



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE
PEDIATRIA**

**IDENTIFICACION DE POLIMORFISMOS
EN LOS GENES DE LA PERTACTINA Y DE
LA SUBUNIDAD S1 DE LA TOXINA DE
BORDETELLA PERTUSSIS EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON DIAGNOSTICO
CONFIRMADO DE TOSFERINA.**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL
TITULO DE LA ESPECIALIDAD EN
PEDIATRIA**

**PRESENTA
DR. OVIDIO LANDA REYES**

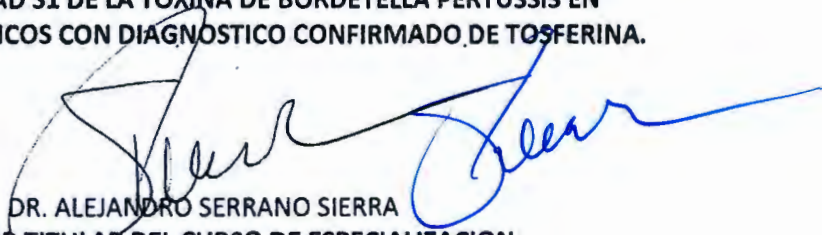
**DRA. EN C. ALEJANDRA AQUINO ANDRADE
TUTOR DE TESIS**

**DR. AGUSTIN DE COLSA RANERO
CO-TUTOR DE TESIS**

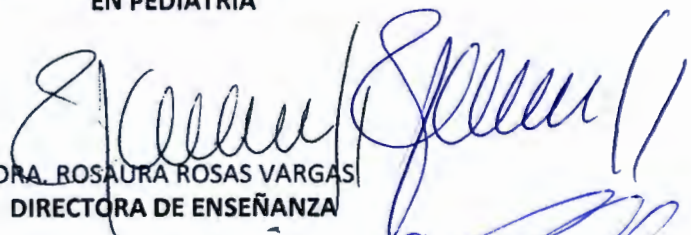
MEXICO DF. 30 DE ABRIL DE 2014



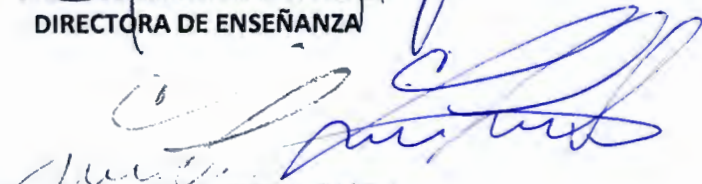
**IDENTIFICACION DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE LA PERTACTINA Y
DE LA SUBUNIDAD S1 DE LA TOXINA DE BORDETELLA PERTUSSIS EN
PACIENTES PEDIATRICOS CON DIAGNOSTICO CONFIRMADO DE TOSFERINA.**



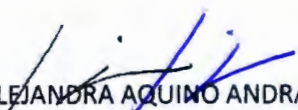
**DR. ALEJANDRO SERRANO SIERRA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION
EN PEDIATRIA**



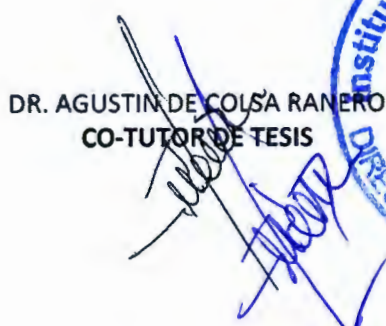
**DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA**



**DR. LUIS MARTIN GARRIDO GARCIA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO**



**DRA. EN C. ALEJANDRA AQUINO ANDRADE
TUTOR DE TESIS**



**DR. AGUSTIN DE COLSA RANERO
CO-TUTOR DE TESIS**



DEDICATORIA

A mis padres, las personas más importantes en mi vida, quienes siempre han estado ahí para alentarme y darme su amor.

A mi esposa, quien representa el amor, la comprensión y el apoyo incondicional.

Gracias.

Identificación de polimorfismos en los genes de la pertactina y de la subunidad S1 de la toxina de *Bordetella pertussis* en pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de tosferina.

INVESTIGADORES

TESISTA

Dr. Ovidio Landa Reyes

Médico residente de tercer año de la especialidad de Pediatría, Instituto Nacional de Pediatría.

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dra. en C. Alejandra Aquino Andrade

Ayudante de Investigador, Laboratorio de Detección Molecular de Patógenos y Virología en Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán.

INVESTIGADORES ASOCIADOS

Dr. Agustín De Colsa Ranero

Médico Adscrito al Departamento de Infectología Pediátrica y Jefe del Laboratorio de Detección Molecular de Patógenos y Virología en Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán.

Q.B.P Gabriel Martínez Leyva

Ayudante de Investigador, Laboratorio de Detección Molecular de Patógenos y Virología en Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán.

Dra. Wendy Dolores Domínguez Viveros

Jefa del Servicio de Epidemiología del Instituto Nacional de Pediatría. Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán.

M. en C. Chiharu Murata

Investigador en Ciencias Médicas B. Adscrito al Servicio de Investigación Clínica en el Instituto Nacional de Pediatría. Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán.

1. RESUMEN ESTRUCTURADO

Antecedentes. En plena era postvacunal, la tosferina sigue un problema de salud pública. En el mundo se registran cada año de 20 a 50 millones de casos que cobran la vida de 200,000-400,000 niños. El 90% de esas muertes son de pacientes en países en vías de desarrollo, sobre todo lactantes menores de seis meses de edad¹. En México es una enfermedad de notificación obligatoria. De acuerdo a los informes del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades se registraron 423, 203 y 252 casos de tos ferina en 2009, 2010 y 2011, respectivamente, lo que indica que a pesar de la amplia cobertura de vacunación (> 90%), continua siendo un problema de salud pública. El aumento en la incidencia de tosferina puede ser resultado de varias causas como: una mejor vigilancia, cambios en la definición de caso, nuevas técnicas diagnósticas, disminución en la cobertura de vacunación, cambios en los procedimientos de producción de las vacunas que afectan la eficacia, así como cambios en la inmunidad inducida por vacunación²⁻⁶. También se ha propuesto que la reemergencia de tosferina obedece a la diseminación de cepas antigénicamente distintas a las vacunales, teniendo como consecuencia que las vacunas no inducen la inmunidad protectora o la aparición de cepas más virulentas debida a cambios en las secuencias reguladoras del principal factor de virulencia: toxina pertussis^{4,7}. En México para la vacunación masiva de la población infantil contra la tosferina se utiliza una vacuna acelular cuyos componentes antigénicos son la pertactina codificada por el gen *prn* y la toxina pertussis (*ptxS1*) regulada por *ptxP*, estos antígenos permiten montar respuesta humoral protectora.

Justificación. En nuestro país no existe ninguna investigación que brinde información sobre la variabilidad de las cepas de *B. pertussis* por lo que la detección de polimorfismos en los genes *prn*, *ptxS1* y su secuencia reguladora permitirá establecer si los aislamientos analizados son diferentes a la cepa vacunal.

Objetivo general. Identificar los polimorfismos de los genes *prn*, *ptxS1* y *ptxP* en aislados de *B. pertussis* obtenidos de pacientes menores de un año con diagnóstico confirmado de tosferina durante el periodo mayo 2011-noviembre 2012.

Tipo de estudio. Observacional, descriptivo y transversal.

Métodos. Se analizarán 97 muestras de pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de tos ferina a través de la amplificación de dos blancos genéticos (*IS481* y *ptxS1*) por PCR en tiempo real. Actualmente se cuenta con un banco de 61 muestras de pacientes que fueron atendidos durante mayo 2011-Febrero 2012 en el Instituto Nacional de Pediatría, otros centros hospitalarios colaboradores como: Centro Médico Nacional La Raza del IMSS y Hospital General Gea González. Se coleccionarán muestras hasta alcanzar el número propuesto en este estudio (n=97). Para identificar los polimorfismos se amplificarán por PCR los genes *prn*, *ptxS1* y la secuencia promotora *ptxP*. Los amplicones se purificarán y secuenciarán. Para establecer el tipo de polimorfismos, las secuencias se compararán usando alineamientos múltiples y árboles filogenéticos. Se detectarán los cambios respecto a la cepa vacunal y se describirá la prevalencia de variantes. Se construirán modelos tridimensionales de cada uno de los polimorfismos encontrados y se analizará su antigenicidad utilizando herramientas bioinformáticas. Finalmente se analizará la información para relacionar los datos obtenidos con la presentación clínica.

2. INTRODUCCIÓN

Generalidades de *B. pertussis*

En plena era posvacunal, la tosferina sigue siendo un problema endémico mundial. En la última década ha resurgido como un problema de salud pública. En el mundo se registran cada año de 20 a 50 millones de casos que cobran la vida de 200,000 - 400,000 niños. El 90% de estas muertes son de pacientes que viven en vías de desarrollo, sobre todo lactantes menores de seis meses de edad¹.

El agente causal de la tos ferina es *Bordetella pertussis*, un cocobacilo Gram negativo aerobio, pleomórfico y no móvil. También existen otras ocho especies en el género *Bordetella*: *B. paraptussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii*, y *B. ansorpii*⁸.

B. pertussis afecta exclusivamente al humano, que también sirve como reservorio. *B. paraptussis* afecta al humano y ocasionalmente a las ovejas por lo que se han descrito dos linajes: *B. paraptussis*_{HU} y *B. paraptussis*_{OV}. *B. bronchiseptica* y *B. hinzii* son patógenos predominantemente de animales, e infrecuentemente pueden causar enfermedad en el humano. *B. holmesii* y *B. trematum* rara vez causan infecciones respiratorias e incluso no-respiratorias en el humano, mientras que *B. avium* es un patógeno exclusivo de las aves, *B. ansorpii* es la especie más reciente solo se han reportado dos casos en la literatura (Cuadro 1)⁹.

Este microorganismo expresa un gran número de factores de virulencia con funciones inmunomoduladoras¹⁰. Estos incluyen varias toxinas como la citotoxina traqueal, la toxina pertussis (PT) y la hemolisina adenilato-ciclasa (ACT) que dañan las células epiteliales ciliadas y macrófagos alveolares causando hiperlinfocitosis, también produce varias adhesinas como hemaglutinina filamentosa, pertactina y proteínas fimbriales (FIM2 y FIM3) (Cuadro 2).

Cuadro 1. Especies pertenecientes al género *Bordetella*

Especies	Huésped	Enfermedad	Comentarios
<i>B. pertussis</i>	Humanos	Tos ferina (niños), tos persistente (jóvenes-adultos)	Enfermedad clásica que dura de 6-12 semanas ocasionalmente hay complicaciones como neumonía, encefalopatía, crisis convulsivas, hipertensión pulmonar y muerte.
<i>B. parapertussis</i>	Humanos Ovejas	Tos ferina, neumonía crónica	Causa enfermedad parecida a la tos ferina, pero más leve. Los humanos y las ovejas forman dos distintos linajes, difícil intercambio entre huéspedes.
<i>B. bronchiseptica</i>	Mamíferos Humanos	Tos (perros), rinitis (cerdos)	Cursa asintomática en muchos huéspedes. La infección en humanos es rara, principalmente afecta a inmunocomprometidos.
<i>B. avium</i>	Aves	Rinotraqueitis	Infecciones propias de las aves
<i>B. trematum</i>	Humanos	Infecciones de heridas, otitis media	La infección en humanos es rara, pero se han reportado en infecciones óticas y en heridas.
<i>B. holmesii</i>	Humanos	Septicemia	Rara pero se ha incrementado el número de infecciones en humanos (septicemia), puede causar enfermedad similar a pertussis.
<i>B. hinzii</i>	Humanos Aves de corral	Asintomática	La infección en humanos es rara, reportada en pacientes con fibrosis quística Quizá comensal del tubo respiratorio de aves de corral.
<i>B. petril</i>	Ambiente Humanos	Desconocida	Aislada de un río de sedimentos de un biorreactor (ambiente). En humanos es infrecuente, se ha detectado en pacientes con mastoiditis y en fibrosis quística
<i>B. ansorpii</i>	Humanos	Dos casos descritos	Infección de quiste dermoide e infección relacionada a catéter en un paciente inmunocomprometido

Cuadro 2. Factores de virulencia de *B. pertussis*.

Factor de virulencia	Descripción	Especie
Hemaglutinina filamentososa (FHA)	Proteína secretada y asociada a superficie de 220 kDa, adhesiva, requerida para colonización traqueal, altamente inmunogénica, componente primario de vacunas acelulares.	BP,BPa,BB
Fimbria (FIM)	Estructuras de superficie celular filamentosas, requeridas para la colonización traqueal persistente, componentes de algunas vacunas acelulares.	BP,BPa,BB
Pertactina (PRN)	Proteína de superficie de 68-70 kDa, media la unión a células eucarióticas <i>in vitro</i> , aumenta la inmunidad protectora.	BP,BPa,BB
BrkA	Proteína con dominio C-terminal de 30 kDa asociado a membrana externa y un dominio n-terminal de 73 kDa asociado a la superficie, confiere protección contra péptidos antimicrobianos.	BP, BB
Factor de colonización traqueal (TcFA)	Proteína secretada de 60 kDa, tiene un papel en la colonización traqueal de modelo murino.	BP
Toxina pertussis (PT)	Toxina A-B responsable de la linfocitosis, adyuvante fuerte y componente primario de vacunas.	BP
Adenilato ciclasa (CyaA)	Toxina de la familia RTX calmodulina- activada, con actividad dual de hemolisina y adenilato ciclasa; actúa como factor anti-inflamatorio y anti-fagocítico durante la infección.	BP,BPa,BB
Secreción tipo III	Permite la traslocación de proteínas efectoras directamente en las células de huésped, se requiere para la colonización traqueal persistente, inhibe la respuesta inmune, activa ERK1/2, causa muerte celular dependiente de caspasa.	BB,BPa _v
Toxina dermonecrótica (DNT)	Toxina termolábil secretada de 160 kDa, activa Rho e induce necrosis <i>in vitro</i> .	BP,BPa,BB
Citotoxina traqueal (TCT)	Tetrapeptido-dicarido co-producto de la síntesis de peptidoglicano, causa crecimiento mitocondrial, destrucción de uniones, daño al cilio, y la producción de IL-1 α y NO ⁺	BP,BPa,BB

8,10

La introducción de las vacunas celulares completas (VCC) contra *B. pertussis* entre 1940 y 1960 dio como resultado la disminución en morbilidad y mortalidad debidas a tosferina.² En la década de 1970s el interés por *B. pertussis* reapareció como consecuencia de los efectos colaterales causados por la vacunación con VCC; tales como las reacciones locales, fiebre y síntomas sistémicos, aunado a esto se observó una baja eficacia que estaba relacionada con la manera en que son producidas, las cepas usadas, las condiciones de cultivo y los procedimientos de inactivación por lo que las VCC fueron descontinuadas en algunos países y sustituidas con vacunas acelulares (VA) las cuales contienen proteínas antigénicas como: Ptx, FHA, Pm y Fim^{2,3,12}.

En países como Australia, Canadá, Estados Unidos y Países Bajos la tos ferina es la enfermedad prevenible por vacunación con la mayor prevalencia. A pesar de las coberturas de vacunación >90%, se presentan epidemias cada tres a cinco años¹³.

El aumento en la incidencia de tos ferina puede ser resultado de varias causas como: una mejor vigilancia, cambios en la definición de caso, nuevas técnicas diagnósticas, disminución en la cobertura de vacunación, cambios en los procedimientos de producción de las vacunas que afectan la eficacia así como cambios en la inmunidad inducida por vacunación²⁻⁶.

También se ha propuesto que la re-emergencia de tos ferina obedece a la diseminación de cepas antigénicamente distintas a las cepas vacunales, teniendo como consecuencia que las vacunas no induzcan la inmunidad que sea capaz de proteger contra esos nuevos aislados^{4,5}.

La adaptación de *B. pertussis* es soportada por varias observaciones entre las que destaca la divergencia antigénica que ha ocurrido entre las cepas vacunales y los aislados clínicos respecto a las proteínas de superficies que confieren inmunidad protectora como Ptx, Pm y fimbrias, se ha establecido que esta variación afecta la eficacia vacunal en modelos de ratón. La adaptación puede involucrar además de la estructura de los factores de virulencia (por variación antigénica) la regulación de éstos¹³.

La mayoría de las investigaciones dirigidas al estudio de esta hipótesis se han centrado en el análisis de los genes que codifican para pertactina (*prn*) y para toxina pertussis (*ptx*) las cuales son parte de casi todas las VA.³ También se ha investigado el polimorfismo en el promotor del gen de la toxina pertussis, *ptxP*^{13,14}.

Pertactina

La proteína pertactina (Prn) es producida como un precursor de 910 aminoácidos, es procesada proteolíticamente en sus extremos amino y carboxilo terminales para producir P.69 y P.30 (Figura 1) las cuales están localizadas en la superficie y en la membrana externa de la célula respectivamente^{3,13}.

P.69 contiene el triplete de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), una secuencia motivo que funciona como sitio de unión celular en algunas de proteínas de mamíferos, también está involucrada en la adherencia a células del huésped^{3,15}. El análisis de *prn* se ha dirigido a dos regiones inmunodominantes que codifican las repeticiones GGxxP y PQP denominadas región 1 y región 2 respectivamente^{3,6}. La estructura cristalina de Prn predice que tanto la secuencia RGD como los motivos GGxxP están expuestos en la superficie de la proteína mientras que la región 2 está localizada más hacia el extremo carboxilo terminal¹⁵.

Los polimorfismos en la región 1 son generados probablemente por la inserción o eliminación de unidades repetidas de GGAVP y GGFGP (Figura 1), en tanto que en la región 2 aparecen con menor frecuencia como consecuencia de la inserción de IS481⁶. Los polimorfismos en la región 1 poseen diferente número de repeticiones de GGAVP y GGFGP lo que ha permitido clasificar a las cepas en tipos (Cuadro 3). Las variantes prevalentes son Prn1, Prn2 y Prn3 (Cuadro 4)¹⁶. La región 1 contiene un epítoto reconocido por células B de humano y ratón, la variación en esta región afecta la unión al anticuerpo así como la eficacia de la vacuna de células completas; sin embargo, la inmunización activa o pasiva indica que la región 1 confiere inmunidad protectora¹⁵.

En los Países Bajos tipos no vacunales de S1 y pertactina remplazaron gradualmente a los tipos vacunales hasta en 90% de las cepas aisladas en la década de 1990s. Estos resultados fueron consistentes con la hipótesis que la vacunación ha seleccionado cepas que son distintas antigénicamente de las cepas vacunales⁶.

Cuadro 3. Polimorfismos de *prn* de *B. pertussis*

		Región 1			Región 2		
	pb	305	798	1010	1595	1746*	2258
	aa	102	266	337	532	582	853
Prn1	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₂	S	L	GPQPPQPPE	H
Prn2	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₄	S	L	GPQPPQPPE	H
Prn3	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₃	S	L	GPQPPQPPE	H
Prn4	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₂	S	L	GPQPPQPPE	H
Prn5	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP)(GGFGP) ₃	S	L	GPQPPQPPE	H
Prn6	pb	T		T	G		G
	aa	F	(GGVVP)(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₂	F	R	GPQPPQPPE	R
Prn7	pb	C		C	G		A
	aa	S	(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₂	S	R	GPQPPQPPE	H
Prn8	pb	C		C	G		A
	aa	S	(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₂	S	R	GPQPPQPPE	H
Prn9	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₃	S	L	GPQPPQPPE	H
Prn10	pb	T		T	G		G
	aa	F	(GGAVP)(GGAVP) ₃ (GGFGP) ₂	F	R	GPQPPQPPE	R
Prn11	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP) ₄ (GGFGP) ₂	S	L	GPQPPQPPE	H
Prn12	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP) ₃ (GGFGP) ₃	S	L	GPQPPQPPE	H
Prn13	pb	C		C	T		A
	aa	S	(GGAVP) ₂ (GGFGP) ₁	S	L	GPQPPQPPE	H

*Numerando secuencia de Prn1 Modificado¹⁶

Toxina pertussis (PT)

La toxina pertussis está compuesta de cinco subunidades (S1 a S5), las funciones tóxica y catalítica están localizadas en la subunidad S1 la cual está formada por 235 aminoácidos, es excretada y puede encontrarse asociada a la membrana externa³. Mooi y col. describieron cuatro tipos de S1 (Figura 2; Cuadro 5), solo el tipo S1A ha sido encontrado en Italia mientras que en Holanda se localizó el tipo S1B en baja frecuencia. S1B o S1D son encontradas en vacunas celulares y acelulares^{3,6}.

Cuadro 4. Variedades de Prn y PtxS1 encontradas en diferentes países

Pertactina	PtxS1	Región	Fuente
Pm1; Pm2; Pm3	S1A, S1B, S1D	Países Bajos	3
Pm1, Pm2, Pm3, Pm5	S1A	Italia	6
Pm1, Pm2, Pm3, Pm4	S1A, S1B, S1D	Finlandia	4
Pm1, Pm2, Pm3	S1A	Reino Unido	17
Pm1, Pm2, Pm3, Pm6	S1A, S1B, S1E	Francia	5
Pm1, Pm2, Pm3	S1A, S1B	Polonia	16
Pm1, Pm2, Pm3	S1A, S1B	Japón	18
Pm1, Pm2	S1A, S1B, S1D	EU	19
Pm1, Pm2, Pm3, Pm9	S1A, S1B	Canadá	20
Pm2, Pm3	S1A, S1B, S1D	Rusia	21
Pm1, Pm2, Pm3	S1A	Alemania	2
ND	S1A, S1B	Suecia	22
Pm1, Pm2, Pm3	S1A	Australia	23
Pr1, Pm2, Pm6, Pm7	S1A, S1B, S1D, S1E	Argentina	24
Pm1, Pm2; Pm3, Pm11	S1A, S1B	Serbia	25
Pm1, Pm2, Pm7	S1A, S1B	Países Bajos	26

ND: No determinado

Ptx causa leucocitosis debido a que inhibe la salida de linfocitos, los altos niveles de linfocitosis están asociados con la mortalidad en infantes debido a hipertensión pulmonar²⁷. Las mutaciones del gen S1 derivan en sustituciones de aminoácidos y se localizan en regiones identificadas como epítopos para células T. En Holanda los tipos S1B y S1D circularon entre 1949-1954 y su frecuencia disminuyó del 58% al 12% en 1990-1996. En el periodo 1978-1985 se encontró el tipo S1A en 80% de los aislados, la frecuencia de este tipo se incremento al 88% de los aislados del periodo 1990-1996³.

Cuadro 5. Polimorfismos de *ptxS1* de *B. pertussis*

	pb	204	586	684	694	696
	aa	68	196	228	232	232
<i>ptxS1A</i>	pb	C	T	A	A	A
	aa	D	S	I	I	I
<i>ptxS1B</i>	pb	C	T	G	A	A
	aa	D	S	M	I	I
<i>ptxS1D</i>	pb	A	T	G	G	G
	aa	E	S	M	V	V
<i>ptxS1E</i>	pb	A	C	G	A	G
	aa	E	P	M	M	M

Modificado Fielt 2003

Promotor de Ptx (*ptxP*)

La síntesis y exportación de Ptx requiere 14 genes los cuales son co-transcritos con *ptxP*. *ptxP* comprende una región de aproximadamente 170 pb río arriba del gen de la subunidad A (*ptxA*) y contiene el sitio de unión de la RNA polimerasa y seis sitios de unión para el dímero BvgA. BvgA es un regulador global de genes de virulencia de *B. pertussis* la unión cooperativa de BvgA a *ptxP* es requerido para la transcripción eficiente de *ptx*. El polimorfismo se encontró en la región implicada en la unión de la RNA polimerasa y BvgA. Se reconocen 14 alelos de *ptxP* (Figura 2)^{13,14}. En un trabajo realizado en cepas de África, Asia, Europa, Norte América (Estados Unidos) y Sur América (Argentina), se analizaron aislados obtenidos en dos periodos 1935-1990 y 1990-2004 dos alelos fueron predominantes *ptxP1* y *ptxP3*, el resto de los alelos fueron escasos. Las cepas con *ptxP1* predominaron en el primer periodo y fueron encontrados con menor frecuencia durante el segundo, 88% y 47% respectivamente. Una tendencia inversa fue observada para *ptxP3*, 3% y 52%. En el primer periodo las cepas *ptxP3* fueron detectadas solamente en Países Bajos y Estados Unidos, las frecuencias fueron 3 y 13% respectivamente¹³.

Comparando la incidencia de hospitalizaciones, muertes y letalidad se dedujo que las cepas que poseen *ptxP3* son más virulentas para los humanos. Se ha propuesto la hipótesis que el alelo *ptxP3* favorece la unión de BvgA más que *ptxP1* ya que las cepas que poseen el alelo *ptxP3* producen 1.62 veces más Ptx (Figura 2)³.

La evidencia señala que la vacunación ha seleccionado al alelo *ptxP3* ya que no se encontró en cepas aisladas antes de la vacunación⁷, aunque *ptxP3* se presentó en frecuencias altas en poblaciones vacunadas en 1990s, no se detectó en cepas aisladas de Senegal, donde la vacunación se introdujo en 1987. Mooi y col. Proponen que el evento crucial que cambio el balance competitivo entre *ptxP1* y *ptxP3* fue la eliminación de la vacunación para inmunizar a menores, como la fuente principal de transmisión, seleccionando a cepas que son transmitidas más eficientemente por huéspedes primarios¹⁴.

Tipificación de cepas

Se han utilizado un gran número de técnicas para abordar la tipificación de cepas de *B. pertussis* como la serotipificación con anticuerpos monoclonales, análisis PFGE (*Pulse-Field Gel electrophoresis*); RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de secuencias de inserción²⁸; MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) así como la secuenciación de *ptxS1* y *prn*;⁵ MAST (*multiple antigen sequence typing*); MLST (*Multilocus Sequence Typing*) de genes que codifican para proteínas de superficie o genes constitutivos¹²; VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*)²; pirosecuenciación y RT-PCR analizando las curvas de disociación²¹. Utilizando estas técnicas se ha observado la separación de los aislados antes y después de la introducción de la vacuna⁵.

Algunos estudios demuestran que no existen diferencias entre los aislados de pacientes vacunados y no vacunados; sin embargo, el número de cepas estudiadas ha sido muy pequeño para tener una conclusión significativa. Lo que sí es evidente es que las cepas aisladas de los pacientes y de sus madres son idénticas, también se observó que la transmisión se realiza entre los miembros de la familia, por otro lado no se ha encontrado relación entre los aislados con la edad o estación³.

Algunos trabajos indican que el resurgimiento de tosferina se relaciona a un cambio en la epidemiología, la transmisión padres a hijos fue observada más que la transmisión niños-niños. Este cambio no se debió a la cobertura de vacunación sino como una disminución de la inmunidad inducida por la vacuna, como consecuencia algunos países han modificado la estrategia de vacunación, introduciendo un refuerzo para niños de 11-13 años de edad⁵.

En la actualidad, la política de vacunación contra tos ferina en México, consiste en aplicar una vacuna pentavalente con fracción celular de pertussis a los 2, 4 y 6 meses de edad, con revacunación a los 2 y 4 años; por lo que después de los 10 años, la inmunidad empieza a disminuir²⁹. En México es una enfermedad de notificación obligatoria de acuerdo a los informes del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVEC) se registraron 423, 203 y 252 casos de tos ferina en 2009, 2010 y 2011, respectivamente, lo que indica que a pesar de la amplia cobertura de vacunación (> 90%) continua siendo un problema de salud pública.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los aislamientos detectados de *Bordetella pertussis* causantes de tosferina presentan polimorfismos en los genes *prn*, *ptxS1* y *ptxP* diferentes a los de la cepa vacunal?

4. JUSTIFICACIÓN

La tos ferina es una enfermedad reemergente pese a que es prevenible por vacunación. En nuestro país las cifras oficiales señalan que se cuenta con una cobertura >90%; sin embargo, en los últimos años se ha detectado un aumento en el número de casos de tosferina. La reemergencia de esta enfermedad puede ser explicada por la diseminación de cepas antigénicamente distintas a las cepas vacunales o a la aparición de cepas más virulentas debido a mutaciones en la secuencia reguladora del principal factor de virulencia: toxina pertusis.

En nuestro país no existe ninguna investigación que brinde información sobre la variabilidad de los aislamientos circulantes por lo que la detección de polimorfismos en los dos antígenos principales utilizados en las vacunas acelulares: pertactina y toxina pertussis y el análisis de su secuencia reguladora permitirá establecer si los aislamientos analizados son diferentes a la cepa vacunal.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar los polimorfismos de los genes *prn*, *ptxS1* y *ptxP* en aislamientos de *Bordetella pertussis* obtenidos de pacientes menores de un año con diagnóstico confirmado de tos ferina.

Objetivos particulares

- Describir la prevalencia de polimorfismos en los genes *prn*, *ptxS1* y *ptxP* en los aislamientos analizados.
- Establecer el patrón de polimorfismos en los genes analizados de los aislamientos.
- Identificar las diferencias entre los genes *prn*, *ptxS1* y *ptxP* de los aislamientos y los de la cepa vacunal.
- Analizar la relación entre los polimorfismos en *prn*, *ptxS1* y *ptxP* con la presentación clínica.

6. HIPÓTESIS

Las secuencias de los genes *prn*, *ptxS1* y *ptxP* de los aislados de *B. pertussis* obtenidos de pacientes pediátricos con tos ferina son diferentes a los de la cepa vacunal.

7. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Es un estudio observacional, descriptivo y transversal.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Logística general

El presente estudio deriva de uno previo titulado "Detección de *Bordetella pertussis* a través de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en niños con diagnóstico de tos ferina y en sus contactos" con número de protocolo 103/2010, registrado y aprobado en el Instituto Nacional de Pediatría, que se realiza en el Laboratorio de Virología. Los centros participantes en este proyecto son: Centro Médico Nacional La Raza del IMSS y el Hospital General Gea González.

Para el desarrollo del estudio mencionado se seleccionaron los casos sospechosos de tos ferina a través del diagnóstico clínico-epidemiológico y siguiendo las definiciones operacionales que dicta la SSA, durante el periodo comprendido entre mayo 2010 y noviembre 2012. Los datos fueron colectados al ingresar el paciente al protocolo.

Para confirmar el diagnóstico de tosferina se realiza la detección de *B. pertussis* a través de la amplificación de dos blancos genéticos: la secuencia de inserción *IS481* y *ptxS1* utilizando la técnica de PCR en tiempo real. A la fecha se cuenta con un banco de DNA de 61 muestras confirmadas con *B. pertussis*. Siguiendo esta estrategia se completará el tamaño de muestra propuesto en este estudio (N=97).

El DNA de *B. pertussis* obtenido de las muestras será utilizado para realizar el análisis de polimorfismos. Los aislamientos que hayan sido conservados y cumplan con los criterios de inclusión se cultivarán en medio de Regan-Lowe para verificar su pureza. Se seleccionarán los casos de tos ferina confirmada que cumplan con los criterios de inclusión. Posteriormente se amplificarán a través de PCR los genes *prn*, *ptxS* y *ptxP*, los amplicones se purificarán y secuenciarán. Las secuencias obtenidas serán comparadas con las secuencias reportadas en la bibliografía internacional y se establecerá si poseen cambios respecto a la cepa vacunal, posteriormente se evaluará mediante herramientas bioinformáticas si los cambios encontrados tienen impacto en los epítopes involucrados en la inmunidad inducida por la vacuna (Figura 3). Finalmente se analizará la relación entre la presentación clínica y los resultados obtenidos.

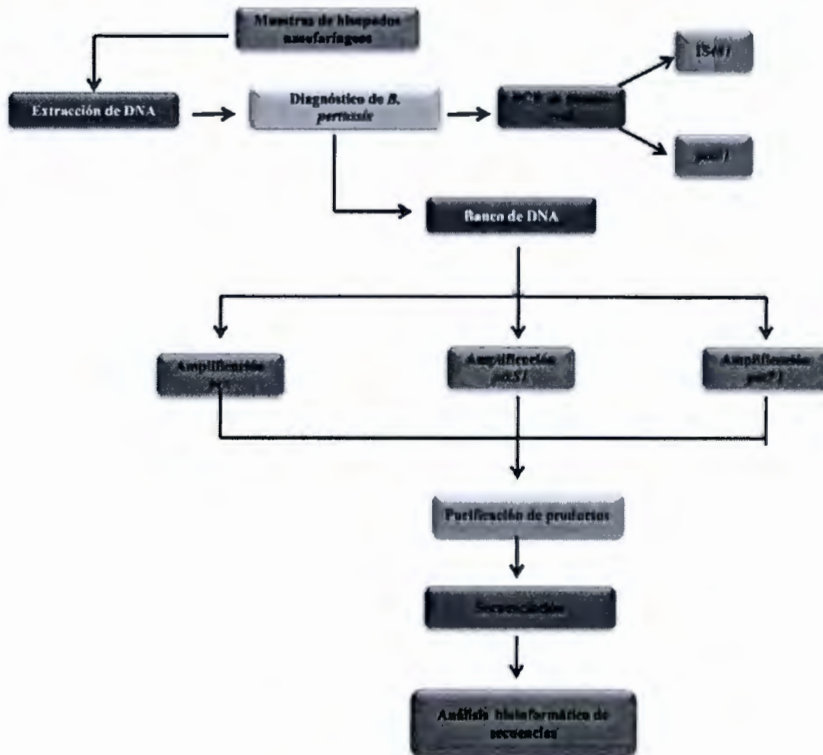


Figura 3. Flujograma de trabajo.

8.2 Población objetivo

DNA de aislamientos de *B. pertussis* obtenidos de niños menores de un año de edad con diagnóstico confirmado de tos ferina a través de la amplificación de *IS481* y *ptxS1* por PCR en tiempo real.

8.3 Criterios de inclusión

DNA de aislamientos de *B. pertussis* identificadas a través de cultivo positivo y/o detección de DNA utilizando los blancos genéticos *IS481* y *ptxS1*.

8.4 Criterios de exclusión

Muestras analizadas por PCR en tiempo real con ciclo umbral (Ct) para *IS481* y *ptxS1* >40 o ND.

Imposibilidad para realizar extracción o tipificación.

8.5 Desarrollo metodológico

a) Material biológico

Cepa de referencia de *B. pertussis* ATCC 1823.

B. pertussis detectada en hisopados nasofaríngeos de pacientes pediátricos menores de un año con diagnóstico confirmado de tos ferina, ya sea por cultivo en medio Regan-Lowe o bien a través de la amplificación de los blancos genéticos *IS481* y *ptxS1* por PCR en tiempo real.

b) Diagnóstico de *B. pertussis* a través de PCR en tiempo real

Se tomarán 200 μ l de cada una de las muestras. Se incubarán con 2 ml PBS de 2-3 h a temperatura ambiente (15-25°C), posteriormente se obtendrá el sedimento por centrifugación (10 min a 5,000 x g) y se resuspenderá en 200 μ l de PBS. El DNA de las muestras se extraerá utilizando el kit QIAampDNA (QIAGEN) siguiendo las instrucciones de fabricante. La elución del DNA se hará en 100 μ l de agua y será conservado a -20°C hasta su uso. La identificación y diferenciación de *Bordetella* spp. se realizará mediante PCR en tiempo real usando *IS481* y *ptxS1* como blancos³⁰. Los iniciadores y sondas que se utilizarán en el estudio se muestran en cuadro 6. Las sondas serán marcadas en el extremo 5' con 6-carboxilfluoresceína (FAM) y en el extremo 3' con TAMRA.

La PCR en tiempo real se realizará en un termociclador AB7500fast (Applied Biosystems). El volumen final de la mezcla de reacción será de 25 μ l y estará constituida por 4 μ l del extracto de DNA y 21 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). El protocolo de reacción será de la siguiente manera: 10 min a 95°C para la activación de la enzima, seguida de 45 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C para *IS481* y para *ptxS1* la temperatura de alineamiento será de 57°C.

Cuadro 6. Iniciadores y sondas utilizados para la detección³⁰

Blanco	Iniciador/sonda	Secuencia	Producto (bp)
IS481	852U18	CAAGCCGAACGCTTCAT	66
	894L24	GAGTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA	
	871U22P	CAGTCGGCCTTGCGTGAGTGGG	
<i>ptxS1</i>	402U16	CGCCAGCTCGTACTTC	55
	442L15	GATACGGCCGGCATT	
	419U22P	AATACGTCGACACTTATGGCGA	
<i>masaP</i>	Iniciador directo	AGATTTGGACCTGCGAGCG	65
	Iniciador reverso	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
	Sonda	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG	

Sondas en negritas

En todas las muestras se amplificará el gen de *masaP* para monitorear la calidad de DNA y verificar que no existan inhibidores de la PCR. Las muestras serán analizadas por triplicado. Por cada ensayo se incluirá un control positivo (*B. pertussis* ATCC 1823) y uno negativo. El promedio de los valores de los Ct de las tres PCR será calculado para obtener un valor final. Una muestra será considerada positiva cuando sea al menos positiva para dos de las tres pruebas con un Ct < 40³⁰.

Para la interpretación de la PCR se utilizará el algoritmo que se muestra en cuadro 7. Una muestra será considerada positiva para DNA de *B. pertussis* por PCR, si es positiva (cualquier valor de Ct < 40) para los blancos IS481 y *ptxS1*. Si una muestra es positiva para *ptxS1* y negativa para IS481, será considerada positiva para DNA *B. parapertussis*. Si una muestra es positiva para IS481 con un Ct < 35 y negativo para *ptxS1* se considerará que posee DNA de *Bordetella* spp. Si una muestra tiene un Ct ≥ 35 para IS481 y es negativo para *ptxS1* se considerará como indeterminado.

Cuadro 7. Algoritmo para la interpretación de los resultados

	IS481+ (Ct < 35)	IS481+ (35 ≤ Ct < 40)	IS481-
<i>ptxS1</i> + (Ct < 40)	<i>B. pertussis</i> ^a	<i>B. pertussis</i> ^a	<i>B. parapertussis</i> ^a
<i>ptxS1</i> -	<i>Bordetella</i> spp. ^b	Indeterminado	Negativo

^a El algoritmo no está diseñado para diferenciar *B. pertussis* o *B. parapertussis* de *B. bronchiseptica*.

^b Posiblemente se trate de *B. pertussis* o *B. holmesii*.



c) Determinación de genotipos de *prn*, *ptxS1* y *ptxP*

La extracción y purificación de DNA que se obtendrán de las cepas de *B. pertussis*, se realizará utilizando columnas de sílica gel. A partir de un cultivo en medio Regan-Lowe se tomarán 4-5 colonias y se resuspenderán en el amortiguador de lisis, se obtendrá el sedimento por centrifugación (10 min a 5,000 x g). Se procederá a seguir los pasos de extracción según el protocolo comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Se obtendrá un volumen final de 50 µL de eluido. Los eluidos se mantendrán a -70°C, hasta su uso.

La reacción será realizada en un termociclador ABI-9700. El volumen final de la mezcla de reacción será de 25 µl y estará constituida 300 nM de cada iniciador (Cuadro 8), 20 ng de DNA y la mezcla de reacción. La amplificación incluirá un ciclo inicial de desnaturalización 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos 94°C por 30s, 55°C 30s, 72°C 30s y 72°C 15 min. Los productos amplificados serán visualizados en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con biotium^{MR}. Los iniciadores utilizados para la amplificación se muestran en el cuadro 6.

La purificación de los productos de PCR se realizará con el sistema comercial QIAquick PCR Purification® (Qiagen). Posteriormente las secuencias se obtendrán mediante un método automatizado en un secuenciador ABI Prism 310.

Cuadro 8. Iniciadores para PCR

Gen	Iniciador	Secuencia	Tamaño	Referencias
<i>prn</i>	AF	GCCAATGTCACGGTCCAA	574 pb	4
	AR	GCAAGGTGATCGACAGGG		
<i>ptxS1</i>	S1F	TAGGCACCATCAAAACGCAG	877 pb	4
	S1R	TCAATTACCGGAGTTGGCG		
<i>ptxP</i>	ptxPF	AATCGTCCTGCTCAACCGCC	554 pb	13
	ptxPR	GGTATACGGTGGCGGGAGGA		

c) Análisis bioinformático

Obtenidas las secuencias se realizarán alineamientos locales utilizando el programa BLAST una vez que se determine que la secuencia corresponde al gen amplificado, se realizarán alineamientos múltiples de las secuencias reportadas en la base de datos GenBank, con los programas Clustal X³¹, MUSCLE³² y T-COFFEE. Se construirán árboles filogenéticos con programa MEGA 5.1³³. Establecidos los polimorfismos se construirán cinco modelos por homología por cada polimorfismo encontrado a través del programa Modeller v4.0. La calidad estereoquímica de estos se evaluará con el programa Procheck v3.5.4³⁴. Cada uno de los modelos validados será comparado con la estructura tridimensional de las proteínas de la cepa vacunal reportadas en la base de datos PDB, utilizando dos matrices de alineamiento de distancias: DalíLite (*Distance Alignment Matrix*)³⁵ y SSM (*Secondary Structure Matching*)³⁶ disponibles en la página del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI *European Bioinformatics Institute*). Los determinantes antigénicos de los modelos se analizarán por el método de Kolaskar & Tongaonkar³⁷.

8.6 Ubicación de estudio

En el Laboratorio de Detección Molecular de Patógenos y Virología en Investigación se realizarán las pruebas para detección de *B. pertussis* a través de la amplificación de dos blancos genéticos, *IS481* y las respectivas PCR en punto final para la amplificación de los genes *prn*, *ptxS* y *ptxP*. La secuenciación de los amplicones obtenidos para la identificación específica de los polimorfismos se realizará en el Instituto de Fisiología de la UNAM.

8.7 Tamaño de la muestra

Se analizarán 97 DNA de muestras obtenidas de pacientes menores de 1 año con diagnóstico confirmado de tos ferina. Se determinó el tamaño de muestra necesario por el uso de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 * \pi(1 - \pi)}{\delta^2}$$

Donde:

$Z_{1-\alpha/2}$: Valor de Z para la probabilidad de error tipo I escogido de dos colas.

π : Probabilidad que corresponde a la prevalencia.

δ : Precisión de la estimación.

En el presente estudio se establece la estimación con el intervalo de confianza de 95%, por lo tanto, $Z_{1-\alpha/2}$ será 1.96. Como las prevalencias del polimorfismo de *prn*, *ptxS1* y *ptxP* son desconocidas, se utiliza 0.5 para π , el cual es el valor que genera la varianza mayor para el cálculo más conservador. Para δ utilizamos el valor de 0.1 para realizar una estimación del parámetro poblacional con la precisión de $\pm 10\%$. Por ende:

$$n = \frac{1.96^2 * 0.5(1 - 0.5)}{0.1^2}$$

$$n = 96.04 \approx 97$$

Con base en este cálculo, se analizarán 97 DNAs de muestras obtenidas de pacientes menores de 1 año con diagnóstico confirmado de tos ferina.

8.8 Variables del estudio

Nombre de la variable	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medición/categorías
Numero de caso	Clave alfa-numérica consecutiva para identificar el aislamiento, registrada en bitácora de Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Patógenos y Virología del INP	Cualitativa ordinal	001,002,003
Edad del paciente	Edad del paciente, en base a la fecha de nacimiento, registrada en el expediente clínico.	Cuantitativa discreta	Meses
Fecha de aislamiento	Fecha en el que se realiza la toma del muestra	Cuantitativa discreta	dd-mm-aaaa
Centro hospitalario	Lugar donde se realizó el aislamiento	Cualitativa nominal	INP, HGMGG, CMLR, ^a
Síntomas	Datos de la presentación clínica de la tos ferina registrados en la hoja de recolección de datos.	Cualitativa nominal	Fiebre (F) Rinorrea (R) Tos paroxística (T) Estridor (E) Vómito (V) Apnea (A) Cianosis (C)
Leucocitosis	Presencia de > 10,000 leucocitos/mm ³ . Registrado en la hoja de recolección de datos.	Cualitativa nominal	Presencia/Ausencia
Linfocitosis	Presencia de más del 30% de linfocitos registrado en la hoja de recolección de datos.	Cualitativa nominal	Presencia/Ausencia
Media Ct IS48I	Ciclo de la PCR en el que la fluorescencia es significativa respecto a la cantidad basal	Cuantitativa discreta	1 a 40
Media Ct <i>ptxS1</i>	Ciclo de la PCR en el que la fluorescencia es significativa respecto a la cantidad basal	Cuantitativa discreta	1 a 40
Tipo <i>prn</i>	Secuencia nucleotídica similar a la reportada en la base de datos GenBank	Cualitativa ordinal	prn1-prn13
Tipo <i>ptxS1</i>	Secuencia nucleotídica similar a la reportada en la base de datos GenBank	Cualitativa ordinal	ptxS1A, ptxS1B, ptxS1C, ptxS1D
Tipo <i>ptxP</i>	Secuencia nucleotídica similar a la reportada en la base de datos GenBank	Cualitativa ordinal	1,2,3,4, etc.
Índice de antigenicidad de <i>prn</i>	Valor asignado al modelo de la proteína derivada del polimorfismo utilizando el algoritmo de Kolascar y Tongaonkar	Cuantitativa continua	1.1,1.2,1.3, etc.
Índice de antigenicidad de <i>prn</i>	Valor asignado al modelo de la proteína derivada del polimorfismo utilizando el algoritmo de Kolascar y Tongaonkar	Cuantitativa continua	1.1,1.2,1.3, etc.

8.9 Hoja de recolección de información

Numero de caso		Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa)				
Edad (meses)		Vacunas	1ª dosis	2ª dosis	3ª dosis	4ª dosis
Fecha de aislamiento (dd/mm/aaaa)						
Centro hospitalario						
Fiebre		Leucocitos (mm ³)		Leucocitosis	Si	
Rinorrea					No	
Tos paroxística		Linfocitos (%)		Linfocitosis	Si	
Estridor					No	
Vómito						
Apnea						
Cianosis						
Media Ct IS48I		Media Ct <i>ptxS1</i>				
Identificación						
<i>prn</i>						
<i>ptxS1</i>						
<i>ptxP</i>						

8.10 Análisis estadístico

Se estimará la prevalencia de los polimorfismos *prn*, *ptxS1* y *ptxP* con el intervalo de confianza de 95%. La asociación de cada uno de los tres polimorfismos, así como su conjunto, con la presentación clínica será evaluada por medio de la prueba de χ^2 . La significancia estadística se reconoce al nivel de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizarán por el uso del paquete estadístico JMP9 de SAS Institute, Inc.

8.11 Consideraciones éticas

Debido a que se trabajarán y se analizarán aislamientos o DNA bacterianos, el presente estudio no incluye la investigación en seres humanos. El estudio no involucrará ningún procedimiento que altere el manejo y el pronóstico del paciente.

Las muestras de DNA y aislamientos son derivadas del estudio previo titulado "Detección de *Bordetella pertussis* a través de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en niños con diagnóstico de tos ferina y en sus contacto" con número de protocolo 103/2010, registrado y aprobado en el Instituto Nacional de Pediatría, donde se describe que las muestras se obtuvieron bajo el consentimiento informado de los padres y en respeto a las leyes y normas vigentes establecidas en la Ley General de Salud y el Reglamento de la L.G.S. en Materia de Investigación así como acatando los estándares bioéticos internacionales. El comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría fijó los requerimientos necesarios para la realización de este protocolo.

Los residuos biológicos así como los reactivos utilizados en este estudio se manejan de acuerdo a los procedimientos de sustancias peligrosas y de residuos peligrosos biológico infecciosos descritos en el Programa de Seguridad de Materiales Peligrosos del Instituto Nacional de Pediatría³⁸.

9. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

El estudio está programado para realizarse en dos años a partir de la aprobación del mismo y obtención de recursos para su desarrollo.

Actividad	Semestres			
	1	2	3	4
Etapa I Detección de <i>B. pertussis</i>				
Obtener muestras de hisopados nasofaríngeos	X			
Recopilar información	X			
Cultivo de muestras	X			
Conservación de aislamientos	X			
Obtención DNA	X			
Detección de <i>B. pertussis</i> RT-PCR	X			
Etapa II Estandarización de PCR				
Estandarización de PCR para <i>prn</i>	X			
Estandarización de PCR para <i>ptxS1</i>	X			
Estandarización de PCR para <i>ptxP</i>	X			
Análisis de las secuencias de la cepa vacunal	X			
Etapa III Detección de polimorfismos				
Amplificar <i>prn</i> para muestras		X		
Purificar productos de <i>prn</i>		X		
Secuenciar <i>prn</i>		X		
Amplificar <i>ptxS1</i> para muestras			X	
Purificar productos de <i>ptxS1</i>			X	
Secuenciar <i>ptxS1</i>			X	
Amplificar <i>ptxP</i> para muestras			X	
Purificar productos de <i>ptxP</i>			X	
Secuenciar <i>ptxP</i>			X	
Etapa IV Análisis de resultados				
Análisis de secuencias				X
Análisis de resultados				X
Presentación en congresos			X	
Publicación de resultados				X
Elaboración y envío de de informes a la comisión de investigación		X		X

10. FACTIBILIDAD

El presente estudio deriva de un estudio previo titulado "Detección de *Bordetella pertussis* a través de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en niños con diagnóstico de tosferina y en sus contactos" con número de protocolo 103/2010, registrado y aprobado en el Instituto Nacional de Pediatría, que se realiza en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Patógenos y Virología. El DNA de *B. pertussis* obtenido de las muestras será utilizado para realizar el análisis de polimorfismos, a la fecha se cuenta con un banco de DNA de 61 muestras confirmadas con *B. pertussis* a través de la amplificación de dos blancos genéticos (PCR en tiempo real) obtenidos de pacientes atendidos en el INP, otros centros hospitalarios del Distrito Federal y de otros estados de la región central del país.

El equipo de trabajo cuenta con el recurso humano que tiene amplia experiencia en el área infectología clínica que será el encargado de realizar el diagnóstico clínico y tomar las muestras para análisis. El Laboratorio de Virología tiene los recursos humanos con experiencia para desarrollar las técnicas de biología molecular y el análisis de las secuencias obtenidas. La interpretación epidemiológica y relación clínica con los polimorfismos detectados se evaluarán por la Jefa del Departamento de Epidemiología y un asesor del departamento de la Metodología de la Investigación hará el análisis estadístico.

Adicionalmente se cuenta con financiamiento (ver presupuesto) por la compañía farmacéutica SANOFI-PASTEUR S.A. de C.V. para poder realizar el diagnóstico de *B. pertussis* a través de PCR en tiempo real en muestras de hisopados nasofaríngeos de los pacientes atendidos en los centros hospitalarios mencionados anteriormente. Esta compañía nos apoyo con la compra de un termociclador de PCR en tiempo real cuyo costo fue de \$1,000,000 y con un gasto de inversión de aproximadamente \$500,000. Lo que nos ha permitido analizar aproximadamente 400 muestras de niños con diagnóstico de tos ferina y sus contactos.

Lo anterior permite que el proyecto sea factible y que se concluya en tiempo y forma, alcanzando los objetivos y obteniendo los productos propuestos.

11. PRODUCTOS A OBTENER

- Información de los polimorfismos de *B. pertussis* en México y su posible asociación con la re-emergencia de tosferina.
- Adaptación de tecnología diagnóstica y de tipificación de *B. pertussis*.
- Titulación de un alumno de la especialidad en pediatría médica del INP.
- Difusión de resultados en congreso internacional.
- Publicación de un artículo donde se informe de los polimorfismos encontrados, los datos clínicos y epidemiológicos.

12. ACTIVIDADES DE LOS INVESTIGADORES

Dra. Alejandra Aquino Andrade.

Investigador responsable/coordinador. Recepción, almacenamiento y registros de muestras clínicas en el laboratorio de Detección Molecular de Patógenos y Virología. Estandarización de técnicas de amplificación de *prn*, *ptxS1* y *ptxP*. Adaptación de tecnología diagnóstica y tipificación de *Bordetella pertussis*. Análisis de secuencias génicas utilizando herramientas bioinformáticas y modelación de proteínas. Resguardo y solicitud de material y equipo. Supervisora de control de calidad.

Dr. Agustín de Colsa Ranero.

Investigador asociado. Evaluación clínica y seguimiento de pacientes con diagnóstico de síndrome coqueluchoide y/o tosferina. Coordinación de la recolección de muestras del interior de la República. Obtención y resguardo de consentimiento informado/asentamiento informado. Obtención de datos clínicos. Responsable del registro y organización de la información clínica.

Q.B.P. Gabriel Martínez Leyva.

Investigador asociado. Extracción de DNA de las muestras de hisopados nasofaríngeos. Detección de *B. pertussis* mediante amplificación de *IS481* y *ptxPS1* a través de PCR en tiempo real. Amplificación de *prn*, *ptxS1* y *ptxP*.

M. en C. Chiharu Murata.

Investigador asociado. Realizará diseño del estudio, bases de datos, cálculo de número de muestra y análisis de datos.

Dra. Wendy Dolores Domínguez.

Investigador asociado. Análisis e interpretación de datos epidemiológicos.

Dr. Ovidio Landa Reyes.

Tesista. Realizará tesis para obtener el grado de especialidad en Pediatría Médica.

12. PRESUPUESTO

PRESUPUESTO PRIMER AÑO

Rubro	Monto en pesos mexicanos				
	Aportaciones			Total	Justificación
	INP	Otra institución participante	SANOFI-PASTEUR S.A. de C.V. (Externo)		
Salario de investigadores	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Gastos generales de mantenimiento	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Materiales y reactivos	200,000	N/A	150,000*	350,000	Síntesis de iniciadores, reactivos para amplificación por PCR de tres genes de 97 muestras, análisis electroforético y purificación de 291 productos de PCR. Consumibles para realizar estos métodos.
Pago de traducciones y correcciones de estilo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Servicios externos	80,000	N/A	N/A	80,000	Secuenciación de las dos cadenas de los tres genes que se evaluarán en las 97 muestras incluidas en el estudio. Las muestras se enviarán al Instituto de Fisiología de la UNAM
Pasajes y viáticos	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Inscripciones a reuniones, cursos	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Software especializado	50,000	N/A	N/A	50,000	Licencia de programa GeniusPro v5.5 para análisis de secuencias de DNA y proteínas. Licencia para programa MEGA v5.0 para análisis filogenético. Licencia para paquete estadístico JMP9.
Otro (especificar)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Equipo de laboratorio	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Herramientas, accesorio e instrumental médico	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Mobiliario	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Otro	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

*Recursos otorgados por SANOFI -PASTEUR, S.A. de C.V. para concluir el proyecto "Detección de *Bordetella pertussis* a través de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en niños con diagnóstico de tos ferina y en sus contacto" con número de registro 103/2010, del cual derivan las muestras de DNA que se analizarán en este proyecto.

PRESUPUESTO SEGUNDO AÑO

Rubro	Monto en pesos mexicanos				
	Aportaciones			Total	Justificación
	INP	Otra institución participante	Externo		
Salario de investigadores	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Gastos generales de mantenimiento	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Materiales y reactivos	200,000	N/A	N/A	200,000	Síntesis de iniciadores, reactivos para amplificación por PCR de tres genes de 97 muestras, análisis electroforético y purificación de 291 productos de PCR. Consumibles para realizar estos métodos.
Pago de traducciones y correcciones de estilo	10,000	N/A	N/A	10,000	Traducción y corrección de un artículo. Pago por publicación e impresión.
Servicios externos	80,000	N/A	N/A	80,000	Secuenciación de las dos cadenas de los tres genes que se evaluarán en las 97 muestras incluidas en el estudio. Las muestras se enviarán al Instituto de Fisiología de la UNAM
Pasajes y viáticos	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Inscripciones a reuniones, cursos	30,000	N/A	N/A	30,000	Difusión de resultados en el congreso anual de ICAAC, Octubre 2013. EE.UU.
Software especializado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Otro (especificar)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Equipo de laboratorio	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Herramientas, accesorio e instrumental médico	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Mobiliario	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Otro	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

RESULTADOS PRELIMINARES

1. Reacción de Polimerasa en Cadena.

Se realizó la estandarización de la PCR en punto final para la detección del gen *ptxS1*. Se utilizó la cepa de *B. pertussis* ATCC BAA-589 (Tohama I) como control positivo.

Se utilizó la mezcla de reacción AmpliTaqGold 360 (AB) en un volumen final de 50 μ L. Los iniciadores utilizados fueron:

INICIADOR	SECUENCIA
Directo	5'CCCTCGATTCTTCCTTACATCC-3'
Reverso	5'-CGCGATGCTTTCGTAGTACA-3'

Ambos iniciadores fueron utilizados a una concentración de 0.6 pmol y 20 ng DNA.

La PCR se realizó en una termocicladora ABI-9700-Fast (Applied Biosystems). Se establecieron las condiciones óptimas en el termociclador para la detección de dicho gen:

- Un ciclo inicial de 95° durante 2 minutos
- 40 ciclos subsecuentes conformados a 95°C por 15s, 52°C por 30s, 72°C por 60 s y un ciclo de polimerización final a 72°C por 7 minutos.

2. Detección de productos de PCR.

El fragmento esperado fue de 984 pb, utilizando un marcador de peso molecular de 1000 pb. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1%, con amortiguador TE IX, 100 V durante 30 min (Figura 1).

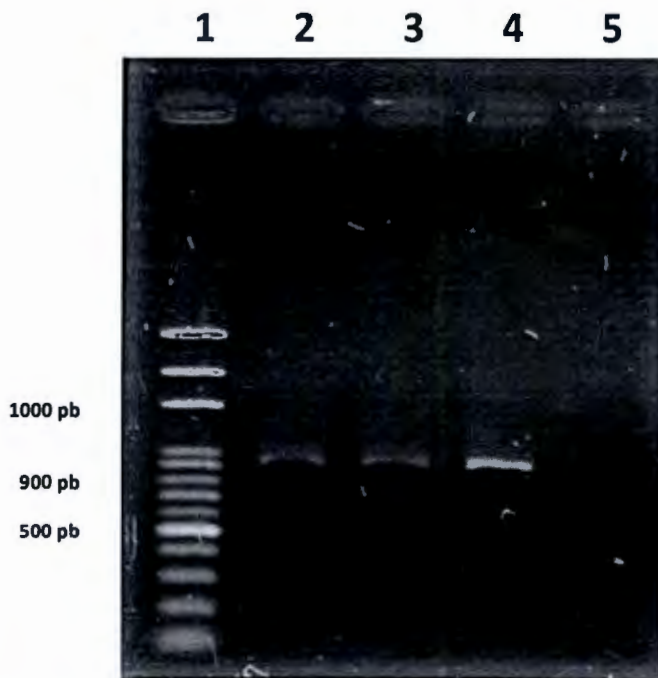


Figura 1. Electroferograma de amplificación de *ptxS1*. Fragmento esperado 984 pb. Carril 1: Marcador de talla molecular 1000 pb ; carril 2: caso 259; carril 3: caso 260; carril 4: control positivo *B. pertussis* ATCC BAA-589.

En esta primera fase, se analizaron un total de 55 muestras obtenidas de pacientes con diagnóstico confirmado de tos ferina durante el periodo comprendido entre mayo 2011 y agosto 2012. El 5.45% de las muestras fueron de pacientes de estados del interior de la República (Coahuila, Tlaxcala y Guadalajara) y el 94.55% tomadas de pacientes del Distrito Federal. En todas las muestras se obtuvo el fragmento esperado y estos fueron secuenciados en ambos sentidos. Al realizar los alineamientos se localizó una transversión de A204C, y una transición de G684A, impactando a la secuencia aminoacídica E68D y M228I, respectivamente. Estos cambios permitieron clasificarlas en la variante *ptxS1A*.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bamberger ES, Sruogo I. What is new in pertussis? *Eur. J. Pediatr.* 2008;167(2):133–139.
2. van Amerfoorth SCM, Schouls LM, van der Heide HGJ, et al. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(6):2837–2843.
3. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, et al. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect. Immun.* 1998;66(2):670–675.
4. Mooi FR, van Loo IH, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerging Infect. Dis.* 2001;7(3 Suppl):526–528.
5. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39(12):4396–4403.
6. Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, et al. Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 1999;145 (Pt 8):2069–2075.
7. Lam C, Octavia S, Bahrame Z, et al. Selection and emergence of pertussis toxin promoter *ptxP3* allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22293463>. Accedido febrero 14, 2012.
8. Preston A. *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. *CMAJ*. 2005;173(1):55–62.
9. Aquino-Andrade A, Martínez-Leyva G, De Colza-Ranero A. Aspectos genómicos de *Bordetella pertussis* y el camino hacia el nuevo estándar de oro en el diagnóstico de tos ferina. *Enf. Infec. Ped.* 2011;26(96):45–49.
10. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18(2):326–382.
11. Herrou J, Debrie A-S, Willery E, et al. Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS ONE*. 2009;4(9):e6996.
12. van Loo IHM, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(6):1994–2001.
13. Mooi FR, van Loo IHM, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerging Infect. Dis.* 2009;15(8):1206–1213.
14. Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect. Genet. Evol.* 2010;10(1):36–49.
15. King AJ, Berbers G, van Oirschot HF, et al. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 2001;147(Pt 11):2885–2895.
16. Fiett J, Letowska I, Gniadkowski M, Hryniewicz W. The new strategy for allele identification of the genes coding for pertussis toxin subunit S1 (*ptxS1*) and pertactin (*prn*) in *Bordetella pertussis*. *J. Microbiol. Methods*. 2003;55(3):651–666.
17. Fry NK, Neal S, Harrison TG, et al. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect. Immun.* 2001;69(9):5520–5528.
18. Kodama A, Kamachi K, Horiuchi Y, Konda T, Arakawa Y. Antigenic divergence suggested by correlation between antigenic variation and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(12):5453–5457.
19. Cassidy P, Sanden G, Heuvelman K, et al. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935–1999. *J. Infect. Dis.* 2000;182(5):1402–1408.
20. Pepler MS, Kuny S, Nevesinjac A, et al. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates from Québec and Alberta provinces of Canada from 1985 to 1994. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(7):3344–3347.

21. Kourova N, Caro V, Weber C, et al. Comparison of the *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates circulating in Saint Petersburg between 1998 and 2000 with Russian vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(8):3706–3711.
22. Storm M, Advani A, Pettersson M, Hallander HO, Bondeson K. Comparison of real-time PCR and pyrosequencing for typing *Bordetella pertussis* toxin subunit 1 variants. *J. Microbiol. Methods.* 2006;65(1):153–158.
23. Byrne S, Slack AT. Analysis of *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin types from Queensland, Australia, 1999–2003. *BMC Infect. Dis.* 2006;6:53.
24. Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, et al. Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007;14(11):1490–1498.
25. Dakic G, Kallonen T, Elomaa A, et al. *Bordetella pertussis* vaccine strains and circulating isolates in Serbia. *Vaccine.* 2010;28(5):1188–1192.
26. Bart MJ, van Gent M, van der Heide HGJ, et al. Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics.* 2010;11:627.
27. Pierce C, Klein N, Peters M. Is leukocytosis a predictor of mortality in severe pertussis infection? *Intensive Care Med.* 2000;26(10):1512–1514.
28. Caro V, Guiso N, Alberti C, et al. Proficiency program for real-time PCR diagnosis of *Bordetella pertussis* infections in French hospital laboratories and at the French National Reference Center for Whooping Cough and other Bordetellosis. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(10):3197–3203.
29. Sandoval PT, Arreola LDPT, Quechol GR, Gallardo HG. [*Bordetella pertussis* in adolescent students in Mexico City]. *Rev Saude Publica.* 2008;42(4):679–683.
30. Tatti KM, Wu K-H, Tondella ML, et al. Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008;61(3):264–272.
31. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947–2948.
32. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–1797.
33. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011;28(10):2731–2739.
34. Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins.* 1992;12(4):345–364.
35. Holm L, Park J. DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics.* 2000;16(6):566–567.
36. Krissinel E, Henrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004;60(Pt 12 Pt 1):2256–2268.
37. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 1990;276(1–2):172–174.
38. Instituto Nacional de Pediatría. Programa de seguridad de materiales peligrosos. 2011.