

### Aplicación de un ensayo comercial de ELISA al diagnóstico de la tos ferina sobre muestra única de suero

**Sr. Editor:** La incidencia de la tos ferina experimentó, como consecuencia de la introducción de la vacunación a partir de 1965, un marcado descenso durante el tercio final del pasado siglo. Sin embargo, la protección inducida por la vacuna, estimada entre el 84 y el 100%<sup>1</sup> parece ser transitoria, lo cual, probablemente asociado con variaciones antigénicas de las cepas circulantes, puede favorecer la aparición de casos de tos ferina en individuos previamente vacunados<sup>2</sup>. Existen diversas aproximaciones de laboratorio para el diagnóstico de la infección por *Bordetella*<sup>3</sup>. El método de elección para el diagnóstico de tos ferina es el cultivo de la bacteria, aunque la definición clinicoepidemiológica de la enfermedad (cuadro catarral con tos de al menos 2 semanas de duración)<sup>4</sup> supone en muchas ocasiones una demora en la toma de muestras que imposibilita el aislamiento de la bacteria. Los métodos de amplificación genómica, que mejoran la sensibilidad del cultivo<sup>5</sup>, pueden igualmente aportar resultados negativos cuando se aplican sobre muestras obtenidas tardíamente. Por otra parte, la alternativa serológica más aplicable, la detección de seroconversión queda limitada por la dificultad de disponer de muestras pareadas de suero (fase aguda y convaleciente) que permitan confirmar una infección reciente. Por todo ello, en los últimos años se ha sugerido como alternativa diagnóstica a los procedimientos convencionales la detección puntual de niveles altos de anticuerpos en muestra única de suero<sup>6</sup>. Para valorar la especificidad de esta aproximación es preciso disponer de valores serológicos de referencia detectados en grupos de control de población general. En la

actualidad existen un gran número de ensayos de ELISA de origen comercial, potencialmente aplicables al diagnóstico de la tos ferina sobre muestra única de suero. En este trabajo se ha valorado la aplicación de un ensayo que emplea como antígeno una mezcla de toxina *pertussis* (TP) y hemaglutinina filamentosa (HF) (*Bordetella pertussis* PT/FHA EIA Test system, MarDx Diagnostics Inc, EE.UU.).

Se han estudiado muestras correspondientes a un grupo de casos y otro de controles comparables en cuanto a edad y número de dosis de vacuna recibidas:

1. Muestras únicas de suero de 18 casos de un brote de tos pertusoide ocurrido en un pueblo de la Comunidad de Madrid. La identificación de este brote como tos ferina se basó en las características clinicoepidemiológicas de los casos, la respuesta al tratamiento con eritromicina, la seroconversión observada en el único caso con un par de muestras disponibles y en la exclusión de otros posibles agentes causales de enfermedades respiratorias (gripe A, gripe B, adenovirus, virus respiratorio sincitial, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* sp. y *Coxiella burnetii*), mediante técnica de fijación del complemento<sup>7</sup>. El brote afectó a niños de 2 a 9 años (edad media, 6,3 años; desviación estándar [DE], 2,3), vacunados con 3 o 4 dosis de vacuna celular (media de dosis, 3,7; DE, 0,5). El tiempo medio entre el comienzo de la sintomatología y la toma de muestras fue de 45,2 días (DE, 26,4).

2. 79 sueros control de otros tantos niños de población general<sup>8</sup>. La edad media de los controles fue 6,7 años; DE, 2,8; límites, 2 a 10. Todos habían recibido entre 3 y 4 dosis de vacuna celular (media de dosis, 3,5; DE, 0,5).

Todas las muestras se procesaron por el método *B. pertussis* PT/FHA EIA Test system, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. La asignación de resultados en esta técnica se realizó calculando un valor índice que se obtiene multiplicando el valor medio de absorbancia de un suero de control por un factor de corrección específico de lote. Las muestras se clasifican como positivas si el valor índice es mayor o igual a 1,2; como equívocas si el valor índice es mayor o igual a 0,8 y menor de 1,2, y como negativas si el valor índice es menor de 0,8.

Mostraron anticuerpos frente a *B. pertussis* (índice  $\geq 1,2$ ) 17 de las 18 muestras de los casos (94,4%), siendo la muestra restante negativa (índice  $< 0,8$ ). Todos los casos positivos mostraron unos índices de positividad muy elevados (índice  $\geq 2,0$ ). Por otra parte, entre los 79 controles, 65 (82,3%)

fueron negativos, lo que confirma la escasa utilidad de los ensayos serológicos para valorar la seroprevalencia frente a tos ferina, como se ha documentado previamente<sup>9</sup>. Siete casos (8,85%) mostraron resultado equívoco (índice  $\geq 0,8$  y  $< 1,2$ ) y los 7 restantes (8,85%) fueron positivos (índice  $\geq 1,2$ ). Entre estos últimos, sólo 2 (2,53% del total de controles) mostraron índices de positividad muy elevados (índice  $\geq 2,0$ ). Así pues, cuando se aplica este ensayo para el diagnóstico de tos ferina sobre muestra única de suero en niños vacunados, un valor de índice de anticuerpos de 2,0 proporciona unos niveles de sensibilidad del 94,4% y de especificidad del 97,5%.

En un intento de valorar el significado de este hallazgo, se han revisado los resultados obtenidos desde 1999 en el Centro Nacional de Microbiología. Durante este período de tiempo, y empleando el mismo ensayo aquí evaluado, se han diagnosticado serológicamente 27 casos de infección por *B. pertussis*, incluyendo 17 seroconversiones (de negativo a positivo), y 10 serorrefuerzos (de positivo a positivo, con variación significativa de anticuerpos frente a *B. pertussis*). En 16 de las 17 seroconversiones (94,1%) la muestra positiva alcanzó valores mayores o iguales a 2,0; y en todos los casos de serorrefuerzo al menos una muestra alcanzó valores mayores o iguales a 2,0.

Se puede por tanto concluir, de acuerdo con lo previamente descrito empleando un ensayo de ELISA con TP<sup>6</sup>, que las muestras de suero de casos con sospecha de tos ferina que tengan índices de anticuerpos iguales o superiores a 2,0 en el ensayo *B. pertussis* PT/FHA EIA Test system pueden clasificarse como "caso probable o caso con evidencia de infección reciente por *B. pertussis*". Por otra parte, la validación de otros ensayos, fundamentalmente de ELISA, que emplean diversas combinaciones de antígenos de *B. pertussis*, o células completas, al diagnóstico de la tos ferina, mediante aproximaciones similares, permitirá la generalización del diagnóstico serológico de la tos ferina. Este tipo de criterio diagnóstico puede ayudar, como ha sucedido en otros entornos<sup>10</sup>, a cuantificar la verdadera importancia de la tos ferina en nuestro medio.

Fernando de Ory<sup>a</sup>,

María Eulalia Guisasola<sup>a</sup>,

Alicia Téllez<sup>a</sup> y Juan Carlos Sanz<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

<sup>b</sup>Laboratorio de Salud Pública. Comunidad de Madrid. Madrid. España.

## Bibliografía

1. Fletcher MA, Saliou P, Ethevenaux C, Plotkin SA. The efficacy of whole cell pertussis immunisation: collected data on a vaccine produced in France. *Public Health* 2001;115: 119-29.
2. Van Bowen M, De Melker HE, Schellekens JF, Kretzschmar M. Waning immunity and sub-clinical infection in an epidemic model: implications for pertussis in The Netherlands. *Math Biosci* 2000;164:161-82.
3. Sanz Moreno JC, De Ory Manchón F, Grupo de Trabajo sobre Tos Ferina. Diagnóstico de Laboratorio de tos ferina. Papel de la serología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20: 212-8.
4. Centro Nacional de Epidemiología. Protocolos de Enfermedades de Declaración Obligatoria. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 1996.
5. Hallander HO. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):99-106.
6. De Melker HE, Versteegh FG, Conyn-Van Spaendonck MAE, Elvers LH, Berbers GA, Van der Zee A, et al. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2000;38: 800-6.
7. Grist NR, Bell EJ, Follett EAC, Urquhart GED. *Diagnostic Methods in Clinical Virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979.
8. III Encuesta de serovigilancia de la Comunidad de Madrid. *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid*, 2002;8:3-41.
9. Sanz JC, Fernández M, Sagües MJ, Ramírez R, Castañeda R, Barranco D, et al. Comparación de tres técnicas ELISA para evaluar la seroprevalencia IgG frente a *Bordetella pertussis* en niños vacunados con tres dosis de DTPe. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20:10-5.
10. Yih WK, Lett SM, Des Vignes FN, Garrison KM, Sipe PL, Marchant CD. The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *J Infect Dis* 2000;182:1409-16.