



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

**EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DE *Bordetella pertussis* Y *Bordetella parapertussis* POR
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL
(qPCR)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
AMÉRICA LUCIELA HERNÁNDEZ MORENO



Director de tesis: Q.F.B. Iliana Alejandra Cortés Ortiz
Asesor de tesis: Q.F.B. Georgina Ernestina Ríos Olivera

MÉXICO, D.F.

2012

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado todos los elementos necesarios para poder estudiar la licenciatura.

Al Departamento de Diagnóstico y Tipificación Molecular del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) por permitirme realizar el trabajo experimental del presente trabajo.

Agradezco la asesoría, entusiasmo y dirección en la elaboración de esta tesis a la Q.F.B. Iliana Alejandra Cortés Ortiz.

Agradezco de manera especial a la Q.F.B. Isaura Isabel Martínez Rivera por su inagotable paciencia, por su profundo espíritu de enseñanza y por su grata compañía durante la realización del trabajo experimental.

A la Q.F.B. Georgina Ernestina Ríos Olivera por confiar en mis capacidades, por permitirme ver más allá de lo académico.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la lectura y revisión del presente trabajo.

Al Maestro Juan Francisco Sánchez Ruíz y a la Maestra María Elena Tejeda Rosales, por sus grandes explicaciones en el ámbito de la validación de técnicas analíticas. Por su tiempo y consejos.

Agradezco inmensamente a Noé, Mari, Ame, Pili, Eli, al Doctor Mario y al Maestro Juanito (trabajadores del InDRE), por sus excelentes explicaciones para la comprensión del fundamento de las diferentes técnicas; así como por sus consejos y pláticas. Pero sobre todo agradezco el haber hecho que mi estancia ahí fuera realmente grata. Agradezco a cada uno de ustedes sus enseñanzas.

DEDICATORIA

A Dios por situarme siempre en el lugar adecuado, en el momento preciso y con las personas indicadas. Por lo finito y lo infinito.

A mi mamá por creer y confiar siempre en mí. Por motivarme a seguir adelante, sin perder de vista el objetivo ni disminuir el entusiasmo.

A mi papá por ayudarme a distinguir el claro-oscuro de las cosas.

A mi hermana Lore por su apoyo incondicional. Por enseñarme que la vida es toda una golosina (en el más amplio sentido de la palabra).

A mi hermana Lulú por hacerme reflexionar.

A mis amigos: José Antonio Alvarado, Juan Carlos Auriostigue, Héctor Pérez y Liredia Vargas por su apoyo, cariño, comprensión y tiempo.

A la Q.F.B. Georgina Ernestina Ríos Olivera por su amistad y apoyo en todo momento; así como por sus agradables pláticas y sabios consejos.

ÍNDICE

	Página
Resumen	5
Introducción	6
CAPÍTULO I	
Marco teórico	8
1.1 Epidemiología	8
1.2 Etiología	9
1.3 Manifestaciones clínicas de la enfermedad	10
1.4 Definición de caso	11
1.5 Diagnóstico	12
1.5.1 Serología	12
1.5.2 Cultivo	13
1.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa	13
1.6 Tratamiento	14
1.7 Prevención	14
1.8 Fundamento de PCR	15
1.8.1 PCR punto final y PCR tiempo real: similitudes y diferencias	17
1.8.2 Términos comúnmente usados en PCR tiempo real	17
1.8.3 PCR tiempo real	18
1.8.3.1 Agentes intercalantes	18
1.8.3.2 Sondas de hibridación específicas	18
1.8.3.3 Equipos para PCR tiempo real	19
1.8.3.4 Gráficas de PCR tiempo real	21
1.8.3.5 Cinética de amplificación de una PCR	22

1.8.3.6 Ventajas de PCR tiempo real	22
1.8.4 PCR múltiple en tiempo real para <i>B. pertussis</i>	23
1.9 Validación	25
1.9.1 Límite de detección	27
1.9.2 Precisión	28
1.9.3 Veracidad	29
1.9.4 Linealidad	30
1.9.5 Sensibilidad y especificidad	31
1.9.6 Valor predictivo positivo	32
1.9.7 Valor predictivo negativo	33
CAPÍTULO II	
Planteamiento del problema	34
CAPÍTULO III	
Objetivos	35
CAPÍTULO IV	
Hipótesis	36
CAPÍTULO V	
Material y método	37
5.1 Diseño experimental	37
5.2 Materiales y equipos	38
5.3 Metodología	39
5.3.1.1 Preparación de la mezcla de reacción para PCR (área blanca)	40
5.3.1.2 Adición de muestras (área de templados)	40
5.3.1.3 Adición del control positivo (área de control positivo)	40
5.3.1.4 Área de instrumentación	40
5.3.1.5 Límite de detección	41
5.3.1.6 Precisión	41

5.3.1.7 Veracidad	41
5.3.1.8 Linealidad	42
5.3.1.9 Sensibilidad, especificidad y valores predictivos	42
5.3.2 Diagrama de flujo	42
CAPÍTULO VI	
Resultados	43
6.1 Límite de detección	43
6.2 Precisión	45
6.3 Veracidad	46
6.4 Linealidad	49
6.5 Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo	51
CAPÍTULO VII	
Discusión	
7.1.1 Límite de detección	57
7.1.2 Precisión	57
7.1.3 Veracidad	57
7.1.4 Linealidad	57
7.1.5 Sensibilidad y especificidad	58
7.1.6 Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo	58
CAPÍTULO VIII	
Conclusiones	59
CAPÍTULO IX	
Sugerencias	60
Referencias bibliográficas	61
Anexos	
Anexo No.1 Iniciadores y sondas utilizados para la PCR múltiple en tiempo real	65
Anexo No.2 Plantilla de trabajo de PCR tiempo real múltiple para preparar la	

mezcla de reacción utilizando el reactivo TaqMan Gene expression Master Mix, Applied Biosystems	66
Anexo No. 3 Esquema que representa una microplaca en la cual se dispensa la mezcla de reacción para PCR	67
Anexo No. 4 Esquema que representa la plantilla de Trabajo de PCR tiempo real multiplex (TaqMan Gene expression)	68
Anexo No.5 Preparación del control positivo	69
Anexo No.6 Programación del termociclador	70

RESUMEN

Bordetella pertussis es el agente etiológico de la tos ferina, un padecimiento de distribución mundial que continúa siendo una importante causa de morbilidad y de mortalidad infantil; y debido a *B. pertussis* anualmente se presentan 50 millones de casos de la enfermedad, y 279 000 muertes en niños en países en desarrollo.

Los métodos de diagnóstico para detectar a *B. pertussis* son el cultivo, la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) y la serología. La prueba de qPCR es rápida, específica y sensible; lo que la convierte en la prueba ideal en los casos en los que se requiere de vigilancia epidemiológica. En éste estudio se evaluó la plataforma propuesta por los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) para el diagnóstico de *B. pertussis* y *B. parapertussis* por qPCR múltiple. Se analizaron 162 exudados nasofaríngeos obtenidos de población infantil procedentes de los diferentes laboratorios estatales de la red de *B. pertussis* y se compararon con los resultados obtenidos por cultivo, evaluando así la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del método. Además se utilizaron diluciones de concentración conocida para conocer algunos parámetros como son límite de detección, precisión, veracidad y linealidad; los cuales cumplen con los criterios de aceptación requeridos por la Entidad Mexicana de Acreditación y el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación; que son los organismos de mayor importancia a nivel nacional en cuanto a certificación y acreditación se refiere.

INTRODUCCIÓN

Bordetella pertussis es el agente etiológico de la tos ferina, un padecimiento de distribución mundial que se manifiesta generalmente en forma endémica con brotes epidémicos esporádicos. Este padecimiento se presenta después de una transmisión directa de persona a persona debido a las secreciones respiratorias y a que el microorganismo es altamente infeccioso^{1,2}.

La tos ferina continua siendo una importante causa de morbilidad y de mortalidad infantil en todo el mundo; en países en desarrollo se estima que anualmente se presentan 50 millones de casos de la enfermedad y 279 mil muertes en niños¹.

El padecimiento es propio de la infancia y se observa rara vez en los adultos. La mayoría de las muertes ocurren a edades menores de 5 años. En México se ha encontrado que hasta el 20% de los niños menores de quince años, no vacunados, tienen anticuerpos contra éste microorganismo, lo que significa que han padecido la infección con o sin enfermedad. De acuerdo al Boletín de Epidemiología emitido por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE), el número total de casos acumulados en el año 2011, fue de 1457 para el síndrome coqueluchoide (conjunto de signos y síntomas similares a los de la tos ferina cuyo agente causal es diferente a *B. pertussis*) y para la tos ferina de 252 casos^{3,4,5}.

De las nueve especies de *Bordetella spp* conocidas, seis son las que se han encontrado en el tracto respiratorio y de las más comunes del tracto respiratorio superior, sólo tres son consideradas como patógenas: *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*.

B. parapertussis causa una infección menos severa que *B. pertussis*, con síntomas que incluyen tos paroxística y con alaridos; la enfermedad de esta especie tiene una corta duración de tiempo. *Bordetella holmesii* se asocia con la septicemia que se presenta en pacientes inmunocomprometidos y también ha sido aislada de exudados nasofaríngeos de pacientes que presentan *B. pertussis* como enfermedad. Por lo tanto es necesario que estas tres especies de *Bordetella* se puedan diferenciar para permitir un diagnóstico preciso, ya sea del síndrome coqueluchoide o bien tos ferina¹.

Los métodos de diagnóstico para detectar a *B. pertussis* son: el cultivo, la serología y la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR). Aun cuando el cultivo de *B. pertussis* es 100% específico y se considere el estándar de oro, tiene baja sensibilidad y un periodo de incubación lento que va de 5 a 10 días; éstas últimas dos características hacen que el cultivo sea impráctico como prueba rápida de diagnóstico^{1,2,5,6}.

Los métodos serológicos representan la principal alternativa en los casos en los que el diagnóstico se demore por causa del cultivo; además son útiles cuando la enfermedad se encuentra en una etapa tardía. Estos métodos detectan anticuerpos IgG humanos en contra de la toxina de *B. pertussis* en el suero del paciente. Se han recomendado técnicas de enzimoimmunoanálisis

(ELISA) que incluyan antígenos purificados como la hemaglutinina filamentosa y especialmente la toxina pertussis⁷.

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es rápida, específica y sensible, lo que la convierte en la prueba ideal en los casos en los que se requiera de vigilancia epidemiológica.

En este estudio se evaluó la plataforma propuesta por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) para el diagnóstico de *B. pertussis* y *B. parapertussis* por PCR múltiple en tiempo real. Esta plataforma consta de cuatro marcadores que son: La IS481, secuencia de inserción utilizada para la determinación de *B. pertussis*; la *ptxS1* para la discriminación de *B. pertussis* de *B. holmesii*, la pIS1001 utilizada para la determinación de *B. parapertussis* y la hIS1001 para *B. holmesii*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

Los seres humanos son el único reservorio conocido para *B. pertussis* que es el agente causal de la tos ferina. Ésta enfermedad continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad infantil en todo el mundo con aproximadamente 50 millones de casos y 279 000 muertes anuales en niños de países desarrollados. En México, de acuerdo al Boletín de Epidemiología emitido por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE), el número total de casos acumulados en el año 2011 fue de 1457 para el síndrome coqueluchoide y de 252 casos para tos ferina^{6,1,4}.

La tos ferina es una enfermedad muy contagiosa, con tasas de transmisión de hasta el 80-90% en personas susceptibles. El contagio es por vía respiratoria, debido a las secreciones generadas durante los ataques de tos. Es máxima antes de la aparición de los primeros síntomas y se extiende al menos 2 semanas después del inicio de la tos^{1,2,8,9}.

Desde la implementación de la vacunación se ha reducido la incidencia de la enfermedad en muchos países. El resurgimiento de este padecimiento, en los últimos años, ha ocurrido incluso en lugares con buenas coberturas de vacunación, aumentando el número de casos sobre todo en adolescentes y adultos; quienes están en mayor contacto con el grupo más vulnerable, los lactantes. Se ha observado que la inmunidad conseguida en la infancia disminuye con el tiempo. Éste problema ha adquirido importancia al hacer comprender el “círculo epidemiológico de la enfermedad”, destacando el papel de los adolescentes y adultos en la prevalencia de esta patología. En México se ha encontrado que hasta el 20% de los niños menores de quince años, no vacunados, tienen anticuerpos contra éste microorganismo, lo que significa que han padecido la infección con o sin enfermedad^{1,5,9,10}.

Actualmente ha aumentado considerablemente el número de casos en menores de un año y sobre todo en menores de 6 meses, quienes generalmente no han completado el esquema de vacunación. Mientras que en la época en la que la vacunación no era sistemática, los que más enfermaban eran los mayores de un año. Además, como ya se ha mencionado, se han modificado los focos epidemiológicos; los adultos son ahora una fuente de contagio importante. Antes de la introducción de las vacunas, los propios niños se contagiaban entre sí.

En los adultos y en niños menores de un año, las infecciones por *Bordetella pertussis* pueden presentarse sin las características típicas con las que clásicamente se describía la enfermedad (tos

paroxística, con alaridos) sino bajo la forma de apneas, distrés respiratorio o bradicardia; siendo un cuadro clínico inespecífico que dificulta el diagnóstico^{9,11}.

Los lactantes presentan una tasa de incidencia mayor a 200 veces que la de otros grupos. Prácticamente todos los casos fatales son en menores de un año y el 90% se produce en menores de seis meses. La mayoría de los pacientes son previamente sanos, sin patología perinatal. Otra explicación probable al aumento en la incidencia de ese grupo poblacional se atribuye a la disminución de la inmunidad transplacentaria al reducir el efecto de refuerzo al bajar la prevalencia en la población^{9,8}.

1.2 ETIOLOGÍA

Seis especies de *Bordetella* spp pueden encontrarse en el tracto respiratorio humano: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella homesii*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella hinzii*, y *Bordetella trematum*. De las más comunes del tracto respiratorio superior sólo tres son las especies consideradas como patógenos: *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*. *B. parapertussis* causa una infección menos severa que *B. pertussis*, con síntomas que incluyen tos paroxística con alaridos durante corto tiempo. *B. holmesii* se asocia con la septicemia que se presenta en pacientes inmunocomprometidos y también ha sido aislada de exudados nasofaríngeos de pacientes que manifiestan el síndrome coqueluchoide. Por lo tanto es necesario que estas tres especies de *Bordetella* se puedan diferenciar para permitir un diagnóstico preciso, ya sea del síndrome coqueluchoide o bien de tos ferina^{1,5,12}.

El síndrome coqueluchoide es causado por otros agentes etiológicos como *Bordetella parapertussis* y por virus respiratorios como los adenovirus, el virus sincitial respiratorio, el coxsackie y el parainfluenzae^{5,13}.

B. pertussis y *B. parapertussis* son cocobacilos pequeños, Gram negativos, aerobios, inmóviles, capsulados e incapaces de formar esporas; son muy lábiles fuera del epitelio respiratorio. Se cree que éstas dos especies evolucionaron, de manera independiente, a partir de *B. bronchiseptica* (especie patógena para animales) hasta convertirse en patógenos humanos^{5,14,15}.

Bordetella pertussis y *Bordetella homesii* también son especies similares; sin embargo, *Bordetella holmesii* carece del gen que codifica para la toxina de pertussis. La diferenciación de especies se basa en el cultivo, en pruebas bioquímicas e inmunológicas^{1,2,12}.

El genoma de *B. pertussis* ha sido secuenciado; posee 4 086 186 pb (pares de bases), 3 816 genes, 358 pseudogenes y tres secuencias de inserción (con varias copias de cada una) IS481: con 50-238 copias; IS1002: con 6 copias; IS1663: con 17 copias^{15,16}.

1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

Este padecimiento se presenta después de una transmisión directa de persona a persona debido a las secreciones respiratorias^{1,2}.

La manifestación típica de la enfermedad presenta cuatro fases²:

- a) Fase de incubación o fase silenciosa: Dura de 9-10 días y no se presentan síntomas².
- b) Fase catarral: Inicia con una tos irritante (de apariencia inofensiva), que posteriormente se convierte en una tos paroxística en un lapso de 1-2 semanas. Los síntomas son similares a los de un resfriado común pero con una tos seca. Durante esta fase *B. pertussis* y *B. parapertussis* pueden aislarse de aspirados nasofaríngeos hasta con un 90% de probabilidad. Desafortunadamente cuando no hay presencia de síntomas clínicos, no se considera el tomar una muestra para el aislamiento de *Bordetella*, a excepción de los pacientes que tienen contactos que han sido confirmados como casos^{2,9}.
- c) Fase paroxística: Después de varias semanas de una tos no productiva, ésta evoluciona a la característica tos paroxística, con producción de moco, cianosis y vómito. Esta fase dura al menos 21 días pero puede llegar a durar hasta 60 días con la típica tos paroxística, congestiva, con alaridos. Los ataques paroxísticos son caracterizados por lapsos violentos y repetidos de tos; en cada ataque paroxístico, el paciente tose tanto que no hay inhalación y esto puede ser seguido por un canto característico de tono alto o alarido. Los ataques paroxísticos frecuentemente terminan con la expulsión del moco y muchas ocasiones seguido de vómito. Estos accesos paroxísticos pueden ser entre 5-7 al día, en casos moderados, pero en circunstancias graves pueden llegar a ser más de 20; son de predominio nocturno, y pueden desencadenarse por estímulos como el llanto, la risa, el estornudo, el ejercicio físico o la alimentación. Los niños menores de 6 meses, niños vacunados, adolescentes y adultos pocas veces presentan la tos con alaridos o paroxística^{2,9,11,18}.

Los pacientes manifiestan leucocitosis y linfocitosis, pérdida de peso, en algunas ocasiones hipoglucemia y en muy raras ocasiones encefalopatía. Dos semanas después del inicio de la tos es muy difícil aislar la bacteria, lo que sugiere que la mayor parte de los síntomas son debidos a las toxinas liberadas por la bacteria. La bacteria no entra en el tejido sanguíneo y no se disemina^{2,9,17}.
- d) Fase de convalecencia: Dura al menos 20 días. La enfermedad es muy severa, en ocasiones la vida de los lactantes, se ve comprometida. Los neonatos y los infantes son quienes presentan mayores complicaciones. Las complicaciones incluyen neumonía, atelectasia, convulsiones, encefalopatías, pérdida de peso, hernias, fracturas costales, prolapso rectal e incluso la muerte. La neumonía es la causa más común de muerte; la encefalopatía fatal, hipoxia e inanición por el constante vómito, ocurren ocasionalmente^{2,9}.

1.4 DEFINICIÓN DE CASO

Definiciones de caso de infección por *B. pertussis*:

a) Diagnóstico clínico.

a.1) Una persona con tos de dos semanas o más de evolución con al menos una de las siguientes características: Paroxismos de tos, alaridos, vómitos postusivos sin otra causa aparente.

a.2) Persona con tos que dura 21 días o más sin características adicionales^{6,9,11}.

b) Diagnóstico por el laboratorio (en muestra de origen nasofaríngeo u orofaríngeo). Un caso de *pertussis* es confirmado por laboratorio si se halla uno o más de los siguientes criterios:

b.1) *Bordetella pertussis* aislada por cultivo.

b.2) PCR positiva para *Bordetella pertussis*.

b.3) Determinación de anticuerpos para toxina *pertussis*^{6,9,11,17}.

c) Caso probable. Caso que cumple los criterios de diagnóstico clínico, pero no se ha podido demostrar microbiológicamente ni se ha podido relacionar epidemiológicamente a un caso confirmado^{6,9,11}.

d) Caso confirmado.

d.1) Cualquier persona que presente un cuadro respiratorio con cultivo positivo para *Bordetella pertussis*.

d.2) Cualquier persona que presente un cuadro que cumple los criterios de diagnóstico clínico, con PCR positiva para *Bordetella pertussis* o asociación epidemiológica a un caso con diagnóstico microbiológico^{6,9,11}.

1.5 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de tos ferina por el laboratorio se puede realizar de dos formas: de manera indirecta o de manera directa. El diagnóstico indirecto es por serología y consiste en identificar los anticuerpos específicos en el suero del individuo enfermo. El diagnóstico directo consiste en la identificación del microorganismo responsable de causar la enfermedad, ya sea por cultivo o por Reacción en Cadena de la Polimerasa².

En los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) se utiliza y recomienda que para el diagnóstico de tos ferina por el laboratorio se utilice una combinación de los tres métodos de prueba con la finalidad de satisfacer la necesidad de resultados rápidos y de alta especificidad. A continuación se describen de manera breve las pruebas de serología y cultivo. También se describirá la Reacción en Cadena de la Polimerasa, pero ésta se tratará más ampliamente debido a que en el presente trabajo se evaluó el desempeño de éste método en el diagnóstico de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*⁶.

1.5.1 SEROLOGÍA

El diagnóstico indirecto consiste en la detección de anticuerpos específicos en el suero de individuos enfermos, cuando las muestras son colectadas al inicio de la tos o bien cuando la muestra se toma un mes después de un mes. La presencia de un alto nivel de anticuerpos en el suero de los pacientes, es indicativo de la enfermedad. La prueba serológica más utilizada y aceptada en los diferentes laboratorios es la medición de anti-toxina pertussis por la técnica de ELISA. Este método detecta anticuerpos IgG humanos en contra de la toxina de *B. pertussis*^{2, 6}.

Diferentes publicaciones indican que esta prueba serológica, no puede utilizarse como una prueba diagnóstica durante el año siguiente a la vacunación debido a que no es posible diferenciar a los anticuerpos generados por la vacunación, de los anticuerpos generados por la infección. Sin embargo, los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades señalan que la cantidad de anticuerpos generados por la vacunación es menor que la cantidad de anticuerpos generados por la infección; y aseguran que el proceso de vacunación genera tan pocos anticuerpos que no se alcanza el valor de corte para infecciones recientes^{2, 6, 7, 19}.

Una desventaja de esta prueba es que no es sensible para los recién nacidos, debido a que su sistema inmunológico aun es inmaduro y puede haber interferencia de los anticuerpos maternos².

Los métodos serológicos representan la principal alternativa en los casos en los que el diagnóstico se demore por causa del cultivo; además son útiles cuando la enfermedad se encuentra en una etapa tardía^{6, 7}.

1.5.2 CULTIVO

El cultivo es 100% específico, pero carece de sensibilidad (12-60%) y los periodos de incubación van de 5 a 10 días. La sensibilidad es mayor en niños no vacunados y en niños recién nacidos, cuyas muestras han sido tomadas después de una corta duración de los síntomas (en las tres primeras semanas del inicio de la tos); dicha sensibilidad es mucho menor en adolescentes y adultos cuyas muestras han sido tomadas después de una larga duración de los síntomas (después de las primeras tres semanas del inicio de la tos)^{2,20}.

B. pertussis y *B. parapertussis* necesitan para su aislamiento primario de medios de cultivo adicionados con nutrientes especiales, un 95% de humedad y una temperatura de 35 - 36°C. Para su cultivo se utilizan los medios Bordet-Gengou y Regan-Lowe. Las placas se incuban hasta por 10 días y deben revisarse diariamente; si aparecen las colonias típicas de éstos microorganismos entonces las colonias se vuelven a resembrar y posteriormente se identifican^{2,6,17}.

Bordetella pertussis es la especie que presenta el crecimiento más lento, generalmente las primeras colonias aparecen durante los 3-4 primeros días después de la inoculación, pero pueden llegar a aparecer hasta diez días después. Las colonias de *B. parapertussis* normalmente aparecen a los 2-3 días. Las colonias de ambas especies son similares, miden aproximadamente 1 milímetro de diámetro, su apariencia es semejante a las gotas de mercurio, y además son mucosas. Para diferenciar ambas especies, es necesario realizar algunas pruebas bioquímicas (oxidasa, ureasa, entre otras) e inmunológicas (utilizando los anticuerpos específicos para cada especie)^{2,6}.

A pesar de que el cultivo tiene un largo periodo de incubación que lo hace impráctico como una prueba diagnóstica rápida, el cultivo en combinación con la PCR son una prueba fidedigna para la detección del microorganismo en caso de una alerta sanitaria. Los aislamientos son necesarios para realizar ensayos antimicrobianos así como de tipificación molecular, con la finalidad de analizar la evolución del patógeno y alertar en caso de que se presentaran algunas variedades; que pudieran ser antigénicamente diferentes de las cepas utilizadas para la realización de vacunas^{2,21}.

1.5.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR punto final fue introducida en 1989 para la detección de *B. pertussis* y ha sido reemplazada por la PCR tiempo real que es una técnica mucho más rápida (2-24 horas), específica (86-100%) y sensible (70-99%). La PCR no requiere la presencia de microorganismos viables; además es posible amplificar una secuencia específica de ADN a partir de una sola célula o de pocas células. Por estos motivos son las pruebas ideales, cuando se requiere de vigilancia epidemiológica. En páginas posteriores se profundizará en la técnica de PCR, a fin de dar a conocer el fundamento de la técnica que se evaluó^{1,6,22}.

1.6 TRATAMIENTO

B. pertussis es sensible a muchos antibióticos *in vitro*, pero hace más de 30 años que el uso de la eritromicina, es el pilar fundamental del tratamiento. Los estudios han mostrado que el beneficio principal de la eritromicina para los pacientes es en la fase catarral de la enfermedad, acortando el periodo sintomático de la fase paroxística.

La eritromicina elimina a la bacteria dentro de los 5 días después de que se ha iniciado la terapia, acortando el periodo de contagio habitual que puede ser hasta 4 semanas. La eritromicina sigue siendo el macrólido por elección debido a su bajo costo; sin embargo han surgido fármacos de igual eficacia, pero con mejor tolerabilidad gastrointestinal y ventajas de dosificación-duración (menos dosis y menor duración en días)^{9,16}.

La duración y la dosificación, sobre todo en menores de un mes, aún no han sido bien determinadas. Los CDC de Atlanta han considerado a la azitromicina, como el macrólido preferido para los lactantes. A partir del mes de vida se puede emplear cualquiera de los dos macrólidos^{3,16}.

1.7 PREVENCIÓN

La principal estrategia para prevenir la tos ferina se basa en la vacunación. La vacuna DTP (difteria, tétanos y tos ferina) puede ser celular (DTPw) o acelular (DTPa). Se trata de un biológico que contiene los toxoides tetánico y diftérico además de microorganismos inactivados de *B. pertussis* (DTPw) o de componentes (1-5) del mismo microorganismo (DTPa)^{6,8,23}.

La vacuna celular completa consiste en una suspensión de células de *Bordetella pertussis* inactivadas. La vacuna acelular contiene componentes inactivados y purificados de *Bordetella pertussis*, dichos componentes pueden variar de una vacuna a otra; y entre estos se encuentran: toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina y fimbrias tipo 2 y 3. Ambas vacunas tienen el mismo nivel de seguridad y eficacia (de hasta un 92%)^{8,23,24}.

En México la producción de la vacuna DTP se inició en el año de 1955. En el año de 1973, un año antes de que la OMS lanzara el Programa Ampliado de Inmunizaciones, se inició en México la Campaña Nacional de Vacunación estableciendo la aplicación de cuatro vacunas esenciales, entre ellas la de DTP²⁵.

Actualmente la Cartilla Nacional de Vacunación de este país contempla la aplicación de la vacuna pentavalente acelular (DTP + HB + Hib), la cual inmuniza contra la difteria, tétanos, tos ferina, Hepatitis B e infecciones graves por *Haemophilus influenzae* tipo b. La administración de esta vacuna pentavalente acelular se efectúa a los 2, 4, 6 y 18 meses de edad. Además se administra un refuerzo a los 4 años de edad, pero únicamente de la vacuna de DTP^{25,26}.

1.8 FUNDAMENTO DE PCR

Con la finalidad de ampliar el conocimiento acerca de la técnica evaluada, en las próximas páginas se describe el fundamento de la PCR.

La PCR se basa en el mecanismo usual de la replicación del ADN, en sus propiedades de hibridación y en la presencia de enzimas de síntesis de ADN (polimerasas) de bacterias termófilas, que son resistentes a altas temperaturas (70-90°C)^{22, 27}.

El proceso de detección de un agente infeccioso por PCR se desarrolla de manera habitual en tres etapas que en general suelen durar aproximadamente 24 horas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa, es decir, la PCR propiamente dicha. La PCR consigue fabricar múltiples copias de una secuencia diana de ADN que llega a permitir la obtención de microgramos de ADN a partir de cada molécula inicial. Cualquier segmento de ADN o de ARN puede ser amplificado siempre que se conozcan las secuencias flanqueantes de la región diana o, lo que es lo mismo, se puede amplificar cualquier porción de ácido nucleico, conocido o no, siempre que quede comprendido entre dos secuencias conocidas con las que podrán hibridar oligonucleótidos complementarios que actuarán como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las hebras molde. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con agentes intercalantes que fluorescen con luz ultravioleta, o mediante hibridación con sondas específicas^{13, 28}.

Por tanto, para que la PCR tenga lugar, los componentes básicos e indispensables de la misma son:

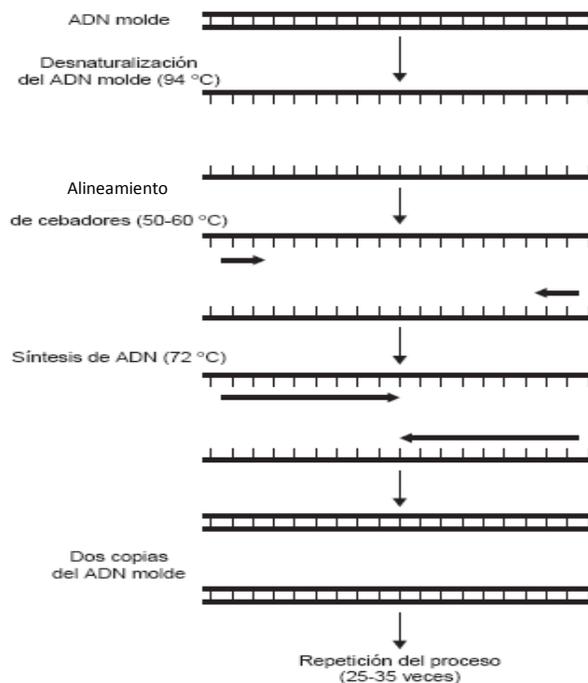
- a) ADN molde que se desea amplificar; también llamado ADN diana, ADN blanco o templado.
- b) ADN polimerasa (la más común denominada Taq polimerasa es una enzima termoestable, extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*).
- c) Cebadores de secuencia específica, también llamados iniciadores (par de oligonucleótidos, de 18-25 pb, que por dirigirse en sentidos opuestos se denominan iniciador delantero e iniciador trasero).
- d) Nucleótidos para la síntesis del nuevo ADN (los cuatro desoxinucleótidos: dCTP, dATP, dGTP, dTTP).
- e) Amortiguador de reacción que incluye las distintas sales requeridas por la enzima (entre ellas la más importante es el MgCl₂).
- f) Sonda (ésta última sólo para qPCR. Es un oligonucleótido de 18-25pb)^{28, 22, 13}.

La PCR es una reacción que ocurre en un único tubo tras mezclar en él los componentes necesarios e incubarlos en un aparato que permite variar la temperatura de incubación a lo largo del tiempo de forma programada denominado termociclador. Un ciclo de PCR consta de los siguientes pasos fundamentales:

- a) Desnaturalización térmica del ADN que se va a usar como molde. En esta etapa, cuando la temperatura llega a 94°C se separan físicamente las dos cadenas del ADN molde.
- b) Alineación. A una temperatura menor que la de desnaturalización (60°C), ocurre la alineación de los cebadores sintéticos cuya secuencia les permite hibridar uno a cada lado de la secuencia específica de ADN (también llamada secuencia diana o secuencia blanco).
- c) Extensión. Cuando la temperatura asciende a 72°C , ocurre la extensión por parte de la ADN polimerasa de los oligonucleótidos alineados que actúan como cebadores. Es decir, la Taq polimerasa empieza a extender, desde el extremo de un cebador, una nueva cadena unida al cebador; esta cadena va copiando la secuencia del ADN molde^{13, 22}.

Este proceso de tres pasos se repite un número determinado de veces (25-35), duplicándose cada vez el número de moléculas de producto. Esta amplificación exponencial tiene como resultado un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueada por el par de oligonucleótidos. De esta manera, la reacción permite obtener una gran sensibilidad al detectar muy bajas cantidades de ADN molde y especificidad al detectar únicamente la secuencia de ácido nucleico para la que han sido diseñados los cebadores (ver Fig. 1)^{22, 28}.

Figura No.1 Representación esquemática de un ciclo de PCR²²



1.8.1 PCR PUNTO FINAL Y PCR TIEMPO REAL: Similitudes y diferencias

La PCR punto final y la PCR tiempo real se basan en el mismo principio, la replicación del ADN; por lo que tienen grandes similitudes. Entre ellas están: el no basarse en la utilización de microorganismos viables, en producir una amplificación exponencial de productos; y en utilizar muchos de los mismos reactivos en ambos procesos, siendo la principal diferencia el empleo de una sonda fluorescente en la PCR tiempo real⁶.

La diferencia en términos de definición entre PCR tiempo real y PCR punto final es que en la primera los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (ver Fig.5). En cambio en la PCR punto final, la generación del producto de PCR se detecta hasta que la amplificación se ha llevado a cabo y posteriormente el amplicón es visualizado en un gel de agarosa, es decir, existe un análisis post-PCR^{13, 29}.

Una vez que se han señalado las diferencias básicas entre una PCR punto final y una PCR tiempo real, analizaremos más a detalle ésta última.

1.8.2 TÉRMINOS COMUNMENTE USADOS EN PCR TIEMPO REAL

Término	Definición
ADN molde, ADN diana, ADN blanco o templado	Secuencia nucleotídica que se desea detectar.
Ct	Ciclo umbral. Es el número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado.
Estándar	Muestra de concentración conocida, usada para fabricar una curva estándar.
Fluoróforo aceptor	Fluoróforo que marca el extremo 3' de la sonda TaqMan. Absorbe la emisión de energía del fluoróforo donador.
Fluoróforo donador	Fluoróforo que marca el extremo 5' de la sonda TaqMan. Provee la señal de fluorescencia específica para la amplificación. Se utiliza para monitorear la hidrólisis de la sonda.
FRET	Transferencia de Energía Fluorescente mediante Resonancia. Proceso que engloba la transferencia de energía de un fluoróforo donador a un fluoróforo aceptor.
Gráfica de amplificación	Gráfica de la señal de fluorescencia (eje "y") contra el número de ciclos (eje "x").
Línea basal	Ciclos iniciales de la PCR, en los cuales el cambio de la señal de fluorescencia es mínimo.
NTC o muestra blanco	Control negativo de templado. Una muestra que no contiene ADN molde o templado, usada para la verificación de la calidad de la amplificación.
Rn	Es el valor o la lectura de fluorescencia total dada en unidades arbitrarias.
Umbral	Inicio de la detección de fluorescencia ^{6, 29} .

1.8.3 PCR TIEMPO REAL

En esta reacción la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto formado. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos^{13, 29}.

1.8.3.1 Agentes intercalantes

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR.

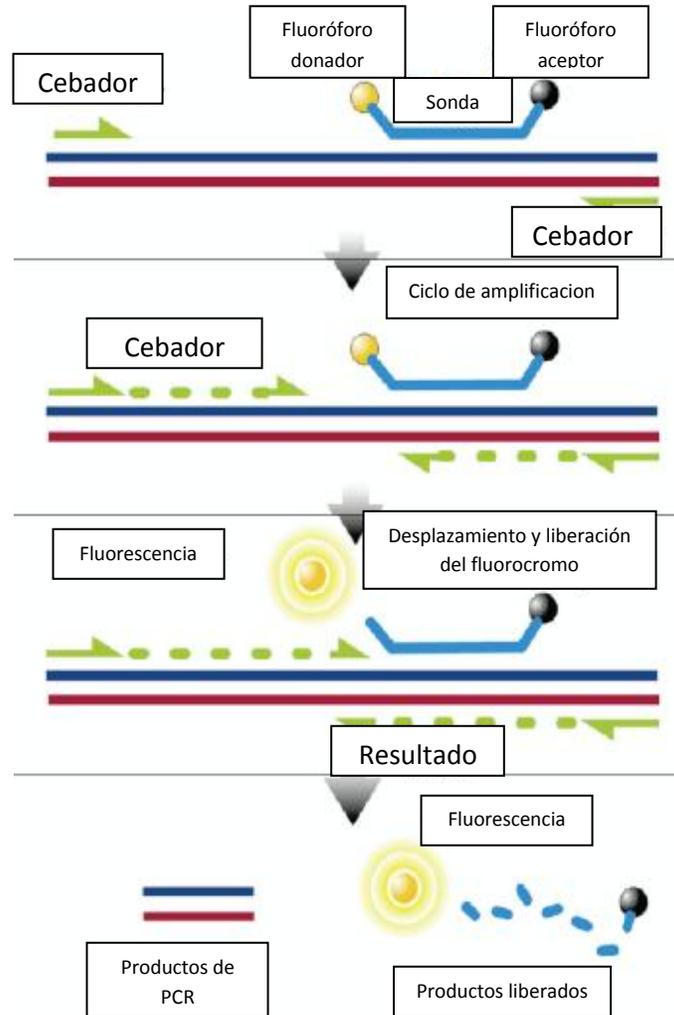
Sin embargo, mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende, sobre todo, de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR^{13, 30}.

1.8.3.2 Sondas de hibridación específicas

Las sondas de hibridación específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Entre las más utilizadas están las sondas de hidrólisis; las cuales se utilizaron en la realización del presente estudio.

Las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra las moléculas deben estar próximas. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria; la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* que tiene actividad 5' exonucleasa, al desplazarse a lo largo de la cadena de ADN, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como el donador y el aceptor están ahora alejados, la fluorescencia emitida por el donador es captada por el lector (ver Figura No.2)^{13, 29, 30}.

Figura No.2 Representación de la función de las sondas de hidrólisis⁶



1.8.3.3 Equipos para PCR tiempo real

Los equipos para PCR a tiempo real están compuestos por un termociclador y por un lector de fluorescencia, diseñados para poder efectuar la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los viales usados y en cualquier momento de la reacción. Las diferencias más importantes entre estos equipos hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante. Disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de ADN diana en la misma reacción (PCR múltiple) o incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores¹³.

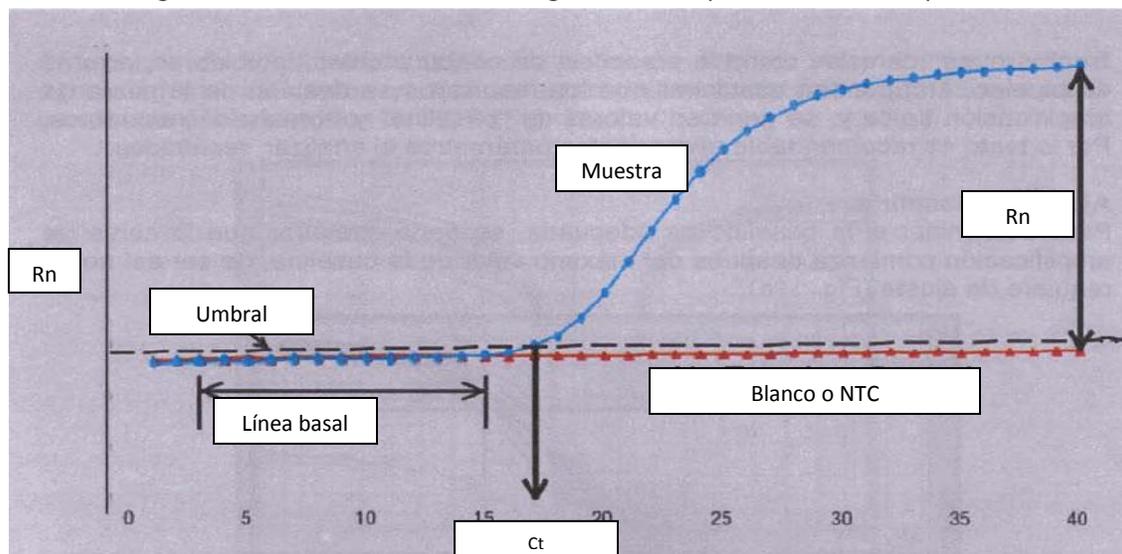
En el caso de una PCR múltiple, lo que se persigue es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de cebadores, así como el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, deben ajustarse experimentalmente. En el caso de los cebadores y el programa de temperaturas a utilizar es necesario tener en cuenta: escoger oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, que tengan temperaturas de alineación semejantes, que cada pareja amplifique una única secuencia diana y que generen amplicones (fragmentos amplificados en la PCR) de tamaño suficientemente diferente como para poder ser separados y diferenciados después de la amplificación^{28, 29}.

También ha de tenerse en cuenta que, en los casos en que se detectan genes que codifican toxinas u otros factores de virulencia, la presencia del gen no implica que la proteína esté siendo producida, por lo que la PCR múltiple debería aplicarse, siempre que sea posible, en conjunción con métodos bioquímicos y/o inmunológicos. No obstante, tampoco se debe dejar de considerar la gran utilidad que puede tener una detección precoz de información genética que pueda ser peligrosa si llegara a ser expresada, ya que permitiría la ejecución de medidas preventivas, tanto de tratamiento como de control. Por último, es conveniente recordar que, tal y como se ha mencionado antes, la PCR es una técnica que por su aparente simplicidad y su alta sensibilidad, es muy susceptible de errores de ejecución o contaminaciones, por lo que la introducción de la PCR múltiple en los laboratorios de microbiología clínica requiere una formación especializada del personal de laboratorio^{6, 13, 30, 31}.

La cuantificación del ADN diana en la muestra por PCR resulta complicada. La dificultad principal radica en que la eficacia de amplificación de la PCR va disminuyendo con el tiempo, hasta que la reacción llega a una fase de saturación en la que ya no se produce incremento de ADN. Puesto que los fragmentos amplificados se detectan al final de la PCR cuando la mayoría de reacciones han alcanzado ya la fase de saturación, la cantidad de ADN obtenido no suele guardar mucha relación con la concentración inicial de ADN en la muestra. Además, al ser la PCR una reacción de tipo exponencial, pequeñas oscilaciones en la eficacia de amplificación para cada muestra se traducen en importantes variaciones en la cantidad de ADN obtenido al final del proceso^{13, 30}.

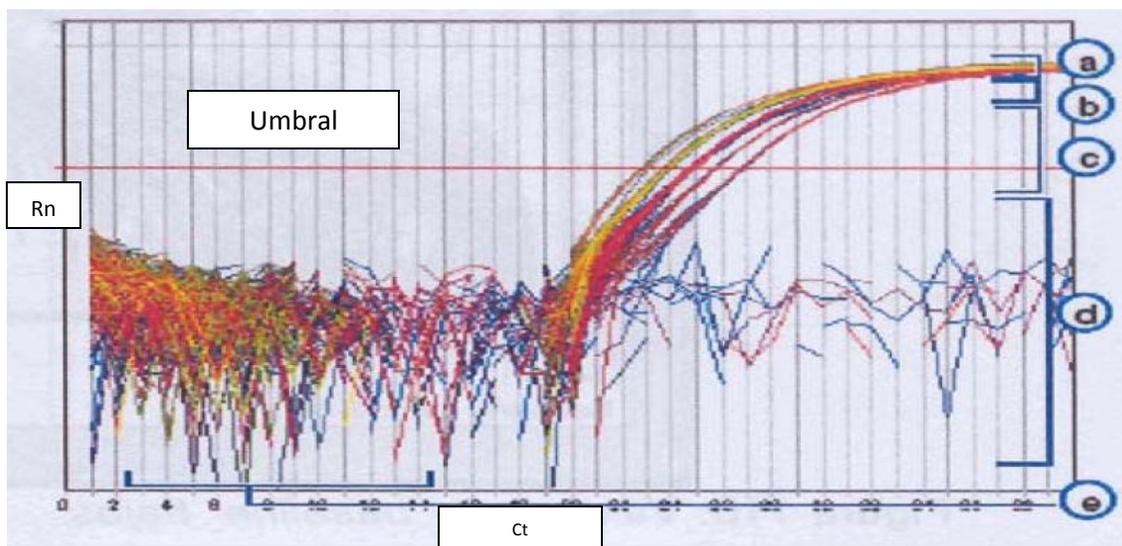
1.8.3.4 Gráficas de PCR tiempo real

Figura No.3 Características de una gráfica de amplificación en tiempo real



En el eje de las "x" se observan los ciclos, en "y" los valores de fluorescencia. La línea azul muestra la fluorescencia obtenida únicamente por el producto de amplificación. La línea roja muestra la señal del blanco. La línea basal abarca normalmente de los ciclos 5-15. El umbral se fija con base a los valores de la línea basal, que se muestran como una línea punteada⁶.

Figura No. 4 Gráfica de amplificación con sus componentes básicos



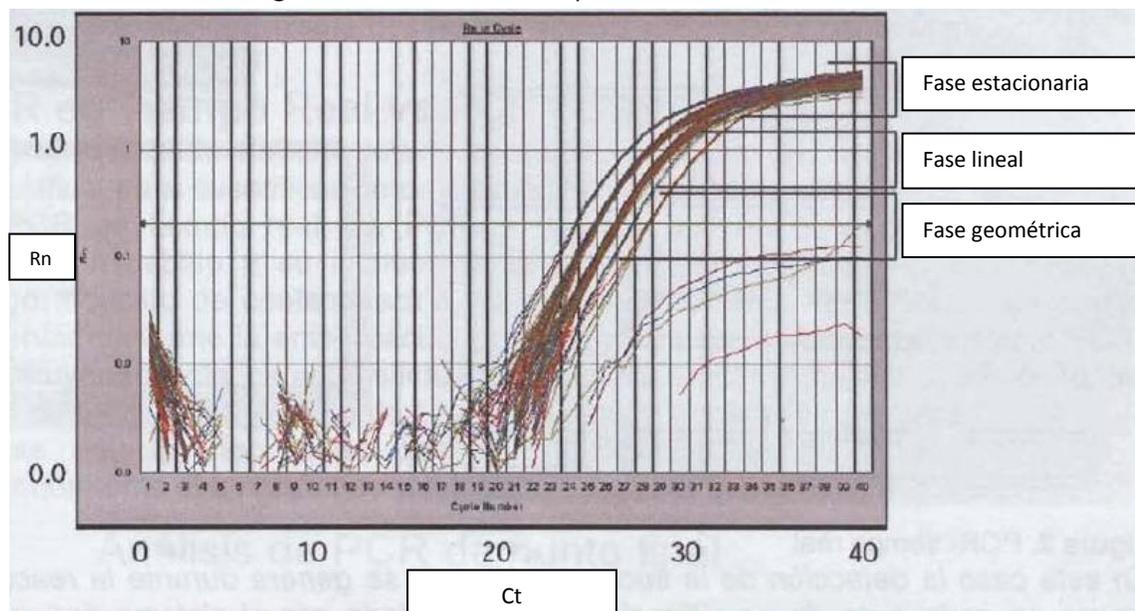
El software del equipo utilizado (Termociclador Tiempo real Fast 7500 Applied Biosystem) calcula automáticamente la línea basal y el umbral para cada detector, siempre que se genera una curva de amplificación típica, como la que muestra ésta figura. a. Fase estacionaria. b. fase lineal. c. fase geométrica. d. señal de ruido. e. línea basal⁶.

1.8.3.5 Cinética de amplificación de una PCR

Al observar el proceso de amplificación, es posible distinguir tres fases:

- Fase geométrica: Todos los reactivos se encuentran en abundancia. En ésta etapa la eficiencia de la amplificación bajo condiciones experimentales es muy cercana al 100%. La cinética de la amplificación tiene un comportamiento 2^n , en donde a partir de una molécula de ADN se generan dos moléculas de ADN. La señal de fluorescencia aumenta de manera directamente proporcional al aumento del producto de PCR.
- Fase lineal: Los iniciadores, nucleótidos y/o enzima comienzan a ser factores limitantes y la eficiencia de la amplificación comienza a disminuir, por lo que no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esa parte.
- Fase estacionaria: En este punto la PCR se detiene, la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuántos ciclos más se prolongue la reacción⁶.

Figura No.5 Fases de la amplificación en una PCR⁶



1.8.3.6 Ventajas de PCR tiempo real

La primera gran ventaja de la PCR a tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación

disminuye. Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, y pueden llevar a cabo ensayos para PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples pasos y equipos^{29, 28}.

La introducción de la PCR en microbiología clínica, ha sido muy limitada y su aplicación se ha restringido a aquellos microorganismos que para su crecimiento requieren medios de cultivo altamente específicos como *B. pertussis* o que crecen muy lentamente como *Mycobacterium tuberculosis*. También, de micosis invasivas especialmente por *Aspergillus* ssp. o de infecciones parasitarias como las ocasionadas por *Toxoplasma gondii* en líquido amniótico o en líquido cefalorraquídeo (LCR); así como muchos virus (familia de los *Herpesvirus* y virus respiratorios)²⁸.

1.8.4 PCR MÚLTIPLE EN TIEMPO REAL PARA *B. pertussis*

La obtención de muestra para el diagnóstico de *B. pertussis* por PCR debe realizarse a partir de un hisopado o un aspirado nasofaríngeo. El aspirado nasofaríngeo es preferido debido a que es más fácil de obtener y es menos doloroso para el paciente; además se ha observado que existe hasta un 15% de mayor probabilidad de aislar al microorganismo a partir del aspirado nasofaríngeo que del hisopado nasofaríngeo^{6, 32}.

Otra desventaja de la toma de muestra con hisopo, es que el hisopo a utilizar debe tener una punta de dacrón. No deben utilizarse puntas de alginato de calcio o de algodón, ya que se ha visto que interfieren con la PCR³².

Los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades han propuesto que para la identificación y diferenciación del agente etiológico de la enfermedad es posible utilizar como método diagnóstico una PCR múltiple en tiempo real utilizando las secuencias IS481, la ptxS1, la pIS1001 y la hIS1001, para el diagnóstico de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*^{6, 1, 12}.

La secuencia IS1001, se encuentra en *B. parapertussis* y se ha denominado pIS1001. Otra de las secuencias elegidas es una secuencia parecida a la IS1001, que se encuentra presente en *B. holmesii*, la cual se ha llamado hIS1001. Para la identificación de *B. pertussis* se utiliza la secuencia de inserción IS481, esta secuencia se consideraba específica para *B. pertussis* pero también se ha encontrado presente en *B. holmesii* (ver tabla No.1).

Para complementar el ensayo múltiple se determina la presencia de la secuencia ptxS1, que codifica para la toxina pertussis y que se encuentra en una sola copia por célula; esta presente en *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Este ensayo se realiza por separado, para evitar que disminuya la sensibilidad del ensayo múltiple^{6, 12, 30, 33}.

Tabla No. 1 Número de copias de secuencias de inserción por célula

Secuencia de inserción	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
IS481	50-238	0	0-7
pIS1001	0	20-23	0
hIS1001	0	0	ND*

* No determinado

En el ensayo múltiple de PCR, cada sonda se marca con un fluorocromo diferente de modo que pueda ser identificado. La sonda para la secuencia diana IS481 y ptxS1 está marcada con FAM, la sonda para pIS1001 con HEX y la sonda de hIS1001 con Quasar 670 (ver detalles, anexo No.1). Los ensayos realizados con las sondas e iniciadores para cada secuencia revelan que son altamente específicos^{1, 6, 12}.

La sensibilidad analítica de estos ensayos también ha sido estudiada; y puede explicarse mediante el siguiente cuadro.

Tabla No.2 Sensibilidad analítica de los ensayos de PCR

No. de bacterias	Valores de Ct para IS481	Valores de Ct para ptxS1
5000	18,4	28,7
500	22	31,3
50	25,7	34,9
10	27,0	35,8
5	29,2	36,7
1	31,2	39,2

La diferencia en los valores de Ct se debe a que diferentes secuencias de inserción se encuentran en cantidad variable (una sola o múltiples copias) en una sola célula^{6, 14}.

Para la identificación de las 3 especies de *Bordetella spp*, por PCR tiempo real en la que se utilizan 4 secuencias diana, se emplea el siguiente algoritmo.

Tabla No.3 Algoritmo de PCR utilizando 4 secuencias diana para identificar 3 especies de *Bordetella spp*

Especie	Resultado del ensayo			
	Reacción única	Reacción múltiple		
	ptxS1	IS481	hIS1001	pIS1001
<i>B.pertussis</i>	+	+	-	-
<i>B.parapertussis</i>	+	-	-	+
<i>B.holmesii</i>	-	+	+	-
<i>B.pertussis</i> y <i>B.parapertussis</i>	+	+	-	+
<i>B.pertussis</i> y <i>B.holmesii</i>	+	+	+	-

Finalmente en este apartado se muestra, una tabla de interpretación de los resultados del algoritmo de PCR^{6,12}.

Tabla No. 4 Interpretación del algoritmo de PCR

IS481	pIS1001 ^a	hIS1001 ^a	ptxS1 ^a	Interpretación
Ct<35	Negativo	Negativo	Positivo o Negativo	<i>B. pertussis</i>
35≤Ct≤40	Negativo	Negativo	Negativo	Indeterminado ^b
Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	<i>B. holmesii</i>
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>B. parapertussis</i>
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	<i>B. bronchiseptica</i>

a. Un valor de Ct<40 indica que la reacción es positiva; pero un valor mayor indica que la prueba es negativa.

b. Requiere la confirmación mediante cultivo y/o serología

Una vez que se han explicado algunos aspectos básicos tanto de *B. pertussis* como de PCR; en las próximas páginas se expondrán algunos conceptos sobre la evaluación de los métodos analíticos usados por los laboratorios para sus distintas determinaciones.

1.9 VALIDACIÓN

En la actualidad los laboratorios clínicos deben efectuar las actividades de validación y verificación de los métodos utilizados por el propio laboratorio, con la finalidad de demostrar que los métodos analíticos empleados emiten resultados fiables y que cumplen con las necesidades requeridas por el médico para tomar decisiones basadas en los resultados proporcionados. Un laboratorio clínico acreditado o en proceso de acreditación debe demostrar que tiene capacidad para realizar las actividades de validación y verificación de los procedimientos de examen³⁴.

La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Además refleja las condiciones reales de la aplicación de los procedimientos de examen. Los datos de la validación los informa el fabricante en los instructivos de uso de los reactivos; no obstante, el laboratorio debe verificar que pueden aplicar correctamente los métodos ya validados por el fabricante, previo a su uso en los exámenes, bajo sus condiciones propias de operación (equipo, calibradores, analistas, etc.) generando evidencias objetivas, para confirmar su aplicación correcta^{35,34}.

Los laboratorios deben validar todos los métodos que utilicen, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios; teniendo en cuenta el intervalo de concentraciones de las muestras de rutina³⁵.

La validación y/o verificación de un procedimiento de examen debe repetirse cuando existan cambios mayores, por ejemplo el cambio de equipo o el mantenimiento mayor de éste, así como los cambios menores como la modificación del tamaño de muestra, cambio de analista o sustitución de reactivos³⁴.

Antes de realizar la validación y/o verificación en la rutina del laboratorio, se debe asegurar que:

- a) El equipo ha sido instalado correctamente y que está en condiciones de generar resultados clínicamente útiles (calibración analítica de los equipos).
- b) El personal que realiza las mediciones analíticas debe ser calificado y competente para emprender la tarea asignada.
- c) Que se cuente con el material de referencia y biológico adecuado para determinar cada uno de los parámetros del desempeño.
- d) Que se maneje o conozca el fundamento del método.
- e) Que la infraestructura, condiciones físicas y ambientales no intervengan en la calidad del proceso^{35, 36}.

Para conocer el desempeño de un método es conveniente utilizar alguna(s) de la(s) siguiente(s) técnica(s)³⁵:

- a) Calibración utilizando patrones de referencia o materiales de referencia
- b) Comparación con resultados obtenidos con otros métodos
- c) Comparaciones con otros laboratorios
- d) Evaluación de los factores que influyen en el resultado
- e) Evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica³⁵.

De manera general la validación de un método analítico presenta dos etapas:

- a) La ejecución analítica, que considera protocolos específicos de realización
- b) La realización de cálculos matemáticos a partir de los datos obtenidos de la etapa previa, los cuales generan evidencia objetiva que indica si el método analítico cumple con los requisitos necesarios para su uso³⁷.

La metodología para validar métodos analíticos cuantitativos es bien conocida, sin embargo, en cuanto a métodos analíticos no cuantitativos la información es escasa y poco uniforme. La Conferencia Internacional de Armonización sobre los Requerimientos Técnicos para el Registro de Fármacos de Uso Humano (ICH) señala que, los parámetros más importantes a considerar en una validación, independientemente del método analítico, son los siguientes³⁸:

- a) Límite de detección
- b) Límite de cuantificación
- c) Precisión
- d) Veracidad
- e) Linealidad
- f) Intervalo de trabajo
- g) Especificidad analítica ^{34, 36, 38}

La validación es un equilibrio entre los costos, los riesgos y las posibilidades técnicas. Los valores de muchas pruebas como la exactitud, el límite de detección, la selectividad, la linealidad, la repetibilidad, la reproducibilidad, la robustez y la sensibilidad sólo pueden ser dadas en una forma simplificada debido a la falta de información³⁵.

Finalmente, el laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una conclusión sobre la aptitud del método. La validación puede ser tan extensa como sea necesaria para satisfacer las necesidades del laboratorio. El laboratorio debe verificar todos los procedimientos utilizados referidos a normas, publicaciones, libros de texto, revistas científicas periódicas, insertos, procedimientos internacionales o nacionales reconocidos, etc. La validación puede incluir los procedimientos para el muestreo, la manipulación y el transporte de las muestras³⁵.

A continuación se describen de manera breve algunos parámetros que permiten evaluar el método analítico, y se menciona qué análisis matemático puede realizarse para evaluar cada parámetro.

1.9.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección será la mínima cantidad de sustrato en una muestra, que bajo las condiciones de operación establecidas, sea capaz de generar una respuesta analítica positiva en el método analítico³⁷.

El límite de detección del método de medición se evalúa haciendo diluciones sucesivas de concentraciones conocidas de la sustancia de interés, como mínimo por quintuplicado y determinando la respuesta analítica^{37, 38, 39}.

Existen diferentes formas para determinar el límite de detección; esto depende generalmente de si el método a evaluar es un método instrumental o no instrumental. Algunos de éstos procedimientos se enlistan a continuación³⁸:

a) Evaluación visual:

Puede utilizarse para métodos instrumentales, pero principalmente para métodos no instrumentales.

Se determina por el análisis visual de muestras con concentración conocida y estableciendo el nivel mínimo al cual el analito puede ser detectado de forma fiable^{38,36}.

b) Señal de ruido:

Solamente es aplicable a métodos instrumentales que presentan una señal de ruido como respuesta analítica.

La determinación de la proporción de la señal de ruido se realiza mediante una comparación de señales emitidas por muestras de concentraciones conocidas (bajas concentraciones) con muestras blanco; así se establece la concentración a la cual el analito puede ser detectado de forma fiable. Una señal de ruido aceptable es cuando existe una relación de 2:1 ó 3:1^{38,36}.

c) La curva de calibración- desviación estándar de los blancos

Se realiza mediante el análisis de un número considerable de muestras blanco y se calcula la desviación estándar de las respuestas analíticas^{38,36}.

d) La curva de calibración-desviación estándar de regresión

La curva de calibración debe diseñarse utilizando muestras que contengan al analito en el límite de detección. El análisis debe realizarse con base a la línea de regresión, la ordenada al origen y la desviación estándar^{38,36}.

Si el límite de detección se determina mediante una evaluación visual o mediante la señal de ruido, la presentación de los gráficos se considera aceptable como justificación³⁸.

El límite de detección es una prueba límite. Las pruebas límite, establecen que la cantidad del analito está, arriba o debajo de cierto nivel. El límite de detección se expresa generalmente como se expresa la concentración del analito en la muestra (porcentaje, partes por millón, etc.)³⁶

1.9.2 PRECISIÓN

Para conocer el valor de una magnitud se emplea un procedimiento de medición, y los resultados que se obtienen son una estimación del valor del mensurando. Tal estimación contiene un error de medida, que es la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero del mensurando³⁴.

En el error de medición están involucrados:

- a) El error aleatorio, que se relaciona con la precisión del procedimiento de medición. Estos errores difieren en gran medida del valor medio y afectan la reproducibilidad.
- b) El error sistemático, que se relaciona con la veracidad del procedimiento de medición. Pueden existir varias fuentes de error sistemático, la suma de todas éstas se conoce como error sistemático total o sesgo de la medición³⁴.

Los errores aleatorios y sistemáticos pueden ocurrir independientemente unos de otros y surgir en diferentes etapas del procedimiento. El error aleatorio es más fácil de detectar que el sistemático, ya que el segundo no se puede apreciar con la sola repetición de mediciones y a menos que se conozca de antemano el valor verdadero del mensurando, podrían existir errores sistemáticos muy grandes, que pasen inadvertidos si no se aplican sistemas de control de calidad interno o se participa en programas de ensayos de aptitud (tales como los programas de evaluación externa de la calidad)³⁴.

Así la precisión es el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas previamente³⁶.

- a) Condiciones de repetibilidad: Son las condiciones bajo las cuales se obtienen los resultados de prueba independientes, aplicando el mismo método analítico sobre un material de prueba idéntico en el mismo laboratorio por el mismo analista usando el mismo equipo dentro de un periodo corto de tiempo (mismo día). Por lo tanto, la repetibilidad es la medida de la precisión del método analítico bajo condiciones de repetibilidad³⁶.
- b) Condiciones de reproducibilidad: Son las condiciones bajo las cuales se obtienen los resultados de prueba independientes, cuando se aplica el mismo método analítico sobre un material de prueba idéntico, en diferentes laboratorios con diferentes analistas usando equipo diferente en diferentes días³⁶.

Para la evaluación de la precisión se deben realizar mediciones repetidas, se recomienda utilizar un mínimo de 5 repeticiones; además se deben aplicar algunos conceptos estadísticos fundamentales como el cálculo de la media (\bar{X}), la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (%CV;) y la varianza (s^2). También se sugiere utilizar la función estadística "Ji cuadrada" para evaluar la repetibilidad y la "F de Fisher" para evaluar la reproducibilidad. El criterio de aceptación de éstas últimas dos funciones estadísticas es que el valor calculado sea menor que el valor de tablas. El criterio de aceptación para el coeficiente de variación es que éste sea $\leq 5\%$ para métodos biológicos^{36, 34}.

1.9.3 VERACIDAD

El término veracidad, se define como el grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia. La veracidad se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático, también llamado “sesgo” o “desviación”; que puede expresarse como un valor absoluto o relativo al valor verdadero³⁴.

La veracidad de un método de medición es de interés cuando es posible disponer del valor verdadero del mensurando. El valor verdadero no se conoce exactamente en algunos métodos de medición, pero es posible contar con un valor de referencia certificado para el mensurando; por ejemplo, si se dispone de materiales de referencia adecuados se establece el valor de referencia con base a otro método de medición o mediante la preparación de una muestra conocida. Se puede investigar la veracidad de un método de medición mediante la comparación del valor de referencia certificado con los resultados obtenidos por el método de medición^{34, 38}.

Normalmente la veracidad se expresa en términos de sesgo, en un análisis químico por ejemplo dicho sesgo se puede presentar si el método falla en extraer a todo el elemento de interés o si la presencia de un elemento interfiere en la determinación de otro.

El término sesgo se ha utilizado durante mucho tiempo en cuestiones estadísticas, pero debido a que causó algunas discusiones de carácter filosófico en algunos ámbitos como la medicina y las leyes, se ha decidido emplear a la veracidad como nuevo término.

En algunos documentos la veracidad ha sido referida como la exactitud de la medición. Sin embargo, este uso no es recomendable. El término exactitud se utilizó durante cierto tiempo para referirse únicamente al elemento veracidad, pero para muchas instituciones el término exactitud debía indicar el desplazamiento total de un resultado con respecto a su valor de referencia, debido tanto a los efectos aleatorios como a los sistemáticos. Por lo anterior, el término general de exactitud se usa para referirse conjuntamente, a la veracidad y a la precisión³⁴.

Para verificar la veracidad de los métodos de examen cuantitativos que se emplean en el laboratorio clínico, se pueden realizar:

- a) Valoración de un material de referencia certificado
 - a.1) Valoración por el cálculo del error relativo
 - a.2) Valoración por el cálculo de porcentaje de recuperación
- b) Estudios de comparación de métodos
 - a) Estudios de comparación interlaboratorios con base en los resultados de programas de ensayos de aptitud^{34, 40}.

En lo que se refiere a la valoración por el cálculo del porcentaje de recuperación, es posible utilizar un material de referencia certificado (MRC), un material de referencia (MR) o un calibrador de

valor conocido. El material se somete a examen 10 veces y se estima la concentración media del analito y con el valor obtenido se puede determinar el porcentaje de recuperación. El porcentaje de recuperación tiene que ser igual o lo más cercano a 100. Valores menores indican menor cantidad recuperada del analito cuantificado y a mayor porcentaje mayor cantidad del analito recuperado. El criterio de aceptación es que el porcentaje de recuperación se encuentre entre 95-105%⁴⁰.

También se sugiere utilizar la función estadística “t de student” para evaluar la veracidad del método. Donde el criterio de aceptación es que la t calculada sea menor o igual que la t de tablas³⁶.

1.9.4 LINEALIDAD

La linealidad es la habilidad del método para producir resultados de prueba que son directamente proporcionales, o por medio de una transformación matemática bien definida, a las concentraciones de los analitos en las muestras dentro de un intervalo dado. La relación lineal debe ser evaluada lo largo del intervalo de trabajo del procedimiento analítico.

En la evaluación de éste parámetro es recomendable utilizar una serie de cinco concentraciones del analito de interés^{36,38}.

La linealidad del método puede evaluarse, analizando los resultados experimentales, por medio de un método estadístico apropiado, como es la línea de regresión obtenida por el método de mínimos cuadrados, que permiten llevar a cabo la estimación matemática del grado de linealidad del método analítico.

El coeficiente de correlación (r) indica que cuando cada par de valores (x, y) están altamente relacionados, al representarlos gráficamente, tienden a estar sobre una línea recta. En una gráfica de dispersión si $r=+1$, existe una alta correlación positiva, si $r=-1$, existe una alta correlación negativa; si $r=0$, significa una falta total de correlación entre las variables x, y³⁶.

El coeficiente de determinación (r^2) se usa como una medida de la linealidad del método. Si $r^2=1$, significa que los datos experimentales: cantidad adicionada (x) y cantidad recuperada (y) al representarlos gráficamente están sobre una línea recta (línea de regresión); si $r^2 = 0$, no existe linealidad.

Tanto el coeficiente de determinación (r^2) como el coeficiente de variación expresado en porcentaje son utilizados como criterios de aceptación en la determinación de la linealidad del método; donde el criterio de aceptación es que $r^2 \geq 0.98$ ^{36,40}.

1.9.5 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Para que un método analítico no cuantitativo se considere validado es necesario que genere de manera correcta respuestas analíticas positivas y respuestas analíticas negativas. Por lo tanto la sensibilidad y la especificidad son dos características importantes para validar un método analítico. Para una adecuada comprensión del fenómeno se debe construir una tabla de contingencia como se aprecia en la tabla No. 5³⁷.

Tabla No.5 Modelo de la tabla de contingencia a construir para el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Resultado de la prueba	Valor de la característica		
	Presente	Ausente	
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
	A+C	B+D	A+B+C+D

Dónde:

A= Verdaderos positivos

B= Falsos positivos

C= Falsos negativos

D= Verdaderos negativos

La sensibilidad es la probabilidad de que la respuesta analítica (y por ende la prueba) resulte positiva cuando en la muestra estudiada está realmente presente el sustrato de interés diagnóstico en los límites de detección o por arriba de ellos^{37, 36}:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A + C}$$

La especificidad es la probabilidad de que la respuesta analítica (y por ende la prueba) resulte negativa debido a que en la muestra estudiada NO existe físicamente el sustrato o sustancia de interés diagnóstico o se encuentra por debajo de los límites de detección^{37, 36}:

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{B + D}$$

En términos de individuos y enfermedades la sensibilidad es la probabilidad de identificar a los enfermos o a los individuos que tienen la característica de interés y se estima como la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente está enfermo o tiene la característica de interés. La especificidad es la probabilidad de identificar a las personas sanas y se estima como la probabilidad de que la prueba resulte negativa cuando el individuo está realmente sano³⁷.

Para que la sensibilidad y la especificidad de un método analítico sean estadísticamente válidas se debe cumplir la siguiente regla de decisión.

Si la sensibilidad ≥ 0.95 el método analítico tiene buena sensibilidad.

Si la especificidad ≥ 0.95 el método analítico tiene buena especificidad^{37, 40}.

Cabe señalar que no siempre es posible demostrar que un procedimiento analítico es específico para un analito en particular (no hay una discriminación completa). En éste caso se recomienda la combinación de dos o más procedimientos analíticos, para lograr el grado de discriminación deseado³⁸.

1.9.6 VALOR PREDICTIVO POSITIVO

Es la probabilidad de que el sustrato de interés diagnóstico esté físicamente presente o en la cantidad mínima detectable cuando la prueba resultó positiva. El valor predictivo positivo puede estimarse como

$$VPP = \frac{A}{A + B}$$

En términos de individuos y enfermedad el valor predictivo positivo es la probabilidad de estar enfermo o tener una propiedad de interés, si se obtiene un resultado positivo en la prueba. El valor predictivo positivo representa la proporción de pacientes o personas con un resultado positivo en la prueba que resultaron estar enfermos³⁷.

Para que el valor predictivo positivo de un método analítico sea estadísticamente válido se debe cumplir la siguiente regla de decisión:

Si $VPP \geq 0.95$ el método analítico tiene buen valor predictivo positivo^{37, 36}.

1.9.7 VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

Es la probabilidad de que el sustrato de interés diagnóstico esté físicamente ausente o en cantidad inferior a la mínima detectable cuando la prueba resultó negativa. El valor predictivo negativo puede estimarse como

$$VPN = \frac{D}{C + D}$$

En términos de individuos y enfermedades el valor predictivo negativo es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano y representa el número de verdaderos negativos del total de pacientes con un resultado negativo en la prueba.

Si $VPN \geq 0.95$ el método analítico tiene buen valor predictivo negativo^{37, 36}.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tos ferina es un problema real a nivel mundial, presentándose 50 millones de casos y 279 mil muertes anualmente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al cultivo como la prueba de oro para el diagnóstico de esta enfermedad; sin embargo carece de sensibilidad y requiere de 5-10 días para emitir un resultado^{1, 2, 6}.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se verificará la plataforma propuesta por los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) para la identificación de *B. pertussis* y *B. paraptussis* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), con la finalidad de obtener resultados en el menor tiempo posible y con los parámetros de calidad establecidos para pruebas diagnósticas.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

General:

Evaluar que la técnica propuesta por los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) para el diagnóstico de *B. pertussis* y *B. parapertussis* por qPCR cumpla con los parámetros de calidad establecidos para pruebas diagnósticas y se establezca como método confiable en el Laboratorio de Diagnóstico y Tipificación Molecular del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE).

Específico:

Realizar pruebas estadísticas que sean de significancia.

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

La técnica propuesta por los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) para el diagnóstico de *B. pertussis* y *B. paraptussis* por qPCR cumple con los parámetros de calidad establecidos para pruebas diagnósticas, para establecerse como una técnica confiable en el Laboratorio de Diagnóstico y Tipificación Molecular del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE).

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODO

En el presente capítulo se describe la metodología que fue utilizada para la evaluación del método de diagnóstico molecular de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, que se desarrolló en el Departamento de Diagnóstico y Tipificación Molecular del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE).

El Departamento de Diagnóstico y Tipificación Molecular cuenta con las áreas de extracción de ácidos nucleicos, área de preparación de la mezcla de reacción de PCR (área blanca), área de colocación de muestras (área de templados), área de control positivo y área de instrumentación. Dichas áreas se encuentran separadas físicamente para evitar la contaminación y por consiguiente para disminuir la probabilidad de emitir falsos positivos. Cabe señalar que todo lo que se usa en cada área, es exclusivo de ésta.

Las áreas utilizadas cumplen con las especificaciones y características establecidas para realizar pruebas de biología molecular. Además los equipos e instrumentos utilizados están calibrados, ya que el Instituto contrata periódicamente los servicios de las compañías especializadas para que realicen este servicio.

Los parámetros evaluados en el presente estudio se eligieron siguiendo las recomendaciones sugeridas por la Entidad Mexicana de Acreditación y el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación en cuanto a la Validación de Métodos Analíticos. Éstos parámetros corresponden al límite de detección, precisión, veracidad, linealidad, sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: Experimental.

Población de estudio: 162 exudados nasofaríngeos obtenidos de población infantil (menores de 5 años) procedentes de los diferentes laboratorios estatales de la red de *B. pertussis*.

Criterios de inclusión y exclusión: Toma de muestra dentro de los primeros 10 días de inicio de síntomas.

Variable dependiente: Muestras de exudados nasofaríngeos.

Variable independiente: edad, caso o control.

5.2 MATERIALES Y EQUIPOS

Equipos

- **Extracción automatizada de ADN**
 - Robot de extracción, Marca Roche, Modelo MagNa Pure 2.0

- **Preparación de Master Mix**
 - Gabinete de bioseguridad, Marca Nuair, Modelo Labogard Class II, Type A2
 - Juego de micropipetas (1-10 μL , 20-200 μL , 200 μL -1000 μL), Marca RAININ
 - Microcentrifuga Marca Eppendorff
 - Vortex, Marca Velp Scientifica, Modelo ZX Classic
 - Congelador a -20°C , Marca Sanyo, Modelo Medicool

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**
 - Termociclador Tiempo real Fast 7500 Applied Biosystem
 - Centrifuga para microplacas, Marca Heraeus Instruments, Modelo Labofuge 100
 - Computadora con programa 7500 Fast System SDS Software

- **Cuantificación de las diluciones por electroforesis capilar**
 - Agilent 2100 Bioanalyzer
 - Computadora con programa Agilent Technologies Original Bundle PC

Materiales

- **Extracción automatizada de ADN**
 - MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit

- **Preparación de Master Mix**
 - Guantes
 - Tubos Eppendorff para microcentrifuga de 600 μL y 1500 μL
 - Puntas con filtro de 10 μL , 200 μL y 1000 μL .

- Microplacas Fast marca Eppendorff
- Tubos Fast marca Eppendorff
- Bata desechable
- Bloques de enfriamiento marca Eppendorff
- Gasas
- Contenedores para desechos

Reactivos y material biológico

- **Preparación de Master Mix**
 - Agua grado biología molecular
 - TaqMan Gene expression Master Mix, Applied Biosystems
 - Iniciadores y sondas específicos para *Bordetella spp* (ver Anexos No.1)
- **Patrones de referencia**
 - Cepas de *Bordetella pertussis* (A639), *B. parapertussis* (F585) y *B. holmesii* (C690); ajustadas con 1.5×10^8 UFC/mL; proporcionadas por los CDC. Conservadas a -20°C hasta su uso (ver preparación del control positivo en el Anexo No.5).
- **Muestras**
 - 162 muestras de exudados nasofaríngeos diluidas con solución salina al 0.85%, extraídas por el método automatizado. Conservadas a -20°C hasta su uso.

5.3 METODOLOGÍA

Las condiciones de trabajo para el área blanca, el área de templados y el área de control positivo indican que antes de utilizar el gabinete de bioseguridad, se debe encender la luz UV durante al menos 15 minutos, posteriormente se debe limpiar el gabinete y las micropipetas con la disolución de descontaminación "RNase away".

En todas las áreas (incluyendo el área de instrumentación) y durante todos los procesos, es indispensable el uso de bata y guantes desechables^{41, 6}.

La evaluación consideró a las secuencias IS481 y ptxS1, debido a que como ya se ha mencionado en páginas anteriores, la primera secuencia es multicopia y forma parte de la reacción múltiple; y la segunda es unicopia y es una reacción independiente^{6, 12, 26, 29}.

También cabe señalar que el uso de un estándar de Mc Farland y por tanto, de manera indirecta el uso de UFC (unidades formadoras de colonias) en la realización de algunos parámetros del presente estudio fue debido a que no se dispuso de un material de referencia certificado. Sin embargo, la escala de Mc Farland es una técnica confiable que estima poblaciones microbianas comparando índices de turbidez del estándar con los logrados del cultivo microbiano^{42, 43, 10}.

5.3.1.1 Preparación de la mezcla de reacción para PCR (área blanca):

La preparación de la mezcla de reacción se realiza en un tubo Eppendorff de 600µL o de 1.5mL dependiendo del volumen total requerido por el número de muestras a analizar (considerando el testigo positivo, blanco y una reacción de exceso), siguiendo el orden de la plantilla de trabajo (ver Anexos No.2).

Se utiliza un tubo Eppendorff para cada reacción, es decir, un tubo Eppendorff para la prueba IS481/pIS1001/hIS1001, otro para el ensayo ptxS1 y uno más para la reacción RNasa P humana. Posteriormente, de cada mezcla de reacción se dispensa un volumen de 21µL en un pozo independiente en la microplaca fast marca Eppendorff (ver Anexos No.3). Todo el proceso se lleva a cabo a 4°C.

Una vez realizado lo anterior, se adicionan 4µL de agua grado biología molecular en los pozos A1, B1 y C1, los cuales conforman el control negativo; estos pozos se tapan y finalmente las placas se conservan en refrigeración hasta su uso^{44, 1}.

5.3.1.2 Adición de muestras (área de templados):

Se adicionan 4µL del ADN de la misma muestra para la prueba IS481/pIS1001/hIS1001, 4µL para el ensayo ptxS1 y 4µL más para la reacción RNasa P humana (ver Anexos No.4)^{41, 1, 6}.

En ésta área siempre se trabaja con el producto de la extracción del ADN de las muestras clínicas. La extracción del ADN de las muestras se realizó por el Departamento de Genoma de Patógenos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica¹.

5.3.1.3 Adición del control positivo (área de control positivo):

Se adicionan 4µL del testigo positivo en el pozo correspondiente (ver Anexo No. 5)^{41, 1, 6}.

5.3.1.4 Área de instrumentación:

Se programa el termociclador, se centrifuga la microplaca fast marca Eppendorff y finalmente ésta se coloca en el interior del termociclador (ver condiciones del termociclador en Anexo No. 6)^{41, 6}.

5.3.1.5 Límite de detección

A partir del cultivo de la cepa de *Bordetella pertussis* (A639) que se encontraba ajustado al 0.5 en la escala de Mc Farland, que equivale a la concentración de 1.5×10^8 UFC/mL, se realizaron 5 diluciones decimales para encontrar el número de copias mínimo que aun puedan generar una respuesta analítica positiva.

Las diluciones utilizadas fueron: 1.5×10^6 , 1.5×10^5 , 1.5×10^4 , 1.5×10^3 , 1.5×10^2 UFC/mL; cada dilución se evaluó por triplicado. Esto se realizó tanto para el ensayo en el que se utilizó como blanco la secuencia de inserción IS481 como en el cual el blanco fue el gen ptxS1. Lo anterior se realizó utilizando el Termociclador Tiempo real Fast 7500 Applied Biosystem^{1, 36, 37}.

Las curvas de amplificación obtenidas por el equipo se analizaron visualmente y se determinó como límite de detección aquella dilución en la cual las diferentes repeticiones mostraron un comportamiento muy azaroso (ver gráfica No.1 y No.2), en donde la misma dilución presentó diferentes valores de Ct (ciclo umbral)^{36, 35}.

Posteriormente se cuantificó, mediante electroforesis capilar, la cantidad de copias de ADN de *Bordetella pertussis* presentes en la dilución correspondiente al límite de detección, utilizando el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (realizado por Departamento de Genoma de Patógenos)^{1, 36}.

5.3.1.6 Precisión

A partir de la dilución 1.5×10^3 UFC/mL, se prepararon 10 muestras independientes y se procesaron aplicando el mismo método analítico, en el mismo laboratorio, por el mismo analista y utilizando el mismo equipo dentro de un mismo día. Éste procedimiento se realizó para evaluar la secuencia de inserción IS481 y ptxS1.

Una vez procesados los datos, se obtuvo el valor de Ct (ciclo umbral) de cada repetición. Con los valores de Ct obtenidos se realizaron los cálculos de desviación estándar, coeficiente de variación, media y Ji cuadrada de Pearson. Finalmente se analizaron los datos^{34, 36}.

5.3.1.7 Veracidad

Se utilizó una dilución de concentración conocida (1.5×10^5 UFC/mL) y se procesó repetidas veces (entre 9 y 11; para las secuencias IS481 y ptxS1). Dichas muestras se programaron en el termociclador como muestras de modo que el equipo cuantificó la cantidad presente en cada una de ellas.

Posteriormente se calculó el porcentaje de recuperación y la t de student para evaluar si los resultados obtenidos eran estadísticamente significativos^{34, 36}.

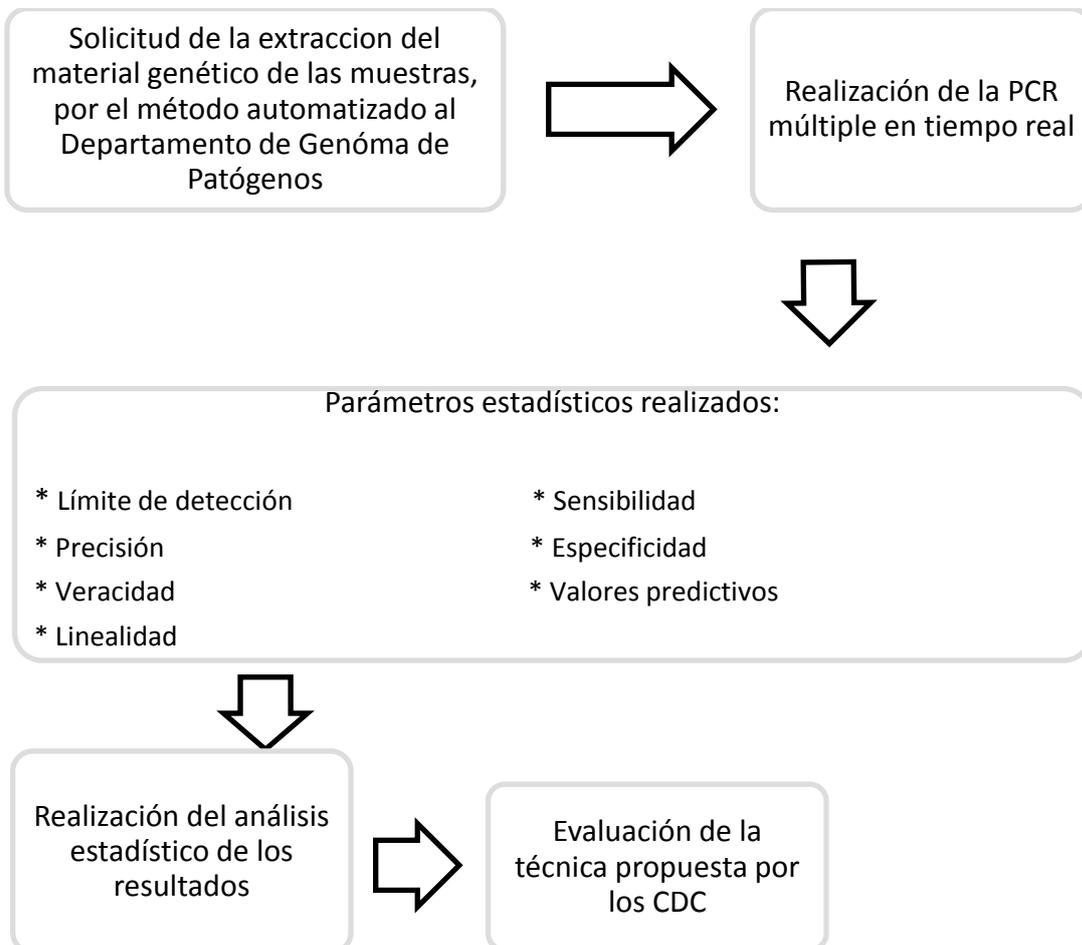
5.3.1.8 Linealidad

Se utilizó una serie de diluciones de *Bordetella pertussis*, cuya concentración corresponde a: 1.5×10^6 , 1.5×10^5 , 1.5×10^4 , 1.5×10^3 , 1.5×10^2 UFC/mL; cada dilución se realizó por triplicado. A partir de éstas diluciones, el equipo generó un gráfico utilizando el programa estadístico SDSv1.4. Posteriormente se analizaron los datos obtenidos a partir de la línea de regresión, para evaluar si el resultado obtenido era estadísticamente significativo^{34, 36}.

5.3.1.9 Sensibilidad, especificidad y valores predictivos

Se analizaron 162 muestras clínicas por dos técnicas diagnósticas; qPCR (método a evaluar) y cultivo (método de referencia, los datos de cultivo los proporcionó el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas). A partir de los resultados obtenidos se construyó una tabla de contingencia para obtener los datos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos^{36, 37}.

5.3.2 DIAGRAMA DE FLUJO



CAPÍTULO VI

RESULTADOS

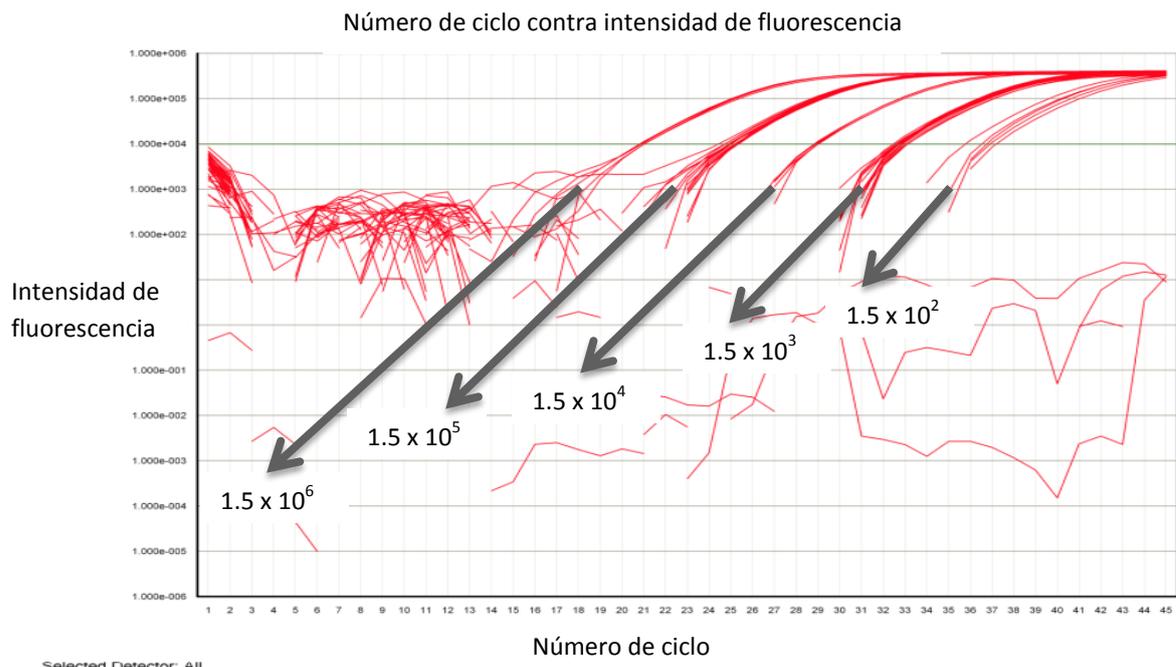
El método diagnóstico evaluado es una qPCR múltiple en la que se utilizan las secuencias IS481, pIS1001, hIS1001 y ptxS1. Estas secuencias de inserción están presentes en múltiples copias en las respectivas especies de *Bordetella spp*, a excepción de la secuencia ptxS1 que es unicopia y que codifica para la toxina pertussis. Es por ésta razón que se ha evaluado únicamente el comportamiento de las secuencias IS481 y ptxS1 debido a que su carácter multicopia o unicopia los hace diferentes. Además la secuencia IS481 forma parte de la reacción múltiple, y la secuencia ptxS1 constituye una reacción única.

6.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la mínima cantidad de sustrato en una muestra, que bajo las condiciones de operación establecidas, sea capaz de generar una respuesta analítica positiva en el método analítico.

Para evaluar el límite de detección, se utilizaron las siguientes diluciones: 1.5×10^6 , 1.5×10^5 , 1.5×10^4 , 1.5×10^3 , 1.5×10^2 UFC/mL; cada dilución se evaluó por triplicado. Esto se realizó tanto para el ensayo en el que se utilizó como blanco la secuencia de inserción IS481 como en el cual el blanco fue el gen ptxS1.

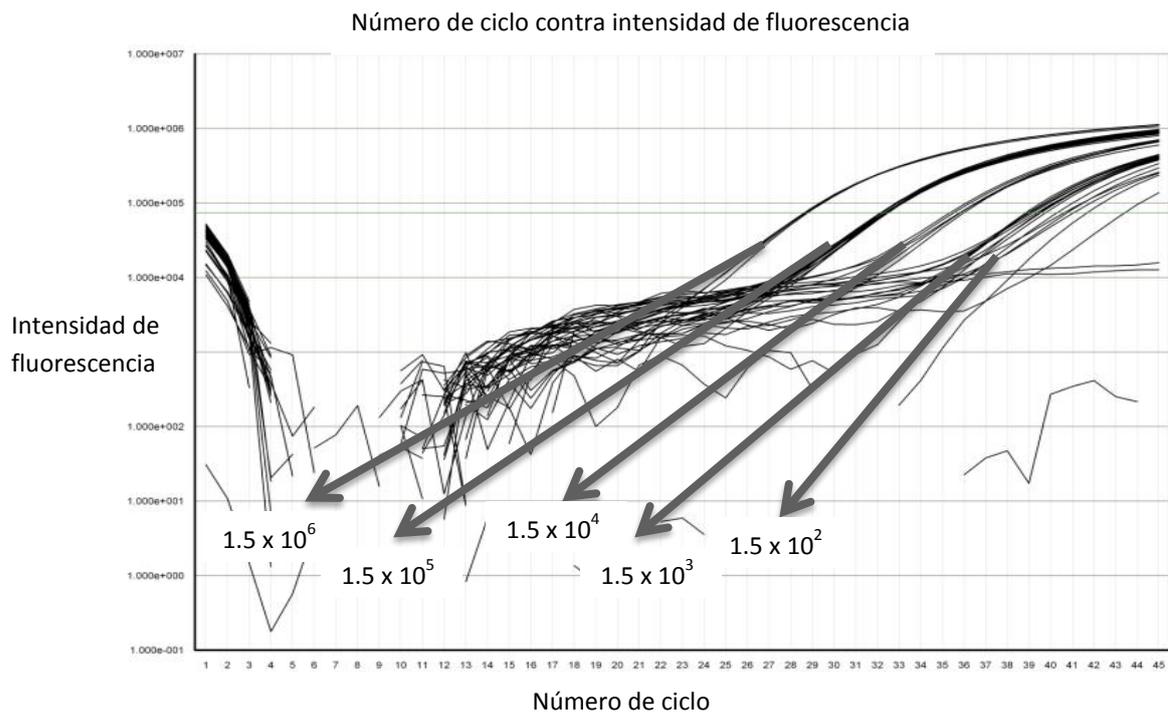
Gráfica No. 1 Amplificación de la secuencia IS481 de *Bordetella pertussis* en tiempo real para la determinar la concentración mínima detectada.



Límite de detección para la secuencia de inserción IS481: 56 copias/ μ L.

En la gráfica No.1 se muestran 5 curvas de amplificación, correspondientes a las diluciones antes mencionadas; en ellas se puede apreciar que las diluciones se realizaron adecuadamente ya que hay cuatro ciclos entre una y otra dilución. Además se observa que las curvas de amplificación (repeticiones) de las diluciones 1.5×10^6 , 1.5×10^5 , 1.5×10^4 y 1.5×10^3 UFC/mL tienen el mismo comportamiento y están muy próximas entre sí, teniendo por tanto un valor de Ct (ciclo umbral) muy semejante. Éste comportamiento difiere del que presenta la dilución 1.5×10^2 UFC/mL en el que se observa que las diferentes repeticiones tienen una curva de amplificación con un comportamiento tal que el 50% de las curvas amplifica y el otro 50% no, además el valor de Ct (ciclo umbral) varía para las muestras que tienen la misma concentración. Así una dilución con una concentración de 1.5×10^1 UFC/mL generaría curvas de amplificación en el que menos del 50% de las curvas amplificaría, lo cual impediría emitir un diagnóstico certero; de tal forma que muchas pruebas podrían darse como falsos positivos o como falsos negativos. Por tanto se establece como límite de detección la dilución 1.5×10^2 UFC/mL que equivale a 56 copias/ μ L.

Gráfica No. 2 Amplificación de la secuencia ptxS1 de *Bordetella pertussis* en tiempo real para la determinar la concentración mínima detectada.



Límite de detección para la secuencia de inserción ptxS1: 1680 copias/ μ L.

Siguiendo el mismo razonamiento que en el gráfico No.1, se observa en el gráfico No.2 que el límite de detección para la secuencia ptxS1 corresponde a la dilución 1.5×10^3 UFC/mL que equivale a 1680 copias/ μ L.

6.2 PRECISIÓN

Es la concordancia entre resultados independientes obtenidos bajo condiciones de medición estipulados. Para conocer el valor de una magnitud se emplea un procedimiento de medición, y los resultados que se obtienen son una estimación del valor del mesurando.

En el presente estudio se consideró realizar la evaluación de la precisión en la última dilución detectada, para definir el rango analítico de la prueba. Así también, se consideró la evaluación de éste parámetro mediante la repetibilidad.

De acuerdo al Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, la evaluación de éste parámetro se realiza en un mínimo de 5 repeticiones. En éste trabajo la evaluación de la precisión se efectuó con 10 repeticiones intracorrida (Tablas No.1 y 2).

Tabla No.1 Valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos de la dilución 1.5×10^3 UFC/mL de la secuencia IS481.

Valores de Ct obtenidos de la dilución 1.5×10^3 UFC/mL de la secuencia IS481
32.6266
32.5728
32.6304
32.6151
32.7694
32.6873
33.0839
32.6137
32.3555
32.5351

Tabla No.2 Parámetros estadísticos calculados para evaluar la precisión del método para la secuencia IS481.

Media	Desviación estándar	Ji cuadrada de Pearson ($\chi^2_{9,95}=16,92$)	C.V. ($\leq 5\%$)
32.64895	0.186567	0.1190	0.5714

Tabla No.3 Valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos de la dilución 1.5×10^3 UFC/mL del gen ptxS1.

Valores de Ct obtenidos de la dilución 1.5×10^3 UFC/mL del gen ptxS1
39.66
40.2
40.67
40.52
38.77
38.89
30.09
39.44
39.37
38.92

Tabla No.4 Parámetros estadísticos calculados para evaluar la precisión del método para el gen ptxS1.

Media	Desviación estándar	Ji cuadrada de Pearson ($X^2_{9,95}=16,92$)	C.V. ($\leq 5\%$)
39.553	0.693366	1.106289	1.7530

Analizando los resultados encontrados (tablas No. 3, 4, 5, 6), la variación de los datos obtenidos con respecto a la media es muy pequeña (desviación estándar); además el coeficiente de variación calculado es menor al 5% (criterio de aceptación para métodos biológicos). El valor calculado en la Ji cuadrada de Pearson es menor que la Ji cuadrada de Pearson de tablas, así el método es preciso utilizando 9 grados de libertad con un 95% de confianza.

6.3 VERACIDAD

Es el grado de concordancia existente entre el valor promedio obtenido de una serie grande de número de resultados y un valor de referencia aceptado. Éste parámetro es de interés cuando es posible conocer el valor verdadero del sujeto a medición.

Tabla No. 5 Concentraciones obtenidas de las mediciones realizadas para el blanco IS481.

Concentración de la dilución (UFC/mL)	Concentración detectada por el equipo (UFC/mL)
1.5×10^5	1.28×10^5
1.5×10^5	1.29×10^5
1.5×10^5	1.46×10^5
1.5×10^5	1.48×10^5
1.5×10^5	2.66×10^5
1.5×10^5	1.21×10^5
1.5×10^5	1.54×10^5
1.5×10^5	1.40×10^5
1.5×10^5	1.24×10^5

Cálculos realizados para obtener el % de recuperación del blanco IS481.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{(\text{Promedio del valor obtenido})}{(\text{Valor de referencia})} \times 100$$

Sustituyendo la ecuación anterior:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{1,51 \times 10^5 \text{ UFC/mL}}{1.5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}} \times 100$$

$$\% \text{ de recuperación} = 100.1\%$$

Cálculo de t de Student

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

Sustituyendo la ecuación anterior:

$$t = \frac{(1,51 \times 10^5 \text{ UFC/mL}) - (1.5 \times 10^5 \text{ UFC/mL})}{(44763) / \sqrt{9}}$$

$$t = | 0.06202 |$$

t de tablas= 2.306; para $\alpha/2$ y con 8 grados de libertad

En la tabla No.5 se encuentran recopiladas las concentraciones detectadas por el equipo (Termociclador Tiempo real Fast 7500 Applied Biosystem) al procesar repetidas veces una dilución de concentración conocida (1.5×10^5), esto para la secuencia de inserción IS481.

Para evaluar la veracidad del método se calculó el porcentaje de recuperación, siendo éste dato de 100.1%, el cual esta dentro del criterio de aceptación. Además, se calculó la t-de student y se obtuvo que el valor de la t calculada fue menor que el valor de la t de tablas (considerando 8 grados de libertad y un 95% de confianza); con lo anterior es posible decir que el método es veraz para la secuencia de inserción IS481.

Tabla No. 6 Concentraciones obtenidas de las mediciones realizadas para el blanco ptxS1.

Concentración teórica de la dilución (UFC/mL)	Concentración detectada por el equipo (UFC/mL)
1.5×10^5	1.32×10^5
1.5×10^5	1.49×10^5
1.5×10^5	1.22×10^5
1.5×10^5	1.35×10^5
1.5×10^5	1.31×10^5
1.5×10^5	1.23×10^5
1.5×10^5	1.45×10^5
1.5×10^5	1.31×10^5
1.5×10^5	1.45×10^5
1.5×10^5	1.24×10^5
1.5×10^5	1.24×10^5

Cálculos realizados para obtener el % de recuperación del blanco ptxS1.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{(\text{Promedio del valor obtenido})}{(\text{Valor de referencia})} \times 100$$

Sustituyendo la ecuación anterior:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{1.33 \times 10^5 \text{ UFC/mL}}{1.5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}} \times 100$$

$$\% \text{ de recuperación} = 88.66\%$$

Cálculo de t de Student

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

Sustituyendo la ecuación anterior:

$$t = \frac{(1.33 \times 10^5 \text{ UFC/mL}) - (1.5 \times 10^5 \text{ UFC/mL})}{(417182) / \sqrt{11}}$$

$$t = | - 5.8 |$$

t de tablas= 2.2281; para $\alpha/2$ y con 10 grados de libertad

Dónde:

t= t de student calculada

\bar{x} = promedio de los resultados de n muestras independientes

μ_0 = valor de referencia

s= desviación estándar de los resultados de n muestras independientes

\sqrt{n} = raíz cuadrada de n muestras independientes

Obteniendo el factor de corrección

$$\bar{x} - \mu_0 = 1.7 \times 10^4$$

Obteniendo el valor ajustado de la medición

$$\hat{y} = y' + 1.7 \times 10^4$$

Dónde:

\hat{y} = valor ajustado

y' = valor obtenido de la medición

1.7×10^4 = factor de corrección

En la evaluación de la secuencia ptxS1, el porcentaje de recuperación y la t de student, no se encontraron dentro de los criterios de aceptación, lo que indica que el método no es veraz para la secuencia de inserción ptxS1. Sin embargo, en estos casos se recomienda realizar el cálculo de la diferencia del numerador de la estadística de prueba ($\mu_0 - \bar{x}$) donde se obtuvo que $\mu_0 - \bar{x} = 1.7 \times 10^4$, que implica la diferencia de veracidad. Por tanto el factor de corrección es la diferencia existente entre el valor real y el valor de referencia. Con lo anterior es posible obtener un valor ajustado de la medición realizada para la secuencia ptxS1.

6.4 LINEALIDAD

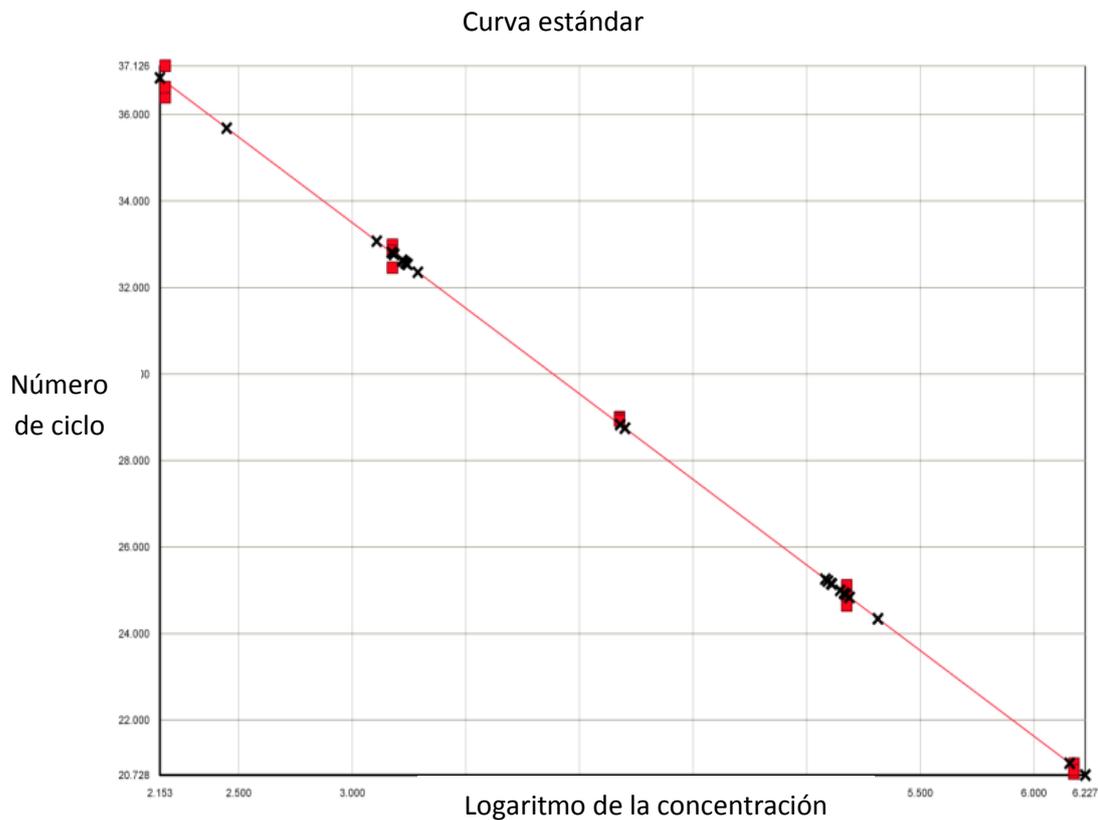
La linealidad es la capacidad de un método de ensayo para generar valores de la magnitud medida, proporcionales a los valores de concentración del analito. En el intervalo lineal se tienen las concentraciones del analito de interés dentro del cual los valores de la magnitud son proporcionales a la concentración del analito. Los valores de las pruebas reportadas son

comparados con los valores asignados o los valores de dilución. La linealidad es obtenida al trazar la línea recta que toque la mayor cantidad de puntos.

Para realizar la prueba de linealidad de un método se recomienda utilizar al menos 5 diluciones. Con base en lo anterior se utilizaron 5 diluciones (1.5×10^6 , 1.5×10^5 , 1.5×10^4 , 1.5×10^3 , 1.5×10^2 UFC/mL) para evaluar la linealidad, obteniéndose los gráficos No.3 y No.4. La obtención de éstos gráficos es mediante una función del mismo equipo (Termociclador Tiempo real Fast 7500 Applied Biosystem), que realiza una relación semilogarítmica, mediante el software SDSv1.4, graficando las repeticiones por cada dilución obteniendo el valor de correlación lineal y la pendiente.

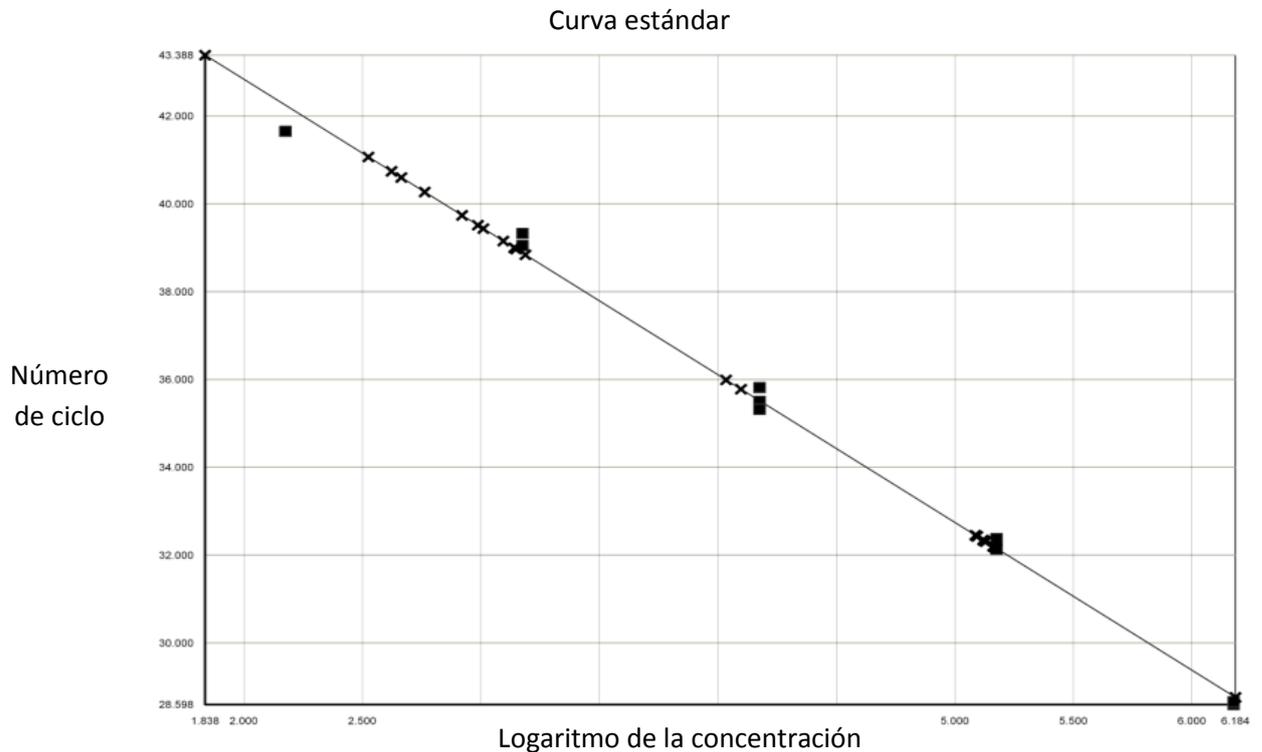
En ésta verificación se han considerado los puntos de decisión clínica.

Gráfica No. 3 Linealidad para la detección de la secuencia de inserción IS481 de *Bordetella pertussis*.



Secuencia de inserción IS481: $m = -3.9576$, $b = 45.3696$ y $r^2 = 0.998658$.

Gráfica No. 4 Linealidad para la detección del gen *ptxS1* de *Bordetella pertussis*.



Secuencia de inserción *ptxS1*: $m = -3.3657$, $b = 49.5729$ y $r^2 = 0.995983$.

Dónde:

m = pendiente

b = ordenada al origen

r^2 = coeficiente de determinación

Los gráficos resultantes fueron lineales, en ambos se calculó un coeficiente de determinación mayor a 0.99, que es el criterio de aceptación para la prueba de linealidad. Con éste último dato se infiere que existe una alta correlación entre las variables (valor de Ct, intensidad de fluorescencia) o las variables (x, y), respectivamente; es decir, que los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración del analito.

6.5 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

Para validar los métodos analíticos no cuantitativos, como es el caso de la qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real), es necesario comparar el resultado contra una característica de referencia exacta. En éste caso como ya se ha mencionado el cultivo se considera el estándar de oro para el diagnóstico de *Bordetella pertussis*. Se realizó una tabla de contingencia (tabla de 2x2) para obtener los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Para la construcción de la tabla No.8, se utilizaron los datos recopilados en la tabla No.7. Estas muestras corresponden a 162 exudados nasofaríngeos obtenidos de una población infantil (menores de 5 años) procedentes de los diferentes laboratorios estatales de la red de *B. pertussis*; pacientes en quienes la toma de muestra se realizó dentro de los primeros 10 días de inicio de los síntomas.

Tabla No.7 Resultados obtenidos al evaluar 162 muestras con diferentes técnicas diagnósticas (cultivo y qPCR).

Folio de la muestra	Resultado obtenido por cultivo	Resultado obtenido por qPCR
401	Negativo	Negativo
405	Negativo	Positivo
406	Negativo	Positivo
410	Negativo	Negativo
420	Negativo	Negativo
1576	Negativo	Negativo
1585	Negativo	Negativo
1587	Negativo	Negativo
1590	Negativo	Negativo
1595	Negativo	Negativo
1599	Negativo	Negativo
2596	Negativo	Negativo
2598	Negativo	Negativo
2602	Negativo	Negativo
2604	Negativo	Positivo
2614	Negativo	Positivo
2615	Negativo	Positivo
2626	Negativo	Negativo
2643	Negativo	Negativo
2655	Negativo	Negativo
2671	Negativo	Negativo
2676	Negativo	Negativo
2679	Negativo	Negativo
2680	Negativo	Positivo
2688	Negativo	Negativo
2694	Negativo	Negativo
2718	Positivo	Positivo
2784	Positivo	Positivo
2818	Positivo	Positivo
3408	Positivo	Positivo
3886	Positivo	Positivo
4468	Positivo	Positivo
4484	Negativo	Negativo
4485	Negativo	Negativo
4486	Negativo	Negativo
4488	Negativo	Negativo
4489	Negativo	Negativo
4494	Negativo	Positivo
4530	Negativo	Positivo

4531	Negativo	Negativo
4532	Negativo	Negativo
4533	Negativo	Negativo
4534	Negativo	Negativo
4535	Negativo	Negativo
4536	Negativo	Negativo
4544	Negativo	Negativo
4545	Negativo	Negativo
4546	Negativo	Negativo
4547	Negativo	Negativo
4548	Negativo	Positivo
4549	Negativo	Positivo
4550	Negativo	Positivo
4551	Negativo	Negativo
4582	Negativo	Positivo
4583	Negativo	Negativo
4584	Negativo	Negativo
4585	Negativo	Positivo
4586	Negativo	Negativo
4587	Negativo	Negativo
4624	Negativo	Positivo
4625	Negativo	Negativo
4626	Negativo	Negativo
4627	Negativo	Negativo
4628	Negativo	Negativo
4629	Negativo	Negativo
4630	Negativo	Negativo
4631	Positivo	Positivo
4674	Negativo	Negativo
4675	Negativo	Negativo
4676	Negativo	Positivo
4677	Negativo	Negativo
4678	Negativo	Negativo
4679	Negativo	Negativo
4680	Negativo	Negativo
4681	Negativo	Negativo
4682	Negativo	Negativo
4683	Negativo	Positivo
4684	Negativo	Negativo
4685	Negativo	Negativo
4695	Negativo	Positivo
4697	Negativo	Negativo
4698	Negativo	Negativo
4699	Negativo	Negativo
4700	Negativo	Negativo
4701	Negativo	Negativo
4719	Negativo	Negativo
4720	Negativo	Negativo
4721	Negativo	Negativo
4731	Negativo	Negativo

4732	Negativo	Negativo
4733	Negativo	Negativo
4734	Negativo	Negativo
4735	Negativo	Negativo
4736	Negativo	Positivo
4737	Negativo	Negativo
4738	Negativo	Negativo
4739	Negativo	Negativo
4740	Negativo	Negativo
4741	Negativo	Negativo
4742	Negativo	Negativo
4743	Negativo	Negativo
4744	Negativo	Negativo
4745	Negativo	Negativo
4746	Negativo	Negativo
4747	Negativo	Negativo
4748	Negativo	Negativo
4749	Negativo	Negativo
4750	Negativo	Negativo
4751	Negativo	Negativo
4757	Negativo	Positivo
4758	Negativo	Positivo
4759	Negativo	Positivo
4760	Negativo	Positivo
4761	Negativo	Negativo
4762	Negativo	Negativo
4763	Negativo	Negativo
4764	Positivo	Positivo
4765	Negativo	Negativo
4766	Negativo	Negativo
4767	Negativo	Negativo
4768	Negativo	Negativo
4769	Negativo	Negativo
4770	Negativo	Negativo
4771	Negativo	Negativo
4772	Negativo	Positivo
4773	Negativo	Negativo
4774	Negativo	Negativo
4775	Negativo	Negativo
4776	Negativo	Positivo
4777	Negativo	Negativo
4778	Negativo	Positivo
4780	Negativo	Negativo
4781	Negativo	Negativo
4782	Negativo	Negativo
4783	Negativo	Negativo
4784	Negativo	Negativo
4785	Negativo	Negativo
4786	Negativo	Negativo
4787	Negativo	Negativo

4788	Negativo	Negativo
4789	Negativo	Negativo
4790	Negativo	Positivo
4792	Positivo	Positivo
4793	Negativo	Negativo
4799	Negativo	Negativo
4800	Negativo	Negativo
4801	Negativo	Negativo
4802	Negativo	Negativo
4803	Negativo	Positivo
4805	Negativo	Negativo
4807	Negativo	Positivo
4808	Negativo	Positivo
4809	Negativo	Positivo
4810	Negativo	Positivo
4811	Negativo	Negativo
4812	Positivo	Positivo
4813	Negativo	Positivo
4815	Negativo	Negativo
4816	Negativo	Negativo
4817	Negativo	Negativo
4818	Negativo	Negativo
4819	Negativo	Negativo

Tabla No.8 Tabla de contingencia para el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Resultado de la prueba	Valor de la característica		
	Presente	Ausente	
Positivo	10	32	42
Negativo	0	120	120
	10	152	162

A partir de la construcción de la tabla de contingencia (tabla No.8) fue posible calcular la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo del método diagnóstico que se evalúa.

CÁLCULO DE SENSIBILIDAD

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A + C} \times 100$$

Sustituyendo la ecuación anterior:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{10}{10} \times 100 = 100\%$$

Se calculó una sensibilidad del 100%; esto indica que existe un 100% de probabilidad de que la prueba resulte positiva en los pacientes que padecen la enfermedad.

CÁLCULO DE ESPECIFICIDAD

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{B + D} \times 100$$

Sustituyendo la ecuación anterior:

$$\text{Especificidad} = \frac{120}{152} \times 100 = 78.9\%$$

El resultado de la especificidad indica que la prueba es negativa en el 78.9% de los pacientes que no padecen la enfermedad, sin embargo, se identificarían como enfermos a 21.1% de los pacientes cuando éstos realmente serían pacientes sanos. Es necesario aclarar que el cálculo de especificidad involucra el número de falsos positivos, es decir, aquellas muestras que resultaron positivas al utilizar la técnica de qPCR pero que por cultivo resultaron negativas. Como ya se ha mencionado anteriormente la qPCR es una técnica mucho más sensible que el cultivo (estándar de referencia contra el cuál se compara la técnica) y por lo tanto es capaz de detectar algunas muestras como positivas cuando por cultivo las mismas muestras resultan negativas.

CÁLCULO DE VALOR PREDICTIVO POSITIVO

$$\text{VPP} = \frac{A}{A + B} \times 100$$

Sustituyendo la ecuación anterior:

$$\text{VPP} = \frac{10}{42} \times 100 = 23.8\%$$

Los resultados indican que si la prueba resulta positiva, la probabilidad de que el paciente padezca realmente la enfermedad es de 23.8%. El cálculo de valor predictivo positivo al igual que el cálculo de especificidad involucra el número de falsos negativos, con lo que se explica el por qué el valor predictivo positivo resulta tan bajo.

CÁLCULO DE VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

$$\text{VPN} = \frac{D}{C + D} \times 100$$

Sustituyendo la ecuación anterior:

$$\text{VPN} = \frac{120}{120} \times 100 = 100\%$$

Éste dato indica que si la prueba resulta negativa, la probabilidad de que el paciente no padezca la enfermedad es de 100%.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

7.1.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

Para la secuencia de inserción IS481, se establece como límite de detección la dilución 1.5×10^2 UFC/mL que equivale a 56 copias/ μ L.

Para la secuencia ptxS1 se establece como límite de detección la dilución 1.5×10^3 UFC/mL que equivale a 1680 copias/ μ L.

7.1.2 PRECISIÓN

El criterio de aceptación para el coeficiente de variación es $\leq 5\%$ para métodos biológicos; y para la X^2 el valor calculado debe ser menor a la X^2 de tablas (que para 9 grados de libertad y el 95% de confianza el valor de tablas es de 16.92).

Secuencia de inserción IS481: C.V. = 0.5714 y $X^2 = 0.1190$ por tanto el método es preciso.

Secuencia de inserción ptxS1: C.V. = 1.7530 y $X^2 = 1.1063$ por tanto el método es preciso.

7.1.3 VERACIDAD

El criterio de aceptación para el % de recuperación es de 95-105%; y para la t de student el valor calculado debe ser menor a la t de tablas. Para la secuencia IS481 el valor de t de tablas = 2.306; para $\alpha/2$ y con 8 grados de libertad; y para la secuencia ptxS1 el valor de t de tablas = 2.2281; para $\alpha/2$ y con 10 grados de libertad.

Secuencia de inserción IS481: % de recuperación = 100.1 y t de student = 0.06202 por tanto el método es veraz.

Secuencia de inserción ptxS1: % de recuperación = 1.7530 y t de student = 5.8 por tanto el método no es veraz. Se calculó un factor de corrección.

7.1.4 LINEALIDAD

El criterio de aceptación es que $r^2 \geq 0.98$.

Secuencia de inserción IS481: $r^2 = 0.998658$; por tanto el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones 1.5×10^6 - 1.5×10^2 UFC/mL.

Secuencia de inserción ptxS1: $r^2 = 0.995983$; por tanto el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones 1.5×10^6 - 1.5×10^2 UFC/mL.

7.1.5 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Para decidir si un método analítico tiene una buena sensibilidad ésta debe ser ≥ 0.95 ; así el método que se evalúa es sensible.

Para que la especificidad de un método sea estadísticamente válida, este parámetro debe tener un valor ≥ 0.95 ; lo cual no se cumple en éste caso. Lo anterior es debido a que la fórmula de especificidad involucra el número de falsos positivos y como ya se ha aclarado anteriormente, la PCR es más sensible que el cultivo (estándar de oro contra el cual se compara la PCR) lo que aumenta el número de falsos positivos en la tabla de contingencia. Con lo anterior es posible señalar que el método evaluado es específico y supera al estándar de oro, sin embargo, no se refleja.

7.1.6 VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

Al estimar el valor predictivo positivo, se obtuvo un valor menor que 0.95; el criterio de aceptación indica que el valor de éste parámetro debe ser ≥ 0.95 . El haber obtenido una cifra tan baja, es debido a que el cálculo del valor predictivo positivo involucra nuevamente el dato de falsos positivos (explicación dada anteriormente).

Al calcular el valor predictivo negativo, se obtuvo un valor superior al criterio de aceptación (mayor que 0.95); de tal forma que el método que se evalúa tiene un valor predictivo negativo deseable.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

Los parámetros utilizados para evaluar el método de diagnóstico molecular de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) fueron: límite de detección, precisión, veracidad, linealidad, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo; los cuales cumplen con los criterios de aceptación requeridos (a excepción de especificidad y valor predictivo positivo). Por lo anterior se puede concluir que al evaluar la técnica propuesta por los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) para el diagnóstico molecular de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* por qPCR, ésta cumple con los parámetros de calidad establecidos para pruebas diagnósticas.

Así también se concluye que las pruebas estadísticas realizadas para la evaluación de los parámetros antes mencionados, satisfacen los requisitos para la aplicación analítica deseada.

CAPÍTULO IX

SUGERENCIAS

Se sugiere la evaluación de ésta técnica en los laboratorios que realicen el diagnóstico molecular de *B. pertussis* y *B. parapertussis* por qPCR, con la finalidad de conocer los alcances y limitaciones de la prueba para emitir en todo momento un diagnóstico certero. Se hace hincapié para que los laboratorios estatales que pertenecen a la red de *B. pertussis* realicen la evaluación de ésta técnica, debido al número de muestras que manejan.

Además se sugiere realizar la prueba estadística de estándar de referencia compuesto que incluya la prueba de serología, con la finalidad de comprobar que el diagnóstico molecular de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) es específico y tiene un valor predictivo positivo que cumple con los criterios de aceptación requeridos.

La metodología descrita en el presente trabajo puede emplearse en cualquier laboratorio analítico, que utilice y requiera validar la técnica de qPCR; ya sea con fines diagnósticos o en la ciencia aplicada. Una gran ventaja de la metodología descrita, es la utilización de la escala de Mc Farland para estimar poblaciones bacterianas, por que es considerada una técnica confiable y de bajo costo; con la cual es posible reemplazar el uso de un material de referencia certificado en casos en los cuales no existe dicho material disponible en el mercado, así como en los casos en los que se dispone de recursos económicos limitados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tatti KM, Wu KH, Tondella ML, Cassiday PK, Cortese MM, Wilkins PP, et al. Development and evaluation of dual-target real time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008; 61: 264-272.
2. World Health Organization. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/ *Bordetella parapertussis*. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals World Health Organization 2004.
3. Romero CR. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. D.F.: Médica Panamericana; 2007.
4. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (México). Boletín epidemiológico 2011, México (D.F.): El Instituto 2011; Diciembre. Consultado enero 12, 2012; 1(1): (2 páginas en pantalla). Disponible en: URL: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010imagen/plantilla/indice-2011.htm>
5. Realpe ME, Herrera D, Agudelo CI, de la Hoz F. Diagnóstico diferencial por el laboratorio del síndrome coqueluchoide. *Revista colombiana de pediatría* 2001; 36 (4): 67-83.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Capacitación en Tos Ferina para Laboratoristas. Atlanta (U.S.A): El Instituto; 2011.
7. Sanz M J, De Ory MF, González AJ, de la Torre JM, Salmeron F, Limia A et al. Diagnóstico de laboratorio de tos ferina. Papel de la serología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2002; 20 (05): 212-8.
8. Donoso A, Díaz F. Coqueluche grave: Puesta al día. *Revista Neumología pediátrica* 2008. Consultado agosto 05, 2011; 1(1): (156 páginas en pantalla). Disponible en: URL: <http://www.neumologia-pediatria.cl/pdf/200831/200831.pdf>
9. Moreno PD, Baquero AF, Gonzalo DL, Cilleruelo OMJ. Tos ferina. *Asociación española de pediatría* 2008: 89-96. Consultado agosto 15, 2011; 1(1): (23 páginas en pantalla). Disponible en: URL: www.aeped.es/protocolos/pdf
10. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC et al. Koneman Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.

11. Quian J, Cerisola A, Russomano F, Fernández A, Cappeta M, Uriarte R, et al. Infecciones por *Bordetella pertussis* en niños menores de un año hospitalizados y sus contactos del hogar. Arch Pediatr Urug 2006; 77(3): 229-236.
12. Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, Tondella ML. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Bordetella* Species in Clinical Specimens. Journal of Clinical Microbiology 2011, Diciembre; 49 (12): 4059-4066.
13. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 2004; 22 (5): 299-305.
14. Templeton KE, Scheltinga SA, Van der Zee A, Diederer B, Kruijssen AM, Goossens H, et al. Evaluation of Real-Time PCR for Detection of and Discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for Clinical Diagnosis. Journal of Clinical Microbiology 2003, Septiembre; 41 (9): 4121-4126.
15. Preston A. *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. Canadian Medical Association 2005, Julio; 173 (1): 55-62.
16. Molina US, Pérez CC. Tos ferina: *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*. Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica 2008; 14 (1): 14-17.
17. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. Vaccine 2009; 6034-6041.
18. Gentile A. Infección por *Bordetella pertussis*. Archivos Argentinos de Pediatría 2010; 108 (1): 78-81.
19. Sanz JC, Fernández M, Sagües MJ, Ramírez R, Castañeda R, Barranco D, et al. Comparación de tres técnicas ELISA para evaluar la seroprevalencia de IgG frente a *Bordetella pertussis* en niños vacunados con tres dosis de DTPe. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 2002; 20(1):10-15
20. Sloan LM, Hopkins MK, Mitchell PS, Vetter EA, Rosenblatt JE, Harmsen WS. Multiplex LightCycler PCR Assay for Detection and Differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in Nasopharyngeal Specimens. Journal of Clinical Microbiology 2002, Enero; 40 (1): 96-100.
21. Romero QG, Tomé SP, Torres ALP, Guiscafré GH, Leaños MB. Identificación de un caso de tos ferina y estudio de sus contactos. Utilidad de la PCR y del cultivo. Revista Medica Instituto Mexicano del Seguro Social 2007; 45 (6): 623-627.
22. Solari AJ. Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en Medicina. 3ra ed. Buenos Aires (Argentina): Editorial Medica Panamericana; 2004.
23. Secretaria de Salud (Mexico). Eventos Temporalmente Asociados a la Vacunación. Manual de Procedimientos Técnicos. México (D.F.): El Instituto; 2002.

24. Castillo RMG, Hernández CV, Rosales GT. Introducción a la salud pública. 1ra ed. D.F. (México): Instituto Politécnico Nacional; 2008.
25. Santos JI. El Programa Nacional de Vacunación: orgullo de México (resumen). Revista de la Facultad de Medicina UNAM 2002; 45 (3): 142-153.
26. Secretaría de Salud (México). Cartilla Nacional de Salud de Niñas y Niños (de 0 a 9 años), México (D.F.): El Instituto 2010; Consultado diciembre 03, 2011; 1(1): (1 páginas en pantalla). Disponible en: URL: <http://promocion.salud.gob.mx/dgps/interior1/programas/cartillas.html#>
27. Guízar VJJ. Genética clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. 3ra ed. D.F. (México): El Manual Moderno; 2001.
28. Méndez AS, Pérez RE. La PCR múltiple en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 2004; 22 (3): 183-92.
29. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids 2002; 30: 1292-305.
30. Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ. Real-Time PCR Assay Targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and Molecular Basis for Detecting *Bordetella holmesii*. Journal of Clinical Microbiology 2001, Mayo; 39 (5): 1963-1966.
31. García MJ, Chaves F, Salto E, Otero JR. PCR en tiempo real, inmunofluorescencia y cultivo para la detección de *Bordetella pertussis*: evaluación prospectiva y epidemiología molecular. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 2006; 24(8):500-5004.
32. Wadowsky RM, Laus S, Libert T, States SJ, Ehrlich AD. Inhibition of PCR-Based Assay for *Bordetella pertussis* by Using Calcium Alginate Fiber and Aluminum Shaft Components of a Nasopharyngeal Swab. Journal of Clinical Microbiology 1994, Abril; 32 (4): 1054-1057.
33. Sloan LM, Hopkins MK, Mitchell PS, Vetter EA, Rosenblatt JE, Harmsen WS. Multiplex LightCycler PCR Assay for Detection and Differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in Nasopharyngeal Specimens. Journal of Clinical Microbiology 2002, Enero; 40 (1): 96-100.
34. Entidad Mexicana de Acreditación. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. D.F. (México): El Instituto; 2008.
35. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Norma Internacional. ISO IEC 17025 (mayo 15, 2005). Consultado febrero 05, 2012; 1(1): (38 páginas en pantalla). Disponible en: URL: http://webstore.iec.ch/preview/info_isoiec17025%7Bed2.0%7Den.pdf

36. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C. Validación de Métodos Analíticos. D.F. (México): El Instituto; 2011.
37. Sánchez RJF, Tejeda RME, Koch W, Mora GJLA, Marroquín SR, Hernández AV, et al. Validación de métodos analíticos no cuantitativos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 2010, Junio; 41 (2): 15-24.
38. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Ginebra (Suiza): El Instituto; 2005.
39. Sánchez RJF, Mora GJLA, Hernández AVJ. Validación de Métodos analíticos. 1ra ed. D.F. (México): FES Zaragoza UNAM; 2006.
40. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Guía de Validación de Métodos analíticos. D.F. (México): El Instituto; 2002.
41. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Laboratorio de Diagnóstico y Tipificación Molecular. Diagnóstico Molecular de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* por PCR en tiempo real (qPCR). D.F. (México): El Instituto; 2011.
42. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Norma Oficial Mexicana. NOM-092-SSA1-1994 (diciembre, 1995). Consultado mayo 18, 2012; 1(1): (1 página en pantalla). Disponible en: URL: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
43. Centers for Disease Control and Prevention. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Atlanta (U.S.A): El Instituto; 2007.
44. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Laboratorio de Diagnóstico y Tipificación Molecular, Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas. Capacitación: Diagnóstico Molecular de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* Multiplex. D.F. (México): El Instituto; 2011.

ANEXOS

ANEXO No.1 Iniciadores y sondas utilizados para la PCR múltiple en tiempo real ^{1,12}

Secuencia	Iniciador o sonda	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón
<i>IS481</i>	852U18 894L24 871U22P ^a	CAAGGCCGAACGCTTCAT GAGTTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA CAGTCGGCCTTGCGTGAGTGGG	66
<i>hIS1001</i>	BHIS41U20 BHIS91L17 BHIS62U28P ^b	GGCGACAGCGAGACAGAATC GCCGCCTTGGCTCACTT CGTGCAGATAGGCTTTTAGCTTGAGCGC	67
<i>pIS1001</i>	135U17 199L20 157U21P ^c	TCGAACGCGTGGAATGG GGCCGTTGGCTTCAAATAGA AGACCCAGGGCGCACGCTGTC	65
<i>ptxS1</i>	402U16 442L15 419U22P ^d	CGCCAGCTCGTACTTC GATACGGCCGGCATT AATACGTCGACACTTATGGCGA	55
<i>rnaseP</i>	rnasePforward rnasePreverse rnasePprobe ^a	CCAAGTGTGAGGGCTGAAAAG TGTTGTGGCTGATGAACTATAAAAAGG CCCCAGTCTCTGTCAGCACTCCCTTC	80

- 5' terminal de la sonda esta etiquetado con 6-carboxyfluoresceína (FAM) y el 3' terminal esta etiquetado con Black Hole Quencher 1 (BHQ1)
- 5' terminal de la sonda esta etiquetado con Quasar 670 y el 3' terminal esta etiquetado con Black Hole Quencher 3 (BHQ3)
- 5' terminal de la sonda esta etiquetado con HEX y el 3' terminal esta etiquetado con Black Hole Quencher 1 (BHQ1)
- 5' terminal de la sonda esta etiquetado con 6-carboxyfluoresceína (FAM) y el 3' terminal esta etiquetado con Black Hole Quencher 1 (BHQ1)

ANEXO No.2 Plantilla de trabajo de PCR tiempo real múltiple para preparar la mezcla de reacción utilizando el reactivo TaqMan Gene expression Master Mix, Applied Biosystems ^{41, 42}

IS481/pIS1001/hIS1001

Reactivo	Volumen por reacción	Número de muestras	Volumen total
TaqMan®Gene expression master mix	12.5 µL	_____	= _____
Agua	1.0 µL	_____	= _____
IS481Forward Primer	0.84 µL	_____	= _____
IS481Reverse Primer	0.84 µL	_____	= _____
IS481Sonda	0.84 µL	_____	= _____
pIS1001Forward Primer	0.84 µL	_____	= _____
pIS1001Reverse Primer	0.84 µL	_____	= _____
pIS1001Sonda	0.84 µL	_____	= _____
hIS1001Forward Primer	0.84 µL	_____	= _____
hIS1001Reverse Primer	0.84 µL	_____	= _____
hIS1001Sonda	0.84 µL	_____	= _____
Volumen Total	21µL		

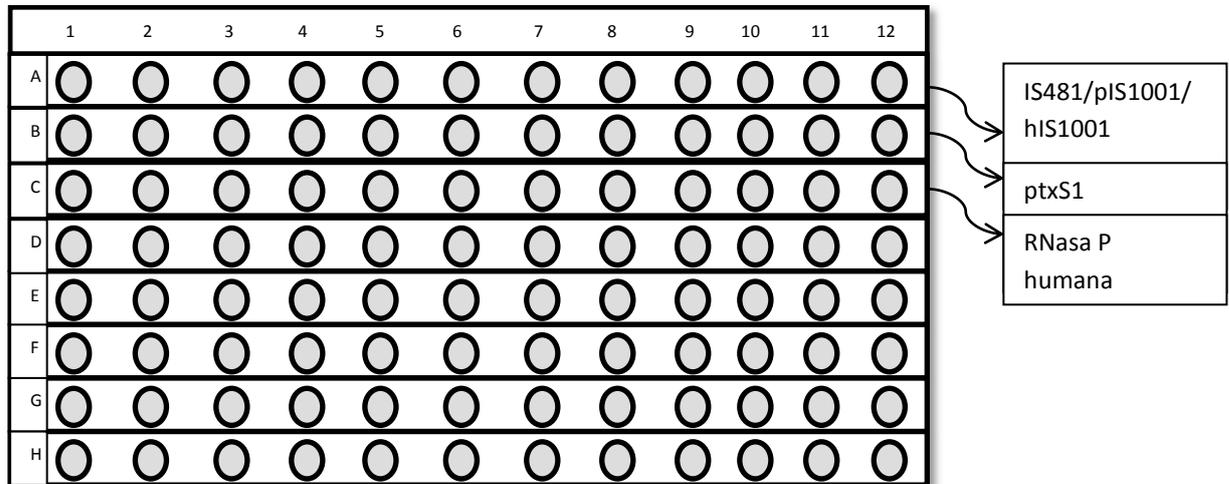
ptxS1

Reactivo	Volumen por reacción	Número de muestras	Volumen total
TaqMan®Gene expression master mix	12.5 µL	_____	= _____
Agua	1.0 µL	_____	= _____
Forward Primer (µl)	2.5 µL	_____	= _____
Reverse Primer (µl)	2.5 µL	_____	= _____
Sonda (µl)	2.5 µL	_____	= _____
Volumen Total	21µL		

RNaseP

Reactivo	Volumen por reacción	Número de muestras	Volumen total
TaqMan®Gene expression master mix	12.5	_____	= _____
Agua	7.0	_____	= _____
RNase P Forward Primer	0.5	_____	= _____
RNase P Reverse Primer	0.5	_____	= _____
RNase P Sonda	0.5	_____	= _____
Volumen Total	21µL		

ANEXO No. 3 Esquema que representa una microplaca en la cual se dispensa la mezcla de reacción para PCR ^{41, 42}



En las filas A y E se coloca la mezcla de reacción para la prueba IS481/pIS1001/hIS1001. En las filas B y F se coloca la mezcla de reacción para el ensayo ptxS1. En las filas C y G se coloca la mezcla de reacción para la prueba de la RNasa P humana. Las filas D y H quedan vacías. Cada pozo se dispensa con 21µL de la mezcla de reacción correspondiente.

Los pozos A1, B1 y C1 corresponden a una sola prueba; normalmente corresponden al control negativo. Así como los pozos E12, F12 y G12 corresponden normalmente al control negativo, esto depende del número de muestras que se procesen.

**ANEXO No. 4 Esquema que representa la plantilla de Trabajo de PCR tiempo real multiplex
(TaqMan Gene expression) ^{41, 42}**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>B. pertussis</i> (IS481)	NTC											
<i>B. holmesii</i> (hIS1001)	NTC											
<i>B. parapertussis</i> (pIS1001)	NTC											
<i>ptX1</i>	NTC											
<i>RP</i>	NTC											
												PTC
<i>B. pertussis</i> (IS481)												<i>B. pertussis</i> (IS481)
<i>B. holmesii</i> (hIS1001)												<i>B. holmesii</i> (hIS1001)
<i>B. parapertussis</i> (pIS1001)												<i>B. parapertussis</i> (pIS1001)
<i>ptX1</i>												<i>ptX1</i>
<i>RP</i>												<i>RP</i>

EQUIPO: _____

FECHA: _____ ELABORO MEZCLA DE REACCIÓN: _____

OBSERVACIONES: _____

ANEXO No.5 Preparación del control positivo^{6, 42}

Preparación de ADN de *B. pertussis* (A639) para el ensayo ptxS1

El control sin diluir de *B. pertussis* tiene una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL. Se toman 4,5µl de ADN de *B. pertussis* y se diluyen en 95,5µl de agua grado biología molecular.

Preparación del control ACF; que corresponde a el ADN de *B. pertussis* (A639), el ADN de *B.holmesii* (C690) y el ADN de *B. parapertussis* (F585) para los ensayos IS481, hIS1001, y pIS1001.

El control sin diluir de cada cepa, corresponde a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL. Se toman 4,5µl de ADN A639, 4,5µl de ADN C690, y 5,5µl de ADN F585; y se diluye en 85,5µl de agua grado biología molecular.

Preparación de ADN para el ensayo de la RNasa P humana

Se prepara a partir de 10 muestras negativas, que presenten un Ct <25. De cada muestra se toman 10µL, obteniéndose un volumen total de 100µL; este volumen total se diluye en 900µL de agua grado biología molecular.

ANEXO No.6 Programación del termociclador ^{1, 12}

Primera etapa: Desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos.

Segunda etapa: Desnaturalización a 95°C por 15 segundos.

Tercera etapa: Alineación y extensión a 60°C por 60 segundos.

Estas tres etapas conforman un ciclo; y el proceso tarda 45 ciclos.