

# Métodos actuales para el diagnóstico de pertussis o coqueluche

---

**Por Daniela Hozbor**

Laboratorio VacSal. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular.  
Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. CCT  
La Plata CONICET

2014

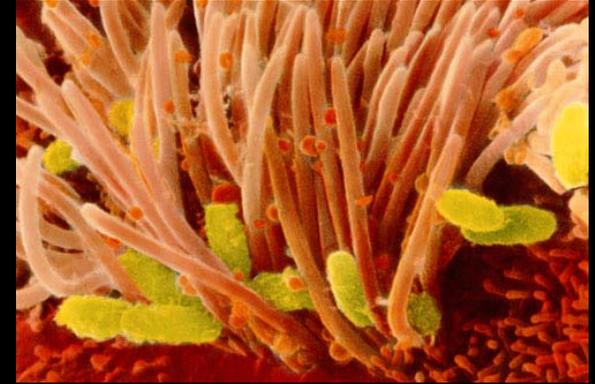
hozbor.daniela@gmail.com

# Objetivos

- Describir los antecedentes que muestran a pertussis como problema para la salud pública. Datos de nuestro país y otros.
- Describir los métodos de diagnóstico para pertussis actuales y sus implicaciones en salud pública
  - Microbiológico (cultivo)
  - Molecular (PCR convencional PCR Real Time)
  - Serológico (ELISA)
- Familiarizarse con las metodologías diagnósticas, la interpretación de los resultados y el algoritmo de trabajo
- Valorizar la vigilancia integrada y al laboratorio dentro de ella

# PERTUSSIS, COQUELUCHE, TOS FERINA

Infección respiratoria inmunoprevenible altamente contagiosa causada principalmente por *Bordetella pertussis*



Afecta preferentemente a los niños menores de 1 año de edad pero puede darse incluso en adolescentes y adultos

Puede ser fatal

OMS estima que en el mundo se producen 16 millones de casos por año de los cuales 195.000 resultan ser fatales

# Estrategias de control: Vacunas

## VACUNAS CELULARES (DTP)

Bacteria entera muerta y detoxificada

## VACUNAS ACELULARES (DTaP)

Inmunógenos protectores  
PT, PRN, FHA, FIM2 y FIM3

1906

1925

1940

1950

1970

1981

1990

2000

2005-actual

Bordet y Gengou  
aislan el agente  
causal

Madsen: primeras  
inmunizaciones  
(bacteria muerta y  
detoxificada)

Perla Kendrick  
Formulación DTP

Inmunización masiva  
con DTP

Suspensión de la vacunación  
y epidemias.

Desarrollo vacunas  
acelulares (DTaP)

Se licencia en Japón la  
primera vacuna acelular.

Desarrollo y evaluación  
de distintas vacunas  
acelulares.  
Implementación

Vacunas acelulares  
para adolescentes y  
adultos. Refuerzos



Jules Bordet  
(1870-1961)



Perla Kendrick

## VACUNAS CELULARES (DTP)



Efectos adversos

Eficiencia 80-85%

## VACUNAS ACELULARES (DTaP)

Menos reactogénicas, más seguras

Eficiencia asociada al número de  
componentes.

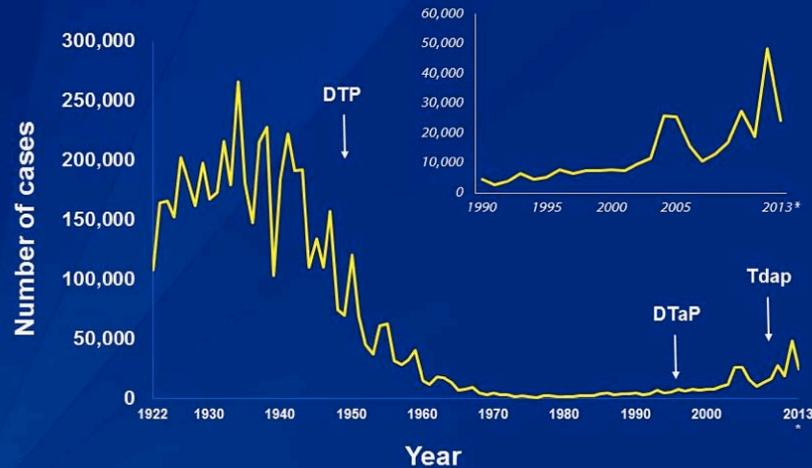
Pentavalente eficacia similar DTP

# Vaccine-preventable diseases

<b>Disease</b>	<b>Maximum cases</b>	<b>Cases in 2003</b>	<b>% change</b>
<b>Diphtheria</b>	<b>296,939 in 1921</b>	<b>1</b>	<b>99.99%</b>
<b>Tetanus</b>	<b>1,560 in 1923</b>	<b>20</b>	<b>98.5%</b>
<b>Pertussis</b>	<b>265,269 in 1934</b>	<b>11.647</b>	<b>92.1%</b>
<b>Measles</b>	<b>894,134 in 1941</b>	<b>56</b>	<b>99.98%</b>
<b>Paralytic polio</b>	<b>21,269 in 1952 3,100 died</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Mumps</b>	<b>152,209 in 1968</b>	<b>231</b>	<b>99.80%</b>
<b>Rubella</b>	<b>57,686 in 1969</b>	<b>7</b>	<b>99.9%</b>
<b>HIB</b>	<b>20,000 prior to 1985</b>	<b>259</b>	<b>98.7%</b>

From Centers for Disease Control and Prevention. MMWR 2004

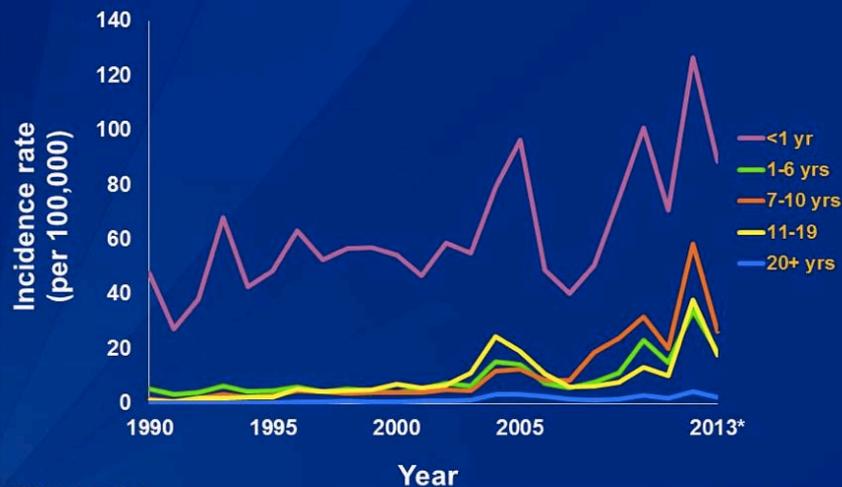
## Reported NNDSS pertussis cases: 1922-2013\*



\*2013 data are provisional.

SOURCE: CDC, National Notifiable Diseases Surveillance System and Supplemental Pertussis Surveillance System and 1922-1949, passive reports to the Public Health Service.

## Reported pertussis incidence by age group: 1990-2013\*



\*2013 data are provisional.

SOURCE: CDC, National Notifiable Diseases Surveillance System and Supplemental Pertussis Surveillance System

## Notice to Readers: Final 2012 Reports of Notifiable Diseases August 23, 2013 / 62(33)

[http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6233a6.htm?s\\_cid=mm6233a6\\_w](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6233a6.htm?s_cid=mm6233a6_w)

### Reported Cases: 2011 and 2012

Weeks 1-52, 2011 18,719

Weeks 1-52, 2012 48,277

### Reported Cases: 2012 and 2013

Weeks 1-52, 2012: 48,277

Weeks 1-52, 2013: 24,231

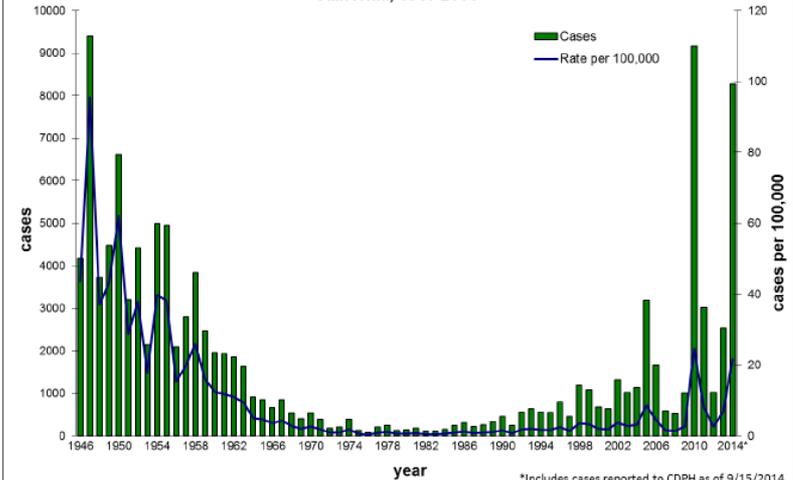
## Reported NNDSS pertussis cases: 1922-2012\*



\*2012 data are provisional.

SOURCE: CDC, National Notifiable Diseases Surveillance System and Supplemental Pertussis Surveillance System and 1922-1949, passive reports to the Public Health Service

Figure 2. Number and incidence of reported pertussis cases by year of onset -- California, 1946-2014\*



\*Includes cases reported to CDPH as of 9/15/2014

## Argentina 1969 2013

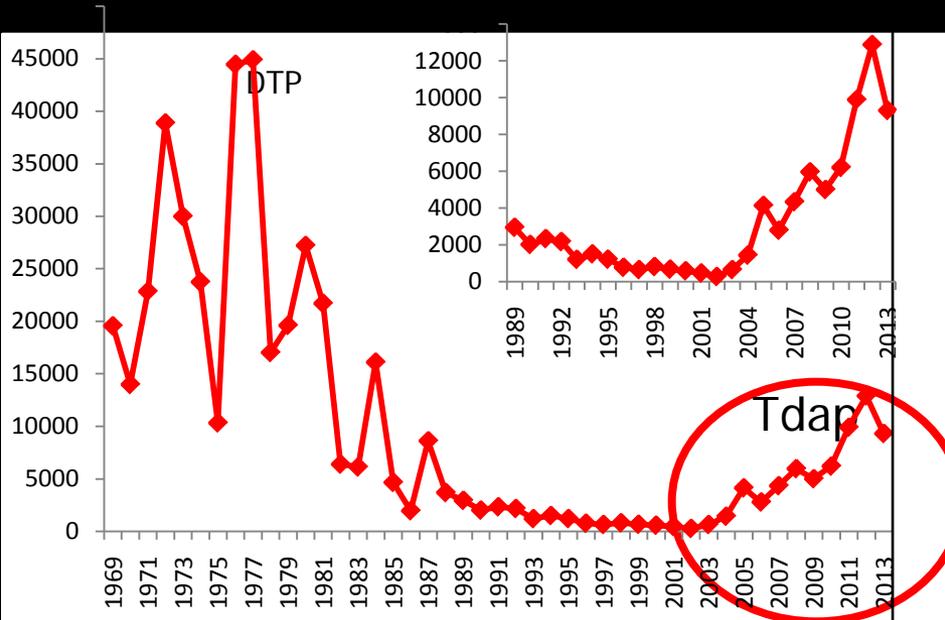
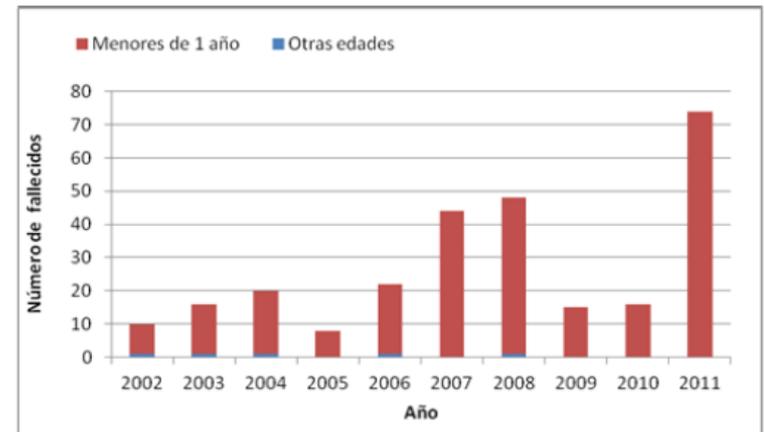


Figura 2. Fallecimientos asociados a Coqueluche. Argentina, 2002- 2011



Fuente: Dirección de Estadísticas e Información de Salud (DEIS), Ministerio de Salud de la Nación

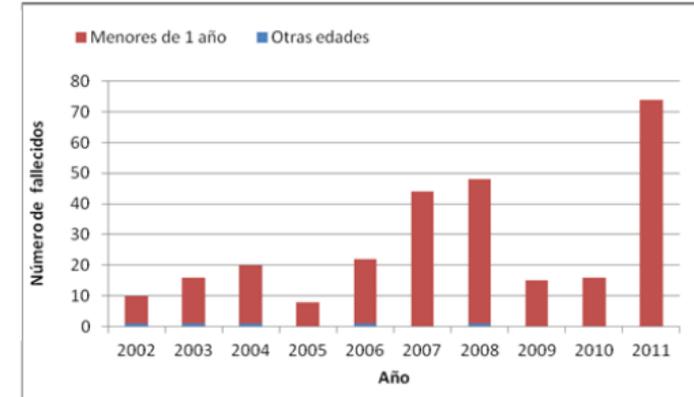
## II.1. Vigilancia de Coqueluche

### II.1.a. Análisis de la situación actual

Coqueluche continúa siendo un grave problema de Salud Pública aún en países con altas coberturas de vacunación.

En Argentina durante los años 2011 y 2012 se observó un incremento de la notificación de coqueluche y de los casos confirmados. En el año 2013 se mantuvo la tendencia en ascenso de las notificaciones, con una menor incidencia de casos confirmados.

Figura 2. Fallecimientos asociados a Coqueluche. Argentina, 2002- 2011



Fuente: Dirección de Estadísticas e Información de Salud (DEIS), Ministerio de Salud de la Nación

# Tos convulsa: Aumento de casos y muertes

## ALERTA

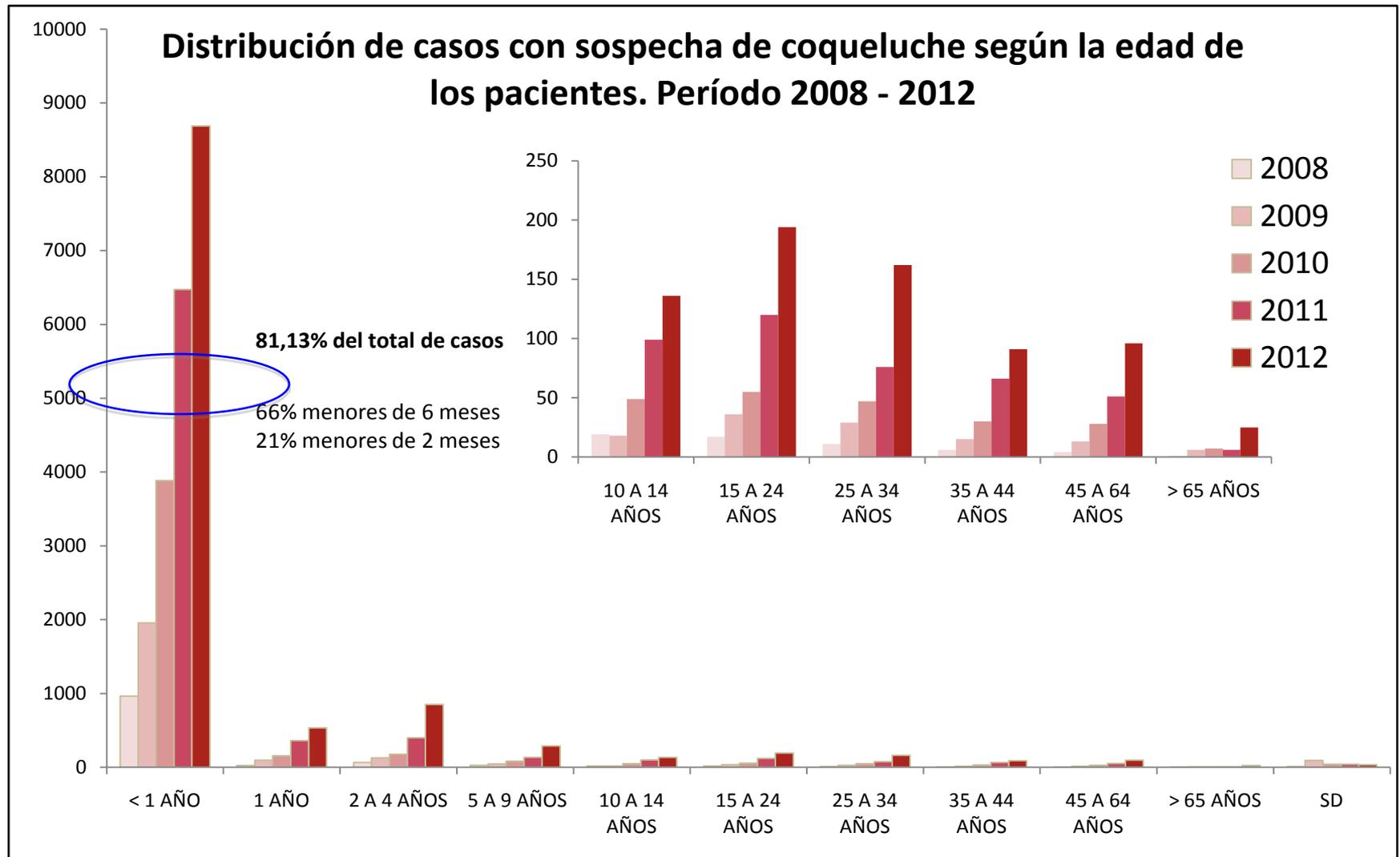
Semana Epidemiológica: 4  
Notificador : Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles  
Fecha de Alerta : 25/01/2012  
Código CIE - 10 : A37  
Redacción informe : .Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles.  
.Dirección de Epidemiología.



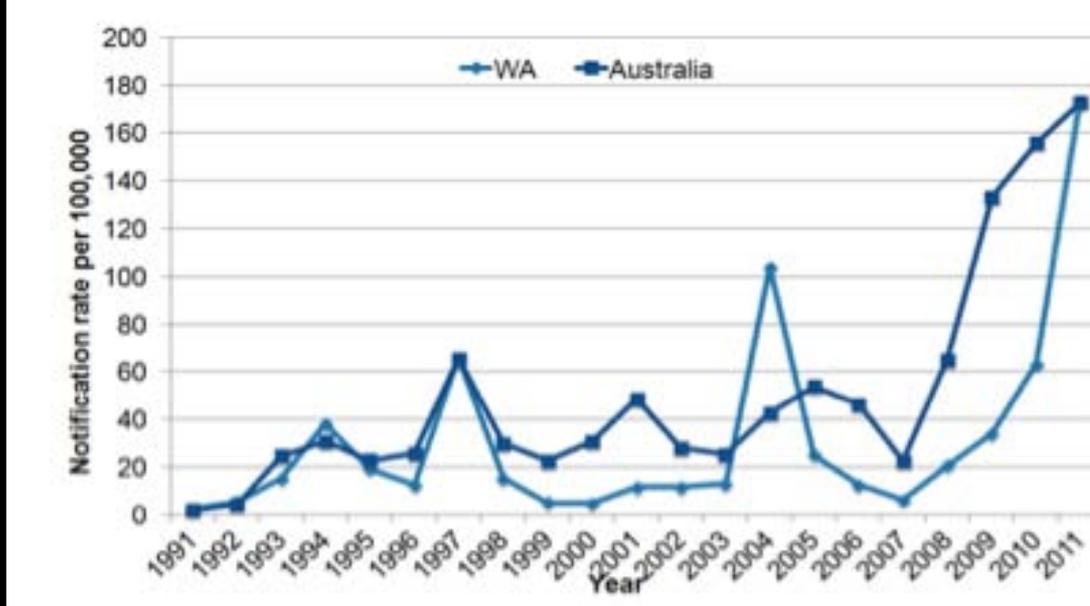
# 1

Durante el año 2014 entre la Semana Epidemiológica (SE) 1 y 37 se registraron **6076** casos sospechosos de coqueluche, de los cuales **436** fueron clasificados como confirmados.

# Coqueluche en SIVILA

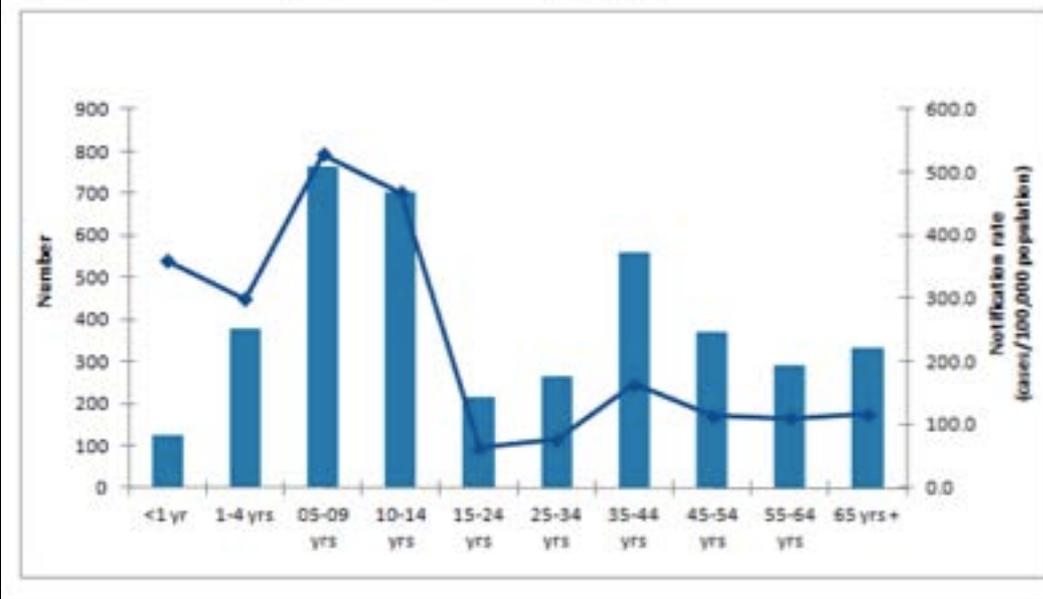


# Australia



Despite relatively high vaccination coverage, pertussis notification rates have increased both nationally and in WA in recent years. An epidemic of pertussis commenced around July 2011 in WA, and is ongoing, with the number and rate of notifications far exceeding levels recorded previously. Whilst notification rates are currently highest in primary school aged children, attributed to waning of vaccine-induced immunity, the impact of the disease remains greatest in infants under 1 year of age, with about 50% of these cases requiring hospitalisation.

Figure 3 – Number and rate of pertussis notifications in WA by age group, 2011



# Causas de la reemergencia de pertussis

---

Problemas asociados a las vacunas:

Efectividad de las vacunas existentes.

Caída de la inmunidad inducida por la vacuna.

Divergencia antigénica y posible adaptación de *B. pertussis* a la inmunidad inducida por la vacuna.

Circulación de otras especies contra las que las actuales vacunas tienen una baja efectividad de protección: ej *B. parapertussis*

# While waiting for better pertussis vaccines, let's use the ones we have.

Boyce TG, Virk A.

## CALENDARIO NACIONAL DE VACUNACION

El Estado Nacional garantiza **VACUNAS GRATUITAS** en centros de salud y hospitales públicos de todo el país

Vacunas	BCG (1)	Hepatitis B HB (2)	Neumococo Conjugada (3)	Quintuple Pentavalente DTP-HB-Hib (4)	Cuádruple o Quintuple Pentavalente (5)	Sabin OPV (6)	Triple Viral SRP (7)	Gripe (8)	Hepatitis A HA (9)	Tripe Bacteriano Celular DTP (10)	Tripe Bacteriano Acelular dTpa (11)	Doble Bacteriano dT (12)	Virus Papiloma Humano VPH (13)	Doble Viral SR (14)	Fiebre Amarella FA (15)	Fiebre Hemorrágica Argentina FHA (16)
Recién nacido	única dosis (A)	dosis neonatal (B)														
2 meses			1ª dosis	1ª dosis		1ª dosis										
4 meses			2ª dosis	2ª dosis		2ª dosis										
6 meses				3ª dosis		3ª dosis										
12 meses			refuerzo				1ª dosis		única dosis							
15-18 meses					1º refuerzo	4ª dosis		dosis anual (E)								
18 meses															1ª dosis (K)	
24 meses																
5-6 años (ingreso escolar)						refuerzo	2ª dosis			2º refuerzo						
11 años		iniciar o completar esquema (C)					iniciar o completar esquema (D)				refuerzo		3 dosis (mujeres)		refuerzo (L)	
A partir de los 15 años																única dosis (M)
Adultos		iniciar o completar esquema (C)										refuerzo (I)		iniciar o completar esquema (N)		
Embarazadas								dosis anual (F)			refuerzo (I)					
Puerperio								dosis anual (G)						iniciar o completar esquema (O)		
Personal de salud		iniciar o completar esquema (C)						dosis anual			única dosis (H)			iniciar o completar esquema (O)		

(A) Antes de separar de la maternidad.  
 (B) En los primeros 12 horas de vida.  
 (C) Si no hubiera recibido el esquema completo deberá completarlo. En caso de tener que ir tarde: según el 1º mes, 2ª dosis al mes de la primera y 3ª dosis a los 6 meses de la primera.  
 (D) Si no hubiera recibido dos dosis de Triple Viral a una de Triple Viral más una dosis de Doble Viral.  
 (E) Deberán recibir en la primera ocasión 2 dosis de vacuna separadas al menos por 4 u ocho semanas.  
 (F) En cualquier trimestre de la gestación.  
 (G) Madres de niños menores a 6 meses que no se vacunaron durante el embarazo.

(I) A los 10 años de la última vacunación antitetánica.  
 (J) A partir de la semana 20 de gestación.  
 (K) Residentes en zonas de riesgo.  
 (L) Residentes en zonas de riesgo. Única refuerzo a los 10 años de la 1ª dosis.  
 (M) Residentes o trabajadores con riesgo ocupacional en zonas de riesgo.

(1) BCG: Tuberculosis (formas invasivas)  
 (2) HB: Hepatitis B  
 (3) Previene la Meningitis, Neumonía y Sepsis por Neumococo.  
 (4) DTP-HB-Hib: (Quintuple/Pentavalente) Difteria, Tétanos, Tos Convulsa, Hep B, Haemophilus Influenzae b.  
 (5) Cuádruple DTP-Hib: Difteria, Tétanos, Tos Convulsa, Haemophilus Influenzae b. Quintuple/Pentavalente: Difteria, Tétanos, Tos Convulsa, Hep B, Haemophilus Influenzae b. Aplicar lo que esté disponible.  
 (6) OPV: (Sabin) Poliomielitis Oral.  
 (7) SRP: (Triple viral) Sarampión, Rubéola, Paperas.  
 (8) Gripe.

(10) DTP: (Triple Bacteriano Acelular) Difteria, Tétanos, Tos Convulsa.  
 (11) dTpa: (Triple Bacteriano Acelular) Difteria, Tétanos, Tos Convulsa.  
 (12) dT: (Doble Bacteriano) Difteria, Tétanos.  
 (13) VPH: Virus Papiloma Humano, causante del 100% de los casos de cáncer de cuello de útero.  
 (14) SR: (Doble Viral) Sarampión, Rubéola.  
 (15) FA: (Fiebre Amarilla).  
 (16) FHA: (Fiebre hemorrágica argentina).

Para más información:



# Esquema de vacunación en USA

FIGURE. Recommended childhood and adolescent immunization schedule, by vaccine and age — United States, 2006

Vaccine ▼	Age ►	Birth	1 month	2 months	4 months	6 months	12 months	15 months	18 months	24 months	4-6 years	11-12 years	13-14 years	15 years	16-18 years
Hepatitis B <sup>1</sup>	HepB		HepB	HepB <sup>1</sup>	HepB			HepB Series							
Diphtheria, Tetanus, Pertussis <sup>2</sup>				DTaP	DTaP	DTaP		DTaP		DTaP		Tdap	Tdap		
<i>Haemophilus influenzae</i> type b <sup>3</sup>				Hib	Hib	Hib <sup>3</sup>	Hib								
Inactivated Poliovirus				IPV	IPV	IPV				IPV					
Measles, Mumps, Rubella <sup>4</sup>							MMR			MMR	MMR				
Varicella <sup>5</sup>							Varicella			Varicella					
Meningococcal <sup>6</sup>												MCV4		MCV4	
Pneumococcal <sup>7</sup>				PCV	PCV	PCV	PCV			PCV	PPV				
Influenza <sup>8</sup>						Influenza (yearly)				Influenza (yearly)					
Hepatitis A <sup>9</sup>						HepA series				HepA series					

This schedule indicates the recommended ages for routine administration of currently licensed childhood vaccines, as of December 1, 2005, for children through age 18 years. Any dose not administered at the recommended age should be administered at any subsequent visit, when indicated and feasible.      Indicates age groups that warrant special effort to administer those vaccines not previously administered. Additional vaccines might be licensed and recommended during the year. Licensed combination vaccines may be used whenever any components of the combination

are indicated and other components of the vaccine are not contraindicated and if approved by the Food and Drug Administration for that dose of the series. Providers should consult respective Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) statements for detailed recommendations. Clinically significant adverse events that follow vaccination should be reported through the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). Guidance about how to obtain and complete a VAERS form is available at <http://www.vaers.hhs.gov> or by telephone, 800-822-7967.

     Range of recommended ages           Catch-up immunization           Assessment at age 11-12 years

# Esquema de vacunación en USA

## Recommended Adult Immunization Schedule—United States - 2013

Note: These recommendations must be read with the footnotes that follow containing number of doses, intervals between doses, and other important information.

VACCINE ▼	AGE GROUP ▶	19-21 years	22-26 years	27-49 years	50-59 years	60-64 years	≥ 65 years
Influenza <sup>2*</sup>		1 dose annually					
Tetanus, diphtheria, pertussis (Td/Tdap) <sup>3*</sup>		Substitute 1-time dose of Tdap for Td booster; then boost with Td every 10 yrs					
Varicella <sup>4*</sup>		2 doses					
Human papillomavirus (HPV) Female <sup>5*</sup>		3 doses					
Human papillomavirus (HPV) Male <sup>5*</sup>		3 doses					
Zoster <sup>4</sup>						1 dose	
Measles, mumps, rubella (MMR) <sup>7,8*</sup>		1 or 2 doses					
Pneumococcal polysaccharide (PPSV23) <sup>4,9</sup>		1 or 2 doses					1 dose
Pneumococcal 13-valent conjugate (PCV13) <sup>10,8*</sup>		1 dose					
Meningococcal <sup>11,8*</sup>		1 or more doses					
Hepatitis A <sup>11,8*</sup>		2 doses					
Hepatitis B <sup>11,8*</sup>		3 doses					

\*Covered by the Vaccine Injury Compensation Program

- For all persons in this category who meet the age requirements and who lack documentation of vaccination or have no evidence of previous infection; zoster vaccine recommended regardless of prior episode of zoster
- Recommended if some other risk factor is present (e.g., on the basis of medical, occupational, lifestyle, or other indication)
- No recommendation

Report all clinically significant postvaccination reactions to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). Reporting forms and instructions on filing a VAERS report are available at [www.vaers.hhs.gov](http://www.vaers.hhs.gov) or by telephone, 800-622-7967. Information on how to file a Vaccine Injury Compensation Program claim is available at [www.hrsa.gov/vaccinecompensation](http://www.hrsa.gov/vaccinecompensation) or by telephone, 800-338-2382. To file a claim for vaccine injury, contact the U.S. Court of Federal Claims, 717 Madison Place, N.W., Washington, D.C. 20005; telephone, 202-357-6400.

Additional information about the vaccines in this schedule, extent of available data, and contraindications for vaccination is also available at [www.cdc.gov/vaccines](http://www.cdc.gov/vaccines) or from the CDC-INFO Contact Center at 800-CDC-INFO (800-232-6236) in English and Spanish, 8:00 a.m. - 8:00 p.m. Eastern Time, Monday - Friday, excluding holidays.

Use of trade names and commercial sources is for identification only and does not imply endorsement by the U.S. Department of Health and Human Services.

The recommendations in this schedule were approved by the Centers for Disease Control and Prevention's (CDC) Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), the American Academy of Family Physicians (AAFP), the American College of Physicians (ACP), American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) and American College of Nurse-Midwives (ACNM).

# Definiciones y clasificación

## DEFINICIONES CLÍNICAS DE CASO:

- **Menores de 6 meses:** Toda infección respiratoria aguda, con al menos uno de los siguientes síntomas: Apnea, cianosis, estridor inspiratorio, vómitos después de toser o tos paroxística.
- **Mayores de 6 meses hasta 11 años:** Tos de 14 o más días de duración acompañado de uno o más de los siguientes síntomas: tos paroxística, estridor inspiratorio o vómitos después de la tos, sin otra causa aparente.
- **Mayores de 11 años:** tos persistente de 14 o más días de duración, sin otra sintomatología acompañante.

**En situaciones de brote se ajustará la definición de caso.**

### MET. DIAGNÓSTICAS

### CLASIFICACIONES DE CASO

Microbiológica

Caso confirmado: Cultivo positivo

Clínica compatible con PCR positiva.

Clínica compatible con seroconversión.

Clínica compatible + nexa epidemiológico caso conf por lab

Molecular

Caso probable: Clínica compatible

Paciente con clínica incompleta o datos insuficientes y con resultado positivo por PCR o por seroconversión.

Serológica

Caso descartado: Clínica incompleta o datos insuficientes, laboratorio negativo y sin nexa epidemiológico con un caso confirmado

# Test diagnósticos

Microbiológico (Cultivo)

Molecular (PCR)

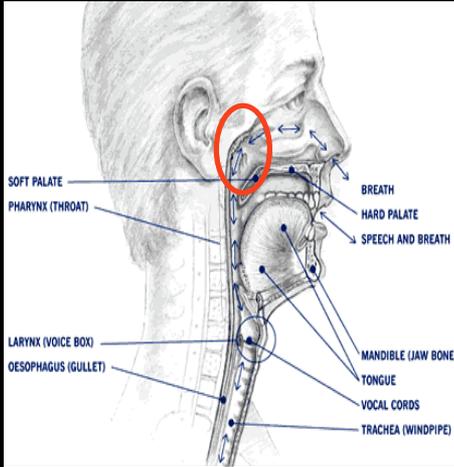
Serológico (ELISA)

Test	Specificity	Optimal Timing	Advantages
Culture	~ 100%	< 2 weeks post-cough onset	Very specific (100%)
PCR	86 – 100%	< 4 weeks post-cough onset	Rapid test; more sensitive than culture; organisms do not need to be viable; positive post-antibiotics
Paired* Sera	72 - 100%	At symptom onset and 4-6 weeks later	Effective indication of mounting antibody titers
Single* Sera	99%	At least 2 weeks post-cough onset; ideally >4 weeks post-cough	Useful for late diagnosis post antibiotics

Sensitivity and specificity values obtained from Wendelboe and Van Rie, 2008.

# Tipo de muestra y condiciones de transporte

- Debe contener células del epitelio ciliado respiratorio



## Aspirado nasofaríngeo



## Hisopado nasofaríngeo



## Nasofaringe posterior

No es bucal, no es nasal

Para cualquiera de los métodos de colección, es MUY importante usar guantes desechables y cambiar los guantes entre pacientes.

También es importante utilizar áreas separadas de la empleada para vacunar a los individuos contra pertussis a partir



## Hisopado nasofaríngeo



Adaptación material CDC



Cultivo  
PCR

uno para cultivo  
y el otro para una prueba PCR.

# Test diagnóstico

---

Después de la toma de muestra

- Se recomienda plaquear inmediatamente o colocar la muestra en medio de transporte Regan Lowe
- El ANF y el HNF sirven para cultivo y PCR

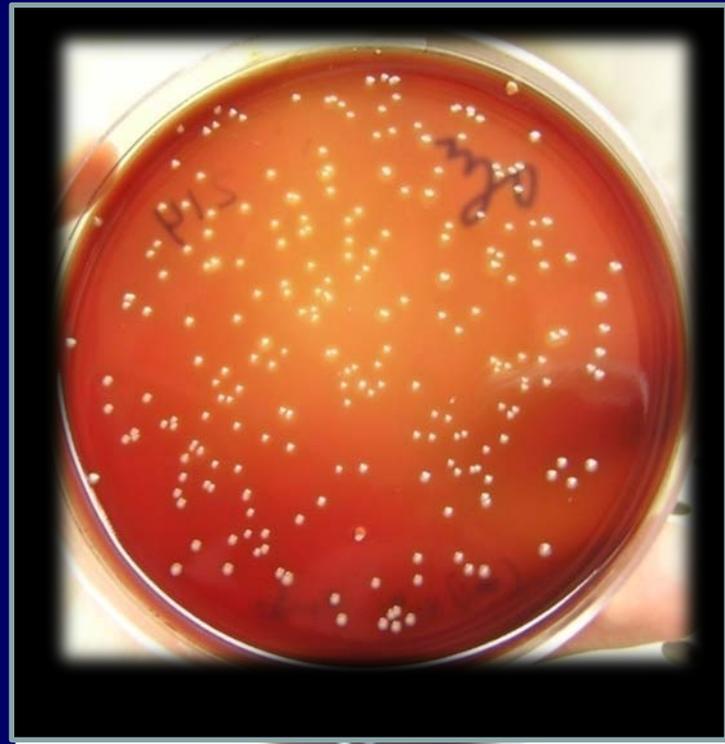
Las muestras deben procesarse lo antes posible

Hasta su procesamiento guardar en heladera. No congelar

En caso de derivación, hacerlo en frío, respetando las normas de bioseguridad y acompañando la muestra con la ficha epidemiológica completa

# Cultivo

- **Esencial para laboratorio de salud pública**
- **100% específica, baja sensibilidad**
- **Mayor tasa de positivo para cultivo:**
  - **Infantes (menor de 1 año)**
  - **No vacunado**
  - **Temprano en la enfermedad**
- **Cultivo no es difícil**



*B. pertussis* en el medio BG

# Impacto del cultivo en salud pública

---

- En la confirmación de pertussis
  - otros patógenos pueden ocasionar síntomas similares
  - pueden ocurrir co-infecciones
  - la morfología de las colonias ayuda a la identificación de otras especies
- Es particularmente importante en la sospecha de un brote
- En la caracterización molecular población bacteriana circulante

1997. Nuestro Laboratorio comenzó con el aislamiento y caracterización molecular de aislamientos obtenidos en nuestro país.

Nuestra colección :

✓ 380 aislamientos de *B. pertussis* período 1997-2013.

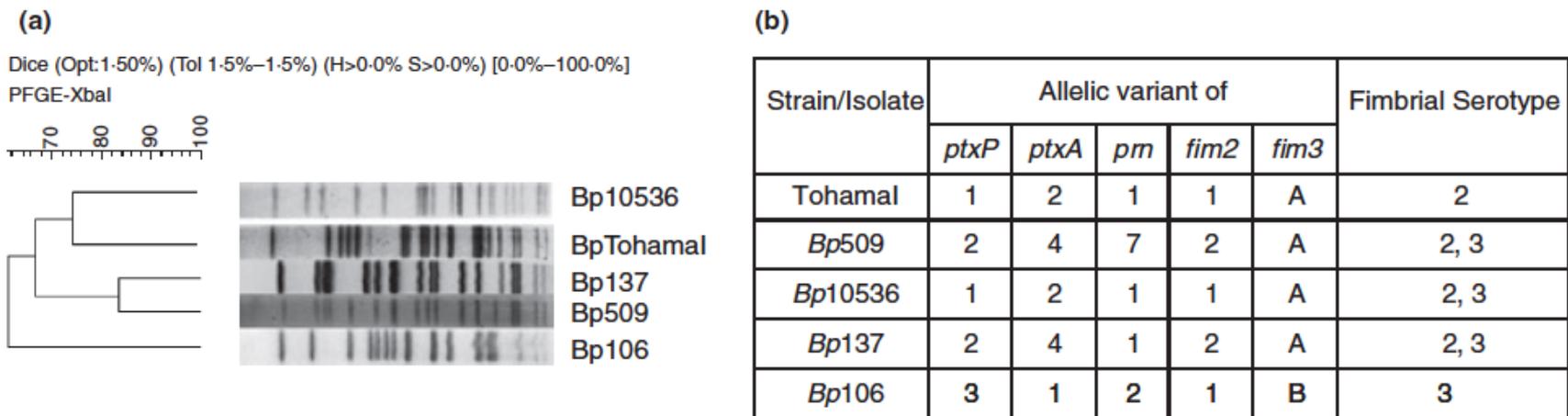
1997. Nuestro Laboratorio comenzó con el aislamiento y caracterización molecular de aislamientos obtenidos en nuestro país.

Nuestra colección :

✓ 380 aislamientos de *B. pertussis* período 1997-2013.

✓ el 92% *ptxA1*, *prn2*,

Cepas vacunales y un aislamiento local representativo de la colección local



**Figure 1** (a) Genomic analysis of *Bordetella pertussis* strains used for vaccine production. The chromosomal DNA profiles obtained after digestion with *XbaI* are shown on the left side and the identifier of strains on the right side. (b) Characteristics of vaccine strains used in this work.

ORIGINAL ARTICLE

**Genotypic and phenotypic characterization of *Bordetella pertussis* strains used in different vaccine formulations in Latin America**

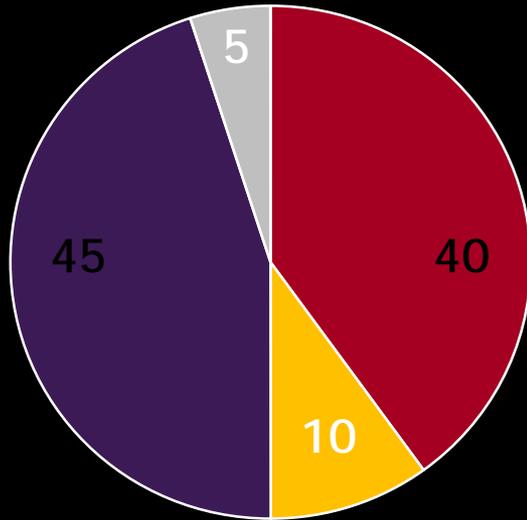
D. Bottero, M.E. Gaillard, L.A. Basile, M. Fritz and D.F. Hozbor

Laboratorio VacSal, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CONICET – Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

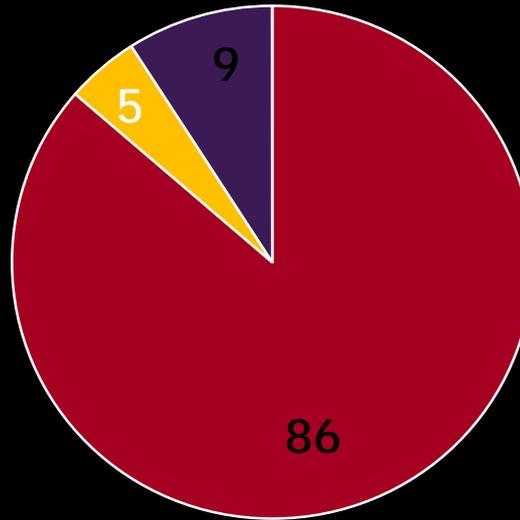
# Cambios en la población circulante de *B. pertussis*

Distribución (%) de los diferentes genotipos en distintos periodos epidémicos

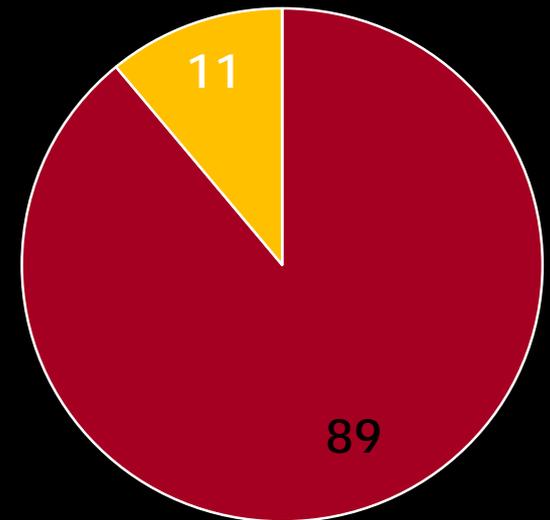
1969-2001



2002-2004



2005-2013



■ *ptxP1,2 prn1 fim3A ptxA1*

■ *ptxP3 prn2 fim3B ptxA1*

■ *ptxP1,2 prn1 fim3A ptxA2*

■ *ptxP3 prn2 fim3A ptxA1*

[Evolution of whooping cough bacterium may reduce vaccine effectiveness.](#)

Riedmann EM.

Hum Vaccin Immunother. 2014;10(6):1430. No abstract available.

PMID: 25396233 [PubMed - in process]

[Related citations](#)

[Pertactin-Negative Bordetella pertussis Strains: Evidence for a Possible Selective Advantage.](#)

Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, Qin X, Reynolds L, Kenyon C, Giambrone G, Kudish K, Miller L, Selvage D, Lee A, Skoff TH, Kamiya H, Cassiday PK, Tondella ML, Clark TA.

Clin Infect Dis. 2014 Oct 9. pii: ciu788. [Epub ahead of print]

PMID: 25301209 [PubMed - as supplied by publisher]

[Related citations](#)

[Rapid increase in pertactin-deficient Bordetella pertussis isolates, Australia.](#)

Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Guiso N, Keil AD, Lawrence A, Robson J, Hogg G, Lan R.

Emerg Infect Dis. 2014 Apr;20(4):626-33. doi: 10.3201/eid2004.131478.

PMID: 24655754 [PubMed - in process]    **Free PMC Article**

[Related citations](#)

# Diagnóstico Molecular (PCR)

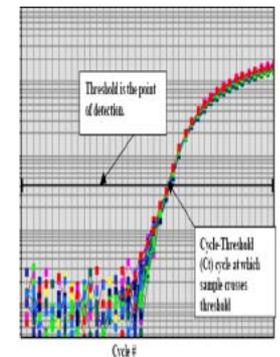
- Detecta específicamente material genético

Especificidad está dada por los primers y las condiciones de reacción

Falsos positivos pueden evitarse empleando diferentes secuencias blanco

Falso negativos pueden evitarse empleando controles

- Formato: PCR convencional o PCR en tiempo real



Primers y Tamaño de bandas esperadas:

Banda de 494 pb para  $\beta$ -globina, banda 187 para IS481 y banda de 191 pb para PT

Secuencias de primers para IS481

IS 481 F: 5'GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT 3'

IS 481 R: 5'TTCAGGCACACAAACTTGATGGGCG 3'

Secuencias de primers para PT:

Primer PTP15' CCAACGCGCATGCGTGCAGATTCGTC 3'

Primers PTP2 5' CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCTATTTTA 3'

Secuencia de primers  $\beta$ -globina:

5' CCA ATC TGC TCA CAC AGG ATA GAG AGG GCA GG 3'

5' CCT TGA GGC TGT CCA AGT GAT TCA GGC CAT CG 3'

El algoritmo consiste en realizar una primera PCR con primers IS481 y en caso de ser positiva realizar una segunda PCR para confirmar, en este caso se recomienda la utilización de los primers para PT.

## IS481 no es específico

- 50 a >200 copias en *B. pertussis*
- Copias múltiples en *B. holmesii*
- 1-7 copias en *B. bronchiseptica*

### Primers para el diagnóstico de *Bordetella parapertussis*

Amplicón esperado: 498pb

IS 1001 F: 5' CACCGCCTACGAGTTGGAGAT 3'

IS 1001 R: 5'CGCCGCTTIGATGACCTTGATA 3'

Bioseguridad: patógeno de riesgo II, necesidad de empleo de flujo laminar vertical.

Especie	IS481	IS1001	PT
<i>Bordetella pertussis</i>	+	-	+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	+	-
<i>Bordetella spp</i>	+	-	-

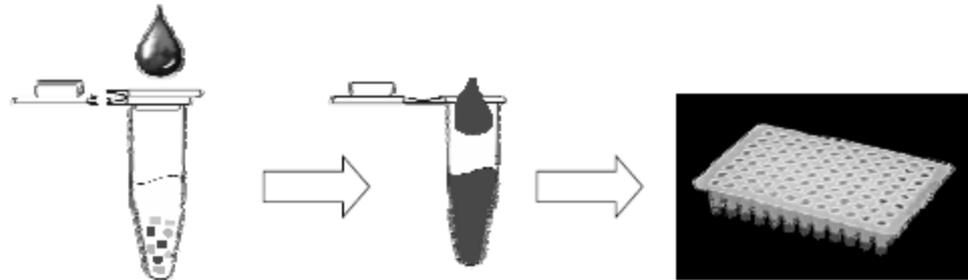
*Bordetella pertussis* ATCC 8467 o CIP 8132  
*Bordetella parapertussis* ATCC 15311

# Diagnóstico molecular

## Multiplex R-PCR Assay for *Bordetella* spp.

25

- □○ IS481 primers/probe set FAM- *B. pertussis*/*B. holmesii*
- □○ hIS1001 primers/probe set Quasar- *B. holmesii*
- □○ pIS1001 primers/probe set HEX- *B. parapertussis*



# Diagnóstico molecular

- The multiplex assay utilizes three target sequences
  - IS481
  - hIS1001 specific for *B. holmesii* (3-5 copies/cell)
  - pIS1001 targets *B. parapertussis* (20-23 copies/cell)
- The *ptxS1* targets the gene for the S1 subunit of pertussis toxin
  - Single copy in *B. pertussis* and *B. parapertussis*

Species	<i>ptxS1</i>	Multiplex		
		IS481	hIS1001	pIS1001
<i>B. pertussis</i>	+	+	-	-
<i>B. parapertussis</i>	+	-	-	+
<i>B. pertussis</i> and <i>B. parapertussis</i>	+	+	-	+
<i>B. holmesii</i>	-	+	+	-

# Los resultados positivos de PCR deben interpretarse en combinación con

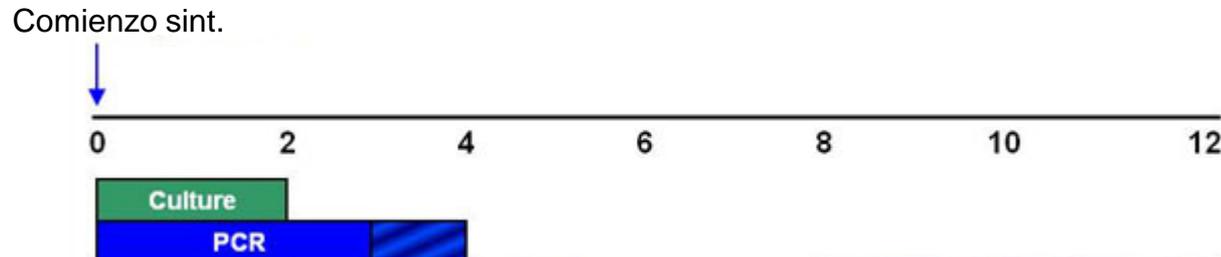
- Síntomas de los pacientes
- Estado del tratamiento
- Factores epidemiológicos

**El diagnóstico es una parte importante de la vigilancia**

# Impacto del Diagnóstico Molecular en salud pública

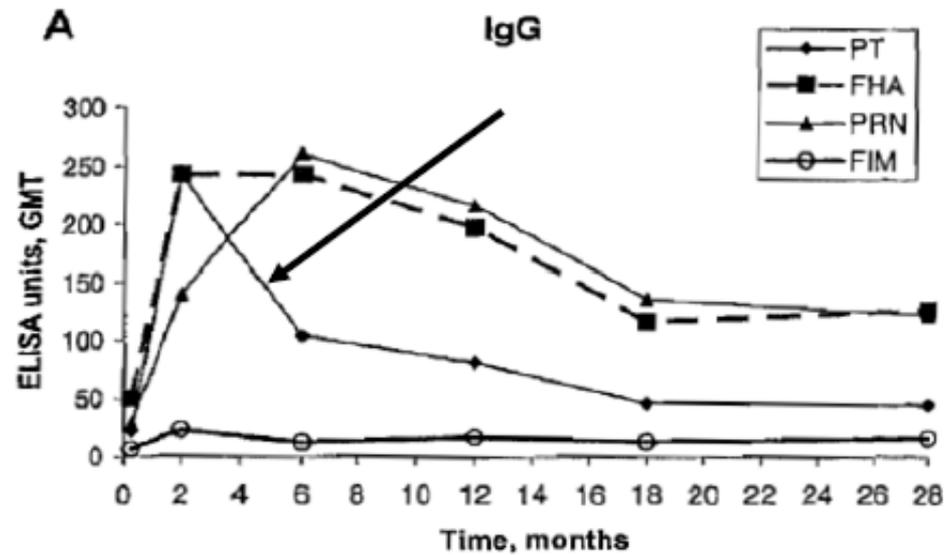
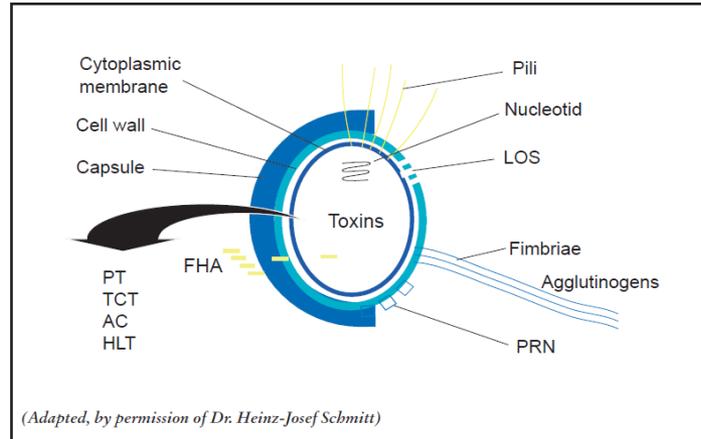
- Oportunidad - detección temprana.
- Oportunidad - Resultados más rápido que el diagnóstico microbiológico  
10 días vs 24 - 48 h

- Positividad en la fase característica de la enfermedad



- Identificación de otras especies

# Serología



# Serología

---

Métodos serológicos aplicados al diagnóstico de *B. pertussis* : ELISA

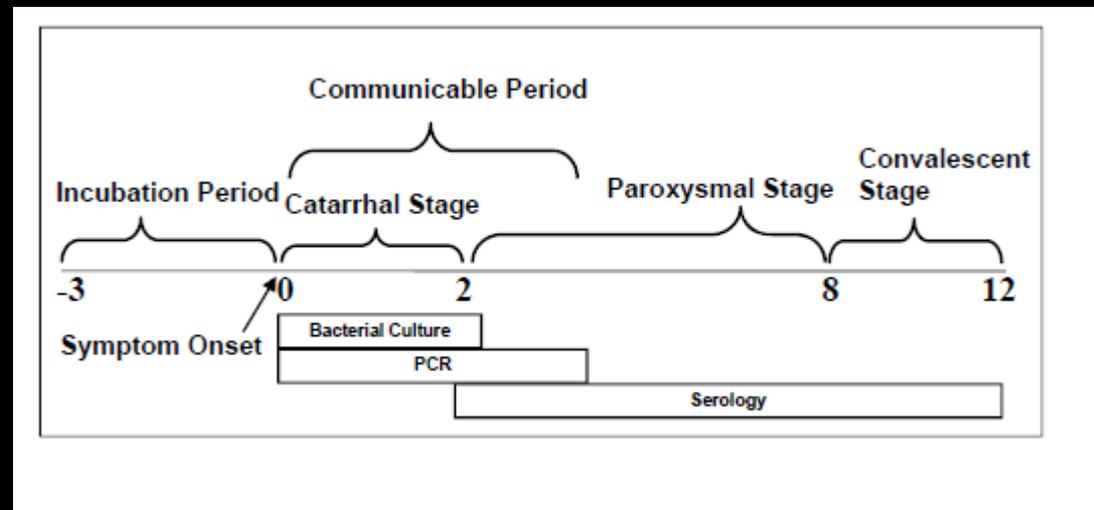
## ELISA

- ✓ Ac. anti *B. pertussis* completa
- ✓ Ac. dirigidos contra antígenos específicos de *B. pertussis*

# Serología

Originalmente diseñada para la evaluación de las vacunas

Util en los estadios tardíos de la enfermedad



Para el diagnóstico en la población adolescente adulta

Los resultados de las distintas metodologías diagnósticas pueden no concordar ya que cada una de ellas depende diferencialmente de factores como edad del paciente, fase de la enfermedad, tratamiento con antibióticos, estado inmunológico, etc.

## Menores de un año

- La prioridad es el cultivo. La reacción de PCR cuando el cultivo no está disponible. La **serología no** resulta apropiada.

## Niños:

- Cultivo ó PCR sólo durante las fases catarral o paroxística y serología, **teniendo en cuenta que la vacunación no se haya recibido en los tres años previos al momento de la toma de muestra**

## Adultos:

- **Serología, teniendo en cuenta que la vacunación no se haya recibido durante los tres años previos, en segundo término PCR.**



# Estadios y síntomas de pertussis: Valor del cultivo, serología y PCR

Semana	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-12
<b>Síntomas</b>			+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	
<b>Ig G Aglutinación ELISA</b>						++	+++	++++	+++	+++	+++	++
<b>Ig A ELISA</b>					+	+	++	+++	+++	++	+	+
<b>Cultivo</b>	+/-	++	+++	++	+	+						
<b>PCR</b>	+	+++	++++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	

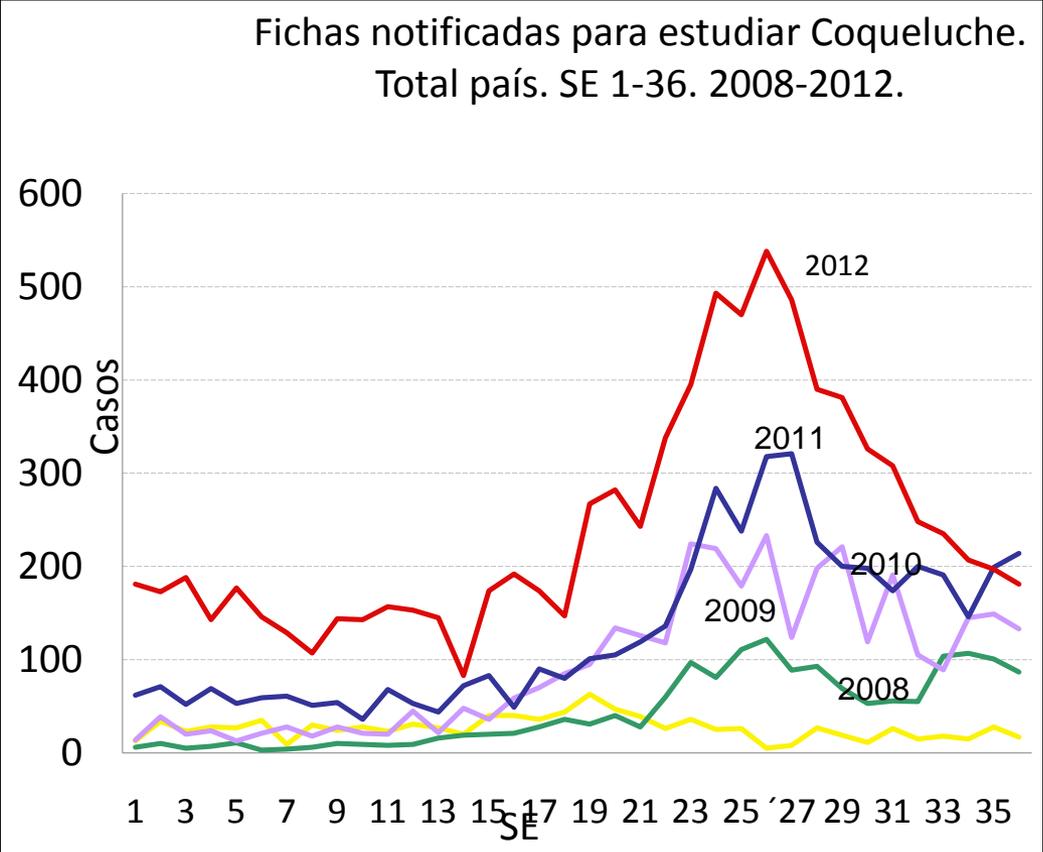
PERIODO DE INCUBACIÓN  
SIN SÍNTOMAS

FASE CATARRAL  
TOS INESP

PERIODO PAROXÍSTICO  
TOS PAROXÍSTICA

FASE DE  
CONVALECENCIA

Varias pueden ser las causas de esta situación epidemiológica, pero más allá de ellas lo claro es que hoy esta enfermedad es un problema para la salud pública que requiere de mejoras en las estrategias de control



Mejoras en el diseño de vacunas:

- vacunas celulares
- vacunas acelulares

## Lab. VacSaI IBBM FCE UNLP CONICET

Erica Bartel  
Daniela Bottero  
Celina Castuma  
Emilia Gaillard  
Dario Flores  
Maximiliano Ormazábal  
Eugenia Zurita  
Francisco Carriquiriborde  
David Sabater  
Daniela Hozbor

## LISIN FCE UNLP CONICET

Agustina Errea  
Griselda Moreno  
Martin Rumbo

## INIFTA UNLP CONICET

Paula Bergero  
Pablo Pesco  
Gabriel Fabricius



Muchas gracias por la atención!!