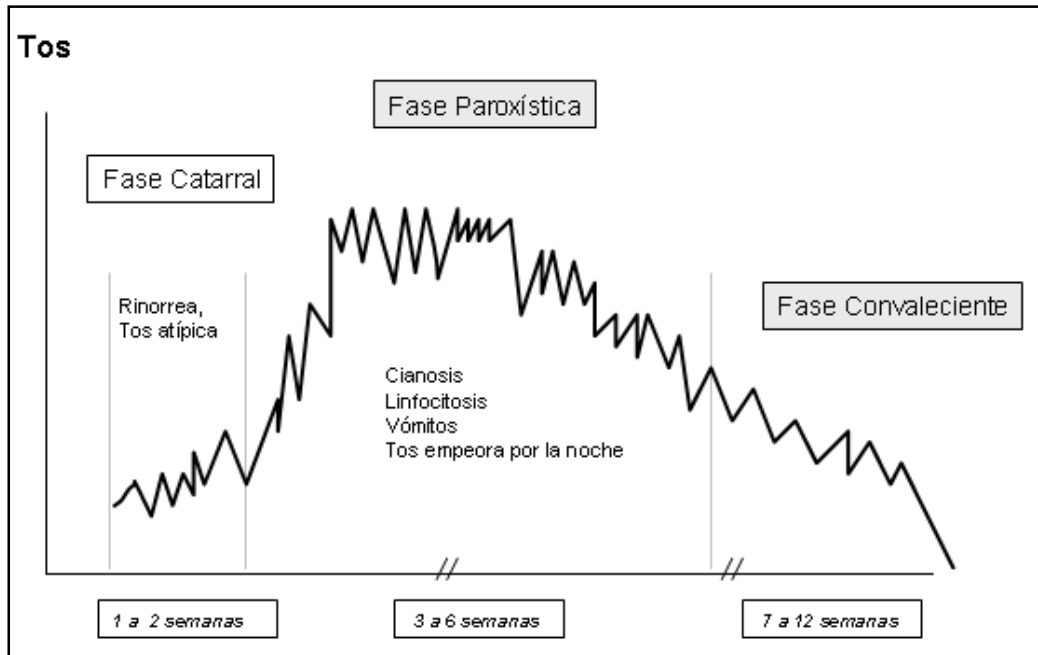


## Consideraciones Generales en el Cultivo y el Diagnóstico Molecular de Coqueluche.

*El objetivo de este documento es difundir las herramientas de laboratorio disponibles para realizar un diagnóstico certero de Coqueluche, mediante la utilización del cultivo y de las técnicas moleculares apropiadas.*

Coqueluche, pertussis o tos convulsa es una enfermedad respiratoria aguda causada por *B. pertussis*. Se caracteriza por paroxismos, estridor inspiratorio y vómitos posteriores a la tos. Se disemina de persona a persona por las gotitas de “flush”.

## Síntomas y signos según la etapa de progreso de la enfermedad Pertussis



Otras características importantes son:

- Fue declarada por la OMS como re-emergente.
- Según la OMS, durante 2008, esta enfermedad causó 16 millones de casos en todo el mundo y produjo la muerte de 195000 niños.
- Afecta principalmente a los menores de un año, especialmente aquellos que no han completado el esquema de vacunación, pero también a adolescentes y adultos.
- Se presenta con brotes epidémicos que se producen cada 3 – 5 años.
- *B. parapertussis* causa un cuadro similar con síntomas más leves.

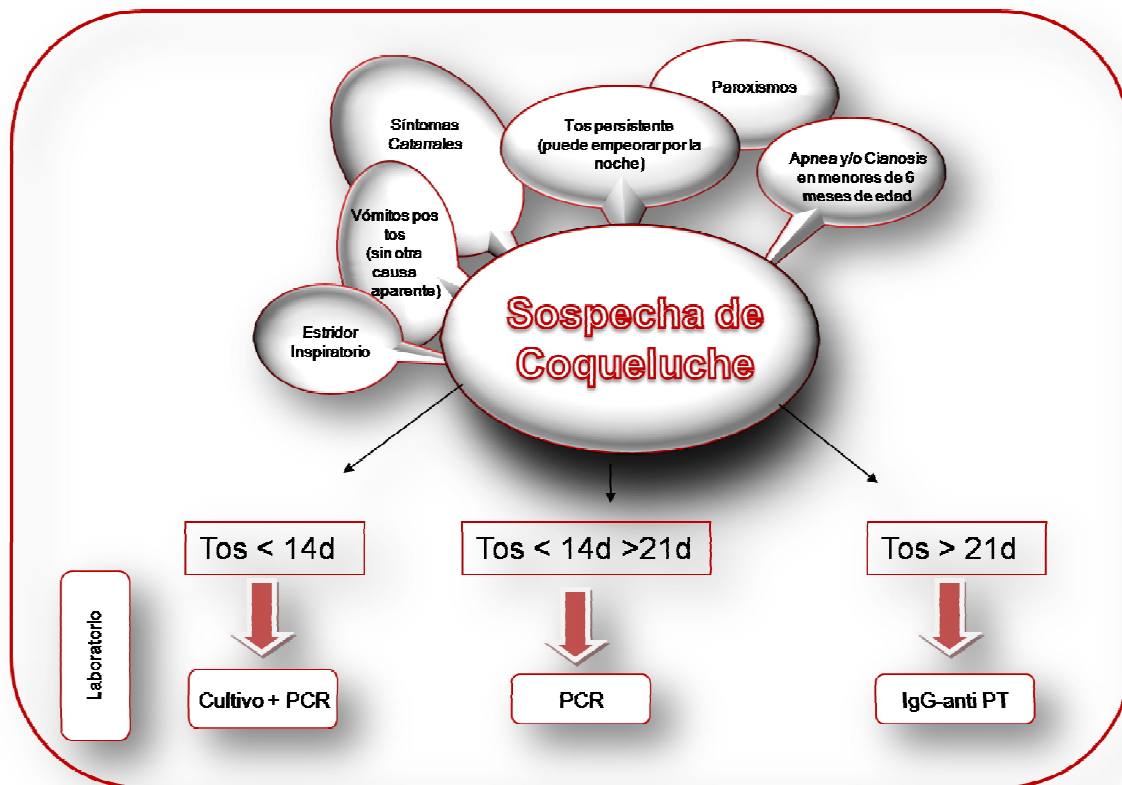
El diagnóstico de esta enfermedad puede realizarse por diversas metodologías cuya sensibilidad y especificidad dependen de factores tales como: el estadio de la enfermedad, la edad del paciente, el estado de vacunación, la previa recepción o no de tratamientos antimicrobianos apropiados.

Es importante resaltar el esfuerzo puesto en marcha desde hace ya algunos años para “armonizar” las metodologías diagnósticas con el fin de asegurar la calidad y la compatibilidad de los datos.

Las pruebas diagnósticas más frecuentemente utilizadas en el laboratorio para el diagnóstico de Coqueluche son el cultivo, las metodologías moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la serología.

La metodología diagnóstica de referencia es el cultivo, a partir de muestras nasofaríngeas extraídas en la fase catarral y en la fase paroxística temprana. Es una prueba muy específica, pero con baja sensibilidad (menos de 60%).

La técnica de PCR es una prueba más sensible y puede realizarse con las mismas muestras que las utilizadas para el cultivo.

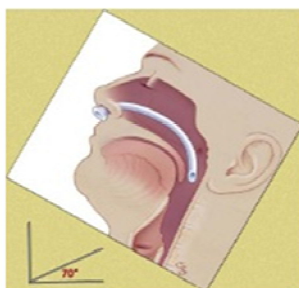


## 1. Recolección y transporte de la Muestra:

Tanto la toma de muestra como su transporte son pasos muy importantes a tener en cuenta y deben ser considerados pilares fundamentales en el correcto diagnóstico de la enfermedad.

### Recolección del espécimen biológico.

La muestra apropiada para el cultivo y las metodologías moleculares aplicadas al diagnóstico de Coqueluche es el **aspirado nasofaríngeo (ANF)**. También es aceptable el **hisopado nasofaríngeo (HF)** en hisopos de dacrón o nylon, aunque puede repercutir en menor sensibilidad. No pueden utilizarse hisopos de algodón porque inhiben el desarrollo de *B. pertussis*, ni tampoco de alginato de calcio porque inhiben las reacciones de PCR.



Aspirado  
Nasofaríngeo



Hisopado Nasofaríngeo

### Transporte

*B. pertussis* es sensible a la acción de ácidos grasos y de otros metabolitos que resultan tóxicos para su desarrollo, por ello tanto el transporte como el cultivo de las muestras requieren medios específicos.

Para realizar el cultivo, la muestra, ya sea ANF o HF, idealmente debería ser transportada inmediatamente al laboratorio de microbiología para ser cultivada en los medios apropiados. Si el cultivo no puede realizarse inmediatamente después de tomada la muestra, la misma (ANF o HF) debería ser enviada en medio de transporte adecuado, tal como Regan Lowe al 50% ó Amies modificado, mantenido a temperatura entre 2-8 °C.

Si sólo se van a emplear técnicas moleculares (reacción de PCR) para el diagnóstico de Coqueluche, entonces no es necesario el empleo de medio de transporte para la remisión de las muestras.

Cabe aclarar que el **cultivo** continúa siendo la **metodología de referencia** y que permite disponer de los aislados que circulan en nuestra población, los cuáles son fundamentales para realizar los estudios de **epidemiología molecular**.

## 2. Cultivo:



(\*) Tener en cuenta que si la muestra se cultiva en medio con agregado de cefalexina también debe ser cultivada en medio sin cefalexina, de modo de realizar el seguimiento de ambas placas hasta la finalización del cultivo.



### 3. Técnica de PCR

Para la detección molecular de *Bordetella* se han descripto una gran variedad de “targets” o blancos de amplificación, entre ellos: las secuencias de inserción *IS481*, *IS1001* e *IS1002* el promotor (ptxP) y el gen de la toxina pertussis (pTx-S1), el gen de porina, flagelina, pertactina y toxina adenilato ciclasa, el gen RecA, etc.

A continuación se muestran los targets más frecuentemente utilizados en las reacciones de PCR y el número de copias por genoma.

Target	Presente en	Nº copias por genoma*
<i>IS481</i>	<i>B. pertussis</i> <i>B. holmesii</i> <i>B. bronchiseptica</i>	50-200 8-10 <5
<i>IS1001</i>	<i>B. parapertussis</i> <i>B. holmesii</i> Algunas <i>B. bronchiseptica</i> Existen diseños específicos para <i>B. parapertussis</i> ( <i>pIS1001</i> ) y <i>B. holmesii</i> ( <i>hIS1001</i> )	20 1-7
ptxP (promotor de la Toxina)	<i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> y <i>B. bronchiseptica</i> . Hay ensayos específicos para <i>B. pertussis</i> que utilizan esta región y son los mejores caracterizados para este agente.	1
pTx-S1 (subunidad 1 de la Toxina)	<i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> y <i>B. bronchiseptica</i> . No hay ensayos específicos de especie.	1
RecA	<i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>B. holmesii</i> y <i>B. bronchiseptica</i> . Existen diseños específicos para <i>B. bronchiseptica</i> y <i>B. holmesii</i> .	1

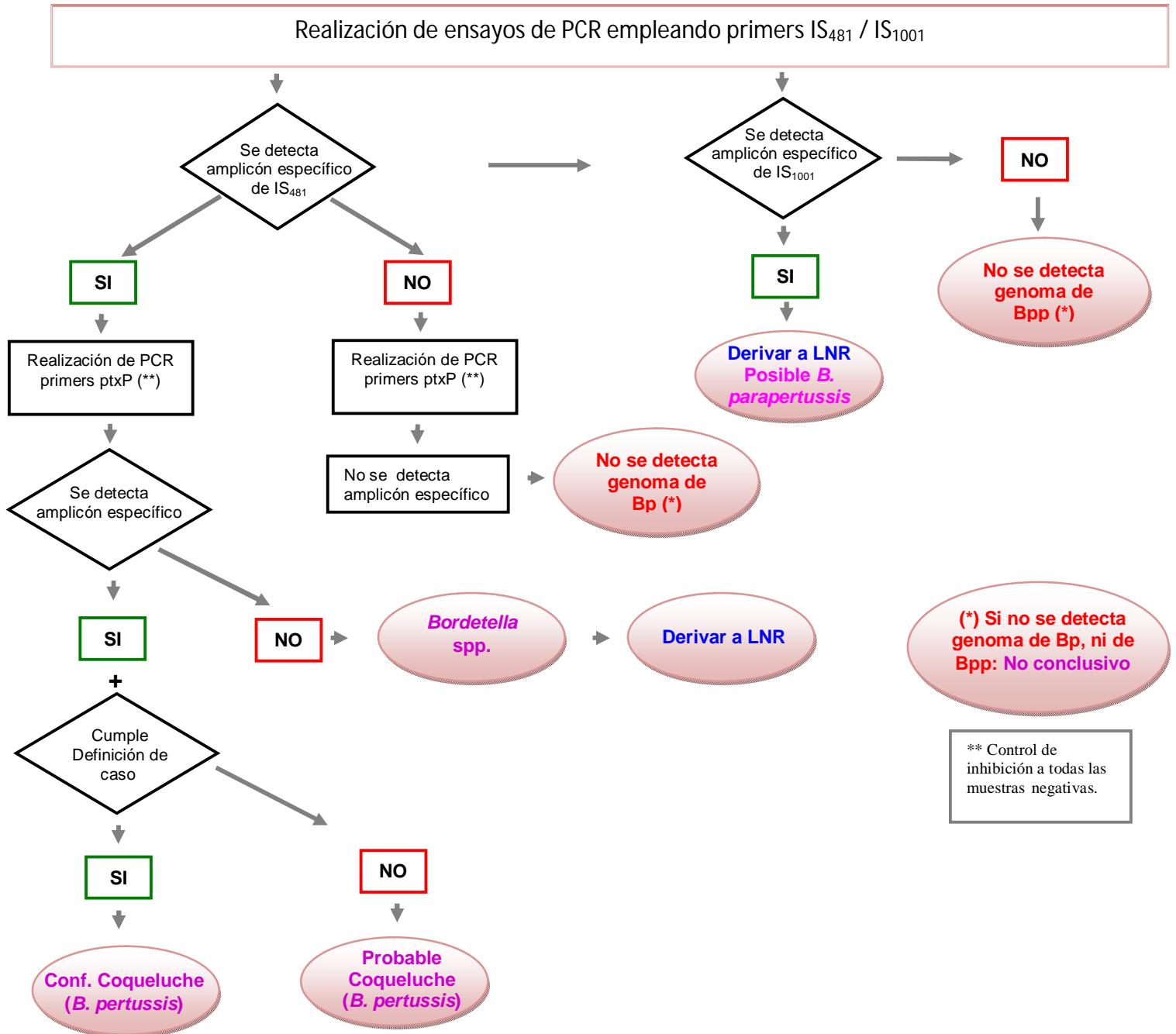
Las secuencias de inserción *IS481* e *IS1001* son frecuentemente utilizadas en los primeros pasos de la detección de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Como se mencionó antes, las secuencias de inserción se encuentran en número variable de copias en las diferentes especies de *Bordetella*, mientras que “targets” tales como el promotor del gen de la toxina pertussis, la toxina pertussis, etc. son genes de copia única. Este hecho repercute en la sensibilidad de las PCRs. Aquellas que utilizan como blanco de amplificación *IS481/IS1001* presentan mayor sensibilidad que las que emplean genes de copia única.

Es necesario resaltar que:



**La detección molecular de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* requiere la utilización de más de un “target” para poder realizar un diagnóstico sensible y específico.**

Desde el LNR se recomienda utilizar el siguiente algoritmo de rutina para la detección de *B. pertussis* y el “screening” de *B. parapertussis*.



En el Servicio de Bacteriología Clínica, LNR de Pertussis, para la confirmación de *B. parapertussis* y *B. holmesii* se utiliza el formato de PCR en Tiempo Real desarrollado por el CDC. Según este esquema la interpretación de los resultados es la siguiente:

**Algoritmo para el ensayo multitarget de PCR en Tiempo Real**

TARGETS				
Ensayo Multiplex			Ensayo simple	
IS481	p - IS1001	h - IS1001	pTx-S1	
Pos	Neg	Neg	Pos	<i>B.pertussis</i>
Pos	Neg	Neg	Neg	<i>Bordetella spp</i>
Neg	Pos	Neg	Pos	<i>B.parapertussis</i>
Pos	Neg	Pos	Neg	<i>B.holmesii</i>
Pos	Pos	Neg	Pos	<i>B.pertussis</i> + <i>B.parapertussis</i>
Pos	Neg	Pos	Pos	<i>B.pertussis</i> + <i>B.holmesii</i>



La detección específica de anticuerpos anti-PT en suero de individuos infectados luego de dos o tres semanas de tos, es un método indirecto. Sin embargo, no es aplicable en infantes ya que presentan un sistema inmune inmaduro y los anticuerpos maternos pueden interferir en el ensayo así como tampoco es aplicable a pacientes que recibieron la vacuna en un periodo inferior a un año.

Servicio de Bacteriología Clínica – INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán:  
Laboratorio Nacional de Referencia de Coqueluche

Jonathan Zintgraff  
Claudia Lara

E-mail: [jzintgraff@anlis.gov.ar](mailto:jzintgraff@anlis.gov.ar)

E-mail: [cslara@anlis.gov.ar](mailto:cslara@anlis.gov.ar)