de células cooperadoras tipo 1T. *Infect. Dis.* 175. 1246-1250.
286. Mascart, F. 2003. *Bordetella pertussis* Infection in 2-month-old infants promotes type 1T cell responses. *J. Immun* 170: 1504-1509.
287. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). 2013. Lineamientos para la vigilancia de tos-ferina y síndrome coqueluchoide por laboratorio. DGE-InDRE-RNLSP. 1:1:88.
288. McGuirk, P, BP. Mahon, F. Griffin, and KH. Mills. 1998. Compartmentation

- of T cell responses following respiratory infection with *Bordetella pertussis*: hyporesponsiveness of lung T cells is associated with modulated expression of the co-stimulatory molecule CD28. Eur. J. Immun 28:153-163.
- 289.** Dunne, PJ, B. Moran, RC. Cummins & Mills. 2009. KH CD11c + CD8 α + dendritic cells promote protective immunity to respiratory infection with *Bordetella pertussis*. J Immun 183: 400-410.
- 290.** Dunne, A, R.J. Pádraig, E. Pospisilova, J. Masin, A. Meaney, CE. Sutton, Y. Iwakura, J. Tschopp, P. Sebo, and HG. Kingston. 2010. Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. J. Immun 185: 1711-1719.
- 291.** Leef, M, KL. Elkins, J. Barbic, RD. Shahin. 2000. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4 (+) T cells for key functions other than specific antibody production. J Exp Med 191:1841-1852.
- 292.** Quinello, C. W. Quinello, M. Carneiro, & P. Palmeira. 2010. Passive acquisition of protective antibodies reactive with *Bordetella pertussis* in newborns via placental transfer and breast-feeding. Scand. J Immun 72, 66–73.
- 293.** Zhang, X, LS. Weyrich, JS. Lavine, AT. Karanikas, and ET. Harvill. 2012. Lack of Cross-protection against *Bordetella holmesii* after Pertussis Vaccination Emerg Infect Dis 18(11): 1771-1779.
- 294.** Ryan, M, G. Murphy, L. Gothefors, L. Nilsson, J. Storsaeter, y KH. Mills. 1997. *Bordetella pertussis* respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. J Infect Dis. 175:1246-1250.
- 295.** Guiso, N, G. Berbers, NK. Fry, Q. He, M. Riffelmann, CH. Wirsing von König. 2011. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30:307-312.
- 296.** Esteves, A, CM. Gómez, M. Esparza, VLR. López. 2012. Vacunación de refuerzo contra *Bordetella pertussis* en mujeres embarazadas. Ginecol

- Obstet Mex 80(5): 341-347.
- 297.** Melker, HE, FGA. Versteegh, MAE. Conyn-van Spaendonck, LH. Elvers, GAM. Erers, A, Zee, and JFP. Schellekens. 2000. Specificity and sensitive of High Levels of Immunoglobulin G Antibodies against Pertussis Toxin in a Single Serum Sample for Diagnosis of Infection with *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 38(2): 800-806.
- 298.** Mills, KH, A. Barnard, J. Watkins & K. Redhead. 1993. Cell-mediated immunity to Bordetella pertussis: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. Infect. Immun 61:399-410.
- 299.** Pérez, ML. 2007. “*Caracterización del fenotipo infectante de Bordetella pertussis. Microbiología celular e inmunoproteómica aplicadas al estudio de su interacción con el hospedador*”. Tesis Dr. Cien. Argentina, Univ. Nacional de la Plata, Fac. Cien. Agr. 151p.
- 300.** Cano, MA, Durazo, MA. Dorame R. Gómez N. 2012. Abordaje Diagnóstico del Síndrome Coqueluchoide y Tosferina. Biol Clin Hosp Infant Edo Son 29(2): 85-87.
- 301.** Salgado, H. 2001. Manual de Inmunización Humana. Bogotá: Editora Médica Colombiana S.A.
- 302.** Ulloa, R. 2008. Estrategias actuales de vacunación contr tos ferina en niños y adultos. Act Pediátr costarric 20(2):81-87.
- 303.** Octavia, S, RP. Maharjan, V. Sintchenko, G. Stevenson, PR. Reeves, GL. Gilbert, and R. Lan. 2010. Insigth into Evolution of *Bordetella pertussis* from Comparative Genomic Analysis: Evidence of Vaccine-Driven Selection. Mol Biol Evol 28(1): 707-715.
- 304.** Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). 2012. Lineamientos para la vigilancia de tos-ferina y síndrome coqueluchoide por laboratorio. DGE-InDRE-RNLSP. 1:1:88.
- 305.** Andrade, AA, G. Martínez, y AC. Ranero. 2011. Aspectos genómicos de *Bordetella pertussis* y el camino hacia el nuevo estándar de oro en el diagnóstico de tos ferina. Rev Enf Inf Ped 24(96): 139-146.
- 306.** Crespo, MD, Escribiano E. Lorente S. Marín A. Palomar JJ. Robles P. Sainz C. Riquelme E. Martínez M. y Ferrer F. 2010. Recogida, transporte

- y conservación de muestras. Laboratorio de Microbiología. Pag. 22
- 307.** Álvarez, HE, y E. Pérez. 2009. Utilidad Clínica de la tabla 2x2. Rev Eviden Invest Clin 2(1):22-27.
- 308.** Perret, C. 2006. Vacuna anti-pertussis para uso en adolescentes y adultos. Rev Chil Infect. 23(3):257-260.
- 309.** Romero, R. 2007. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Raúl Romero Cabello. – 3ª ed.- México- Pág. 903. Editorial Médica Panamericana. ISBN 978-968-7988-48-1.
- 310.** Pumarola, A, A. Rodríguez-Torres, JA. García-Rodríguez, G. Piédrola-Angulo. Microbiología y Parasitología Médica. 2º eds. Salvat Editores, S. A. 490p.
- 311.** Jansen DL, GC. Gray, SD. Putnam, F, Lynn, BD. Meade. 1997. Evaluation of pertussis in U.S. marine corps trainees. Clin Infect Dis 25:1099-107.
- 312.** Gaillard, ME, D. Bottero, CE. Castuma, LA. Basile, and D. Hozbor. 2011. Laboratory Adaptation of *Bordetella pertussis* Is Associated with the Loss of Type Three Secretion System Functionality. Infect and Immunity 79(9): 3677-3682.
- 313.** Hallander, H, M. Andersson, L. Gustafsson, M. Ljungman, and E. Netterlid. 2009. Seroprevalence of pertussis antitoxin (anti-PT) in Sweden before and 10 years after the introduction of a universal childhood pertussis vaccination program. J Completion APMIS 117:912-922.
- 314.** Guermonprez, P, N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi, N. Guiso, D. Ladant, and C. Leclerc. 2001. The Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis* Binds to Target Cells via the $\alpha\beta_2$ Integrin (CD11b/CD18). J Exp Med 193(9): 1035- 1044.
- 315.** Serres, G, R. Shadmani, B. Duval, N. Boulianne, P. Déry, M. Douville, L. Rochette, and SA. Halperin. 2000. Morbidity of Pertussis in Adolescents and Adults. J Infect Diseases 182: 174-9.
- 316.** Hallander, HO. 1999. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. Clin Infect Dis 28:S99-106.
- 317.** Müller, FMC, JE. Huppe, CH. Wirsing von König. 1997. Laboratory

- diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. J Clin Microbiol 35: 2435-43.
318. Ulloa R, D. Hozbor, ML. Avila, J. Caro, CH. Wirsing, T. Tan, and S. Plotkin. 2010. The Global Pertussis Latin America Meeting, Costa Rica, 5-6 December, 2008. Human Vaccines 6(11): 876-880.
319. Quinn, PJ, and DK. Markey. 2002. Veterinary microbiology and microbial Disease. Blackwell, Osney Mead, UK. Second Edition.
320. Farrell DJ, G. Dagard, and TKS, Mukkur. 1999. Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its application in diagnosis of pertussis in nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia. J Clin Microbiol 37:606-10.
321. Enfermedades proliferativas de las células del sistema inmune. Capitulo 40. Pag. 420.
322. European Center for Disease Prevention and Control. 2012. Guidance and Protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. Stockholm ECDC; 2012.
323. Spears, PA, LM. Temple, DM. Miyamoto, DJ. Maskell, and PE. Orndorff. 2003. Unexpected Similarities between *Bordetella avium* and Other Pathogenic *Bordetellae*. Infect Immun 71(5): 2591-2597.
324. Ledermann, WD, 2004. Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. Rev Chil Infect; 21(3):241-246.
325. Comité Asesor de Vacunas. 2014. Vacuna Tos ferina. Vacunas.. Una a Una. Pág. 1-3.

11.1. REFERENCIAS WEB:

326. Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2012. Aviso epidemiológico de Tos ferina: Incremento de casos de tos ferina en América. CoNaVe/2012/02/TOS FERINA. 06/julio/2012. [Online]: [Citado 2013-04-07]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/vigilanciaepidem/alerta_tosferina_060712.pdf
327. Organización Mundial de la Salud. Vacunas antitosferínicas: Documento

- de posición de la OMS. 2010. No. 40(85): 385–400. [Online]: [Citado 2013-02-19]. Disponible en: <http://www.who.int/wer>
- 328.** World Health Organization. 2011. Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos. La tos ferina. [online]: [Citado 2013-02-19]. Disponible en: <http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/#>
- 329.** Medellín. Ciudad saludable. 2013. Tos Ferina. Boletín Epidemiológico Boletín número 1. [online]: [Citado 2013-02-19]. Disponible en: <http://www.medellin.gov.co/irj/go/km/docs/wpccontent/Sites/Subportal%20del%20Ciudadano/Salud/Secciones/Indicadores%20y%20Estad%3%ADsticas/Documentos/2013/Bolet%3%ADn%20Epidemiol%3%B3gico%202013/Bolet%3%ADn%20Medell%3%ADn,%20ciudad%20saludable%20N%C2%B01%20-%202013.pdf>
- 330.** Organización Panamericana de la Salud. 2012. Alerta Epidemiológica. Tos Ferina (Coqueluche) 2 de marzo 2012. [online] [Citado 2013-06-15] Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=17052&Itemid
- 331.** Ibarra, JM, LR. Garrido y V. Cárdenas *et al.* Cobertura con la vacuna DPT en Oaxaca, México. [Online] [Citado 2014-04-06] Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v10n4/art2.pdf>
- 332.** Miyaji, Y, N. Otsuka, H. Toyozumi, K. Shibayama, and K. Kamachi. 2013. Genetic Analysis of *Bordetella pertussis* Isolates from the 2008-2010 in Japan. . [online]. [Citado: 2014-03-11]. Disponible en: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0077165>
- 333.** Herrera JF, Dr. A. Vargas, Dr. M. Campos, Dra. JP. Marín, Dr. T. Moya, Dra. Y ML. Herrera, Dr. Inmunoflorescencia por *Bordetella pertussis*. 2002 Hospital Nacional de Niños. Rev Méd Hosp Nac (Costa Rica) 37 (1-2): 33-39 [online]. [Citado 2014-02-19]. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462002000100006&lng=es&nrm=iso
- 334.** DGE (México). 2010. Alerta Epidemiológica: Situación Epidemiológica de

- Tos Ferina y Síndrome Coqueluchoide. DGE/2010/15/Tos Ferina. [online]. [Citado 2013-10-22]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/41190615/ALERTA-TOSFERINA-09-09-2010>
- 335.** Garnier, JM. 2006. Coqueluche (78). Faculté Médcecine de Marseille. Santé et Environnement-Maladies Transmissibles. [online] [Citado 2012-09-10] Disponible en: <http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/Comite-etudes/ItemsENC/sitelocal/disciplines/niveaudiscipline/niveaumodule/Item78/leconimprim.pdf>
- 336.** Comisión de Epidemiología de Venezuela. 2012. Alerta Epidemiológica N° 234. Tos ferina y síndrome “coqueluchoide” una enfermedad reemergente en Venezuela. Red de Sociedades Científicas Médicas Venezolanas. 20 de mayo de 2012 [online] [Citado 2012-06-06] Disponible en: http://www.rscmv.org.ve/pdf/ALERTA_234.pdf
- 337.** Emerging Infectious Diseases (CDC). Etymologia *Bordetella pertussis*. 2010 Vol 16, No. 8 [Online]. [Citado 2013-02-02] Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/8/pdfs/et-1608.pdf>
- 338.** Ministerio de Salud de Chile. 2012. Unidad de Vigilancia. Departamento de Epidemiológica. Informe Situación Epidemiológica de Coqueluche. Semana 1 al 21 de 2012. . [Online]: [Citado 2013-08-09]. Disponible en: http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Coqueluche/Tos_SE292012.pdf
- 339.** Ministerio de Salud de Argentina. 2012. Boletín Integrado de Vigilancia. Secretaría de Promoción y programas sanitarios. N° 130-SE 30 julio de 2012. Argentina. [Online]: [Citado 2013-08-09]. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/BoletinIntegradoDeVigilanciaVersion_N130-SE30.pdf
- 340.** California Department of Public Health. 2011. *B. parapertussis* infection: Public Health Recommendations. [Online]: [Citado 2013-04-09]. Disponible en: <http://www.cdph.ca.gov/HealthInfo/discond/Documents/BParaPertussisInfectionPublicHealthRecommendations201107.pdf>

- 341.** Vigilancia en Salud. 2012. Situación Epidemiológica Internacional. ISSN 1028-4346. [online] [Citado 2014-04-05]. Disponible en: <http://files.sld.cu/vigilancia/files/2013/01/sei281212resumenanual.pdf>
- 342.** Cherry, JD, MSc, R. Harrison MD, JS. Bradley MD, P. Weintrub MD, S. Lehman MD, S. Duthie MD, and WH. Mason MD, MPH. 2011. Pertussis in Young Infants-Guidance for Clinicians. [online] [Citado 2012-09-10] Disponible en: http://cchealth.org/pertussis/pdf/pertussis_in_young_infants_guidance_for_clinicians.pdf
- 343.** Finer, N, y KJ. Barrington. 2009. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. Copyright 2009. Published by John Wiley & Sons, Ltd. [online] [Citado 2013-02-07] Disponible en: <http://www.update-software.com/pdf/CD000399.pdf>
- 344.** Ministerio de Salud de Costa Rica. 2012. Boletín de Vigilancia De la Salud. Semana Epidemiológica #8 a 18. Documento [online] [Citado 2013-09-27] Disponible en: http://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/inicio-vigilancia-salud-boletines-ms/doc_download/1427-boletin-vigilancia-de-la-salud-semana-8-a-18-de-2012
- 345.** Ministerio de Salud de Perú. 2012. Alerta Epidemiológica. Brote de Tos ferina en el país. Código: AE-DEBE N° 003-12. [online] [Citado 2013-03-02] Disponible en: <http://www.inr.gob.pe/transparencia/Epidemiolog%C3%ADa/alertas%20epidemiologicas/ALERTA%20N%C2%BA%2003%20BROTE%20DE%20TOS%20FERINA.pdf>
- 346.** Washington State Department of Health. 2013. Weekly pertussis update for Washington State. [online]: [Citado 2013-04-28] Disponible en: <http://www.doh.wa.gov/Portals/1/Documents/Pubs/348-254-PertussisUpdate.pdf>
- 347.** Instituto Nacional de Salud (Colombia). 2011. Boletín Epidemiológico de la Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Semana 52, diciembre de 2011. [online] [Citado 2012-07-11] Disponible en:

http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2011%20Boletin%20epidemiologico_Semana%2052.pdf

- 348.** Ministerio de Salud de Chile. Unidad de Vigilancia. Departamento de Epidemiológica. Informe de Coqueluche año 2011. [online] [Citado 2013-04-10] Disponible en: http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Coqueluche/Tos_Final_2011.pdf
- 349.** Asociación Española de Pediatría. 2012. Tos ferina. Comité Asesor de Vacunas. [online] [Citado 2013-09-02] Disponible en: <http://vacunasaep.org/profesionales/enfermedades/tos-ferina>
- 350.** Universidad Nacional Autónoma de México. 2013. Departamento de Microbiología y Parasitología. Glosario. [Online]: [Citado 2014-03-27]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html>
- 351.** Informativo del Sur de Jalisco. 2009. En Michoacán hay brote de tos ferina. [online] [Citado 2014-04-05] Disponible en: <http://www.periodicoelsur.com/noticia.aspx?idnoticia=40616>
- 352.** El Universal. 2007. Declara Costa Rica emergencia por tosferina En Michoacán hay brote de tos ferina. [online] [Citado 2011-03-05] Disponible en: <http://www.eluniversal.com.mx/notas/409538.html>
- 353.** Organización Panamericana de la Salud. Alerta Epidemiológica. Tos Ferina (Coqueluche) 16 de noviembre 2012. [online] [Citado 2013-05-20] Disponible en http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19325&Itemid=&lang=es
- 354.** World Health Organization. 2013. Reported measles cases and incidence rates by HWO Member States 2012, 2013 as of 11 noviembre 2013. [online] Disponible en: http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/measlesreportedcasesbycountry.pdf
- 355.** Ministerio de Salud de Argentina. 2011. Vigilancia de Coqueluche. Alerta Epidemiológica. 2011 [online].

356. CeNSIA. 2010. Panorama Epidemiológico de las enfermedades prevenibles por vacunación. México 2010. [online]: [Citado 2013-03-09] Disponible en: http://www.censia.salud.gob.mx/descargas/vacunacion/2010/2.5_Parorama_EPV.pdf
357. Fundación Panamericana de la Salud y Educación (PAHEF). Hoja de Datos. Día Latinoamericano de la Lucha contra la Pertussis. 2012.
358. Vacunas. 2013. Definiciones de Vacunología. [Online]: [Citado 2014-06-22]. Disponible en: http://www.vacunas.org/index.php?option=com_content&task=view&id=739&Itemid=0&limit=1&limitstart=4
359. Molina, J, Dr. 2011. Tos Ferina. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM. [Online] [Citado 2013-10-23] Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tosferina.html>
360. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. *Bordetella hinzii* in Rodents, Southeast Asia. 19(3). ISSN: 1080-6059 [online]: [Citado 2014-03-27]. Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/3/pdfs/12-0987.pdf>
361. Liphaut, B, MI. Goncalves, TR. Marques. 2008. La tos ferina: epidemiología y control. Boletín Epidemiológico Paulista. 53(5) ISSN 1806-4272 [Online] [Citado 2012-01-27] Disponible en: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa53_coqueluche.htm
362. Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, D.C. 2008. Manual para toma de muestras para análisis microbiológico. Dirección de Salud Pública. Pág. 30-31. [Online]: [Citado 2013-09-10]. Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/Manual%20Toma%20Muestras.pdf>
363. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. Tomando un espécimen clínico de hisopado nasofaríngeo [Online]: [Citado 2012-03-27]. Disponible en: <http://www.youtube.com/watch?v=PyjEf1rgVvo>

- 364.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. Tomando un espécimen clínico de aspirado nasofaríngeo. [Online]: [Citado 2013-03-27]. Disponible en: http://www.youtube.com/watch?v=7BxEHCrXj_M
- 365.** Beltrán, S. Situación Actual Pertussis o Tosferina en Colombia. [online]. [Citado 2014-04-07] Disponible en: http://www.acin.org/acin/new/Portals/0/Alerta_Pertussis_Colombia.pdf
- 366.** Instituto Nacional de Salud (Colombia). 2013. Protocolo de Vigilancia y Control de la Tos Ferina. PRO-R02, 0000-013. [Online]. [Citado: 2014-27-01]. Disponible en: <http://www.ipsunipamplona.com/es/images/notas/PDF/TOS%20FERINA.pdf>
- 367.** PAHO fondation. 2012. Día Latino de la Lucha contra le Pertussis. [Online]. [Citado 2014-08-19]. Disponible en: <http://www.pahofoundation.org/es/2012/319-america-latina-sin-pertussis.html>
- 368.** América Latina sin Pertussis. [Online]. [Citado: 2014- 07-19]. Disponible en: <http://www.americalatinasinpertussis.com/>
- 369.** Pardo, J, MP. Arrazola. 2004. Vacunación frente a difteria, tétanos y tos ferina. Servicios de Medicina Preventiva. Madrid. [Online]. [Citado 2014-05-13]. Disponible en: http://www.semes.org/revista/vol16_4/s54.pdf
- 370.** Organización Mundial de la Salud. 2005. Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de Sustancias Infecciosas. WHO/CDS/CSR/LYO/2005.22. [Online]. [Citado 2014-09-06]. Disponible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2005_22SPc%20.pdf
- 371.** Medicopedia. Diccionario médico. [Online]. [Citado 2014-08-25]. Disponible en: http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Diagnostico
- 372.** Álvarez, CC. 1998. Glosario de Término para la administración y gestión de los servicios sanitarios. [Libro Online]. [Citado 2014-03-02]. Disponible en:

http://books.google.com.mx/books?id= OIMd9UbOBsC&pg=PA112&lpg=PA112&dq=estudio+retrospectivo++glosario&source=bl&ots=AO0ePwu59i&sig=hhMo3vbweD0B_Sc2XN0ljHDzQTK&hl=en&sa=X&ei=NzMPVOWfJ9WggSz2oLwAg&ved=0CEQQ6AEwBA#v=onepage&q=estudio%20retr ospectivo%20%20glosario&f=false

- 373.** Organización Mundial de la Salud. 1999. Normas y Estándares en Epidemiología: Definiciones de Casos: Difteria y Tos ferina. [Online]. [Citado 2013-05-04]. Disponible en: <http://www1.paho.org/spanish/sha/bs994difttosfer.htm#diftvig>
- 374.** Organización Mundial de la Salud. Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos. División para la Vigilancia y el Control de Enfermedades Emergentes y otras Enfermedades Trasmisibles. WHO/EMC/97.3. [Online]. [Citado 2014-09-06]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/whoemc973es.pdf>
- 375.** Glosario. Biblioteca Digital ILCE. [online] [Citado 2014- 07-25]. Disponible en: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/125/htm/sec_7.htm
- 376.** Mahon, BP, and KH. Mills. 1999. Interferon-gamma mediated immune effector mechanisms against *Bordetella pertussis*. Immun Lett 68(2-3):213-7.[Online]. [Citado 2014-08-22]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10424423?dopt=Abstract&holding=ngpg>
- 377.** Organización Mundial de la Salud. 2010. Resumen del documento de posición de la OMS acerca de las vacunas antitosferínicas, 1 de octubre de 2010. [Online] [Citado 2014-02-06]. Disponible en: http://www.who.int/immunization/documents/PP_Pertussis_summary_oct_2010_ES.pdf
- 378.** Glosario de terminología de vigilancia epidemiológica. MERCOSUR/GMC/RES. N° 53/99. [Online]. [Citado: 2014-09-09].

- Disponible en: <http://www.bvs.org.ar/pdf/vigilancia.pdf>
- 379.** Oficina General de Epidemiológica, Ministerio de Salud. Protocolos de Vigilancia Epidemiológica. Parte I. Glosario. [Online]. [Citado 2014-09-09]. Disponible en: http://www.dge.gob.pe/buho/buho_glosario.pdf
- 380.** Organización Mundial de la Salud. 2010. Vacunas antitosferínicas: Documento de posición de la OMS. 40(85):385-400. [Online]. [Citado 2013-06-05]. Disponible en: http://www.who.int/immunization/documents/PP_Pertussis_oct2010_ES.pdf
- 381.** Vega, GB. 2009. Antígenos e inmunógenos. Inmunología para el médico general. Rev Fac Med UNAM 52(1). [Online]. [Citado 2014-08-25]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un091j.pdf>
- 382.** Norma Nacional de Vacunación. 2013. Organización Panamericana de Salud. Costa Rica. [Online] [Citado 2014-09-09]. Disponible en: http://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/inicio-vigilancia-normas-protocolos-guias-ms/doc_view/2302-norma-nacional-de-vacunacion-2013
- 383.** Diccionario Médico. La guía médica donde opinas tú. [Online] [Citado: 2014-09-11]. Disponible en: <http://www.quemedico.com/diccionario/enfermedad/6-Apnea>
- 384.** Glosario de Salud. [Online]. [Citado 2014-09-11]. Disponible en: <http://www.saludymedicinas.com.mx/biblioteca/glosario-de-salud/tos-ferina.html>
- 385.** Bioestadística. Tabla 2x2. [Online]. [Citado: 2014-09-24]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=WF2RYFX-QRU>
- 386.** Tomoda, T, H, Oqura, and T, Kurashige. 1992. The longevity of the immune response to filamentous hemagglutinin and pertussis toxin in patients with pertussis in a semiclosed community. [Abstrac] [Citado 2014-09-24]. J Infect Dis 1992;166:908-10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1527428>
- 387.** Centers for Disease Control and Prevention. Vaccines and

immunizations. Pertussis. Epydemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. [Online]. [Citado 2014-09-24]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pert.html>

- 388.** CeNSIA. Esquema de Vacunación Actual. Secretaria de Salud, México. [Online]. [Citado: 2014-09-24]. Disponible en: <http://censia.salud.gob.mx/contenidos/vacunas/esquemavacunas.html>
- 389.** UNICEF. Tos Ferina. [Online]. [Citado 2014-09-24]. Disponible en: http://www.unicef.org/spanish/immunization/23245_pertussis.html

ANEXOS

ANEXO I Estudio Epidemiológico de Tos Ferina

SISTEMA NACIONAL DE SALUD
ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE TOS FERINA



ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE TOS FERINA

I. IDENTIFICACION - PACIENTE

Número de Caso _____ JS / DELEG _____ No. Lab. Estatal _____ No. InDRE _____
 Nombre y apellidos _____ Edad _____ Sexo _____
 Domicilio completo _____ Teléfono _____
 Localidad _____ Municipio _____ Estado _____

II. DATOS DE NOTIFICACION - ESTUDIO

Fuente de notificación: Inmediata () Rutinaria () VEA () Laboratorio () BROTE si() no()
 Fecha _____ Responsable _____ Teléfono _____
 Fecha Primer Contacto con Serv. de Salud _____
 Fecha Ingreso al Hospital _____
 Fecha Notificación a la Jurisd. / Deleg. _____ Sem. Notific. _____
 Fecha Notificación a la Coord. Estatal _____
 Fecha Notificación a la DGE _____
 Fecha Estudio por Unidad / Juris. / Deleg. _____

III. UNIDAD TRATANTE

Nombre C.S./Hosp./Cin. _____ Institución _____
 Domicilio _____ Teléfono _____
 Derechohabiente si() no() Núm. de Expediente _____
 Médico Tratante _____

IV. ANTECEDENTES

Vacunado contra Tos ferina ? si() no() No. Dosis _____ Fecha de última dosis _____
 Tipo de vacuna _____ (1-DPT, 2-Pentavalente, 3-Hexavalente, 4-Tdap, 5-Otra, 6-Ninguna, 9-Ignora)
 Fuente de información _____ (1-Cartilla, 2-Otro registro, 3-Verbal, 9-Ignorado)
 ¿ Ha tenido contacto con casos similares en las últimas 6 semanas ? si() no()
 ¿ Ha viajado o recibido visitas en las últimas 6 semanas ? si() no()
 Lugares visitados y fechas _____

V. CUADRO CLINICO

	Fecha de inicio de la Tos	Semana de inicio	Duración de la Tos días
Tos si() no()			
Tos paroxística si() no()			
Tos espasmódica si() no()	Estridor laringeo inspiratorio si() no()		
Tos en accesos si() no()	Hemorragia conjuntival, otras si() no()		
Tos emetizante si() no()	Episodios de apnea o cianosis si() no()		
Tos claudicante si() no()	Fiebre si() no() Cuantificación _____ °C		

Otros datos clínicos

Diagnóstico Inicial _____

Tratamiento con antibiótico: si() no()

a) Antibiótico	Fecha	Duración	días
b) Antibiótico	Fecha	Duración	días
c) Antibiótico	Fecha	Duración	días
d) Antibiótico	Fecha	Duración	días
e) Antibiótico	Fecha	Duración	días

Complicaciones si() no() Especificar _____

Evolución (1-Sano, 2-Convaleciente, 3-Defunción, 4-Hospitalizado, 5-Traslado, 9-Ignorado)

Fecha de Defunción _____ Fecha de Egreso Hospitalario _____

CONTINUJA - IDENTIFICACION
Y ESTUDIO DE CONTACTOS

SISTEMA NACIONAL DE SALUD
ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE TOS FERINA

Nombre 3 _____ Edad _____ Sexo _____
 Contacto domiciliario SI NO Parentesco con el caso _____
 Tos o síntomas respiratorios SI NO Días con tos _____
 Ha recibido dosis de vacuna contra la Tos ferina? SI NO Cuantas dosis? _____
 Tipo de vacuna aplicada _____ (1-DPT, 2-Pentavalente, 3-Hexavalente, 4-Tdap, 6-Otro, 8-Ninguna, 9-Ignores)
 Tiempo aprox. de última dosis de vacuna aplicada contra Tos ferina _____ Tomó Antibiótico? SI NO
 Fecha de toma del Cultivo _____ * Resultado del Cultivo _____ (+) 1- Positivo, 2- Negativo
 Fecha de toma de PCR _____ * Resultado de PCR _____ 3- Proceso, 4- Sin Muestra, 5- Inadecuado
 Clasificación de contacto 3 _____ (1-Confirmado Lab, 2-Conf. Asociación, 3-Conf. Clínic, 4-Descartado, 5-Probable, 6-Conf. Ad. pta, 7-Portador positivo Lab)

Nombre 4 _____ Edad _____ Sexo _____
 Contacto domiciliario SI NO Parentesco con el caso _____
 Tos o síntomas respiratorios SI NO Días con tos _____
 Ha recibido dosis de vacuna contra la Tos ferina? SI NO Cuantas dosis? _____
 Tipo de vacuna aplicada _____ (1-DPT, 2-Pentavalente, 3-Hexavalente, 4-Tdap, 6-Otro, 8-Ninguna, 9-Ignores)
 Tiempo aprox. de última dosis de vacuna aplicada contra Tos ferina _____ Tomó Antibiótico? SI NO
 Fecha de toma del Cultivo _____ * Resultado del Cultivo _____ (+) 1- Positivo, 2- Negativo
 Fecha de toma de PCR _____ * Resultado de PCR _____ 3- Proceso, 4- Sin Muestra, 5- Inadecuado
 Clasificación de contacto 4 _____ (1-Confirmado Lab, 2-Conf. Asociación, 3-Conf. Clínic, 4-Descartado, 5-Probable, 6-Conf. Ad. pta, 7-Portador positivo Lab)

Nombre 5 _____ Edad _____ Sexo _____
 Contacto domiciliario SI NO Parentesco con el caso _____
 Tos o síntomas respiratorios SI NO Días con tos _____
 Ha recibido dosis de vacuna contra la Tos ferina? SI NO Cuantas dosis? _____
 Tipo de vacuna aplicada _____ (1-DPT, 2-Pentavalente, 3-Hexavalente, 4-Tdap, 6-Otro, 8-Ninguna, 9-Ignores)
 Tiempo aprox. de última dosis de vacuna aplicada contra Tos ferina _____ Tomó Antibiótico? SI NO
 Fecha de toma del Cultivo _____ * Resultado del Cultivo _____ (+) 1- Positivo, 2- Negativo
 Fecha de toma de PCR _____ * Resultado de PCR _____ 3- Proceso, 4- Sin Muestra, 5- Inadecuado
 Clasificación de contacto 5 _____ (1-Confirmado Lab, 2-Conf. Asociación, 3-Conf. Clínic, 4-Descartado, 5-Probable, 6-Conf. Ad. pta, 7-Portador positivo Lab)

Nombre 6 _____ Edad _____ Sexo _____
 Contacto domiciliario SI NO Parentesco con el caso _____
 Tos o síntomas respiratorios SI NO Días con tos _____
 Ha recibido dosis de vacuna contra la Tos ferina? SI NO Cuantas dosis? _____
 Tipo de vacuna aplicada _____ (1-DPT, 2-Pentavalente, 3-Hexavalente, 4-Tdap, 6-Otro, 8-Ninguna, 9-Ignores)
 Tiempo aprox. de última dosis de vacuna aplicada contra Tos ferina _____ Tomó Antibiótico? SI NO
 Fecha de toma del Cultivo _____ * Resultado del Cultivo _____ (+) 1- Positivo, 2- Negativo
 Fecha de toma de PCR _____ * Resultado de PCR _____ 3- Proceso, 4- Sin Muestra, 5- Inadecuado
 Clasificación de contacto 6 _____ (1-Confirmado Lab, 2-Conf. Asociación, 3-Conf. Clínic, 4-Descartado, 5-Probable, 6-Conf. Ad. pta, 7-Portador positivo Lab)

Nombre 7 _____ Edad _____ Sexo _____
 Contacto domiciliario SI NO Parentesco con el caso _____
 Tos o síntomas respiratorios SI NO Días con tos _____
 Ha recibido dosis de vacuna contra la Tos ferina? SI NO Cuantas dosis? _____
 Tipo de vacuna aplicada _____ (1-DPT, 2-Pentavalente, 3-Hexavalente, 4-Tdap, 6-Otro, 8-Ninguna, 9-Ignores)
 Tiempo aprox. de última dosis de vacuna aplicada contra Tos ferina _____ Tomó Antibiótico? SI NO
 Fecha de toma del Cultivo _____ * Resultado del Cultivo _____ (+) 1- Positivo, 2- Negativo
 Fecha de toma de PCR _____ * Resultado de PCR _____ 3- Proceso, 4- Sin Muestra, 5- Inadecuado
 Clasificación de contacto 7 _____ (1-Confirmado Lab, 2-Conf. Asociación, 3-Conf. Clínic, 4-Descartado, 5-Probable, 6-Conf. Ad. pta, 7-Portador positivo Lab)

Elaboró _____
 Nombre (S) _____ Apellido Paterno _____ Apellido Materno _____
 Cargo / Pue _____ Firma _____ Institución _____ Teléfono _____

* Para respuesta de resultado de Cultivo y PCR, utilizar los números utilizados dentro de los corcheteros {1-2-3-4-5-}

ANEXO II Procedimientos para Toma de Muestra

Exudado Nasofaríngeo (ExNF)

Es dispensable llenar el estudio epidemiológico antes de la toma de muestra ¹⁶. Se recomienda la utilización de hisopos de rayón o dacrón con mango flexible ante la búsqueda de *Bordetella pertussis*. Así como la toma de muestra para el caso y de cinco de sus contactos ^{334, 363}.

Procedimiento.

1. Recostar al paciente y elevar un poco su cabeza.
2. Introducir suavemente el hisopo de forma paralela al paladar; casi en su totalidad hasta llegar a la nasofaringe (aprox. 2.5 cm en adultos y un poco menor en niños).
3. Rotar suavemente el hisopo para frotar la pared nasofaringe (obtención de células infectadas) y retirar cuidadosamente sin dejar de rotar.
4. Introducir el hisopo en medio de transporte de solución salina con cefalexina (40µg/mL).
5. Rotular medio de transporte con datos de paciente y fecha de toma.
6. De ser posible, procesar la muestra de forma inmediata al Laboratorio. En caso no ser posible, la muestra debe mantenerse en refrigeración a 4°C y transportar al laboratorio lo más pronto posible.

Para la toma de muestra en menores, esté debe ser sujetado por un adulto. El adulto debe sentarse con el menor en su regazo, colocando uno de los brazos alrededor del tórax y el otro sosteniendo la frente para estabilizar su cabeza del menor. Con las piernas y rodillas se estabiliza la parte inferior del cuerpo de menor y se prosigue con el procedimiento para toma de muestra ²⁸.

Aspirado Nasofaríngeo (ANF)

El ANF se realiza en pacientes que se encuentran hospitalizados. Consiste en la extracción de muestra por nasofaringe mediante aspiración de ésta y es recolectada en un frasco estéril para su posterior procesamiento en laboratorio. Habitualmente se

recomienda ser realizados por médicos o personal altamente capacitado para no lastimar al paciente ^{306, 327, 364}.

Procedimiento.

1. Es colectado mediante el paso de una sonda nelaton de un calibre apropiado dentro de la nasofaringe.
2. Introducir una aguja en el antrum maxilar por debajo del cornete inferior, o en el seno frontal por debajo del marco supra orbital del ojo.
3. Aspirar el líquido del seno. Aplicar 1ml de solución salina estéril y aspirarlo nuevamente.
4. Inyectar una parte de la muestra en un medio de transporte para anaerobios y enviar el resto en un contenedor estéril o en la propia jeringa.

En la sospecha por *Bordetella pertussis*, la muestra debe ser sembrada de forma inmediata al ser obtenida. Colocando 5 gotas en superficie de medio de Bordet-Gengou, así mismo colocar en tubo estéril aspirado para procesamiento mediante Inmunoflorescencia directa o PCR-TR ³⁶².

Muestra Serológica

La punción venosa permite extraer la cantidad de sangre necesaria para el procesamiento mediante serología. Se debe utilizar tubos con tapón de gel que permitan separar los componentes de la sangre después de la centrifugación ^{241, 284}.

Procedimiento.

1. Explicar al paciente lo que se realizará.
2. Localizar una vena en cara anterior del codo y colocar el torniquete en la parte media del brazo.
3. Desinfectar el área con un algodón humedecido (alcohol 70%) e introducir la aguja con el bisel hacia arriba.
4. Al fluir la sangre retirar torniquete y obtener cantidad de sangre requerida (3.0-6.0 mL).
5. Retirar la aguja y colocar torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia.

Debido a que la toma de sangre es para obtención de suero, no se debe utilizar anticoagulante y si el tubo tiene gel, centrifugar lo antes posible. Es decir, dentro de las primeras 8 horas de recolectada la muestra sanguínea. Es muy importante que la sangre se deje coagular de 30 a 45 minutos (máximo 2 horas) para obtener una mayor volumen de suero ^{284, 287}.

ANEXO III Medios de Transporte para *Bordetella pertussis*

Medio de Transporte de Solución Salina con Cefalexina

El medio de transporte recomendado para el transporte de muestras para casos con Síndrome coqueluchoide y contactos es en Solución salina con 40 microgramos/ml de Cefalexina (SIGMA). El contenido del antibiótico a esta cantidad favorece la conservación de *Bordetella* e inhibe la flora de microorganismos Gram positivos ²⁵¹.

Procedimiento.

1. Pesar y diluir 10 µg de Cefalexina en 250 mL de solución salina (0.85%).
2. Esterilizar la solución por filtración utilizando membrana de nitrocelulosa 0.45 micras.
3. Distribuir 1.0 ml de solución con Cefalexina en tubos estériles (0.5 mL por cada tubo).
4. Conservar a -20°C hasta por un máximo de tres meses, evite congelar y descongelar consecutivamente.

La utilización de este medio de transporte permite la búsqueda del agente por Rt-q-PCR. Una vez utilizado debe ser desechado como RPBI ²⁵¹.

Medio de Transporte Regan-Lowe

El medio de transporte de Regan-Lowe permite mantener viable a la bacteria durante el transporte de la muestra, este medio semisólido contiene la mitad de la concentración de agar de medio de cultivo Regan-Lowe.

Fórmula.

Agar carbón OXOID (número de catálogo CM119)	25.5g
Sangre de caballo estéril y desfibrada	100mL
Solución estéril de cefalexina (se puede usar	
“Oxoid <i>Bordetella</i> suplement, número de catálogo SR82)	10mL
Agua deionizada y esterilizado	890mL

Procedimiento.

1. Transferir 25.5 g de agar carbón Oxoid a un matraz Erlenmeyer de 2.0 L y añadir 890 mL de agua deionizada y esterilizada. Agregar una barra magnética al matraz para agitar la solución.
2. Colocar en parrilla de agitación con calentamiento y ajustar la velocidad de agitación para mantener el agar en suspensión. Cubrir el matraz con papel aluminio.
3. Calentar lentamente la solución hasta llegar a ebullición para disolver el agar. Tener cuidado de no quemar la solución.
4. Esterilizar el agar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15lb de presión
5. Colocar el matraz con agar estéril en baño de agua para que se enfríe hasta 50°C. Este paso es necesario para prevenir que se deteriore la sangre de caballo y la cefalexina cuando se agregue a la solución.
6. Una vez que el agar se ha enfriado, añadir asépticamente 100mL de sangre de caballo estéril y desfrinada ¹⁶.

ANEXO IV Preparación de Medios de Cultivo

Medio de Cultivo de Bordet-Gengou (Tradicional)

Medio empleado para proceso de identificación de especies del género *Bordetella*. Las cepas inoculadas deben mantener un ambiente húmedo para un mejor desarrollo de colonias ²⁴¹.

Fórmula.

Papa amarilla en inicio de germinación	150.0g
Cloruro de Sodio	5.4g
Agar bacteriológico	30.0g
Glicerol	10mL
Sangre de carnero desfibrinada estéril	150-200mL
Agua destilada, de ionizada.	1000mL

pH 7.2-7.5, enfriar 50°C

Procedimiento.

1. Pelar y cortar papas en trozos pequeños.
2. Lavarlas con agua destilada y envolverlas en gasa.
3. Sumergir en aproximadamente 1 ½ veces el volumen final deseado de agua destilada.
4. Someter a ebullición de 1 ½ a 2 horas, hasta que adquiera consistencia de puré.
5. Retirar el paquete de papa y dejar sedimentar la infusión de 6-12 horas, en refrigeración. Decantar y desechar el sedimento.
6. Agregar agar, NaCl y glicerol a la infusión.
7. Dejar enfriar hasta 50°C y añadir NaOH al 2% hasta obtener un pH de 7.2-7.5.
8. Envasar en un matraz y esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.
9. Dejar enfriar a 40-45°C, adicionar la sangre en condiciones estériles con agitación constante y vaciar las placas.
10. Agregar antimicrobianos si se desea disueltos en 5 o 10 ml de Solución salina fisiológica (0.85%) junto con la sangre, distribuir en placas desechables estériles.

Control de calidad.

Microorganismo de referencia	Incubación			
	Tiempo	Temperatura °C	Atmósfera	Resultado
<i>Bordetella pertussis</i>	48-72h	35-37	Aeróbica	Crecimiento

Almacenamiento y caducidad.

Las placas ya preparadas son de un color cereza brillante. Se pueden almacenar por 30 días a temperatura de 2 a 8°C, lejos de luz directa. En caso de presentar señales de deterioro, contaminación o fecha de caducidad vencida, no utilizar. Proteger de humedad y congelamiento ^{16, 251}.

Agar Bordet-Gengou (Comercial, Difco™)

La base de Agar Bordet-Gengou, con la adición de glicerol y sangre estéril, se utiliza en procedimientos cualitativos para la detección y es aislamiento de *Bordetella pertussis* a partir de muestras clínicas como exudados o aspirados nasofaríngeos, de las secreciones bronquiales ^{284, 287}.

Fórmula.

Infusión de papa	4.5g
Cloruro de Sodio	5.5g
Agar	20.0g
Agua	850mL

*Ajustada y/o complementada cuando sea necesario para cumplir con los criterios de desempeño.

Procedimiento.

1. Suspender 30g de la base de Agar en 1.0L de agua destilada que contenga 10mL de glicerol y mezclar bien.
2. Calentar la mezcla anterior agitando frecuentemente y hervir durante un minuto para disolver por completo la base de agar Bordet-Gengou.
3. Ajustar a pH a 6.7±0.2
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 154 minutos.

5. Añadir asépticamente 15% de sangre estéril desfibrinada de carnero al medio cuando éste alcance de 45-50°C. Mezclar bien.
6. Vaciar el medio de cultivo en cajas de Petri estériles.
7. Realizar prueba de esterilidad en estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.
8. Almacenar a temperatura de 4-8°C, el medio de cultivo preparado puede durar hasta 30 días.

Control de calidad.

Inocular las siguientes cepas de *Bordetella* en el medio de cultivo previamente preparado, e incubar a 35± 2°C durante 48-72 horas^{284, 287}.

Microorganismo	ATCC	Recuperación de CFU™ con sangre de carnero al 15%
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	Buena 30-300
<i>Bordetella parapertussis</i>	15311	Buena 30-300
<i>Bordetella pertussis</i>	8467	Buena 30-300

Limitaciones de procedimiento.

Algunos *Haemophilus* spp. Pueden crecer en el aislamiento de *Bordetella* y pueden dar reacción cruzada con antisueros- *B. pertussis*^{284, 287}.

Medio de Cultivo Regan-Lowe

Las placas de agar Regan-Lowe con carbón se usan en laboratorios clínicos para el aislamiento de *Bordetella pertussis* en aspirados y exudados nasofaríngeos de tos ferina, pero demostró ser un medio de enriquecimiento para el aislamiento selectivo *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Consiste en un agar con carbón como base suplementado con cefalexina (RL+C) para inhibir bacterias de la nasofaringe, así como sangre de caballo desfibrinada para el crecimiento de otras especies de *Bordetella*. El uso de este medio sin cefalexina (RL-C) en paralelo a RL+C es recomendado, ya que varias cepas (<10%) de *B. pertussis* no crecen en RL+C. *B. holmesii* también es inhibida por la cefalexina. RL-C se usa en subcultivos para obtener un mayor crecimiento de aislamientos para pruebas bioquímicas, de aglutinación e inmunofluorescencia^{284, 287}.

Materiales para preparar un litro de medio de agar.

Agar carbón OXOID (número de catálogo CM119)	51g
Sangre de caballo estéril y desfibrinada	100mL
Solución estéril de cefalexina ("Oxoid <i>Bordetella</i> supplement", número de catálogo SR82)	10mL
Agua deionizada, estéril	890mL

Procedimiento.

1. Transferir 51g de agar carbón OXOID a un matraz Erlenmeyer de 2.0 L y añadir 890 mL de agua. Añadir una barra magnética para agitar la solución.
2. Coloque en un agitador magnético con plato calefactor que permita la agitación, con la finalidad de que el agar se disuelva y se mantenga en suspensión. Mientras la solución se calienta, cubrir el frasco con papel aluminio.
3. Calentar lentamente la solución hasta que inicie la ebullición para disolver el agar. Tener cuidado de no quemar la solución.
4. Esterilizar el agar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.
5. Colocar el matraz con el agar estéril en baño de agua para que se enfríe hasta 50°C. Este paso es necesario para prevenir que se desnaturalice la sangre de caballo y la cefalexina una vez que se agreguen a la solución.
6. Añadir asépticamente 100 ml de sangre estéril desfibrinada de caballo, después de que el agar se ha enfriado hasta la temperatura deseada.
7. Preparar la solución de cefalexina disolviendo 40mg de cefalexina en 10 mL de agua. Filtrar la solución para esterilizarla.

Nota: Se pueden usar dos frascos de "Oxoid *Bordetella* Supplement" en lugar de los 10 mL de la solución de cefalexina.

8. Preparar el suplemento añadiendo 0.5 ml de agua estéril a cada frasco.
9. Añadir asépticamente 100 ml de solución estéril de cefalexina. La concentración final de cefalexina es 40 µg/ml
10. Opcional: En el caso de observar crecimiento de hongos en placa, añadir 50 mg/L de Amfotericina B en adición a la cefalexina.

11. Mezclar el medio y dispersar en placas Petri de 15x100. Verter aproximadamente 20mL de medio en cada aplaca. Dejar las tapas de las placas un poco abiertas hasta que se enfríe el agar para prevenir que se condense.
12. Empacar las placas en bolsa plásticas una vez que el agar se haya solidificado y enfriado.
13. Guardar las placas de manera invertida a 4 °C hasta por 3 meses, después de esta fecha desecharlas ^{284, 287}.

ANEXO V Procedimientos para identificación y diferenciación de *B. pertussis*.

Tinción Gram

La tinción Gram permite diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. La diferencia entre estos microorganismos estriba en el tipo de pared celular que posee la bacteria.

Procedimiento.

1. Limpiar bien la laminilla con agua.
2. Desinfectar el asa en el mechero.
3. Colocar una gota de solución salina
4. Transfiere a la laminilla limpia una muestra de cultivo axénico de *Bordetella pertussis*.
5. Esperar que la muestra se seque.
6. Añadir una gota de colorante cristal violeta a la laminilla, sobre los microorganismos. Espera por un minuto.
7. Lava la laminilla con agua. Espera a que se seque un poco el tinte.
8. Añadir una gota de yodo-lugol a la laminilla. Espera por un minuto a que seque un poco el tinte.
9. Lava la laminilla con agua. Espera que se seque.
10. Añadir una gota de Alcohol-Cetona a la laminilla. Durante 10 segundos.
11. Lava la laminilla con agua. Espera que se seque.
12. Añadir una gota de Safranina a la laminilla. Espera por dos minutos para una mejor coloración de *B. pertussis*.
13. Lavar con agua y esperar que seque. La laminilla esta lista para observarse por microscopio.

Pruebas de diferenciación de *Bordetella pertussis*

Morfología Macroscópica en agar Charcoal	Colonias lisas, brillantes con un perfil alto en forma de cúpula, similares a pequeñas gotas de mercurio que miden de 1 a 2 mm.
Crecimiento en Agar Sangre	<i>Bordetella pertussis</i> no tiene la capacidad para desarrollarse en agar sangre, por lo tanto la prueba es negativa pues no se observa crecimiento bacteriano.
Crecimiento en Agar MacConkey	<i>Bordetella pertussis</i> no tiene la capacidad de desarrollarse en agar MacConkey por lo tanto la prueba es negativa pues no se observa crecimiento bacteriano.
Coloración de Gram:	Observación de bacilos diminutos gramnegativo, ovoides que se tiñen débilmente. No presentan agrupación característica.
Prueba de Oxidasa:	<i>Bordetella pertussis</i> posee la enzima citocromooxidasa, por lo que da una reacción positiva, que se caracteriza por la aparición de un color púrpura en la tira de papel filtro.
Prueba de Catalasa:	<i>Bordetella pertussis</i> posee la enzima catalasa, la cual descompone el Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂) en agua y oxígeno, el cual se desprende formando burbujas.
Prueba de Movilidad:	<i>Bordetella pertussis</i> no posee flagelos por lo tanto es inmóvil por lo que la prueba es negativa, observándose crecimiento solamente a lo largo de la punción del inóculo.
Prueba de Hidrólisis de la Urea:	<i>Bordetella pertussis</i> carece de la enzima ureasa por lo tanto no hidroliza la urea dando un resultado negativo ¹⁶ .

ANEXO VI Conservación a corto plazo de *Bordetella pertussis*

Medio de transporte de AMIES

El medio de transporte de AMIES se considera como alternativa en conservación a corto plazo para *Bordetella pertussis*. Este medio permite el tiempo de resiembra hasta por una semana.

Procedimiento.

1. Tomar una asada de cultivo axénico de *Bordetella pertussis* e inocular en Bordet-Gengou en ambiente estéril. Incubar durante 72hrs en ambiente húmedo.
2. Verificar pureza del medio de cultivo.
3. Etiquetar medio de transporte de AMIES por cada cepa a conservar con clave o número de laboratorio y su fecha de conservación.
4. Cosechar con hisopo estéril todo desarrollo bacteriano y depositar en medio de transporte de forma hasta el fondo de AMIES.
5. Sellar con Parafilm™ el tapón de tubo y colocarlo en gradilla a temperatura ambiente.
6. Realizar resiembras una vez por semana y mantener a los microorganismos a temperatura ambiente sellando placas o tubos para evitar desecación de éstos ^{241, 251}.

ANEXO VII Preparación de Antígeno “O” para *Bordetella pertussis*

Procedimiento.

1. Sembrar cepa de *Bordetella pertussis* en placas de Bordet-Gengou por estría cruzada y masiva. Incubar a 37°C por 72hrs.
2. Cosechar con asa bacteriológica el crecimiento bacteriano obtenido en 2 tubos de ensaye con 25 ml c/u de solución salina fisiológica. Agitar vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Colocar los tubos en baño maría a ebullición durante 60 min.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min.
5. Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento bacteriano en solución salina formalizada al 0.3% hasta igualar la turbidez con el tubo No. 3 del nefelómetro de Mc Farland.
6. Probar la esterilidad del antisuero, sembrar en medio de Bordet-Gengou. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 96 horas. Reportar la ausencia de crecimiento bacteriano
7. Envasar la suspensión en un frasco ampula estéril y mantenerlo en refrigeración hasta su uso ²²⁸.

ANEXO VIII Manejo e Inoculación de Conejos

La inmunización es el proceso mediante el cual se induce una respuesta inmunológica en el conejo a consecuencia del contacto con el antígeno específico.

Procedimiento.

1. Antes de inmunizar al conejo, se hace la obtención del SUERO TESTIGO.
 - Obtener 5 ml de sangre de la arteria central de la oreja del conejo.
 - Centrifugar 3000 rpm x 10'
 - Separar suero en tubo rojo
 - Rotular: Antígeno y fecha.
 - Congelación hasta su uso.

La inmunización de los conejos consistió en la aplicación de 4 dosis del antígeno en vena exterior de la oreja del animal. La primera dosis correspondiendo al día inicial cero, aplicando 0.5 ml de antígeno, seguido por una segunda aplicación al día 4 con una dosis de 1ml de antígeno. La tercera dosis correspondió para el día 8, aplicando 2 ml de antígeno y 3ml para la aplicación de la cuarta dosis en el día 12 (Figura 8).

Figura 8. Esquema de Inmunización de Conejos.

INYECCIÓN	TIEMPO	FECHA	DOSIS	VIA	OBSERVACIONES
1	Día 0		0.5 ml	I.V.	
2	Día 4		1.0 ml	I.V.	
3	Día 8		2.0 ml	I.V.	
4	Día 12		3.0 ml	I.V.	
SANGRADO	Día 18			I.C.	Obtener 10- 50 ml de sangre según el antígeno del que se trate, separar el antisuero para su análisis. Congelar el resto de antisuero
SI ES REQUERIDO SE ADMINISTRA UNA QUINTA DOSIS DE 3.0 ml 4-6 DIAS ANTES DEL SANGRADO.					

Tomado de: Tinoco, R. 2012. Inmunología 1. Manual de Prácticas. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH. pág. 5-18.

Obtención del Antisuero.

1. Del corazón del conejo obtener de 10 a 50 ml de sangre según la que se necesite.
2. Separar suero a 3000 rpm por 10'
3. Colocar en un tubo rojo nuevo, Rotular: antígeno y fecha.

Utilizar el antisuero obtenido para realizar la titulación correspondiente para cada antígeno, EL RESTO DEL ANTISUERO CONGELAR HASTA SU NUEVO USO ²²⁸.

ANEXO IX Determinación de anticuerpos, Técnica de Manclark

Es un método de aglutinación para titular anticuerpos contra *Bordetella pertussis* por medio de microplaca, basado en una reacción serológica antígeno-anticuerpo donde se establecen cambios fisicoquímicos entre los reactivos y el suero de un paciente conduciendo a la formación de una malla a una temperatura óptima de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72hrs en Incubación y 2 horas en Refrigeración.

Procedimiento.

1. Colocar 50 microlitros de solución salina estéril del pozo 2 al 10 en la microplaca.
2. Hacer una dilución del antígeno de *Bordetella pertussis* 1:23
3. En el pozo 1 se colocan 100 microlitros del suero problema.
4. Del pozo 1 se toman 50 microlitros del suero problema y se pasan al pozo 2 (Hacer 4 lavados)
5. Del pozo 2 se pasan 50 microlitros al pozo 3 y se sigue el procedimiento sucesivamente hasta el pozo 10.
6. Agregar 50 microlitros del antígeno de *Bordetella pertussis* recientemente preparado (Dilución 1:23).
7. Colocar en el pozo 11, suero de referencia positivo más 50 microlitros del antígeno (50 microlitros c/u).
8. Colocar en el pozo 12 solución salina y antígeno (Testigo negativo).
9. Mezclar
10. Sellar placa con cinta adherente transparente e incubar a 37°C durante 24 horas.

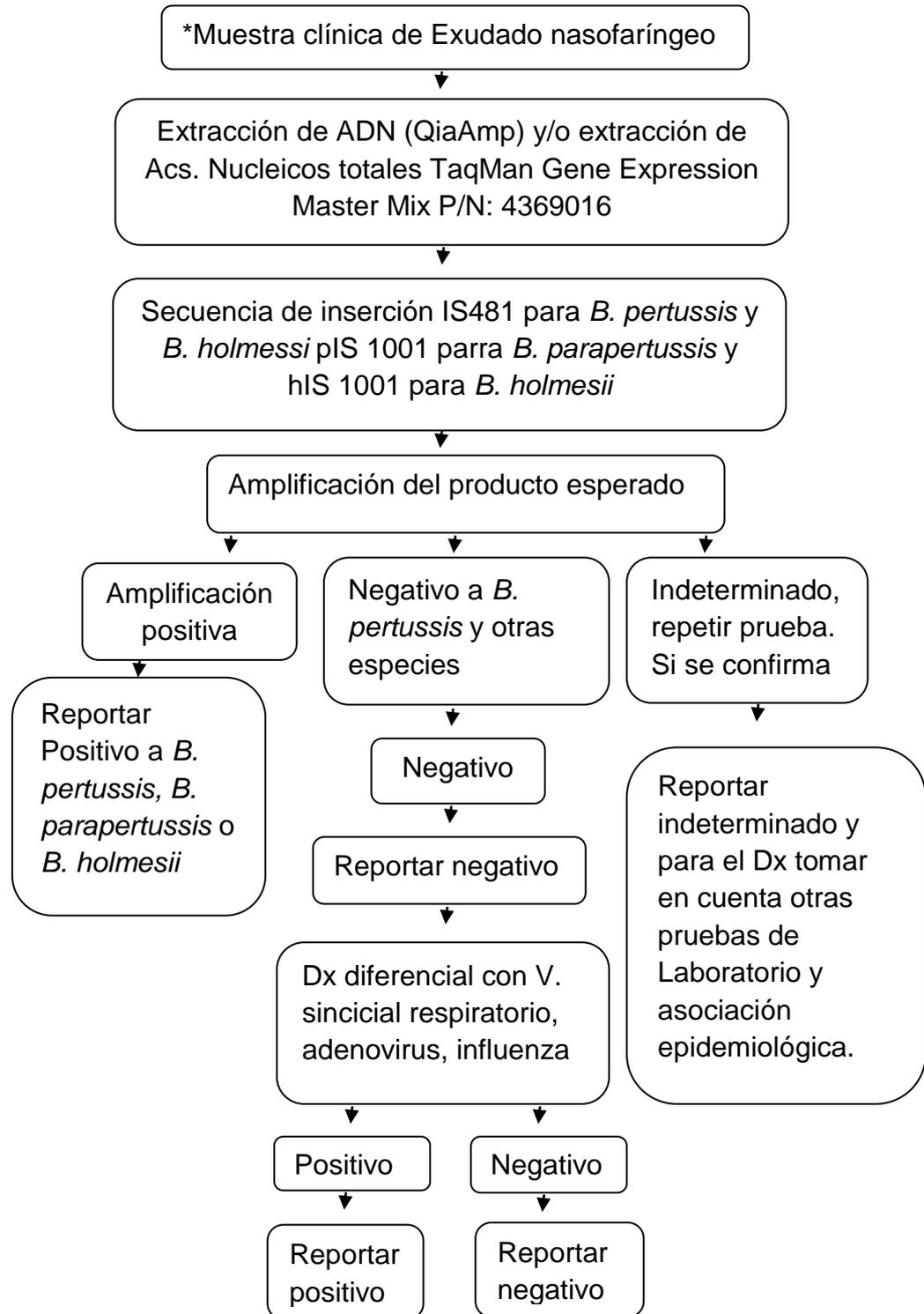
Se considera positiva: la formación de una malla en la superficie de la suspensión y negativo: la formación de botón en el fondo de la microplaca ²²⁷.

ANEXO X Sistema Básico de Triple Embalaje.

Se utiliza para todas las sustancias infecciosas. Comprende de la utilización de un recipiente primario, en el cual se coloca la muestra biológica (exudado nasofaríngeo, suero), el recipiente impermeable y estanco (Frascos con tapa rosca), éste debe ser hermético para evitar derrames de la muestra y tiene que estar perfectamente etiquetado con el nombre o número de muestra del paciente ^{370, 374}.

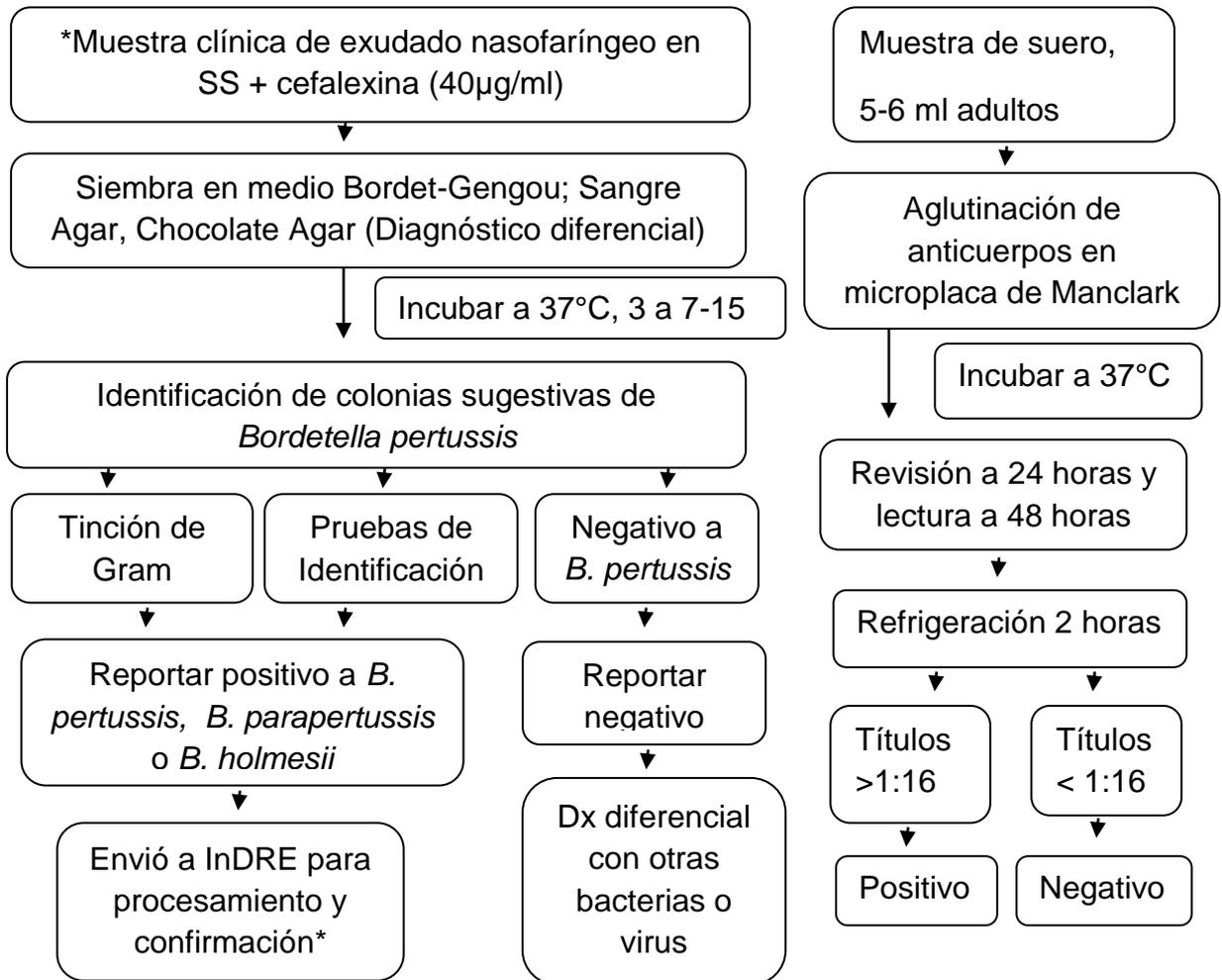
El recipiente primario, debe ser rodeado por materia absorbente como gasa o papel absorbente y debe colocarse en el recipiente hermético. Para envío de varias muestras (exudado nasofaríngeo, suero) se deberá utilizar una gradilla y utilizar suficiente material para absorber todo fluido en caso de ruptura. El recipiente secundario (hielera) debe tener suficientes refrigerantes para conservación de una temperatura de 4 a 8°. Además de llevar las etiquetas de riesgo biológico y señal de orientación del recipiente. A su vez, éste deberá ir en paquete externo (caja de cartón) que proteja el contenido de elementos externos del medio ambiente. La documentación debe ser colocada en la parte interior del paquete. Ninguna de las caras del embalaje debe tener dimensiones inferiores a 10 x 10 cm ^{370, 284}.

ANEXO XI Algoritmo del Diagnóstico de *Bordetella* spp mediante PCR Tiempo Real Multiplex.



Fuente: Diagnóstico de tos ferina mediante PCR en tiempo real multiplex. Presentación Power point. SiNAVE et al 2012

ANEXO XII Algoritmo de procesamiento de muestras para Tos Ferina.



*Exudados nasofaríngeos y cepas se envían al InDRE para procesamiento mediante PCR-TR.

Fuente: Diagnóstico de tos ferina mediante PCR en tiempo real multiplex. Presentación Power point. SiNAVE et al 2012

ABREVIATURAS

µg	Microgramo.
°C	Grados Centígrados.
ABG	Agar Bordet-Gengou.
ACT	Toxina adenilato ciclasa.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
ADV	Adenovirus.
AMPc	AMP cíclico.
ANF	Aspirado nasofaríngeo.
Bvg	Sistema de dos componentes (BvgA, BvgS) de <i>Bordetella</i>
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades.
CeNSIA	Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia.
CoNaVe	Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
DC	Células dendríticas.
DNT	Toxina dermonecrótica.
DPT	Vacuna contra difteria, tos ferina y tétanos.
DTPa	Vacuna acelular compuesta por antígenos purificados (Difteria + Tétanos + Pertussis acelular).
DTPc	Vacuna pentavalente contra difteria, tos ferina, tétanos, hepatitis B y enfermedad invasiva por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.
DTP+HB/Hib	Vacuna pentavalente contra difteria, tos ferina, tétanos, hepatitis B y enfermedad invasiva por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.
DPT+VIP/Hib	Vacuna pentavalente contra difteria, tos ferina, tétanos, poliomielitis y enfermedad invasiva por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.
ECMO	Membrana extracorpórea.
ECDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, Estados Unidos.
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima.
ExNF	Exudado nasofaríngeo.
FHA	Hemaglutinina filamentosa.

Fim	Fimbria.
FQ	Fibrosis quística.
HTP	Hipertensión pulmonar.
HYL	Hemolisina.
IFD	Inmunoflorecencia directa
IFN-γ	Interferón gamma.
Ig	Inmunoglobulina.
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
InDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.
LPS	Endotoxina.
LESP	Laboratorio Estatal de Salud Pública.
MI	Mililitros
MØ	Macrófago
NK	Célula <i>natural killer</i> .
NO	Óxido nítrico.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
NT	Células T <i>naive</i> .
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PME	Proteína de membrana externa.
Prn	Pertactina.
PT	Toxina pertussis.
TCT	Citotoxina traqueal.
TD	Toxina dermonecrótica.
TIC	Traqueobronquitis Infecciosa Canina.

TF	Tos Ferina
VRS	Virus respiratorio sincicial.

GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN). Ácido presente en todas las células, es el material hereditario que contiene toda la información genética. Al enrollarse con ayuda de las proteínas llamadas histonas, forma los cromosomas ³⁷⁵.

Adherencia: Proceso mediante el cual un agente patógeno se fija a la superficie de la célula hospedera. Es el paso inicial y el más importante del proceso infeccioso ³⁵⁰.

Agente etiológico: Entidad biológica, física o química capaz de causar enfermedad ³⁷⁸.

Agente Infeccioso: Microorganismo (virus, bacteria, hongo o parásito) que puede causar una enfermedad ³⁵⁸.

Aglutinación: Reacción caracterizada por agrupación de células o partículas resultante de la interacción entre antígenos y anticuerpos ²⁷³.

Aislamiento: Separación de personas o animales infectadas, durante el período de transmisibilidad de la enfermedad, en lugares y condiciones tales, que eviten o limiten la transmisión directa o indirecta del agente infeccioso a personas susceptibles o que puedan transmitir la enfermedad a otras ³⁷⁸.

Alerta epidemiológica: Comunicado de un evento epidemiológico que representa un daño inminente a la salud de la población y/o de trascendencias social, frente al cual es necesario ejecutar acciones de salud inmediata y eficaz, a fin de minimizar o contener su ocurrencia ²⁷².

Anticuerpo: Molécula proteica (inmunoglobulina) producida por las células plasmáticas en respuesta a la estimulación de un antígeno. Cada anticuerpo es capaz de unirse específicamente con el antígeno que ha inducido su formación ²⁷⁴.

Antígeno: Molécula o fracción de la misma capaz de ser reconocida por un anticuerpo o receptor de células T. La mayoría de los antígenos son inmunógenos, es decir, tienen la capacidad de generar una respuesta de anticuerpo ²⁷⁴.

Antisuero: Suero que contiene anticuerpo(s). Se obtiene de animales previamente inmunizados mediante la inyección del antígeno o por infección con los

microorganismos adecuados. Puede ser monovalente, es decir específico para un antígeno, o polivalente, con especificidad para más de un antígeno ³⁵⁰.

Antitoxina: Anticuerpos capaces de neutralizar la acción tóxica de un antígeno ²⁷⁴.

Apnea: Episodios de falta de respiración durante el sueño ³⁸³.

Ataque, tasa de- Caso particular de tasa de incidencia. Corresponde al número de personas que presentan una enfermedad, relacionándolo con el número de personas expuestas al riesgo de sufrir la enfermedad en un periodo limitado de tiempo y en condiciones especiales como en una epidemia. Se expresa en porcentaje (caso por cien) ³⁷⁸.

Bacteria: Organismo unicelular procariótico sin núcleo diferenciado, aunque presenta un nucleóide, una estructura que contiene una molécula circular de ADN; sin organelos con membrana; presenta varias formas y se pueden encontrar prácticamente en cualquier ambiente (suelos, aguas, aire, y como simbiosis o patógenos del humano, otros animales y plantas) ³⁵⁰.

Bacteriemia: Presencia de bacterias patógenas en la sangre ³⁷⁹.

Búsqueda activa de casos: Es la búsqueda de casos a través de visitas sistemáticas y periódicas o eventuales a servicios de salud, domicilios o áreas determinadas ³⁷⁸.

Brote: Ocurrencia de dos o más casos asociados epidemiológicamente entre sí, a excepción de aquellas enfermedades que ya se encuentran erradicadas o eliminadas, en cuyo caso la presencia de un solo caso se considera brote ²⁷².

Cartilla Nacional de Vacunación: Documento gratuito, único e individual, oficialmente válido para toda la República Mexicana que se utiliza para el registro y control de las acciones de vacunación, así como del peso y la talla en la población menor de 20 años de edad. En su distribución participan las unidades operativas del Sistema Nacional de Salud y las Oficialías o Juzgados del Registro Civil ²⁷⁴.

Caso: Individuo de una población en particular que, en un tiempo determinado, es sujeto de una enfermedad o evento bajo estudio o investigación ²⁷².

Caso autóctono: Caso contraído por el enfermo en la zona habitual de su residencia (país) ³⁷⁸.

Caso confirmado: Caso cuyo diagnóstico se corrobora por medio de estudios auxiliares, o aquel que no requiere estudios auxiliares pero presenta signos o

síntomas propios del padecimiento o evento bajo vigilancia, o aquel que presente evidencia de asociación epidemiológica con algún caso confirmado por laboratorio ²⁷².

Caso esporádico o aislado: Caso que según las informaciones disponibles, no se presenta relacionado epidemiológicamente a otros casos ³⁷⁸.

Caso importado: Caso contraído en un país y detectado en otro, siempre que sea posible situar el origen de la infección en una zona conocida, y se cumplan los periodos de transmisión e incubación específicos para cada enfermedad ³⁷⁸.

Caso Índice: Primero entre varios casos de naturaleza similar y epidemiológicamente relacionado. EL caso índice es muchas veces identificado como fuente de contaminación o infección ³⁷⁸.

Caso inducido: Caso de una determinada enfermedad que se puede ser atribuido a una transfusión de sangre u otra forma de inoculación parenteral, por lo tanto no es por transmisión natural ³⁷⁸.

Caso introducido: Caso en el que se puede probar que constituye el primero de transmisión local, luego de un caso importado conocido ³⁷⁸.

Caso secundario: Caso nuevo de una enfermedad trasmisible, surgido a partir del contacto con un caso índice ³⁷⁸.

Caso nuevo: Enfermo en quien se establece un diagnóstico por primera vez ²⁷².

Caso probable: Persona que presenta signos o síntomas sugerentes de la enfermedad bajo vigilancia ²⁷².

Caso sospechoso: Individuo susceptible que presenta algunos síntomas o signos compatibles con el padecimiento o evento bajo vigilancia ²⁷².

Célula. Unidad morfofuncional de los seres vivos. Puede presentarse aislada (organismos unicelulares) o en grupos (organismos multicelulares) ³⁷⁵.

Cianosis: coloración azul de piel y mucosas ²⁷¹.

Cobertura vacunal: Indicador que expresa la proporción de la población blanco que fue vacunada conforme a las normas establecidas en la estrategia de vacunación según biológico ³⁷⁸.

Colonización: proceso por el que un patógeno se fija a receptores específicos de la superficie tisular y supera las defensas químicas producidas por los tejidos ³⁵⁸.

Contacto: cualquier persona o animal cuya relación con una fuente de infección haya sido tal que pueda contraer la infección ³⁵⁸.

Contaminación: Acción o momento por el cual una persona, animal o elemento (ambiente, agua, aire, tierra, alimento) se convierte en vehículo mecánico de diseminación de un agente patológico ³⁷⁸.

Control de enfermedades: Acciones o intervenciones desarrolladas con el objetivo de reducir la incidencia y/o prevalencia de enfermedades al más bajo nivel posible ³⁷⁸.

Convulsión o ataque: Contracción involuntaria, violenta o tenue de los músculos voluntarios que determina movimientos irregulares, localizados en uno o varios grupos musculares o generalizados a todo el cuerpo ²⁷¹.

Cultivo: Propagación de microorganismos o células vivas en medios propicios para su desarrollo ³⁷⁹.

Cultivo axénico: Cultivo puro de microorganismos, libre de contaminantes externos y de otros organismos ³⁵⁰.

Desinfección: Destrucción de agentes infecciosos que se encuentran fuera o en la superficie del cuerpo de personas o elementos contaminados, por medio de la exposición directa a agentes químicos o físicos ³⁷⁸.

Dificultad respiratoria: Alteración en el funcionamiento pulmonar, que se manifiesta por uno o más de los siguientes signos: aumento de la frecuencia respiratoria; tiraje; estridor en reposo; o sibilancia en diferentes intensidades ²⁷¹.

Diagnóstico: Acto por el cual el médico, agrupando los síntomas mórbidos que ofrece el enfermo, los atribuye a una enfermedad que ocupa su lugar en el cuadro nosológico ³⁷¹.

Dosis de refuerzo o “Booster”: Dosis adicional de una vacuna o toxoide con objeto de incrementar y prolongar su efecto inmune ³⁵⁸.

Efectividad: Mide la consecuencia del propósito u objetivo general. En salud se mide por indicadores como Expectativa de vida, Mortalidad, Morbilidad ³⁷⁸.

Efecto: Es el resultado final, deseado o no ³⁷⁸.

Efecto adverso: Reacción indeseable que ocurre tras una vacunación. Puede estar causada por el producto vacunal, reacción inmunológica del individuo o por el procedimiento de vacunación ³⁸².

Eficacia: Capacidad de obtener resultados satisfactorios, ajustados a los objetivos ³⁷⁸.

Eficiencia: Obtención de resultados lo más satisfactorios posibles al menor costo ³⁷⁸.

Eliminación: Es la reducción a cero de la incidencia de una enfermedad con mantenimiento indefinido en el tiempo de las medidas de control, mientras no se erradique el agente ³⁷⁸.

Emergencia epidemiológica: Evento de nueva aparición o reaparición, cuya presencia pone en riesgo la salud de la población, y que por su magnitud requiere de acciones inmediatas ²⁷².

Encuesta epidemiológica: Relevamiento epidemiológico hecho por medio de recolección ocasional de datos, casi siempre por muestreo y que aporta datos sobre factores de riesgo y/o la prevalencia de casos clínicos o portadores, en una determinada población ³⁷⁸.

Endemia: Presencia continua de una enfermedad o un agente infeccioso en un área geográfica determinada. Puede también expresar la prevalencia usual de una enfermedad particular en una zona geográfica ³⁷⁸.

Enfermedad emergente: Es aquella que aparece o se diagnostica por primera vez o aquella cuya incidencia ha aumentado en los últimos dos decenios y tienden a incrementarse en el futuro ³⁷⁸.

Especificidad: Capacidad de un test o una prueba diagnóstica para reconocer los individuos sanos (verdaderos negativos) ³⁷².

Epidemiología: Rama de la medicina que trata de la incidencia, distribución y control de las enfermedades entre las poblaciones ²⁷¹.

Erradicación: Desaparición en un área continental, en un tiempo determinado, tanto de casos de enfermedad como del agente causal ²⁷⁴.

Estudio observacional: Analiza estudios epidemiológicos en los que el investigador no controla previamente las condiciones en las que se conduce el estudio. Los cambios o diferencias en una característica son estudiados con relación a los cambios o diferencias en otras, sin la intervención del investigador ³⁷².

Estudio prospectivo: Estudio epidemiológico en el que se identifica un grupo de personas expuestas y un grupo de no expuestas a diferentes grados o a factores de hipotéticamente enfermedad ³⁷².

Estudio retrospectivo: Estudios que comienzan con la identificación de personas con una enfermedad de interés y un grupo de personas sin la enfermedad, para examinar la relación de una característica y la enfermedad, comparando con qué frecuencia el atributo o característica está presente, o si son cuantitativo los niveles de atributo en cada grupo, buscando posibles factores casuales ³⁷².

Estridor: Ruido áspero, de predominio inspiratorio, que ocurre cuando se estrecha la laringe ²⁷¹.

Huésped: Organismo simple o complejo, incluido el hombre, que en circunstancias naturales permite la subsistencia o el alojamiento de un agente infeccioso ³⁷⁸.

Incidencia, tasa de: Número de casos nuevos de una enfermedad en una población particular durante un período específico de tiempo ³⁷⁸.

Incubación período de: Intervalo de tiempo entre la exposición efectiva del huésped susceptible a un agente biológico o sus productos tóxicos, y el inicio de los signos y síntomas clínicos de la enfermedad en ese huésped ³⁷⁸.

Infección: Penetración y desarrollo o multiplicación de una agente infeccioso en el organismo de una persona o animal. Infección no es sinónimo de enfermedad infecciosa; el resultado puede ser manifiesto o no (aparente o inaparente). La presencia de agentes vivos en la superficie del cuerpo o en prendas de vestir o artículos sucios, no constituyen infección, sino contaminación de dicha superficie u objetos ³⁷⁸.

Inmunidad: Estado biológico del organismo capaz de resistir y defenderse de la agresión de agentes extraños; sin embargo, en ocasiones el organismo también actúa contra sustancias propias ²⁷⁴.

Inmunidad activa: Protección de un individuo susceptible a una enfermedad transmisible, mediante la aplicación de una vacuna o toxoide ²⁷⁴.

Inmunidad adquirida: Cualquier forma de inmunidad no innata, que se adquiere a lo largo de la vida. Puede ser natural o artificial, e inducida activa o pasivamente ²⁷⁴.

Inmunidad pasiva: Forma de inmunidad adquirida, debida a la acción de los anticuerpos transmitidos en forma natural a través de la placenta de la madre al feto,

a través del calostro de la madre al lactante o bien artificialmente por inyección de sueros como tratamiento profiláctico de alguna enfermedad. La inmunidad pasiva no es permanente ni dura tanto tiempo como la activa ²⁷⁴.

Inmunología: Rama de las ciencias biológicas que se ocupa del estudio de las respuestas de defensa a estímulos exógenos o endógenos y a sus desviaciones patológicas ³⁷¹.

Inmunógeno: Antígeno que produce una respuesta inmune. Todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos los antígenos son inmunógenos ³⁸².

Inmunogenicidad: Es la potencia o capacidad que tiene una molécula para generar una respuesta inmune y depende tanto de su naturaleza, como de la inherente al individuo en el que actúa (receptor) ³⁸¹.

Inmunización: Consiste en la inducción y producción de una respuesta inmunitaria específica protectora (anticuerpos y/o inmunidad mediada por células) por parte de un individuo sano susceptible como consecuencia de la administración de un producto inmunológico, la vacuna o toxoide. Se define como la acción de conferir inmunidad mediante administración de antígenos (inmunización activa) o mediante la administración de anticuerpos específicos (inmunización pasiva) ³⁸².

Inmunización primaria: Serie de dosis de un mismo producto biológico vacunal que se ha de administrar a una persona susceptible para que consiga una inmunidad adecuada frente a la infección que se quiere prevenir ³⁷¹.

Inmunoglobulinas: a) Proteínas plasmáticas con función de anticuerpo; hay cinco clases o isotipos: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. De la IgG existen cuatro subclases (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), y de la IgA dos (IgA1, IgA2). b) Preparado farmacéutico consistente en una solución estéril de anticuerpos, los cuales generalmente se obtienen de mezclas de plasmas de donantes; contiene un 15%-18% de proteína ³⁵⁸.

Memoria Inmunológica: Capacidad de las células del sistema inmunitario (linfocitos T y B) para reconocer un antígeno con el que estuvieron previamente en contacto y de responder de forma rápida y generalmente eficaz frente a él ³⁸².

Microgramo (µg): Es una unidad de masa del SI (sistema internacional) que equivale a la milmillonésima parte de un kilogramo (10⁻⁹ kg) o a la millonésima de un gramo (10⁻⁶ g). El microgramo se emplea en los análisis químicos cuantitativos para medir la pequeñísima cantidad de componentes que tiene una pequeña muestra ³⁸².

Mililitro (ml): Unidad de volumen equivalente a la milésima parte de un litro, representado por el símbolo ml. Equivale a 1 centímetro cúbico ³⁸².

Morbilidad: Número de personas enfermas o, el número de casos de una enfermedad en relación a la población en que se presentan en un lugar y tiempo determinado. Se expresa generalmente a través de tasas ²⁷⁰.

Mortalidad: Número de defunciones ocurridas por una enfermedad determinada en relación a la población en que se presentan en un lugar y tiempo determinado. Se expresa generalmente a través de tasas ²⁷².

Muestra: Alícuota de sangre, plasma, suero o de un producto extraída del conjunto por métodos que permitan considerarla como representativa del mismo, empleada para fines de diagnóstico, comprobación o investigación, no utilizable para fines terapéuticos ²⁷³.

Norma: Documento aprobado por una institución reconocida que prevé, para su uso común y repetido, reglas, directrices o características para los productos o los procesos y métodos de producción conexos, y cuya observancia y aplicación es obligatoria. También incluye prescripciones en materia de terminología, símbolos, embalaje, marcado o etiquetado aplicable a 12 un producto, proceso o método de producción, o tratar exclusivamente de ellas ³⁸².

Oportunista: Organismos que, viviendo normalmente como comensal o de vida libre, pasa a actuar como parásito, generalmente coincidiendo con una disminución de la resistencia natural del huésped ³⁷⁸.

Patogenicidad: Los mecanismos bioquímicos por medio de los cuales los microorganismos causan enfermedad ³⁵⁰.

Patógeno: Microorganismo que en circunstancias apropiadas, es capaz de causar enfermedad a un huésped, al cual infecta ³⁸².

Patógeno oportunista: Organismo que, en circunstancias habituales, no causa daño, pero que en ciertas circunstancias produce enfermedad (ejemplo: en condiciones que producen inmunodepresión) ³⁵⁰.

PCR: Acrónimo de Polymerase Chain Reaction - Reacción en Cadena de la Polimerasa. Método muy eficiente y sensible para amplificar secuencias específicas de DNA (secuencia blanco). Permite ampliar un fragmento de DNA usualmente menor a 3000 bp hasta un millón de veces ³⁵⁰.

Periodo de incubación: Lapso que transcurre entre la exposición inicial a un agente infeccioso y la aparición de síntomas de la enfermedad que el mismo agente produce ³⁷⁹.

Pleomórfico: Que se presenta en varias formas ³⁵⁰.

Portador: Persona o animal enfermo, convaleciente o sano que alberga el agente patógeno de una enfermedad y actúa como propagador de la misma ³⁵⁸.

Prevalencia: Proporción de personas de una población que tienen una enfermedad determinada, un efecto adverso, una complicación, entre otros); describe la situación en un momento concreto. Puede también significar manifestaciones de un hecho durante un determinado período de tiempo; por ejemplo, “prevalencia de anticuerpos” ³⁷⁸.

Quimioprofilaxis: Administración de una sustancia química, incluidos los antibióticos, para evitar el desarrollo o la evolución de una infección hasta manifestarse plenamente la enfermedad ³⁷⁸.

Reservorio: Cualquier persona, animal, vegetal, materia inorgánica, sustancia o combinación de los mencionados, en donde un agente infeccioso vive, se multiplica y del que depende para su supervivencia y reproducción de modo que pueda transmitirse a un huésped susceptible ³⁷⁹.

Riesgo: Probabilidad de que ocurra un hecho, por ejemplo, de que un individuo enferme o muera, dentro de un período de tiempo o edad determinados ³⁷⁹.

Sensibilidad: Capacidad del procedimiento de diagnóstico de efectuar diagnósticos correctos de enfermedad cuando la misma está presente, (verdaderos positivos o enfermos) ³⁷⁸.

Serotipificación: Caracterizado de un microorganismo mediante la identificación de los antígenos que posee. Se utiliza para diferenciar cepas dentro de una misma especie ³⁷⁹.

Síndrome: Conjunto de signos y síntomas que caracterizan a una enfermedad en particular. Un síndrome puede deberse a varias etiologías que tiene en común el compartir diversos mecanismos fisiopatológicos ³⁷⁹.

Síndrome coqueluchoide: Término utilizado para incluir aquellos pacientes que presentan cuadro clínico indistinguible de tos ferina, pero no se identifica la presencia de *Bordetella pertussis* o *parapertussis* por ningún método de laboratorio y

la etiología puede deberse a otros agentes bacterianos o virales tales como: *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *M. pneumoniae*; Adenovirus, Influenza virus, Parainfluenza 1-4, Virus Sincicial Respiratorio (VRS), Citomegalovirus y Virus de Epstein Barr ³⁰⁰.

Síntoma: Manifestación subjetiva de una alteración orgánica o funcional, que sólo es capaz de apreciar el paciente (Ej: dolor) ³⁵⁰.

Seroconversión: Producción de anticuerpos específicos frente a un microorganismo, detectables en el suero, durante el curso de una infección o en respuesta a una inmunización ³⁵⁰.

Serología: método diagnóstico de enfermedades infecciosa por medio de la detección de anticuerpos específicos de microorganismos en la sangre (suero) ³⁵⁸.

Sueros: Productos de origen animal derivados de la sangre del caballo u otras especies ²⁷⁴.

Susceptible: Individuo que tiene el riesgo de contraer alguna enfermedad evitable por vacunación, porque, de acuerdo con su edad cronológica u ocupación, no ha completado su esquema de vacunación y no ha enfermado de dichos padecimientos ²⁷⁴.

Transmisión (Transmisibilidad): Intervalo de tiempo durante el cual una persona o animal infectado transfiere un agente biológico a otro individuo, al medio ambiente o al organismo de un vector hematófago, posibilitando por lo tanto su transmisión a otro huésped ³⁷⁸.

Transmisión, modo de: Cualquier mecanismos por medio del cual un agente infeccioso se propaga desde una fuente o un reservorio hasta un nuevo huésped ³⁷⁸.

Tinción Gram: Técnica de tinción diferencial que divide a grandes grupos bacterianos en gram positivos o gram negativos de acuerdo a su habilidad para retener el cristal violeta cuando son decolorados con un solvente orgánico, como el etanol ³⁵⁰.

Toxina: Sustancia productora de efectos tóxicos, en especial las proteínas de origen vegetal, animal o bacteriano, cuyos caracteres generales más importantes son los de producir efectos tóxicos y de ser antígenos. Las toxinas producidas por las bacterias incluyen a las endotoxinas y a las exotoxinas ³⁷⁸.

Tos Ferina: Enfermedad caracterizada por infección del aparato respiratorio con accesos de tos y respiración difícil. Es infección grave y la mayoría de casos se presentan en niños ³⁸⁴.

Toxide: Toxina que ha sido tratada con productos químicos o calor, a fin de perder su efecto tóxico, pero que conserva su inmunogenicidad ²⁷⁴.

Vacuna: Suspensión de microorganismos vivos atenuados, inactivados o sus fracciones, que son aplicados a individuos con el objeto de inducir inmunidad activa protectora contra la enfermedad infecciosa correspondiente ²⁷⁴.

Vacunación: Aplicación de un producto inmunizante a un organismo, con objeto de protegerlo contra el riesgo de una enfermedad determinada ²⁷⁴.

Virulencia: Grado de patogenicidad de un agente infeccioso, indicado por las tasas de letalidad, o por su capacidad para invadir y lesionar los tejidos del huésped, o por ambos