

# Identificación de un caso de tos ferina y estudio de sus contactos.

## Utilidad de la PCR y del cultivo

**Guillermina Romero-Quechol,<sup>1</sup>**  
**Patricia Tomé-Sandoval,<sup>2</sup>**  
**Laura del Pilar Torres-Arreola,<sup>1</sup>**  
**Héctor Guisafre-Gallardo,<sup>1</sup>**  
**Blanca Leños-Miranda<sup>3</sup>**

### RESUMEN

**Objetivo:** describir el estudio de un caso de tos ferina y sus contactos familiares en el municipio de Apizaco, en Tlaxcala, México.

**Caso clínico:** a partir de la identificación de un caso de neumonía en un niño de cinco años con esquema incompleto de vacunación de DPT se confirmó el diagnóstico de tos ferina con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cultivo. Se realizó un estudio de contactos familiares. Se obtuvieron 20 muestras por duplicado para las mismas pruebas.

**Resultados:** la edad promedio de los contactos fue de 26.5 años, 50 % fue del sexo femenino y 62 % no contaba con seguridad social; 30 % tenía tres dosis de DPT. 35 % fue positivo a la PCR y de éstos 20 % a cultivo.

**Conclusiones:** es importante resaltar que ante la presencia de un cuadro de neumonía en un niño menor de cinco años, el médico tiene que averiguar los antecedentes de vacunación de DPT, y ante un cuadro incompleto, con sintomatología sugestiva, realizar el estudio epidemiológico.

### SUMMARY

**Objective:** to describe an epidemiological study of one case of pertusis.

**Clinical case:** a five-year old boy was diagnosed with pneumonia and he had incomplete DPT vaccination scheme; pertusis was diagnosed by using the PCR technique and culture. An epidemiological study with family contacts was carried out, in which 20 samples for both tests were obtained. These were taken twice. **Results:** The average age of the family members was 26.5 years, 50 % were women, 62 % did not have social security and 30 % had three doses of DPT. 35 % were positive to PCR and, 20 % out of these had positive cultures.

**Conclusions:** in children smaller than five years suffering from pneumonia, is relevant to ascertain about DPT vaccination status and to consider the possibility of carrying out an epidemiological study with the family.

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)  
<sup>2</sup>División de Desarrollo de la Investigación, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS  
<sup>3</sup>Instituto Tlaxcalteca de Asistencia Especializada a la Salud, Secretaría de Salud, Tlaxcala, Tlaxcala

Comunicación con:  
Guillermina Romero-Quechol.  
Tel: 5627 6900, extensión 21072, 21075, 21076.  
Correo electrónico: guillermina.romero@imss.gob.mx

## Introducción

En algunos casos, el diagnóstico de tos ferina es difícil de establecer clínicamente con certeza puesto que la sintomatología no sigue un curso bien definido. El cuadro clínico típico de tos ferina en niños está caracterizado por tos intensa paroxística, en accesos cianóticos, emetizante y con un estridor inspiratorio final (coqueluchoide), fiebre ocasional, apnea y vómito. En adolescentes y adultos jóvenes la sintomatología es variada y puede presentarse desde un cuadro respiratorio leve y atípico

hasta el cuadro clínico típico. Además, se ha observado la presencia de *Bordetella pertussis* en adolescentes y adultos inmunizados, lo que indica una disminución o desaparición de la inmunidad.<sup>1-3</sup>

La transmisión es principalmente por contacto directo con las secreciones de la mucosa de las vías respiratorias de las personas infectadas que la diseminan. Suele ser contagiada en el núcleo familiar por alguno de los hijos mayores y a veces por alguno de los padres, durante la fase catarral temprana, antes de la fase paroxística.<sup>4</sup> El tratamiento antimicrobia-

### Palabras clave

- ✓ tos ferina
- ✓ reacción en cadena de la polimerasa
- ✓ técnicas de laboratorio clínico

### Key words

- ✓ whooping cough
- ✓ polymerase chain reaction
- ✓ clinical laboratory techniques

no específico es la eritromicina que acorta el periodo de transmisibilidad cuando se administra durante la incubación al comienzo de la fase catarral en los primeros 14 días, tratamiento que debe incluir a los contactos familiares.<sup>5</sup> En la actualidad existe un gran número de pruebas de laboratorio para confirmar el diagnóstico clínico; pero debe sospecharse la presencia de este agente etiológico en los pacientes con tos repetitiva y prolongada. El diagnóstico se realiza con el aislamiento de *Bordetella pertussis* en 90 % de los casos y en menor frecuencia *Bordetella parapertussis* que causa una enfermedad semejante, por lo general más leve.

Existen varios métodos para la identificación de *Bordetella pertussis*, entre los cuales se encuentra el cultivo nasofaríngeo, la serología y métodos de biología molecular.

El cultivo nasofaríngeo de *Bordetella pertussis* puede realizarse durante la fase catarral y paroxística temprana. El resultado positivo de esta prueba depende de factores tales como la concentración bacteriana y el tiempo de evolución.<sup>6</sup> Las pruebas rápidas como serologías, inmunofluorescencia directa y ELISA son más sensibles que el cultivo, pero con frecuencia el resultado positivo es falso. En la actualidad, el uso de técnicas de biología molecular es una

alternativa útil con buena sensibilidad y especificidad, además de la rapidez en el diagnóstico y seguimiento oportuno, por lo que es una excelente alternativa en casos de brotes.<sup>7,8</sup>

Entre los métodos de biología molecular, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de *Bordetella pertussis* ya que es más sensible que el cultivo y la serología en la fase paroxística y puede ser procesada en uno o dos días. Diferentes secuencias blanco han sido reportadas, sin embargo, algunos investigadores señalan la secuencia de inserción IS481 como blanco idóneo para la detección de *Bordetella pertussis* por su alto número de copias en el genoma de 80-100.<sup>9-14</sup>

El análisis del cromosoma de *Bordetella pertussis* por técnicas de electroforesis de gel de campos pulsados (PFGE) ha demostrado ser una buena herramienta epidemiológica, con reproducibilidad para esta bacteria y otras para definir ampliamente el origen de una clona común.<sup>15-17</sup> El inconveniente es la falta de estandarización en los procedimientos de comparación de los datos que registra cada laboratorio.

El objetivo de este trabajo es describir el estudio de un caso de tos ferina y sus contactos familiares en el municipio de Apizaco en Tlaxcala, México.



**Figura 1. Placa de tórax de caso índice con diagnóstico radiológico de neumonía**

## Caso clínico

En el mes de noviembre de 2004 acudió a consulta una madre con su hijo de cinco años de edad al Instituto Tlaxcalteca de Asistencia Especializada a la Salud, de la Secretaría de Salud, con cuadro clínico de neumonía. Los datos clínicos que hicieron sospechar tos ferina fueron: cuadro catarral, tos paroxística, espasmódica, cianótica y en ocasiones emetizante, con estridor respiratorio final y un tiempo de evolución de 40 días, además de un esquema de vacunación incompleto (dos dosis de DPT). Se realizó estudio radiológico, el cual mostró datos de neumonía de etiología infecciosa (figura 1). Se tomó muestra de exudado nasal, procesada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cultivo.

A la madre del menor se le aplicó un cuestionario para obtener información sobre la

evolución de la enfermedad del niño y aspectos sociodemográficos.

Se acudió al domicilio del menor para realizar estudio de contactos familiares. Se tomaron muestras de exudado nasal con hisopo de dacrón para cultivo y PCR. Además, se les aplicó un cuestionario de seguimiento epidemiológico para obtener información sobre algunas variables como antecedentes de vacunación de DPT y datos sociodemográficos y clínicos.

Las muestras fueron trasladadas en hielera *lab top colest* a una temperatura de menos 20 °C al Instituto para su procesamiento, el cual estuvo a cargo de una química experta en la técnica de PCR.

### Procedimiento de las pruebas de laboratorio

El diagnóstico fue confirmado por PCR. Se obtuvieron 20 muestras de exudado nasofaríngeo por duplicado. Una toma se depositó en 100 µL de agua inyectable estéril libre de DNAsa y RNAsa y se conservó a -20 °C para PCR y otra en medio de Regan y Lowe<sup>18</sup> para el cultivo, las cuales se transportaron en un tiempo menor a cuatro horas para su análisis. Las muestras fueron sembradas en agar Bordet Gengou; se incubaron por seis días a 35 °C. A las colonias sospechosas de *Bordetella pertussis* se les realizó la tinción de Gram, prueba de catalasa, citocromo oxidasa, crecimiento en agar Mac Conkey y pruebas bioquímicas de urea, movilidad, fermentación de carbohidratos y de aglutinación con antisueros específicos.<sup>19</sup>

Las muestras de exudado nasofaríngeo para PCR fueron procesadas, al igual que una suspensión bacteriana de las cepas control (positivo de *Bordetella pertussis* ATCC 9797 y aislamientos clínicos); en todas las muestras se hizo extracción de DNA con Aqua Pure Genomic DNA Isolation Kit (BIO-RAD).

El fragmento de la secuencia de inserción IS481 de *Bordetella pertussis* se detectó por PCR anidada, utilizando los iniciadores descritos por Farrell et al.<sup>11</sup> BPIS4801 (5'GACTTCGTCTTCGTGGCCAT-3') y BPIS4802 (5'GTA-CAGCGCGCCCGATGCCT-'); BPNEST1 (5'-CGCGTGGCCTTCACCGACAT-3') y

BPNEST2 (5'-GGGCGGTAAGGTCGGG-TAAA-3').

Se utilizaron controles positivos y negativos: cepas de *Bordetella pertussis* ATCC 9797, *Bordetella parapertussis* ATCC 15311 y *Bordetella bronchiseptica* ATCC 10580 y aislamientos clínicos de este estudio.

## Resultados

Se definió como caso índice al menor de cinco años que acudió a consulta por ser el sujeto con más tiempo de evolución de la tos.

La edad promedio de los contactos familiares fue de 26.5 años; 50 % fue del sexo femenino; 62 % no contaba con seguridad social; 30 % tenía al menos las tres dosis de DPT en el primer año de vida.

De los 20 contactos familiares estudiados siete (35 %) fueron positivos a PCR y cuatro (20 %) a cultivo. Los cuatro sujetos positivos a cultivo habían sido positivos a PCR. El parentesco de éstos fue padres y hermanos del caso índice.

En el cuadro I se muestran las características de los contactos que resultaron positivos a *Bordetella pertussis* con la técnica de PCR.

En relación con la edad, se identificaron dos adolescentes de 12 y 16 años, los cuales eran hermanos del caso índice, y resultaron positivos a cultivo y ambos con esquema de vacunación de DPT completo confirmado por cartilla. Ambos habían presentado tos.

El resto de los contactos tenía una edad entre 36 y 75 años; sólo dos de ellos no tuvieron el antecedente de tos. Dos de los contactos fueron los padres del caso índice y resultaron también positivos a cultivo.

En la figura 2 se muestra la amplificación de un fragmento de IS481 de *Bordetella pertussis*.

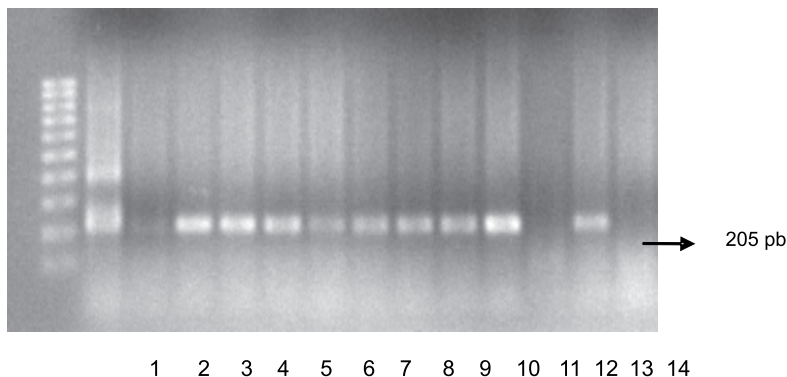
## Discusión

*Bordetella pertussis* es un agente causal importante de enfermedades respiratorias que afecta a niños, adolescentes y adultos. Pocas veces considerado como agente etiológico en cuadro atípico catarral, muchas de las infecciones pro-

**Cuadro I**  
**Características de los contactos de un niño positivo a *Bordetella pertussis* por reacción en cadena de polimerasa**

Paciente	Edad (años)	Sexo	Parentesco con caso índice	Semanas con tos	Rubicondidez	Cianosis	Vómito	Número dosis DPT	Cultivo
1*	5*	M		5.7	p	p	+	2	p
2	12	F	Hermana	1.6	n	n	+	5	p
3	36	F	Mamá	2.9	n	n	-	ns	p
4	40	M	Papá	5.1	p	n	+	ns	p
5	16	F	Hermana	3.2	p	n	+	5	p
6	50	F	Tío	0.0	n	n	-	ns	n
7	44	M	Tío	0.0	n	n	-	3	n
8	75	F	Empleada doméstica	2.1	p	n	-	ns	n

\*Caso índice      p = positivo      n = negativo      ns = no sabe



**Figura 2.** Amplificación de un fragmento de IS481 de *Bordetella pertussis*. El tamaño del fragmento amplificado de 205 pb. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 bp PCR. Carriles 2 y 13, cepa control de *Bordetella pertussis* ATCC9797. Carriles 3 a 8, muestra nasofaríngea. Carriles 9 a 11, cepa aislada de *Bordetella pertussis*. Carril 12, control negativo de muestra nasofaríngea. Carril 14, cepa control negativa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

vocadas por éste no son diagnosticadas a tiempo y los pacientes no reciben un tratamiento adecuado.<sup>1</sup> La incidencia es de aproximadamente 30 %, sobre todo en las tres primeras semanas del padecimiento, tanto intraescolar como intrafamiliar.<sup>20</sup> La detección del microorganismo por cultivo o PCR en pacientes sintomáticos implica gran responsabilidad de los servicios de salud. Los adultos que tienen tos crónica pueden ser reservorios de *Bordetella pertussis* y

convertirse en transmisores potenciales para los pacientes pediátricos, sobre todo los menores de seis meses que en más de 50 % pueden requerir hospitalización.<sup>2-3</sup>

El cultivo es un método muy sensible para la identificación de *Bordetella pertussis* en la fase catarral, sin embargo la positividad depende de la concentración bacteriana que tenga el sujeto así como de la toma de la muestra y su procesamiento.<sup>19</sup>

Una excelente alternativa rápida, que ofrece grandes ventajas en la actualidad, es la PCR, pero sólo laboratorios especializados son capaces de realizar este tipo de pruebas.<sup>10,12</sup>

De los 20 sujetos en cuestión, siete (35 %) fueron positivos a PCR y cuatro de éstos (57 %) a cultivo. Estos resultados son similares a los reportados por otros estudios en donde se observa una prevalencia de *Bordetella pertussis* entre 12 y 26 %.<sup>6-7</sup>

La ventaja de realizar el diagnóstico por PCR es que los resultados se obtienen entre 24-48 horas, a diferencia de un cultivo que puede tardar hasta 10 días. La tos ferina puede ser de 10 a 40 veces más frecuente de lo que reporta nuestro sistema de vigilancia epidemiológica. La detección oportuna de este microorganismo permitirá un tratamiento adecuado, así como evitar posibles contagios en adultos

aún inmunizados y en niños menores de cinco años con dosis incompletas de DPT. Por otro lado, aun cuando este estudio no permite definir modificaciones en las acciones preventivas, sí es necesario considerar la posibilidad de una revacunación después de los 12 años de edad, como en otros países.<sup>1</sup>

Finalmente, es importante resaltar que ante la presencia de un cuadro de neumonía en un niño menor de cinco años, el médico tiene que interrogar sobre los antecedentes vacunales de DPT, y cuando el esquema de vacunación está incompleto y existe sintomatología, deberá realizar el estudio epidemiológico.

## Referencias

1. von König CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* 2002;2:744-750.
2. Mooi FR, van Loo IHM, King A. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis* 2001;7:526-552.
3. Birkerbaek NH, Kristiansen M, Seefeldt T, Degn J, Moller A, Heron I, et al. *Bordetella pertussis* and cough in adults. *Clin Infect Dis* 1999;29:1239-1242.
4. Orenstein WA. Pertussis in adults: epidemiology, signs, symptoms, and implications for vaccination. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):147-150.
5. Halperin SA, Bortolussi R, Langley JM, Miller B, Eastwood BJ. Seven day of erythromycin is as effective as fourteen of treatment of *Bordetella pertussis* infections. *Pediatrics* 1997;100(1):65-71.
6. Tilley PA, Kanchana MV, Knigh I, Blondeau J, Antonishyn N, Denner 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;37:17-23.
7. Ewanowich CA, Chui LWL, Aranchych MG, Pople MS, Marusyk RG, Albritton W. Major outbreak of pertussis in northern Alberta, Canada: analysis of discrepant direct fluorescent-antibody and culture results by using polymerase chain reaction methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:1715-1725.
8. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1999;37:2872-2876.
9. Lingappa JR, Lawrence W, West-Keefe S, Gautom R, Cookson BT. 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.
10. He Q, Mertsola J, Soini H, Viljanen MK. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal specimens. *J Pediatr* 1994;124:421-426.
11. Farrell DJG, Daggard G, Mukkur TKS. Nesste duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and its application in diagnosis of pertussis in non metropolitan Southeast Queensland, Australia. *J Clin Microbiol* 1999;37:606-610.
12. Bäckman A, Johansson BO, Olcen P. Nested PCR optimized for detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal samples. *J Clin Microbiol* 1994;32:2544-2548.
13. Reschl 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;39:1963-1966.
14. Farrell DJ, McKeon M, Daggard G, Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Mukkur TKS. Rapid-cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 2000;38:4499-4502.
15. Brandberg LL, Welinder-Olsson C, Lagergard T, Taranger J, Trollfors B, Zackrinsson G. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *J Clin Microbiol* 1998;36: 679-683.
16. Beall B, Cassidy PK, Sanden GN. Analysis of *Bordetella pertussis* isolated from epidemic by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3083-3086.
17. Bisgard KM, Christie CD, Reising SF, Sanden GN, Cassidy PK, Gomersall C, et al. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* by pulsed-field gel electrophoresis: Cincinnati, 1989-1996. *J Infect Dis* 2001;183:1360-1367.
18. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol* 1977;6: 303-309.
19. Hallander HO. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* 1999;28(Suppl 2):99-106.
20. von Korning-Wirsing S, Postels-Multani T, Bock HL, Schmitt HJ. Pertussis in adults; frequency of transmission after household exposure. *Lancet* 1995;346:1326-1329. **rm**

**Guillermina Romero-Quechol et al. Estudio de un caso de tos ferina**