

Estudio comparativo de la sensibilidad entre el cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Bordetella pertussis* a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo.

Comparative study of culture and sensitivity polymerase chain reaction in the diagnosis of Bordetella pertussis from nasopharyngeal swab specimens.

ZULMARY FARIAS^{1,2}, CIRANA RODRÍGUEZ¹, DANIEL MARCANO¹, ENZA SPADOLA¹, DAISY PAYARES¹, NIRVIA CUAICAL¹, CARMEN UGARTE¹, NURI SALGADO¹

RESUMEN

La tosferina es una enfermedad infecciosa causada por *Bordetella pertussis*, que se diagnostica mediante el cultivo como técnica de referencia, la cual tiene como limitante una baja sensibilidad. Es debido a esto, que el presente trabajo se centró en evaluar a la técnica de PCR a punto final amplificando las secuencias IS481 y PT, como una metodología alternativa diagnóstica a partir de 100 muestras pareadas de hisopado nasofaríngeo de pacientes provenientes de distintas regiones de Venezuela. Dichas muestras pareadas constaron de un hisopado para realizar el cultivo bacteriano y el otro para la detección de ADN específico. La identificación microbiológica de *B. pertussis* incluyó el aislamiento del microorganismo en agar Regan-Lowe, identificación bioquímica y la confirmación por coaglutinación. El análisis de los resultados fue realizado empleando el programa SPSS 21.0.0., usando como herramienta estadística el test de McNemar. La sensibilidad obtenida por el protocolo de PCR a punto final fue 50%, en concordancia con reportes previos. De acuerdo al valor de $p=0,002$ obtenido, la detección de *B. pertussis* mediante los dos métodos presentó una diferencia para el diagnóstico de tosferina estadísticamente significativa, por lo que

ABSTRACT

Whooping cough is an infectious disease caused by *Bordetella pertussis*, diagnosed by culture as a reference technique, which has low sensitivity as limiting. It is because of this that the present work focused on evaluating the PCR technique endpoint amplifying IS481 and PT sequences, as an alternative methodology diagnostic from 100 paired samples of nasopharyngeal swabs from patients from different regions of Venezuela. Such paired samples comprised a swab for bacterial culture and the other for detection of specific DNA. Microbiological identification of *B. pertussis* included the isolation of the microorganism in agar Regan-Lowe, biochemical identification and confirmation by Coagglutination. The analysis of the results was performed using the SPSS program 21.0.0., as a statistical tool using the McNemar test. The sensitivity obtained by the PCR protocol endpoint was 50%, consistent with previous reports. According to the value of $p = 0.002$ obtained, detection of *B. pertussis* by the two methods showed a difference for the diagnosis of pertussis statistically significant, so it is not indifferent both diagnostic techniques employed. However, it is recommended to use both methods in combination to increase the likelihood of diagnosis.

1 Laboratorio de Aislamiento e Identificación Bacteriana. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

2 Cátedra de Bioquímica "A", Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Autor de correspondencia: Zulmary Fariás. E-mail: zulmaryfarias02@gmail.com Teléfono: (+58) 212-605.33.21

no es indiferente emplear ambas técnicas diagnósticas. Sin embargo, se recomienda emplear en forma combinada ambas metodologías para incrementar la probabilidad de realizar el diagnóstico.

Palabras Claves: *Bordetella pertussis*, cultivo microbiológico, PCR, sensibilidad diagnóstica, tosferina, gen IS481, gen PT.

Keywords: *Bordetella pertussis*, microbiological culture, PCR, diagnostic sensitivity, whooping cough, IS481 gene, PT gene.

INTRODUCCIÓN

La tosferina es una enfermedad muy contagiosa, con tasas de ataque de hasta el 80% en personas susceptibles ⁽¹⁾ y que en Venezuela se incluye dentro del llamado síndrome coqueluchoide ⁽²⁾. La enfermedad es causada por la bacteria *Bordetella pertussis* que es un bacilo aerobio, Gram-negativo, pleomórfico, no móvil, que afecta exclusivamente al ser humano. Se estima que cada año se presentan entre 20 y 40 millones de casos de infecciones por *B. pertussis* en el mundo, de las cuales el 90% ocurre en países en desarrollo ⁽³⁾. Adicionalmente, se ha evidenciado que aproximadamente un 70% de los casos de tosferina se presentan en lactantes ⁽¹⁾.

El aislamiento en cultivo representa el procedimiento de referencia para el diagnóstico microbiológico de la infección por *B. pertussis* ⁽⁴⁾. Sin embargo, pese a que posee una especificidad de 100%, la sensibilidad suele ser muy baja, llegando a alcanzar cifras de 12 a 26% ^(5, 6, 7). Debido a esto, la técnica de PCR a punto final ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de *B. pertussis* ya que ha demostrado ser más sensible que el cultivo y que la serología en la fase paroxística; obteniéndose resultados con una sensibilidad de 21 a 61% ⁽⁸⁾ y de una manera más rápida (24 o 48 horas). Para el diagnóstico molecular se han reportado diferentes secuencias diana en el genoma de *B. pertussis*, sin embargo, algunos investigadores señalan a la secuencia de inserción altamente repetida IS481 como el blanco idóneo para su detección por su alto número de copias ⁽⁶⁾. Otros blancos de amplificación usados son la región promotora del gen que codifica para la toxina pertussis (PT) el cual es específico para *B. pertussis* ⁽⁹⁾, así como el gen de la adenilatociclasa ⁽¹⁰⁾. De dicho

genoma, la región IS481 y la del gen promotor de la toxina pertussis, son los blancos más frecuentemente utilizados en la detección molecular de *B. pertussis* al obtenerse mejores resultados en muestras clínicas, por ser altamente sensibles y específicos al usarse conjuntamente ^(7, 11, 12).

El manejo efectivo de los brotes de tosferina, considerado un problema de salud pública, requiere un diagnóstico altamente sensible y específico que permita iniciar las medidas necesarias para su resolución ⁽¹³⁾. Sin embargo, es importante destacar que la ausencia de un buen estándar de referencia, ha dificultado la evaluación e implementación de la PCR como método diagnóstico ⁽¹²⁾.

Con la finalidad de promover el desarrollo de técnicas que permitan un diagnóstico altamente sensible y específico para adecuar los esquemas de tratamiento de una manera rápida e igual de eficaz, el objetivo del trabajo fue la evaluación de la sensibilidad y especificidad de técnicas moleculares implementadas por el Laboratorio de Aislamiento e Identificación Bacteriana del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", en comparación al cultivo microbiológico, para la detección de *B. pertussis* en muestras de hisopados nasofaríngeos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

Se seleccionaron 100 muestras pareadas al azar de hisopados nasofaríngeos del banco de muestras del Laboratorio de Aislamiento e Identificación Bacteriana del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", las cuales fueron tomadas empleando hisopos de alginato de calcio e hisopos de dacrón, para el cultivo de *B.*

pertussis y la determinación por PCR, respectivamente; procesándose un total de 200 muestras recibidas en un periodo comprendido entre los años 2011 y 2013.

Para este estudio se incluyeron únicamente muestras pareadas de pacientes definidos por el médico tratante como caso sospechoso o caso probable de padecer el síndrome coqueluchoide ⁽²⁾ y provenientes de diversas partes de Venezuela; sin importar el grupo etario, sexo o condición socioeconómica.

Los hisopos de dacrón fueron almacenados a -20°C, mientras que los hisopos de alginato de calcio en agar Regan-Lowe fueron conservados a 4 °C hasta su procesamiento.

PROCEDIMIENTOS

Diagnóstico microbiológico

La identificación de especies de *B. pertussis* a partir de hisopados nasofaríngeos de alginato de calcio, incluyó el aislamiento del microorganismo en cultivo de agar-carbón Regan Lowe suplementado con 10% de sangre de caballo y cefalexina (40 mg/L), elaborado en el Laboratorio de Medios de Cultivo del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Es importante mencionar, que toda muestra donde aparecieran colonias sospechosas en el agar Regan-Lowe, con morfología y tinción de Gram sugestiva, así como bioquímicamente mostrara actividad catalasa positiva, oxidasa positiva y ureasa negativa, además de una aglutinación apreciable mediante el análisis con antisueros *Difco*® (Becton, Dickinson and Company), se consideró positiva para el cultivo de *B. pertussis*.

Diagnóstico molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de los hisopados nasofaríngeos, empleando el kit de extracción por método de columna de sílica-gel, de marca QIA amp® DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), Cat No/ID 51306, mediante el protocolo de purificación de ADN total.

Detección de los genes

Se detectó la secuencia de inserción altamente repetida IS481 de 187 pb amplificada con los cebadores

Forward 5'-GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT-3' y *Reverse* 5'-TTCAGGCACACAACTTGATGGG-CG-3' ⁽¹⁴⁾, Además se detectó el gen promotor de la toxina mediante los cebadores *Forward* 5'-CCAACG-CGCATGCGTGCAGATTGCTC-3' de 26 pb y *Reverse* 5'-CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCTATTTTA-3' de 29 pb que amplificaron un fragmento de ADN de 191 pb, el cual es específico para *B. pertussis* ⁽⁹⁾. Se consideró positivo por PCR aquel paciente que mostrara las dos bandas características en el gel de electroforesis correspondientes al gen IS481 y el gen PT.

Se empleó el mismo protocolo de amplificación para las dianas genéticas IS481 y PT. La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 1 µL de Tris/HCl 10X, pH 8, 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP 2mM, 1 µL de cada cebado, 0,15 µL de Taq polimerasa y 3 µL de cada muestra. Todos los componentes de la PCR utilizados fueron de la casa comercial Invitrogen® (California, EE.UU.), Cat No 10297-018. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de predesnaturalización/activación de la enzima a 94 °C por 45 seg; 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, anillamiento a 60 °C por 10 seg y extensión a 72 °C por 20 seg; con un ciclo de extensión final a 72 °C por 45 segundos. Las muestras, controles y el marcador de peso molecular de 100 pb (BIOLABS®, Massachusetts, EE.UU.) se dispensaron en pocillos del gel de agarosa al 2 % con el buffer de carga 6X (BIOLABS®, Massachusetts, EE.UU.). Para la migración electroforética se utilizó una corriente de 90 mAmp y un voltaje de 125 V. Se culminó con la captación de las imágenes del gel utilizándose un equipo GEL-DOC XR System (BIO-RAD, California, EE.UU.), donde finalmente se procedió a la digitalización y al análisis a través del programa Quantity One® (BIO-RAD, California, EE.UU.).

Controles

Como control negativo de amplificación se empleó agua mili-Q estéril (calidad PCR); mientras que, el control positivo fue la cepa *B. pertussis* INH134 proveniente del banco maestro de *B. pertussis*, proporcionada por el Laboratorio de Vacunas Bacterianas del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Cálculo de sensibilidad y especificidad

Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnóstica se utilizaron las fórmulas halladas en la Figura 1⁽¹⁵⁾. Donde se consideró que los verdaderos positivos y negativos fueron las muestras que resultaron positivas y negativas por ambas metodologías respectivamente; siendo los falsos positivos y negativos aquellas muestras que resultaron solamente positivas o negativas por la metodología de PCR.

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos}} \times 100$$

Figura 1. Fórmulas descritas para el cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnósticas.

Tratamiento estadístico

Para determinar si existió una diferencia estadísticamente significativa entre el diagnóstico de *B. pertussis* mediante el cultivo y la detección por PCR se empleó el programa SPSS 21.0.0; usando como herramienta estadística el test de McNemar, una modificación de Chi-cuadrado para variables dicotómicas dependientes^(16, 17).

RESULTADOS

Cultivo en agar Regan Lowe

De los 100 hisopados nasofaríngeos recolectados en hisopos de alginato de calcio, logró obtenerse crecimiento bacteriano de *B. pertussis* en un total de cuatro muestras cuya morfología se observa en la Figura 2. De estas cuatro muestras con sospecha fenotípica, la PCR resultó positiva en dos casos.

Detección molecular

De los 100 hisopados nasofaríngeos de dacrón utilizados para el diagnóstico molecular, se obtuvieron 17 muestras donde se detectó ADN de *B. pertussis*, como

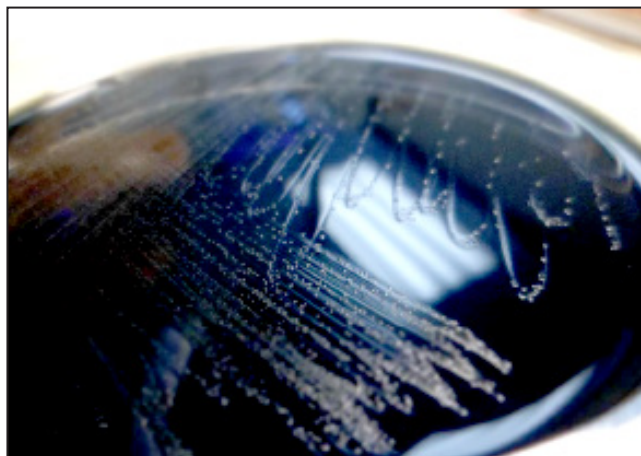


Figura 2. Fotografía de colonias de *B. pertussis* en agar Regan-Lowe provenientes del paciente de la muestra N° 3. Fotografía tomada en el Departamento de Bacteriología por la Lic. Zulmary Farías.

se señala en la Figura 3. De estas 17 muestras, hubo 15 donde no logró observarse crecimiento bacteriano, mientras que en dos muestras el cultivo en agar Regan-Lowe resultó positivo.

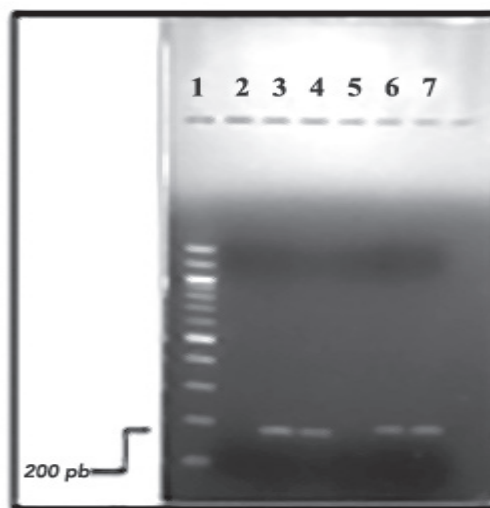


Figura 3. Gel de agarosa al 2% de un paciente perteneciente al estudio el cual resultó positivo por PCR para los genes IS481 y PT. 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. 2: Control negativo para el gen IS481. 3: *INH134* (Control positivo para el gen IS481). 4: Muestra. 5: Control negativo para el gen PT. 6: *INH134* (Control positivo para el gen PT). 7: Muestra.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos mediante el cultivo y por la PCR, coincidieron en 83 muestras, de las cuales dos muestras fueron positivas para el diagnóstico de *B. pertussis* y 81 negativas (Tabla 1). Además, se obtuvo dos pacientes que resultaron positivos mediante PCR para el gen IS481 y negativos para el gen PT.

Tabla 1. Frecuencia de las pruebas diagnósticas para la detección de *B. pertussis* en muestras de hisopado nasofaríngeo.

		Cultivo Microbiológico		
		Positivo	Negativo	Total
PCR	Positivo	2	15	17
	Negativo	2	81	83
	Total	4	96	100

La sensibilidad y especificidad diagnóstica de la PCR para la detección de *B. pertussis* obtenidas en este trabajo fueron de 50% y 84%, respectivamente, respecto al cultivo que constituyó el método de referencia. Mediante el test de McNemar se obtuvo una $p=0,002$.

DISCUSIÓN

La discrepancia entre las dos muestras que fueron positivas para el diagnóstico de *B. pertussis* mediante cultivo y fueron negativas por la técnica de PCR; pudiera deberse al hecho de la presencia de polimorfismos en los segmentos diana de ADN de dichas muestras^(18, 19), así como errores inherentes a la toma de la muestra en el hisopo de dacrón^(8, 20, 21). Se argumenta que la toma de muestra desempeñó un papel muy importante en todos los casos negativos, sean coincidentes o no, e incluso en aquellos catalogados como falsos negativos debido a la localización tan específica de la toma de muestra, como es el epitelio ciliado respiratorio de la mucosa nasofaríngea⁽²¹⁾. Además, una disminución en la sensibilidad de la PCR para detectar *B. pertussis*

a través del hisopado nasofaríngeo de dacrón, pueda deberse tanto a la técnica como al orden en la utilización de los hisopos de alginato y dacrón que el médico utiliza para extraer la muestra.

Los 81 pacientes que fueron catalogados como verdaderos negativos, se les atribuyó como posible causa de enfermedad otros agentes etiológicos considerados en la definición de síndrome coqueluchoide, tales como *B. parapertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *M. pneumoniae*, adenovirus, influenza virus, parainfluenza 1-4, virus sincitial respiratorio, citomegalovirus y virus de Epstein Barr⁽²⁾.

Se infiere que la alta cantidad de falsos positivos respecto a los verdaderos positivos se debe a la baja sensibilidad de 12 a 26%^(5, 6) que presenta el cultivo como estándar de oro en la detección de *B. pertussis*. Sin embargo, los falsos positivos se han reportado igualmente en otros trabajos⁽²²⁾ por lo cual se refuerza la necesidad de incluir el estudio del cultivo para la validación de la técnica. No obstante, La sensibilidad y especificidad diagnóstica hallada para la PCR ante la detección de *B. pertussis* en este estudio fue de un 50% y 84% respectivamente, lo cual evidenció la mayor capacidad de la PCR para detectar pacientes positivos respecto el cultivo, por lo que no es indiferente emplear ambas técnicas diagnósticas.

En los dos pacientes que resultaron positivos mediante PCR para el gen IS481 y negativos para el gen PT, se considera que el agente etiológico involucrado pertenecía a otras especies del género *Bordetella*, de allí la recomendación de emplear a futuro más dianas genéticas en la búsqueda de otras especies como el gen *IS1001* para *B. parapertussis*, el cual constituye otra especie que es patógena en humanos⁽⁹⁾.

CONCLUSIÓN

La PCR a punto final validada en este trabajo por primera vez en Venezuela, resultó una valiosa herramienta metodológica en el diagnóstico de *B. pertussis* no solo en términos de sensibilidad (50%) que se correspondió con lo hallado en otros trabajos^(8, 19, 20, 23) con una buena correlación estadística ($p=0,002$), sino que además permitió obtener resultados en menor tiempo, lo que podrá favorecer el ejecutar decisiones diagnósticas a futuro de manera más eficaz en los pacientes in-

fectados. Es importante destacar que esta metodología de igual forma, tiene un impacto a nivel epidemiológico, permitiendo dilucidar la verdadera incidencia en el país respecto a la tosferina, a fin de aplicar las medidas para el tratamiento, control y prevención de la enfermedad.

Finalmente se recomienda el empleo de una metodología combinada, como la presentada en este trabajo, donde se incluyan al menos dos técnicas con fundamentos diferentes para incrementar la probabilidad de realizar el diagnóstico, debido a que tienen sensibilidades diferentes y a diferentes tiempos del período de la enfermedad, además de poder determinar de manera más exacta la incidencia de la tosferina. Así mismo, se plantea la inclusión de más dianas genéticas que permitan discernir entre las diferentes especies del género *Bordetella*⁽⁹⁾.

REFERENCIAS

- (1) World Health Organization. Pertussis surveillance: A global meeting. Ginebra, 16-18, octubre 2000. Dept. of Vacc. and Biol. 2001. Disponible en: <http://www.who.int/vaccines-documents/>. (Consultado el 14 de enero del año 2013).
- (2) Manual para el manejo de enfermedades de denuncia obligatoria del Ministerio del Poder Popular para la Salud. Bol. Epidemiol. 2001; 26: 1-27.
- (3) Tan TQ, Trindade E, Skowronski D. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis*. 2005; 24 (5): 10-18.
- (4) Romero GQ, Tomé PS, Torres LA, Guiscafré HG, Leañón BM. Identificación de un caso de tosferina y estudio de sus contactos. Utilidad de la PCR y del cultivo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2007; 45; (6): 623-627.
- (5) Sanz JC, de Ory MF. Diagnóstico de laboratorio de tosferina. Papel de la serología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20 (5): 212-218.
- (6) Lingappa JR. Diagnosis of community-acquired pertussis infection: comparison of both culture and fluorescent-antibody assays with PCR detection using electrophoresis or dot blot hybridization. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2908-2912.
- (7) Tilley PA, Kanchana MV, Knight I, Blondeau J, Antonishyn N, Deneer H. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, polymerase chain reaction, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; 37 (1):17-23.
- (8) Heining U, Schmidt SG, Cherry JD, Stehr K. Clinical validation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pertussis by comparison with serology, culture, and symptoms during a large pertussis vaccine efficacy trial. *Pediatrics* 2000; 105(3): 31-36.
- (9) Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, Jensen JS. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol*. 2004, 53 (8): 749-54.
- (10) Riffelmann M, Wirsing von Köning CH, Caro V, Guiso N., Pertussis PCR Consensus Group. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (10): 4925-4929.
- (11) Poddar SK. Differential detection of *B. pertussis* from *B. parapertussis* using a polymerase chain reaction in presence of SYBR green1 and amplicon melting analysis. *Mol Cell Probes*. 2004; 18 (6): 429-35.
- (12) Templeton KE, Scheltinga SA, Van der Zee A, Diederer BM, 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. *J Clin Microbiol*. 2003; 41 (9):4121-4126.
- (13) Scott PT, Clark JB, Miser WF. Pertussis: an update on primary prevention and outbreak control. *Am Fam Phys*. 1997; 56:1121-1128.
- (14) 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.
- (15) Ruiz RP. Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test. *Jano*; 2009. 1736: 30-32.
- (16) Díaz PS, Fernández PS. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. *Cad Aten Primaria*; 2004; 11: 304-308.
- (17) Gómez GM, Danglot BC, Vega FL. Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuándo usarlas. *Rev Mex Pediatr* 2003; 70 (2): 91-99.
- (18) Pianciola LA, Mazzeo ML, Flores D, Hozbor DF. Desarrollo y validación de una PCR múltiple para el diagnóstico de *Bordetella* spp. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46 (4): 667-676.
- (19) Glare EM, Paton JC, Premier RR, Lawrence AJ, Nisbet IT. Analysis of a Repetitive DNA Sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1990 September; 28(9): 1982-1987.
- (20) Marcon MJ, Hamoudi AC, Cannon HJ, Hribar MM. Comparison of throat and nasopharyngeal swab specimens

for culture diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J. Clin. Microbiol. 1987; 25 (6): 1109–1110.

- (21) Schlapfer G, Cherry JD, Heininger U, Berall U, Schmitt GS, Laussucq S, et al. Polymerase chain reaction identification of *Bordetella pertussis* infections in vaccines and family members in a pertussis vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J.* 1995; 14 (3): 209-214.
- (22) Sotir MJ, Cappozzo DL, Warshauer DM, Schmidt CE, Timothy A. Monson TA, et al. Evaluation of polymerase chain reaction and culture for diagnosis of pertussis in the control of a county-wide outbreak focused among adolescents and adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1216–9.
- (23) Skowronski DM, De Serres G, MacDonald D, Wu W, Shaw C, Macnabb J, et al. The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. *J Infect Dis.* 2002; 185: 1448-1453.