

DIAGNÓSTICO DE TOS CONVULSA POR TÉCNICAS DE CULTIVO Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Ochoa Andrea Daniela¹, Vidal Delgado Carolina², Buggia Virginia Elena³, Cortes Paulo³,
Barbero Paula F⁴, ZucottiAgostina¹, Vercelli Beatriz¹, Berruezo Fabiana¹, Bottiglieri
Marina¹.**

¹ Servicio de Microbiología - Clínica Universitaria Reina Fabiola – Córdoba - Argentina

**² Servicio de Microbiología - Hospital de Niños de la Santísima Trinidad– Córdoba -
Argentina**

³ Servicio de Microbiología - Hospital Pediátrico del Niño Jesús– Córdoba - Argentina

**⁴ Programa de Inmunizaciones del área de Epidemiología – Ministerio de Salud - Córdoba
- Argentina**

**Correspondencia: Ochoa Andrea Daniela. Laboratorio de Microbiología, Clínica
Universitaria Reina Fabiola. Oncativo 1248, Córdoba. Tel: 03544-15446046 -
andreochoa.8a@gmail.com**

RESUMEN

La tos convulsa o coqueluche es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa causada por *Bordetella pertussis*. Esta enfermedad inmunoprevenible ha resurgido en las últimas décadas y afecta a todos los grupos etarios pero con mayor gravedad a los lactantes menores de 6 meses. Para el diagnóstico de laboratorio existen diferentes metodologías que no son excluyentes entre sí. El cultivo es la metodología de referencia. En los últimos años se ha introducido de las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de genotipificar los aislamientos clínicos circulantes ya que podrían en parte explicar el resurgimiento de la enfermedad. Los objetivos del presente trabajo fueron describir los resultados obtenidos por técnicas de PCR y cultivo, y las características clínicas de pacientes con sospecha de coqueluche.

Se estudiaron 245 aspirados nasofaríngeos de pacientes pediátricos con sintomatología compatible con tos convulsa. Veinte pacientes (8,2%) dieron resultado positivo por alguna de las dos metodologías, 19/20 (95.0%) fueron positivos por PCR, de los cuales ocho (40%) también fueron positivos por cultivo y sólo uno (5.0%) arrojó un resultado positivo por cultivo y PCR negativa. El 35.0% de los casos fue en niños menores de 2 meses, y el 70.0 % en menores de 6 meses. Los signos y síntomas como la tos, paroxística o no y los síntomas catarrales fueron los predominantes, las complicaciones como la neumonía y las convulsiones se presentaron en un solo paciente cada una y hubo una muerte. Entre los pacientes con confirmación de coqueluche, el 64.0% (13 /20) tenían vacunación completa acorde a la edad.

En una segunda etapa del trabajo los aislamientos serán enviados para su estudio molecular con el objetivo de evaluar si las cepas circulantes están presentes en la vacuna que se aplica actualmente.

Palabras Clave : coqueluche, aspirado nasofaríngeo, aislamientos clínicos.

INTRODUCCIÓN

La tos convulsa o coqueluche es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa que afecta tanto a la población pediátrica como a adolescentes y adultos. Esta enfermedad inmunoprevenible es causada por *Bordetella pertussis*. La transmisión es de persona a persona a través de gotitas de Pflügge o por contacto directo con las secreciones de las vías respiratorias de las personas infectadas. La sintomatología de la enfermedad varía con la edad del paciente, el estado de vacunación, el tratamiento con antibióticos y la co-infección con otros microorganismos (1,2)

Actualmente el género *Bordetella* incluye diez especies siendo *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* las más prevalentes. El principal agente etiológico de la enfermedad es *B. pertussis*, aunque también se han descrito casos con sintomatología similar en los que el agente causal es *B. parapertussis* y más recientemente *B. holmesii* (3-5).

El curso clínico de la enfermedad puede dividirse en tres etapas: catarral, paroxístico y convaleciente (6). Después de un período de incubación de cinco a diez días, con un límite máximo de 21 días, la enfermedad comienza con la denominada fase catarral. Esta fase tiene una duración de una a dos semanas y por lo general se caracteriza por la presencia de rinorrea, y tos progresiva. Al final de la fase catarral, puede observarse una leucocitosis con linfocitosis absoluta. En la fase paroxística posterior, *B. pertussis* causa tos severa y espasmódica, estridor inspiratorio y a menudo cianosis y vómitos. Durante la primera o segunda semana, la frecuencia de los ataques de tos va en aumento y luego se mantiene para ir disminuyendo gradualmente. La fase paroxística suele durar entre una a seis semanas, pero puede persistir hasta 10 semanas. Los niños pequeños menores de seis meses de edad pueden no tener la fuerza para hacer el sonido característico de la enfermedad. En ellos los paroxismos pueden estar ausentes y los períodos de apnea presentes (6). La fase de convalecencia, que generalmente dura entre una a tres semanas, se caracteriza por una disminución gradual y continua de la tos. La fiebre

en general está ausente o es mínima a lo largo de toda la enfermedad. Los casos más graves requieren de hospitalización, y pueden presentar complicaciones e incluso ser mortales. Las complicaciones más importantes son la bronconeumonía, convulsiones, encefalopatía aguda, daño cerebral permanente y muerte. Los adultos y adolescentes con algún grado de inmunidad pueden presentar tanto síntomas leves como la típica tos paroxística prolongada. En todas las personas, la tos puede persistir durante meses (7).

La implementación de la vacunación masiva en la población, a mediados del siglo pasado, logró reducir significativamente la morbimortalidad asociada con la enfermedad. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto un aumento de los casos de tos convulsa, incluso entre poblaciones con altas coberturas de vacunación (8,9). Las causas de esta situación epidemiológica se siguen debatiendo aunque se ha aceptado que mejoras en la vigilancia, la disminución de la inmunidad inducida ya sea por vacunación o adquirida de forma natural y la adaptación del patógeno *B. pertussis* a la vacunación podrían ser las principales causas del incremento registrado (10).

El diagnóstico clínico de la enfermedad en general se realiza de acuerdo con criterios recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (11). En Argentina, desde el nivel central y basado en los criterios de la OMS, se han consensuado a partir del 2010 las siguientes definiciones clínicas de caso según la edad del paciente (12):

- Menores de 6 meses: Toda infección respiratoria aguda, con al menos uno de los siguientes síntomas: apnea, cianosis, estridor inspiratorio, vómitos después de toser o tos paroxística.
- Mayores de 6 meses hasta 11 años: Tos de 14 o más días de duración acompañado de uno o más de los siguientes síntomas: tos paroxística, estridor inspiratorio o vómitos después de la tos, sin otra causa aparente.

- Mayores de 11 años: tos persistente de 14 o más días de duración, sin otra sintomatología acompañante.

Un caso se considera confirmado cuando se obtiene alguna de las siguientes condiciones:

- Paciente con tos de cualquier duración y cultivo positivo
- Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) positiva con clínica compatible
- Seroconversión con clínica compatible
- Clínica compatible más nexo epidemiológico confirmado por laboratorio.

El diagnóstico molecular basado en PCR es una excelente técnica que da oportunidad para la acción rápida sobre el caso y los contactos obteniendo resultados rápidos y con grandes posibilidades de positividad en la fase característica de la enfermedad y permite la identificación de otras especies. Todo esto sumado a su alta sensibilidad (70-99%) y especificidad (80-100%). La técnica de cultivo sigue siendo el “gold standard” con una especificidad del 100% pero con baja sensibilidad que varía entre 12-60% lo cual significa una desventaja a la hora de elegirla como técnica de diagnóstico en el laboratorio (13, 23). Sin embargo la realización de cultivo tiene gran impacto en la salud pública sobre todo en la sospecha de brotes y en el estudio de la población bacteriana circulante.

Aunque *B. pertussis* no requiere un medio de cultivo complejo, resulta difícil de cultivar debido a que es extremadamente lábil, nutricionalmente exigente, de lento crecimiento y requieren de personal entrenado para su recuperación. El procesamiento de las muestras debe hacerse bajo campana de bioseguridad (14, 15).

Los objetivos del presente trabajo fueron describir los resultados obtenidos por técnicas de PCR y cultivo, y las características clínicas de pacientes con sospecha de coqueluche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, analítico y transversal, en el período comprendido entre abril de 2016 hasta abril del 2017. Se estudiaron pacientes pediátricos que presentaron sospecha o diagnóstico clínico de coqueluche provenientes del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Hospital Pediátrico del Niño Jesús y Clínica Universitaria Reina Fabiola.

Los criterios de inclusión fueron:

- Niños menores de 6 meses con diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda, con al menos uno de los siguientes síntomas: apnea, cianosis, estridor inspiratorio, vómitos después de toser y tos paroxística.
- Niños mayores de 6 meses hasta 11 años con tos de 14 o más días de duración acompañado de uno o más de los siguientes síntomas: tos paroxística, estridor inspiratorio o vómitos después de la tos, sin otra causa aparente.

El criterio de exclusión fue pacientes que aún cumpliendo con los criterios de inclusión, se negaron a firmar el consentimiento informado.

La muestra estudiada fue el aspirado nasofaríngeo tomado con una sonda nasogástrica por las fosas nasales hasta la pared posterior de la faringe. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 24 hs. Se sembraron bajo campana de flujo laminar en dos placas de agar Bordet-Gengou, una con Anfotericina B y otra sin la droga, para evitar el crecimiento de hongos contaminantes. Se incubaron a 37°C en atmósfera aeróbica hasta 14 días. Para el control de calidad se contó con la cepa *B.pertussis* Tohama fase I suministrada por el Laboratorio Nacional de Referencia INEI ANLIS Malbrán.

Las colonias compatibles con las características morfológicas de *Bordetella spp.* se repicaron en Agar Bordet-Gengou (16) y se les hizo la coloración de Gram. Se efectuaron las siguientes pruebas iniciales de identificación bioquímica: producción de oxidasa, catalasa y ureasa (17).

Luego se efectuó la identificación bacteriana por espectrometría de masa (MALDI-TOF) y se enviaron las cepas al Laboratorio de La Plata para su identificación molecular y posteriores estudios genotípicos.

Al mismo tiempo las muestras se analizaron por la técnica de PCR convencional en el Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba donde se realizó la detección de dos genes: la secuencia de inserción IS481 y la secuencia del promotor toxina *pertussis* (PT). Este mismo método es el que se llevó a cabo para la identificación molecular de las cepas aisladas por cultivo y se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia Pertussis, La Plata, Argentina.

RESULTADOS

Se estudiaron 245 pacientes con edades comprendidas entre un mes y los cinco años de vida, el 56,7% (139/245) fueron de sexo masculino y el 33,1% (81/245) menores de dos meses de vida. El 74,7% (183/245) fue de Córdoba Capital y el resto de alguna localidad del interior de la Provincia. Del total de pacientes estudiados, 8,2% (20/245) fueron casos confirmados de tos convulsa por alguna o ambas técnicas diagnósticas. De los casos positivos, no hubo diferencias en cuanto al sexo, el 35,0% (7/20) fueron menores de dos meses y el 70,0% menores de 6 meses.

Los datos clínicos de los pacientes positivos se encuentran en la Tabla 1. De los 20 pacientes con tos convulsa, 19 no habían recibido ningún antibiótico previo a la toma de muestra y a 10 de ellos se les instauró tratamiento antibiótico con Claritromicina inmediatamente después de la toma de la muestra. De 14 pacientes donde se pudo constatar el dato de vacunación, nueve estaban vacunados con la vacuna Pentavalente, el 66,7% (6/9) llevaban un esquema acorde a la edad y el 33,3% (3/9) llevaban colocada una dosis menos de lo correspondiente según el calendario de vacunación. En tres madres de los niños con resultado positivo, se pudo

constatar que habían recibido vacunación durante el embarazo, en el resto no se pudo obtener el dato.

Tabla 1: Signos, síntomas y complicaciones en los pacientes positivos (N^o=20).

Signos, síntomas y complicaciones.	n^o (%)
Tos	17(85)
Tos Paroxística	14(70)
Estridor	3(15)
Apnea	7(35)
Cianosis	12(60)
Vómitos	9(45)
Síntomas Catarrales	15(75)
Convulsiones	1(5)
Neumonía	1(5)
Letalidad	1(5)
Leucocitos>20000mm ³	14(70)
Linfocitos>70%	2(10)

La incidencia estacional mostró dos picos anuales, uno en mayo 2016 y otro en enero 2017.

La Tabla 2 describe los resultados de las técnicas utilizadas en el diagnóstico de los pacientes con sospecha clínica de coqueluche.

Tabla 2: Resultados del cultivo y PCR en los casos confirmados de coqueluche (Nº=20)

		CULTIVO	
		+	-
PCR	+	8	11
	-	1	0

Los cultivos en medio de agar Bordet-Gengou tardaron de 4 a 13 días en desarrollarse. Las colonias fueron inicialmente pequeñas, betahemolíticas, ligeramente grisáceas y con la prolongación de la incubación aumentaron de tamaño y adquirieron el brillo característico de gotitas de mercurio. En la tinción de Gram se observó en todos los casos cocobacilos gram negativos pálidos y pequeños, catalasa y oxidasa positivas y urea negativa. En cuanto a la identificación de las cepas obtenidas por cultivos, 3/9 fueron identificadas por MALDI-TOF como *Bordetella bronquiseptica* y 6/9 como *Bordetella pertussis*. Por técnicas moleculares todas fueron identificadas como *Bordetella pertussis*.

DISCUSIÓN

La tos ferina continúa siendo un importante problema de salud pública.

En nuestra serie, se confirmó la detección de *Bordetella pertussis* en el 8,2 % de los casos sospechosos, porcentaje inferior al presentado por el programa SIVILA que a nivel país

confirma el 26% de los casos (18) y en otro reporte argentino (13) se obtuvo un 38% de confirmación.

El 35,0% de los casos fue en niños menores de 2 meses, y el 70,0% en menores de 6 meses, datos coincidentes con el registro nacional de Argentina año 2016 (18). El aumento de los casos de tos ferina en los últimos años, incluso entre poblaciones con gran cobertura vacunal y sobre todo a expensas del incremento de casos declarados en niños mayores, adolescentes y adultos requiere de estudios epidemiológicos para conocer la situación de la región.

Entre los pacientes con confirmación de coqueluche, el 64,0% (13/20) tenían vacunación completa acorde a la edad. Este dato sugeriría las posibles adaptaciones de las cepas o el surgimiento de nuevos genotipos no contenidos en la vacuna.

Se observó una estacionalidad en otoño y primavera-verano, similar a lo informado en otros países (13). En nuestro estudio los signos y síntomas como la tos, paroxística o no y los síntomas catarrales fueron los predominantes y coinciden con la literatura consultada. (13). De los 20 casos estudiados las complicaciones como la neumonía y las convulsiones sólo se presentaron en un solo paciente cada una; las convulsiones son variables de acuerdo a los diferentes reportes y en nuestro estudio ocurrió en el paciente que falleció. Este tenía dos meses de edad, presentó leucocitosis superior a 30.000/mm³ y no pudo determinarse su status vacunal (13,19). Según muchos autores la hiperleucocitosis al ingreso debería considerarse un predictor de riesgo de evolución desfavorable (13).

En los países desarrollados se confirma la tos convulsa en más del 50% de los casos y, en muchos de ellos, no sólo se utiliza de rutina la PCR sino también el cultivo, método que tiene alta especificidad (20, 23). Comparado con otros países, en Argentina no es frecuente la realización del cultivo debido a su complejidad y costo, sin embargo cabe destacar la importancia del aislamiento de la bacteria no sólo para diagnóstico sino para estudios posteriores. Los resultados de las distintas técnicas de diagnóstico pueden no coincidir ya que cada una de ellas depende diferencialmente de factores. En el único caso que se obtuvo cultivo

positivo y PCR negativa no se encontró un factor específico que justifique dicho resultado pero si podemos decir que la PCR si bien tiene alta sensibilidad y la especificidad está dada por los primers y las condiciones de reacción, existen falsos negativos que pueden evitarse con estrictos controles. De los 11 casos con PCR positiva y cultivo negativo, ninguno había recibido antimicrobianos previos a la toma de la muestra, pero otros factores como el estado inmunológico, la calidad de la muestra, la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente a la hora de la toma de muestra, pueden haber influido en un resultado de cultivo negativo. En este último caso lo óptimo para favorecer el crecimiento bacteriano es la toma de muestra dentro de las tres semanas del inicio de los síntomas. Las características culturales y el tiempo de desarrollo bacteriano (habitualmente entre 2 y 10 días) fueron acordes a lo descrito en la literatura (21), con la excepción de un cultivo que se positivizó a los 13 días de incubación. Si bien la identificación definitiva previa a la confirmación molecular fue por espectrometría de masa (MaldiToF), las pruebas bioquímicas preliminares realizadas a los cultivos (oxidasa, catalasa y urea) fueron acordes al género y especie confirmados luego por los métodos moleculares. El sistema MaldiToF arrojó resultados discordantes en tres cepas, identificadas erróneamente como *B. bronchiseptica* y confirmadas molecularmente como *B. pertussis*. En estos tres casos, el diagnóstico molecular directo sobre la muestra clínica informó *B. pertussis*.

Por medio de técnicas moleculares de las bacterias aisladas por cultivo, es posible conocer los genotipos circulantes y relacionarlos con aquellos que están incluidos en la vacuna para lograr un mejor control de la enfermedad. Se necesitan estudios ulteriores para conocer la epidemiología de nuestra región.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dotres Martínez C, Vega Mendoza D, Toraño Peraza G, Álvarez Carmenate M, Broche Morera A. Síndrome coqueluchoide y tos ferina. *Revista Cubana de Medicina General Integral* 2012; 28: 725-34.
2. Pesco P, Bergero P, Fabricius G, Hozbor D. Estudio de la resurgencia de pertussis y estrategias de vacunación: modelado y simulación computacional. *Investigación Joven* 2015. Disponible en <https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/1316>. Consultado el 27/11/16
3. Cherry JD, Seaton BL. Patterns of Bordetella parapertussis respiratory illnesses: 2008-2010. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012; 54:534-7.
4. Bottero D, Griffith MM, Lara C, Flores D, Pianciola L, Gaillard ME, et al. Bordetella holmesii in children suspected of pertussis in Argentina. *Epidemiology and infection* 2013;141:714-7.
5. Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H. Bordetella holmesii-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerging infectious diseases* 1999; 5:441-3.
6. Ministerio de Salud. Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles. Alerta epidemiológico tos convulsa: Aumento de casos y muertes. 2012. En http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000454cnt-2013-10_alerta-n01-tos-convulsa-2012.pdf; consultado el 27/11/2016.
7. Centro para el control y la prevención de enfermedades (CDC) 2015. En <https://www.cdc.gov/pertussis/about/signs-symptoms-sp.html>; consultado el 25/01/17
8. Hewlett EL, Edwards KM. Pertussis-Not just for kids. *N Engl J Med*. 2005; 352:1215-22.
9. Poynten M, McIntyre PB, Mooi FR, Heuvelman KJ, Gilbert GL. Temporal trends in circulating Bordetella pertussis strains in Australia. *Epidemiol Infect* 2004;132:185-93.
10. Gentile A, Romanin V. ¿Podemos controlar la infección por Bordetella pertussis en Argentina? Nuevas estrategias. *Rev Hosp Niños B Aires* 2012; 236:297-303.

11. Department of vaccines and biologicals. WHO-Pertussis surveillance, a global meeting, Geneva. World Health Organisation. Geneva. WHO/V&B/01.99. 2001.
12. Coqueluche, Tos convulsa o Pertussis. Ministerio de salud de la Nación, Argentina. En: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/pdf/coqueluche-recomendaciones-definiciones.pdf>; consultado el 10/11/2016.
13. Gentile Á, Romanin VS, Juárez MDV, Lución M, Marques M DLÁ, Mistchenko AS. Epidemiología de Bordetella pertussis en un hospital pediátrico. Archivos argentinos de pediatría 2012;112:26-32.
14. García-Martínez J, Chaves f, Salto E, Otero JR. Bordetella pertussis detection by real-time PCR, immunofluorescence and culture: prospective evaluation and molecular epidemiology. 2006;24: 500-4.
15. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of Bordetella. J Clin Microbiol 1977;6:303-3.
16. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, et al. Global Population Structure and Evolution of Bordetella pertussis and Their Relationship with Vaccination. mBio. 2014;5: 1-13.
17. Wirsing von König CH, Riffelmann M, Coenye T. Bordetella and Related Genera. En "Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Louise Landry M, Warnock DW. Manual of Clinical Microbiology, 10th edition, Vol1". Washington, DC 20036-2904, USA 2011;43:739-45.
18. Área de Vigilancia de la Salud de la Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud de la Nación. Boletín integrado de vigilancia. Secretaria de promoción y programas sanitarios 2016: 309-SE 19.
19. Mooi FR, Zeddeman A, van Gent M. The pertussis problem: classical epidemiology and strain characterization should go hand in hand. J Pediatr (Rio J) 2015;91:315-7.
20. Quian J, Cerisola A, Russomano F, Fernández A, Cappeta M, Uriarte R., Mogdacy C, Romero C, Carugarri MJ, Rüttimann, R. Infecciones por Bordetella pertussis en niños menores

de un año hospitalizados y sus contactos del hogar. Archivos de Pediatría del Uruguay 2006; 77: 229-36.

21. José Molina López. Universidad Autónoma de México. En <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tosferina.html>; consultado el 20/03/2016.

22. Retrato microbiológico. Bordetella pertussis. En <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v25n2/art05.pdf>; consultado el 10/05/2016.

23. Sensitivity and specificity values obtained from Wendelboe and Van Rie. 2006. En <http://henrico.us/assets/Summary-of-Diagnostic-Tests-for-Pertussis.pdf>; consultado el 11/02/2017.