

Vacunas

www.elsevier.es/vac



Imágenes en vacunología

Tos ferina. Diagnóstico de laboratorio

Whooping Cough: Laboratory Diagnosis

G. Codina Grau* y A. Ferrer Marcellés

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

Tos ferina, ¿una enfermedad reemergente?

La enfermedad causada por *Bordetella pertussis* no está controlada en los países de la Unión Europea, actualmente la vemos con frecuencia y se está registrando un aumento en el número de casos declarados¹.

La inmunidad, tanto la natural como la adquirida por la vacunación, va menguando con el tiempo, y el microorganismo continúa circulando también en países con alta cobertura vacunal, por lo que se producen ondas epidémicas cada 3 o 4 años².

¿A qué puede atribuirse el aumento en la incidencia de la tos ferina?

Podría ser por un aumento real del número de casos³ y también por mejoras en su diagnóstico. La pérdida de la inmunidad vacunal con el tiempo, una menor efectividad de las vacunas acelulares respecto a las de célula entera y cambios genéticos en la bacteria son posibles causas de este incremento de la incidencia.

¿Han cambiado los métodos diagnósticos?

El diagnóstico tradicional de laboratorio se realiza mediante cultivo de las secreciones respiratorias en medios como agar charcoal suplementado con sangre de caballo y cefalexina. Tras una incubación de 7-10 días, se puede identificar las colonias.

Sin embargo, la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en protocolo de los laboratorios asistenciales ha supuesto un cambio importante en el diagnóstico de la tos ferina. Esta técnica permite seleccionar de forma muy específica una pequeña zona del genoma de la bacteria y crear un gran número de copias, lo que facilita su detección e identificación.

¿En qué consiste la PCR en tiempo real?

En una muestra respiratoria (aspirado nasofaríngeo, frotis faríngeo), se aíslan los ácidos nucleicos y se lleva a cabo la amplificación de la región genómica específica de *B. pertussis* mediante la PCR usando sondas marcadas con fluoróforos. El mismo instrumento que lleva a cabo la reacción enzimática va leyendo la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN que estamos creando (fig. 1). Esta lectura se va realizando durante todo el tiempo que dura la reacción, y cuando sobrepasa un umbral que hemos determinado, ya podemos decir que tenemos un positivo sin necesidad de otras manipulaciones (fig. 2). La visualización de los resultados se hace durante el proceso, "en tiempo real".

¿Qué ventajas presenta el diagnóstico mediante PCR en tiempo real?

En primer lugar, la rapidez. Puesto que no depende de la tasa de replicación del microorganismo, que es lento en el caso de

Sección coordinada por el Dr. F.A. Moraga-Llop.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mgcodina@vhebron.net (G. Codina Grau).



Figura 1 – Termociclador para reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

B. pertussis, los resultados se obtienen en horas, en lugar de días como en el cultivo.

Otra ventaja evidente es la sensibilidad, que es claramente superior a la del cultivo⁴. Este hecho puede atribuirse directa-

mente a las características propias de las técnicas genéticas y también a que el diagnóstico mediante PCR no necesita que el microorganismo sea viable para obtener resultados positivos. La demora en el transporte de las muestras y que los pacientes ya hayan recibido tratamiento antibiótico son dos factores que pueden inhibir el crecimiento de esta bacteria y producir resultados falsamente negativos por cultivo, mientras que no tienen repercusión en la PCR.

¿Hay diferencias en la sensibilidad de los métodos diagnósticos según la edad del paciente?

La confirmación microbiológica, tanto por cultivo como por PCR, se consigue con mayor frecuencia en los pacientes menores de 1 año, que son los que eliminan mayor cantidad de microorganismos.

¿Podemos encontrar resultados positivos en pacientes con una clínica de tos de larga duración?

Según un estudio realizado en nuestro laboratorio (datos no publicados), el número de resultados positivos por cultivo es inversamente proporcional al tiempo transcurrido desde el

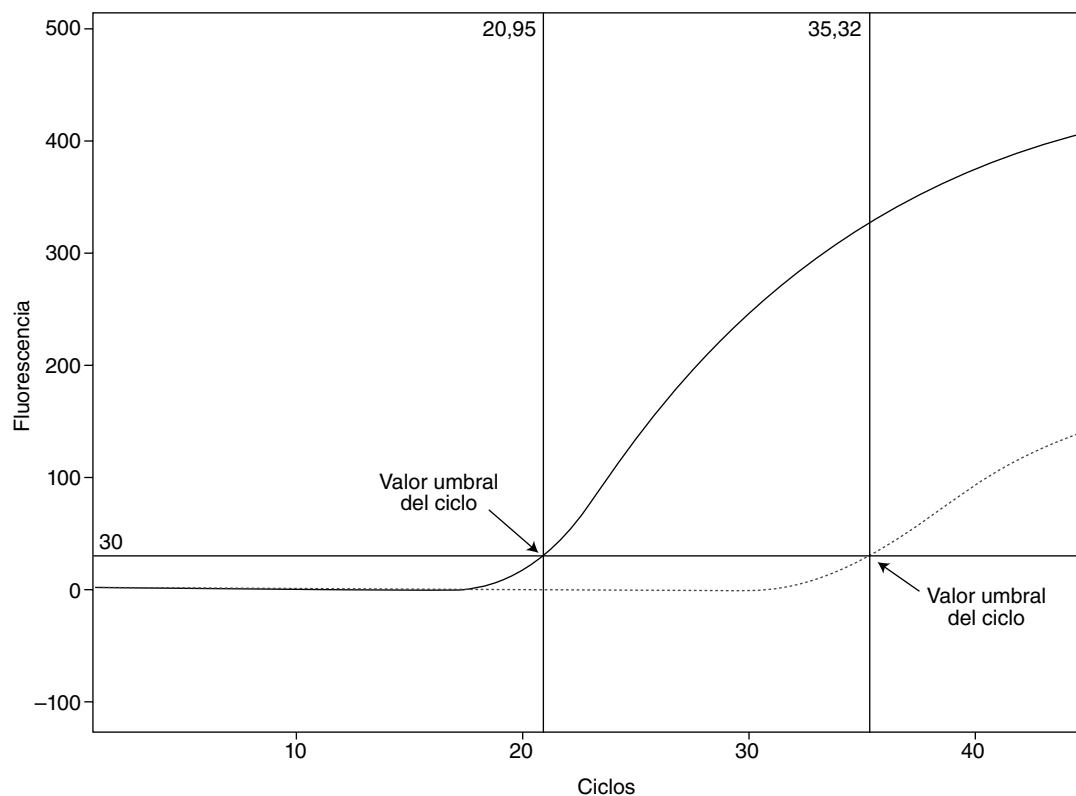


Figura 2 – Dos muestras con reacción en cadena de la polimerasa positiva para *Bordetella pertussis*. La línea continua de fluorescencia pasa por encima del valor umbral en el ciclo 20,95, y la discontinua, en el ciclo 35,32. En ambas detectamos ADN del microorganismo, pero la primera tiene mayor cantidad, puesto que ha tardado menos en positivizarse.

inicio de la tos, pero esto no ocurre con la PCR, en la cual el número de resultados positivos no disminuye significativamente hasta 1 mes después de iniciarse la tos.

Desconocemos cuánto tiempo después de transcurrido ese periodo podemos seguir encontrando amplificaciones positivas, aunque se ha descrito que la eliminación de ácidos nucleicos de microorganismos no viables puede ocurrir durante meses en otro tipo de infección respiratoria⁵, y también podría ser así en este caso.

¿El cultivo sigue siendo de utilidad?

Para los pacientes con mayor riesgo de sufrir una infección grave (lactantes no vacunados), el cultivo tiene una sensibilidad adecuada, sobre todo si estudiamos muestras recogidas en los primeros días del inicio del cuadro y tenemos cuidado de realizar un transporte rápido al laboratorio para asegurar la viabilidad del microorganismo.

Además, presenta otras ventajas adicionales inherentes al aislamiento de la cepa, como puede ser su utilidad para los estudios epidemiológicos. A fin de poder controlar las cepas que circulan en la comunidad, es imprescindible realizar la tipificación de las cepas aisladas en cultivo, lo que supone un valor añadido de este método.

¿La PCR en tiempo real está disponible en todos los laboratorios?

Actualmente hay numerosas técnicas comercializadas que siguen las normas de la Unión Europea (marcado CE), lo que hace que su realización sea sencilla. Sin embargo, tenemos que valorar el aspecto económico, pues el instrumental necesario es caro y sólo es factible si el número de muestras que se procesan es alto.

B I B L I O G R A F Í A

1. Wirsing von Konig CH, Riffelman M. Pertussis: an old disease in new clothes. *Euro Surveill*. 2007;12:E1-2.
2. Asvall JE. Health for all in the 21st century, a policy framework for the WHO European region. *Int J Occup Med Environ Health*. 2000;13:5-13.
3. Spokes PJ, Quinn HE, McAnulty JM. Review of the 2008-2009 pertussis epidemic in NSW: notifications and hospitalisations. *N S W Public Health Bull*. 2010;21:167-73.
4. Codina Grau MG, Ferrer Marcellés A. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por *Bordetella pertussis*. *Vacunas*. 2009;10:56-8.
5. Hermans PWM, Schuitema ARJ, Van Soolingen D, Verstynen CPH, Bik EM, Thole JER, et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by PCR. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1204-13.