

Aspectos genómicos de *Bordetella pertussis* y el camino hacia el nuevo estándar de oro en el diagnóstico de tos ferina

Alejandra Aquino Andrade*

Gabriel Martínez Leyva*

Agustín de Colsa Ranero*, **

* Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Patógenos y Virología
en Investigación.** Médico adscrito al Departamento de Infectología Pediátrica.
Instituto Nacional de Pediatría, México, DF.**Correspondencia:**

Dr. Agustín de Colsa Ranero

Av. Insurgentes Sur 3700-C, colonia Insurgentes Cuicuilco, México 04530 DF.

Correo electrónico: adcdoc@yahoo.com

En plena era postvacunal, la tos ferina sigue siendo un problema endémico mundial, no sólo en países en vías de industrialización, sino también en los industrializados. En la última década ha resurgido como un problema de salud pública. En el mundo se registran cada año de 20 a 50 millones de casos que cobran la vida de 200,000-400,000 niños. El 90% de esas muertes son de pacientes que viven en países en vías de desarrollo, sobre todo lactantes menores de seis meses de edad.^{1,2}

El agente causal de la tos ferina es *Bordetella pertussis*, un cocobacilo gramnegativo aerobio, pleomórfico y no móvil. También existen otras ocho especies: *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii*, y *B. ansorpii*.³

B. pertussis afecta exclusivamente al humano, que también sirve como reservorio. *B. parapertussis* afecta al humano y ocasionalmente a las ovejas por lo que se han descrito 2 linajes distintos: *B. parapertussis_{HU}* y *B. parapertussis_{OV}*. *B. bronchiseptica* y *B. hinzii* son patógenos predominantemente de animales, e infrecuentemente pueden causar enfermedad en el humano. *B. holmesii* y *B. trematum* rara vez causan infecciones respiratorias e incluso no-respiratorias en el humano, mientras que *B. avium* es un patógeno exclusivo de las aves, *B. ansorpii* es la especie más recientemente descrita, reportándose tan sólo en dos casos en la literatura.³ (**Cuadro 1**)

Con base en análisis comparativo de secuencias del gen

16S rRNA se demostró que *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. holmesii* están estrechamente relacionadas. Desde el punto de vista taxonómico, *B. pertussis* y *B. parapertussis* parecen derivar, recientemente, de *B. bronchiseptica*. Por otra parte, el análisis por tipificación de secuencias multilocus (MLST) de las especies clásicas de *Bordetella*, ha distinguido cuatro linajes o complejos. Los complejos I y IV se forman por *B. bronchiseptica*, mientras que los complejos II y III están constituidos por *B. pertussis* y *B. parapertussis_{HU}*, respectivamente. *B. parapertussis_{OV}* está agrupada en el complejo I. Este análisis filogenético también revela que *B. pertussis* y *B. parapertussis_{HU}* evolucionaron de *B. bronchiseptica* complejos IV y I, respectivamente, indicando que la adaptación en humanos ocurrió como dos eventos independientes. La mayor parte de las cepas de *B. bronchiseptica* del complejo IV se aislarón de humanos con sospecha de tos ferina. Este soporta la hipótesis que *B. pertussis* evolucionó de una *B. bronchiseptica* adaptada a humanos.⁴ Los aislados de *B. parapertussis* adaptados al humano son más cercanos a *B. bronchiseptica* que los de *B. pertussis*, lo que indica que *B. bronchiseptica* surgió antes que *B. pertussis*, lo que a su vez sugiere que su adaptación al humano como huésped es más reciente (**Figura 1**).⁴⁻⁷

BASES GENÓMICAS DE *Bordetella* spp.

El primer y único proyecto genómico terminado hasta

la fecha de *B. pertussis* (cepa Tohama I),⁶ reveló que su genoma cuenta con 4,086,186 pb, que contiene 3,816 genes. El genoma de las tres especies más importantes de *Bordetella spp.*, por su relación con humanos, difiere considerablemente de tamaño, lo que correlaciona con el número de genes codificantes. *B. bronchiseptica* codifica 1,191 genes más que *B. pertussis*, por lo que se espera que tenga un mayor número de funciones; sin embargo, su genoma resulta más complejo porque *B. bronchiseptica* tiene sólo 18 pseudogenes, mientras que *B. pertussis* tiene 358 (**Cuadro 2**). Muchos de estos pseudogenes se formaron a partir de eventos mediados por elementos de secuencias de inserción (IS).^{4,6} Las IS son elementos genéticos móviles simples que desempeñan un papel muy importante en la plasticidad de los genomas procariontes. Son secuencias de DNA de aproximadamente 2.5 kb que codifican sólo la información genética involucrada en su translocación y transposición dentro y entre los genomas. Son capaces de promover varios tipos de re-arreglos genómicos

como: eliminaciones, inversiones y fusión de replicones.^{7,8} Las secuencias de inserción tienen un papel muy importante en la reducción del genoma de *B. pertussis*.⁹

Se han reportado patrones de adquisición de elementos de secuencias de inserción como IS1001 que se encuentra en miembros de diferentes grupos de especies, incluida *B. bronchiseptica* y los aislados humanos y ovinos de *B. parapertussis*, mientras que IS1002 se encuentra exclusivamente, en aislados humanos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* (**Cuadro 2**).

Es interesante observar que el genoma de *B. pertussis* contiene 261 copias de tres elementos de secuencias de inserción, 238 son copias de IS481, este IS también se ha localizado entre 10-20 copias en *B. holmesii*.^{3,7,9} La evolución de *B. pertussis* a partir de *B. bronchiseptica* (o su antecesor) fue determinada por la adquisición y rápida multiplicación de elementos IS. *B. parapertussis* también tuvo una evolución similar porque contiene 588 genes más que *B. pertussis* pero 603 menos que

Cuadro 1. Especies pertenecientes al género *Bordetella spp.*

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

Referencias 3,7

Cuadro 2. Características generales de los genomas de las especies más importantes de *Bordetella* spp.

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Tamaño del genoma (pb)	4,086,186	4,773,551	5,338,400
Número de genes	3,816	4,404	5,007
Pseudogenes	358 (9.4%)	220 (5%)	18 (0.4%)
Elementos IS			
IS481	238	0	1
IS1001	0	22	0
IS1002	6	90	0
IS1663	17	0	0

Referencias 6,7,9,10

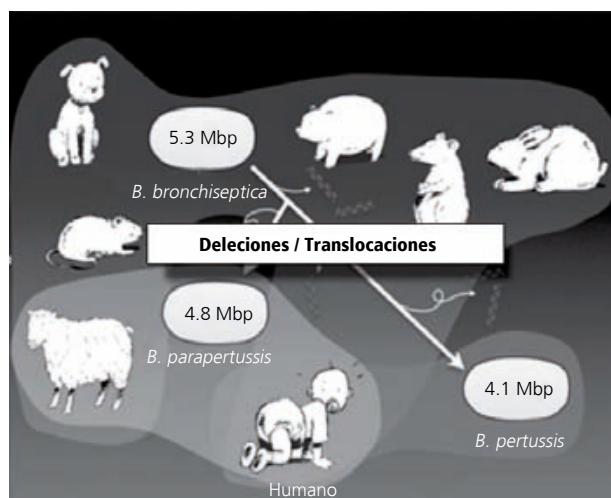
*pb: pares de bases

B. bronchiseptica, así como 112 copias de dos elementos IS, 90 de los cuales son IS1002.³ La divergencia de *B. pertussis* con *B. bronchiseptica* se acompaña de una gran cantidad de re-arreglos cromosomales y pérdida de genes mediados por IS.⁴ La reducción del genoma en *B. pertussis* podría reflejar una restricción del huésped y la pérdida de la necesidad de sobrevivir en el ambiente. Los estudios de hibridización comparativa del genoma (CGH) han revelado un alto grado de variación del contenido genético de *B. pertussis*, debido a la recombinación entre IS, lo que podría tener un papel en su adaptación.⁵

DIAGNÓSTICO DE TOS FERINA

El diagnóstico de la tos ferina debe considerar los aspectos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio. Los clínicos se basan en las características del síndrome coqueluchoides, caracterizado por tos prolongada en accesos, que es emetizante, cianozante y disneizante. El epidemiológico, que toma en consideración el estudio de la asociación de las variables epidemiológicas de tiempo, lugar y contactos, así como las coberturas de vacunación específicas por grupo de edad. Y finalmente, los datos de laboratorio que, por una parte, pueden apoyar el diagnóstico clínico al encontrar leucocitosis (incluso reacción leucemoide) y linfocitosis; y principalmente la confirmación de la tos ferina a través del diagnóstico etiológico basado en diferentes metodologías.¹¹

A continuación se describen las metodologías diagnósticas emergentes y tradicionales para la documentación de infección por *B. pertussis* (**Cuadro 3**)

Figura 1. Huéspedes de *Bordetella* spp

1. Reacción de polimerasa en cadena (PCR)

Recientemente se desarrollaron diferentes pruebas moleculares para la detección de *B. pertussis*. La reacción de polimerasa en cadena (PCR) es la más utilizada, y ha sido desarrollada para diferentes formatos y plataformas. A últimas fechas, las aplicaciones diagnósticas de PCR mejoraron gracias a la implementación de la detección de fluorescencia en tiempo real (RT-PCR) de los productos amplificados. Estas técnicas reducen el tiempo de generación de resultados y de contaminación. Los ensayos en tiempo real proporcionan, de forma eficaz, la detección de la infección por *B. pertussis*, especialmente en la etapa catarral y paroxística de la enfermedad e incluso después del tratamiento con antibiótico.

Cuadro 3. Pruebas utilizadas para el diagnóstico de tos ferina

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

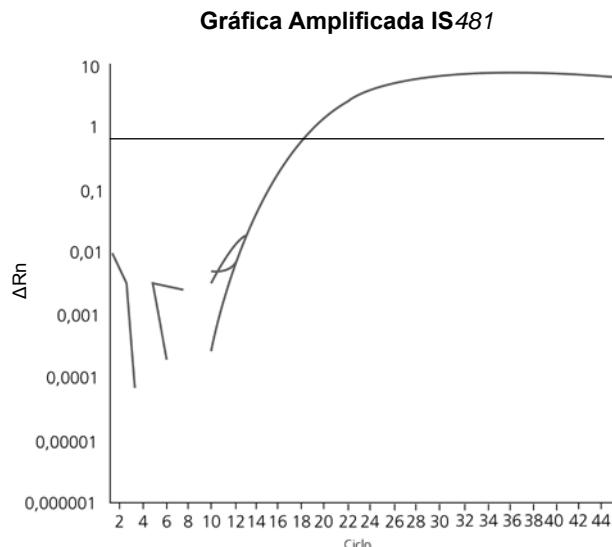
Modificado y ampliado de referencias 1 y 29

Los métodos moleculares han sido comparados con el cultivo y han demostrado ser de 2-4 veces más sensibles que este último, debido a que los ensayos en tiempo real tienen una excelente sensibilidad analítica.^{12,13} Cuando se utiliza en el laboratorio la PCR como diagnóstico, pueden generarse resultados falsos positivos debido a la contaminación o reactividad cruzada. El uso de RT-PCR ayuda a minimizar el riesgo de falsos positivos porque se realiza en tubos cerrados y no se requiere el manejo posterior del material amplificado (amplicones). En la actualidad, se ha adoptado a la RT-PCR como un método de rutina para el diagnóstico de *B. pertussis* en diversos países europeos y norteamericanos.^{14,15}

La literatura reporta una sensibilidad entre 70-99% y una

especificidad entre 86-100% de la RT-PCR para *B. pertussis*.^{12,15} Esta variabilidad depende de las condiciones de realización de la RT-PCR, formato utilizado y condiciones de ciclado; sin embargo, el factor más importante es el tipo de blanco genómico utilizado. Se han estudiado diferentes blancos genómicos, los genes más estudiados son los IS481, adenilato ciclasa cyA, porina, pertactina, *BP283*, *BP485*, *ptxS1* (subunidad-1 de la toxina pertussis), entre otros.

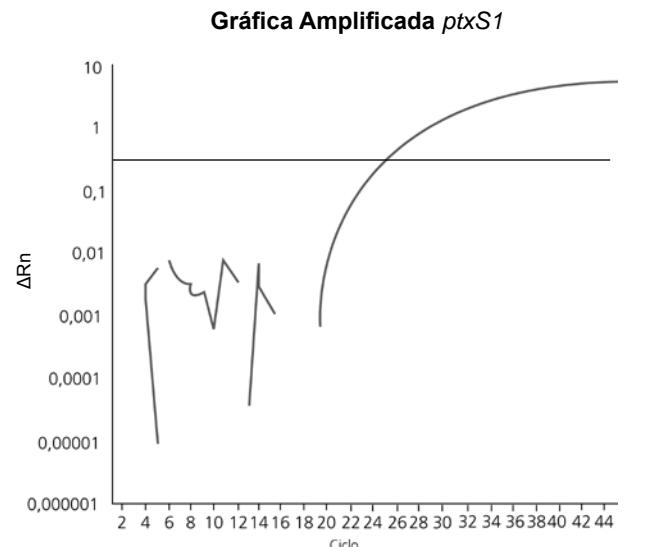
De estos diferentes blancos genómicos, el más utilizado e incluso ya incorporado en pruebas comerciales, es la secuencia de inserción IS481, que cuenta con una elevada sensibilidad, debido a que el genoma de *B. pertussis* tiene más de 200 copias de este gen, lo que lo hace un blanco idóneo para su detección; sin embargo, su especificidad puede verse limitada por la coexistencia de este gen IS481 en *B.*

Figura 2. RT-PCR para el blanco genómico IS481.

Resultados de la amplificación/fluorescencia por triplicado del blanco genómico IS481, obteniendo Ct: 18.00, 18.18, 18.18

homesii (10-20 copias) y *B. bronchiseptica* (1 copia).^{3,4,11,17} Por fortuna, estas dos especies son raras en humanos. Por ello, el blanco IS481 es el más utilizado, pero siempre habrá que considerar la posibilidad de falsos positivos debido a la reacción cruzada con estas dos especies.^{16,17}

La utilización de un solo blanco genómico no se considera suficiente para diagnóstico de pertussis. Para mayor especificidad, el uso de varios blancos minimiza la incidencia de falsos positivos, que generan errores en cualquier método que solo utilice un blanco genómico.^{18,19} Debido a la disminución de especificidad asociada con IS481, se ha sugerido el uso de blancos alternativos o RT-PCR con blancos múltiples para la confirmación de *B. pertussis*.^{19,20} De tal manera, además del blanco genómico IS481 (que nos ofrece una alta sensibilidad), se utiliza un segundo blanco que nos ofrezca elevada especificidad; los blancos más utilizados para esta función son: pertactina, BP283, BP485 y ptxS1.¹⁸ Este último blanco es el mejor estudiado, se le encuentra en *B. pertussis* y en *B. parapertussis*, pero con solo una copia en ambas especies, de manera que su detección en ocasiones puede demostrar sensibilidad intermedia, por lo que esto es su mayor limitante para utilizarse exclusivamente como blanco único. Así, la estrategia multiblanco utiliza dos o más blancos que garantizan una buena sensibilidad y especificidad.²¹

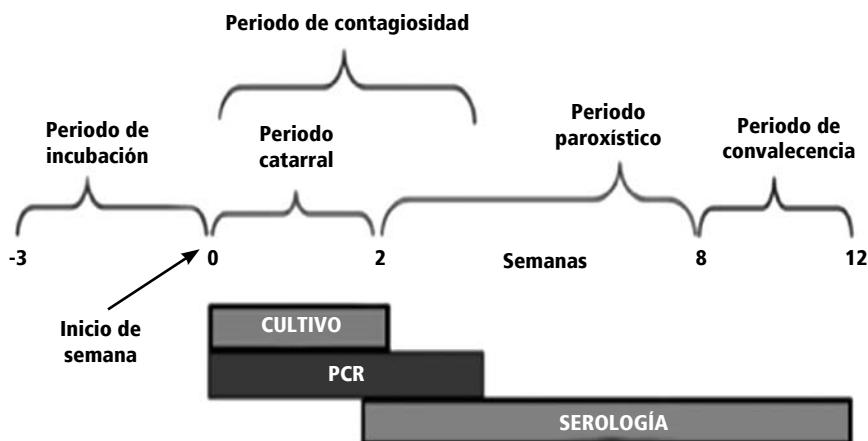
Figura 3. RT-PCR para el blanco genómico ptxS1.

Resultados de la amplificación/fluorescencia por triplicado del blanco genómico ptxS1, obteniendo Ct: 25.24, 25.30, 25.13

Recientemente, el CDC de Atlanta recomendó este abordaje multiblanco, mediante la técnica de RT-PCR.²² Para la detección de *B. pertussis* y su diferenciación con *B. parapertussis* y *B. holmesii* se utilizan tanto la IS481 (que nos ofrece una alta sensibilidad) y la ptxS1 (que ofrece una alta especificidad). En ensayos de RT-PCR es importante analizar con detenimiento los Ct (de sus siglas en inglés: Cycle threshold), que corresponde al ciclo de termociclado en el que se detecta la fluorescencia específica estadísticamente significativa. Normalmente, ante *B. pertussis* se obtienen Ct<35 para el blanco IS481 y Ct<40 para el blanco ptxS1;²² además, es muy importante correlacionar los Cts obtenidos para IS481 y ptxS1, porque hay una correlación lineal para la sensibilidad analítica en relación con los valores de Ct de ambos blancos con sus equivalentes genómicos.

En las **Figuras 2 y 3** se muestran los resultados positivos obtenidos en nuestro laboratorio, utilizando la detección de ambos blancos genómicos a través de RT-PCR en una muestra de hisopado nasofaríngeo, obtenida de un paciente de cuatro meses de edad con cuadro clínico de tos ferina y que no se encontraba vacunado.

La ventaja de utilizar RT-PCR para el diagnóstico etiológico específico de tos ferina radica en que es extraor-

Figura 4. Periodos de la tos ferina y sus métodos diagnósticos

Modificado de referencia 29

dinariamente rápida, además de ser mucho más sensible que los cultivos bacterianos tradicionales,^{14,21} y que utilizando los blancos genómicos apropiados, su especificidad alcanza el 100%. Una ventaja adicional es que aunque las bacterias no suelen cultivarse durante el periodo paroxístico, la RT-PCR es capaz de detectar a *B. pertussis* desde el periodo catárral así como en las primeras tres semanas o más del periodo paroxístico, e incluso la RT-PCR puede seguir siendo positiva durante tres semanas después de haber recibido tratamiento específico con antibióticos.²³ Actualmente, el mismo CDC tiene como definición de caso de tos ferina, aquellos pacientes con cuadro clínico compatible y su confirmación bacteriológica de *B. pertussis* mediante cultivo o PCR.²⁴

Las mejores muestras clínicas a obtener para los ensayos de PCR son: el aspirado (lavado) y el hisopado (exudado) nasofaríngeos, que ofrecen mayor recuperación tanto para cultivo, como para PCR; las muestras obtenidas de la faringe o del vestíbulo nasal no deben utilizarse porque normalmente *B. pertussis* no suele encontrarse en estos sitios. Es de vital importancia que los hisopos utilizados para muestras para PCR sean de dacrón o raya, porque los de alginato de calcio pueden inhibir la PCR.¹² Los medios de transporte pueden ser el agar de Regan-Lowe, o medios no nutritivos como el de Amies adicionado con carbón.

2. CULTIVO

Tradicionalmente, el cultivo para *B. pertussis* se ha considerado el estándar de oro para el diagnóstico de tos ferina. Si bien es altamente específico, su sensibilidad es muy pobre, lo que ha hecho que las técnicas moleculares empiecen a reemplazarlo. Su principal limitante es que la capacidad para aislar *B. pertussis* depende, fundamentalmente, del momento de la toma de la muestra, pudiendo ser positivo en el periodo catárral, pero diminuye considerablemente su sensibilidad en el periodo paroxístico (**Figura 4**). Se estima que su sensibilidad varía entre 15 y 45% cuando la muestra se obtiene durante los 21 días del inicio de los síntomas y de 0% si se obtiene tres semanas después.^{25,26}

Los dos medios de cultivo más utilizados para el aislamiento de *B. pertussis* son el medio de Bordet-Gengou (infusión de papa, glicerol y sangre de caballo/carnero) y el agar Regan-Lowe (suplementado con sangre de caballo al 10% y cefalexina 40 mg/L).²⁷

En general, el agar Regan-Lowe permite mayor porcentaje de aislamientos, además de que la vida media del medio es de 4-8 semanas, a diferencia del medio Bordet-Gengou que es, tan sólo, de cinco días. Si bien en el agar Regan-Lowe el crecimiento de *B. pertussis* puede observarse después de 3-5 días de incubación a 35-36°C, se recomienda

su incubación hasta 7-12 días para obtener resultados positivos.^{27, 28} Una vez obtenido el cultivo, se requiere además, la confirmación mediante métodos de aglutinación con antisueros específicos o por fluorescencia.

3. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

La prueba más utilizada es la detección directa del antígeno mediante anticuerpos fluorescentes (inmunofluorescencia directa o IFD). Este método utiliza anticuerpos (monoclonales o policlonales) específicos conjugados con diversos fluorocromos. Independientemente de los anticuerpos utilizados, en general, esta metodología carece de sensibilidad y especificidad. Su sensibilidad se reporta, en general, del 50%, con un rango entre 30 y 71%;³⁰ mientras que su especificidad es muy variable, debido al alto índice de reacciones cruzadas, así como la subjetividad de la interpretación. Precisamente, la interpretación de las laminillas requiere ser realizada por personal experimentado. Casi siempre la positividad se obtiene al observar de 10-100 organismos por campo.

Las pruebas basadas en detección de antígenos ofrecen la importante ventaja de que los organismos no deben estar viables para su detección y pueden detectarse durante la evolución de la enfermedad o, incluso, después de haber recibido antibióticos. Su mayor limitante es su falta de estandarización, que se requiere utilizar microscopía fluorescente, además de que se necesita amplia experiencia para una apropiada interpretación.

4. PRUEBAS SEROLÓGICAS

La infección con *B. pertussis* es seguida del incremento en la concentración sérica de anticuerpos IgA, IgG e IgM contra antígenos específicos. Entre los antígenos contra los cuales se generan anticuerpos están: la toxina pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN), fimbrias (FIM) y la toxina adenilato ciclase. De estos, la toxina pertussis es el antígeno más utilizado para la determinación serológica porque es muy específico para *B. pertussis*. Existen varias metodologías para determinar anticuerpos, como el ELISA, microaglutinación, fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, inmunoblot y la neutralización de toxina. En la actualidad, el método de ELISA es el más utilizado en la práctica clínica por su mejor estandarización, de manera que los otros métodos mencionados ya no se aconseja utilizarlos.³¹

Los anticuerpos IgG son los que se miden con mayor frecuencia. La inmunización primaria induce la producción de anticuerpos tanto IgM como IgG. En la actualidad se recomienda la medición de IgG contra PT (IgG-anti-PT) para confirmar el diagnóstico de tos ferina. La IgG-anti-PT también puede detectarse en saliva, con una sensibilidad de 80% y especificidad de 97%.^{14,31} Los títulos de corte deben encontrarse entre 50-100 UI/mL, con una sensibilidad de 76% y especificidad de 99%.³¹ Uno de los inconvenientes de medir la IgG, es que no permite distinguir si la respuesta inmune es secundaria a la infección o bien inducida por vacunación. La determinación de IgA-anti-PT sólo deberá utilizarse cuando se cuente con un resultado de IgG-anti-PT indeterminado o cuando no pueda obtenerse una segunda muestra.

La adecuada detección serológica de *B. pertussis* suele requerir muestras pareadas, aunque las mediciones de inmunoglobulina A o G pueden realizarse con una sola muestra; sin embargo, un inconveniente es que con una sola muestra de IgG la sensibilidad disminuye (36-76%).²⁹

Si bien las pruebas serológicas no están aún estandarizadas entre los diversos laboratorios, actualmente tanto el CDC y la FDA de los Estados Unidos (Menzies SL, et al)³², así como el grupo europeo Pertstrain (Guiso N, et al),³¹ trabajan activamente para la adecuada estandarización de la serología, incluyendo los sueros humanos estandarizados, estableciendo puntos de corte y desarrollando equipos comerciales basados en el método de ELISA IgG-anti-PT.¹⁴

CONCLUSIÓN

La tos ferina ha resurgido como un problema de salud pública en todo el mundo, lo que ha motivado la implementación de mejores estrategias por parte de los sistemas sanitarios para su adecuado diagnóstico, control y prevención. Para ello, los sistemas de vigilancia epidemiológica se han optimizado, además de que las estrategias de vacunación se han reforzado y actualmente también se han extendido al grupo de adolescentes y adultos. Por su parte, los avances en el campo del diagnóstico de tos ferina también han sido muy significativos, en donde las pruebas moleculares empiezan a ser el referente diagnóstico en muchos de los centros a nivel mundial.

REFERENCIAS

1. Beltrán Silva S, Cervantes Apolinar Y, Cherry JD, et al. Expert group on vaccinations for pertussis. Consensus on the clinical and microbiologic diagnosis of *Bordetella pertussis*, and infection prevention. *Salud Publica Mex* 2011;53:57-65.
2. Bamberger ES, Srugo I. What is new in pertussis? *Eur J Pediatr* 2008;167:133-139.
3. Preston A. *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. *CMAJ* 2005;173(1):55-62.
4. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schous LM, et al. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog* 2005;1(4):e45.
5. Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010;10(1):36-49.
6. Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 2003;35(1):32-40.
7. Herrou J, Debré A, Willery E, et al. Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS ONE* 2009;4(9):e6996.
8. Preston A, Parkhill J, Maskell DJ. The *bordetellae*: lessons from genomics. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(5):379-390.
9. Mahillon J, Léonard C, Chandler M. IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res Microbiol* 1999;150(9-10):675-687.
10. Locht C. *Bordetella*: Molecular microbiology. *Horizon Scientific Press*; 2007.
11. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(2):326-382.
12. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):4925-4929.
13. Wendelboe AM, Van Rie A. Diagnosis of pertussis: a historical review and recent developments. *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6(6):857-864.
14. The Global Pertussis Initiative: Report from a Round Table Meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 January 2010. *Vaccine* 2011;29:1115-1121.
15. Farrell DJ, McKeon M, Daggard G, et al. Rapid-cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 2000;38(12):4499-4502.
16. Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1963-1966.
17. Templeton KE, Scheltinga SA, van der Zee A, et al. Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4121-4126.
18. Probert WS, Ely J, Schrader K, et al. Identification and evaluation of new target sequences for specific detection of *Bordetella* pertussis by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46(10):3228-3231.
19. Qin X, Galanakis E, Martin ET, Englund JA. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):506-511.
20. Furuya D, Yagihashi A, Endoh T, et al. Simultaneous amplification of *Bordetella* repeated insertion sequences and toxin promoter region gene by polymerase chain reaction. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999;21(1):55-63.
21. Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, et al. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 8):1023-1029.
22. Tatti KM, Wu K, Tondella ML, et al. Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61(3):264-272.
23. Bidet P, Liguori S, De Lauzanne A, Caro V, et al. Real-time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J Clin Microbiol* 2008;46(11):3636-3638.
24. <http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html#case-definition>
25. Crowcroft NS, Pebody RG. Recent developments in pertussis. *Lancet* 2006;367:1926-1936.
26. Hoppe JE, Weiss A, Wörz S. Failure of charcoal-horse-blood broth with cephalexin to significantly increase rate of *Bordetella* isolation from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26(6):1248-1249.
27. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol* 1977; 6(3):303-309.
28. Katzko G, Hofmeister M, Church D. Extended incubation of culture plates improves recovery of *Bordetella* spp. *J Clin Microbiol* 1996;34(6):1563-1564.
29. Current Methods for Diagnosis of Pertussis Infections. Tatti K., Pawloski L., Pittenger LG. Pertussis and Diphtheria Laboratory, Meningitis and Vaccine Preventable Disease Branch, Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. <http://www.cdc.gov/pertussis/lab.html>.
30. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJ. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1999;37(9):2872-2876.
31. Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann M, Wirsing von Konig CH; EU Pertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(3):307-312.
32. Menzies SL, Kadwad V, Pawloski LC, Lin TL, Baughman AL, Martin M, Tondella ML, Meade BD; Pertussis Assay Working Group. Development and analytical validation of an immunoassay for quantifying serum anti-pertussis toxin antibodies resulting from *Bordetella pertussis* infection. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(12):1781-1788.