

## La inmunofluorescencia en el diagnóstico de la tos ferina: experiencia de un laboratorio de referencia

Nélida Muñoz, Liliana Gómez, Clara Inés Agudelo

### Resumen

Publicaciones recientes refieren un alto porcentaje de falsos positivos en el diagnóstico de la tos ferina con el empleo de la inmunofluorescencia directa (IFD); por esta razón, se analizaron los datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, al emplear esta técnica en el estudio de dos poblaciones infantiles. El primer grupo estaba conformado por 267 niños con edades entre 15 días y 7 años, con diagnóstico clínico de síndrome coqueluchoide de etiología por determinar, viral o pertussis, y en ellos se tomó un aspirado nasofaríngeo. El grupo control estuvo constituido por 50 niños sanos, entre 3 y 28 meses de edad de quienes se obtuvo una muestra nasofaríngea. El procesamiento de las muestras incluyó el cultivo en agar Regan-Lowe y la IFD realizada con el empleo de anticuerpos policlonales anti-*Bordetella pertussis* y una cepa control. Adicionalmente, las muestras del grupo control fueron inoculadas en agar sangre de cordero y agar chocolate y los microorganismos recuperados fueron identificados con el empleo de pruebas convencionales. En 36 de las 267 muestras de aspirado nasofaríngeo de los pacientes, se aisló *B. pertussis* y la IFD fue reactiva en 46; en 30 casos las pruebas coincidieron en positividad y en 16 la IFD fue reactiva con el cultivo negativo; esto representó para la IFD una especificidad de 93%. En el grupo control, los cultivos para *B. pertussis* fueron negativos y la IFD fue reactiva con baja intensidad, en 8 (16%) casos, lo que representó una especificidad de 84%. Estos falsos positivos fueron confirmados, por coloración de Gram como *Bacillus* sp. en 4 casos y, por aislamiento e identificación, como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en 2 casos cada uno. Estos datos indican que la IFD puede ser empleada para el diagnóstico de la tos ferina, siempre y cuando se tenga especial cuidado en la interpretación de la lectura, basada en la morfología microscópica del microorganismo y en el grado de intensidad de la fluorescencia. Para lograr esto, es indispensable el empleo de cepas control y de personal entrenado en la lectura de la prueba.

### Summary

Recent publications revealed a high percentage of false positives when the direct fluorescent antibody test (DFA) was used for the diagnosis of pertussis. The aim of this work was to analyse the results obtained in our laboratory when the DFA was used for pertussis diagnosis, in two child-populations. The first group consisted of 267 children, from 15 days to 7 years old, having clinical diagnosis of whooping cough, etiology to be determined. A nasopharyngeal swab was obtained from each child of this group. The control group consisted of 50 normal children between 3 and 28 months old, from each of whom a nasopharyngeal swab was obtained. Sample processing included culturing in Regan-Lowe agar and DFA using *Bordetella pertussis* polyclonal antibodies and a control strain.

Control samples were also cultured in sheep blood agar plates and chocolate agar. *B. pertussis* was isolated in culture in 36 of the 267 aspirates studied and the DFA was reactive in 46 of them. In 30 cases both tests were positive. Specificity for DFA was 93%. In the control group, *B. pertussis* was not encountered in culture, but DFA was reactive (though with low reactivity) in 8 cases (16%) (specificity 84%). False positives were confirmed by Gram stain as *Bacillus* sp. in 4 cases and by culture as *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in 2 cases each. Our data confirmed that DFA could be used in the pertussis diagnosis if the interpretation of the results are based on microscopic morphology of the microorganisms as well as in the intensity of the fluorescence. The use of a trained technician and control strains are thus highly recommended.

El género *Bordetella* está conformado por las especies *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. avium*. *B. pertussis*, agente etiológico de la tos ferina o pertusis, es un cocobacilo pequeño, de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$ , Gram negativo, aeróbico, inmóvil, no esporulado y bioquímicamente inerte. Esta última característica explica su papel como parásito, al requerir los productos del hospedero (1).

*B. pertussis* infecta únicamente los cilios del epitelio que recubre la nasofaringe, la tráquea y los bronquios; no invade ningún otro tejido ni líquido corporal. Sin embargo, debido a los factores de virulencia del microorganismo, el paciente presenta alteraciones sistémicas como linfocitosis, estimulación de la producción de insulina o una inmunodepresión, transitoria, de la respuesta dependiente de linfocitos T (1).

La tos ferina es una enfermedad altamente contagiosa que puede presentarse en cualquier edad, pero con síntomas diferentes y con una tasa de ataque mayor de 90% en individuos no inmunizados. La infección ocurre por la exposición de la población susceptible a los organismos liberados en los aerosoles generados por un individuo infectado (1-3).

La inmunofluorescencia directa (IFD) constituye una gran ayuda en el diagnóstico de numerosas entidades bacterianas debido a su sensibilidad y especificidad (4). Sin embargo, se ha informado hasta un 40% de falsos positivos cuando ha sido aplicada al diagnóstico de la tos ferina (5).

El objetivo del presente trabajo fue el determinar, bajo las condiciones establecidas en nuestro laboratorio para la realización de la IFD, la

especificidad de esta técnica en el diagnóstico de la tos ferina.

### Materiales y métodos

**Población.** Se estudió, entre enero y septiembre de 1994, un grupo de 267 pacientes con diagnóstico clínico de síndrome coqueluchoide, con edades entre 15 días y 7 años. Las muestras fueron enviadas por diferentes Servicios de Salud (cuadro 1). El grupo control lo conformaron 50 niños sanos con edades de 3 a 28 meses que asistían a una de las guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) de Santa Fe de Bogotá; estas últimas muestras se tomaron en abril de 1994.

**Toma y procesamiento de muestras.** De los pacientes se obtuvo una muestra de aspirado nasofaríngeo; una parte de ella se colocó en el medio de transporte de Regan-Lowe (6); con la otra parte del aspirado, se realizaron dos extendidos en láminas portaobjetos (1). El medio de transporte y las láminas fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología para su procesamiento en las 24 horas siguientes a la toma. En algunos casos, el aspirado fue enviado en un tubo estéril con tapa de rosca.

**Cuadro 1.** Procedencia de los pacientes con diagnóstico clínico de síndrome coqueluchoide (n=267).

Servicios de salud	n	(%)
Santa Fe de Bogotá	18	(70,0)
Santander	33	(12,4)
Cauca	24	(9,0)
Córdoba	9	(3,5)
Huila	7	(2,6)
Cundinamarca	3	(1,0)
San Andrés	4	(1,5)
<b>Total</b>	<b>267</b>	<b>(100,0)</b>

El personal del Laboratorio de Microbiología del INS realizó la toma de la muestra de los niños del grupo control. Se obtuvieron dos frotis nasofaríngeos, con el empleo de escobillones estériles, flexibles, de alginato de calcio (BBL). Con uno de los escobillones, se realizó la siembra directa en los medios de cultivo; el segundo escobillón se colocó en 0,5 mL de caldo de casaminoácidos (1) al 1% para preparar, a partir de él, los extendidos para la IFD (7).

**Cultivos.** Las muestras se sembraron a partir del medio de transporte o directamente, en el medio de Regan-Lowe con antibióticos [cefalexina 40 µg/mL (Sigma) , anfotericina B 50 µg/mL (Squibb)] y suplementado con sangre desfibrinada de caballo (10% v/v) (6), en agar chocolate suplementado y en agar sangre de cordero al 5% (8). Todos los medios se incubaron a 37°C en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Los aislamientos fueron identificados con el empleo de las pruebas convencionales (9). El procesamiento para el aislamiento e identificación de *B. pertussis* se realizó de acuerdo con el esquema 1.

**IFD.** Se emplearon como conjugados los anticuerpos policlonales anti-*B. pertussis* y *B. parapertussis* marcados con fluoresceína (Difco) y como cepas control *B. pertussis* ATCC 10536 y *B. parapertussis* ATCC 15311 (esquema 2). La reactividad fue interpretada como débil (1+) o fuerte (4+). Los resultados reactivos débiles para *B. pertussis* se confirmaron con la coloración de Gram para determinar las características morfológicas del microorganismo visualizado.

**Resultados**

**Grupo de pacientes.** La distribución por grupos de edad fue la siguiente: 90 (34,5%) pacientes fueron menores de 3 meses, 80 (30%) tenían entre 4 y 12 meses, 24 (9%) eran mayores de 1 año y en 73 (27,5%) no se conoció el dato.

De los 267 pacientes, en 36 (9,8%) se aisló *B. pertussis* y en 46 (17%) la IFD fue reactiva (4+). En 30 (65%), las dos pruebas coincidieron en positividad y en 16 (35%) la IFD fue reactiva y el cultivo negativo (cuadro 2). Estos datos representaron para la IFD una sensibilidad de 83% y una especificidad de 93% (cuadro 3).

**Grupo control.** En este grupo, el rango de edad fue de 3 a 28 meses. Todos los cultivos para *B.*

*pertussis* y *parapertussis* fueron negativos. En el cultivo para gérmenes comunes, se obtuvieron 49 (98%) aislamientos de *Haemophilus influenzae*, 46 no serotificables (NST), 2 serotipo b y 1 serotipo f. En 29 (58%) niños, se aisló *Streptococcus pneumoniae* y en 2(4%) *S. pyogenes* (cuadro 4).

La IFD fue débilmente reactiva (1+) en 8 (16%) casos, los cuales se consideraron falsos positivos, 4 de ellos fueron confirmados microscópicamente con la coloración de Gram como *Bacillus* sp., en 2 casos se aisló *H. influenzae* y en 2 casos *S. pneumoniae*. Estos datos representaron para la IFD una especificidad del 84% (cuadro 3).

**Cuadro 2.** Resultado del cultivo y de la IFD para *B. pertussis* en muestras de aspirado nasofaríngeo de los pacientes (n=267).

Cultivo	IFD	Muestras	
		n	%
+	R	30	(11,0)
+	NR	6	(2,5)
-	R	16	(6,0)
-	NR	215	(80,5)
<b>Total</b>		<b>267</b>	

R: reactividad 4+  
NR: no reactividad

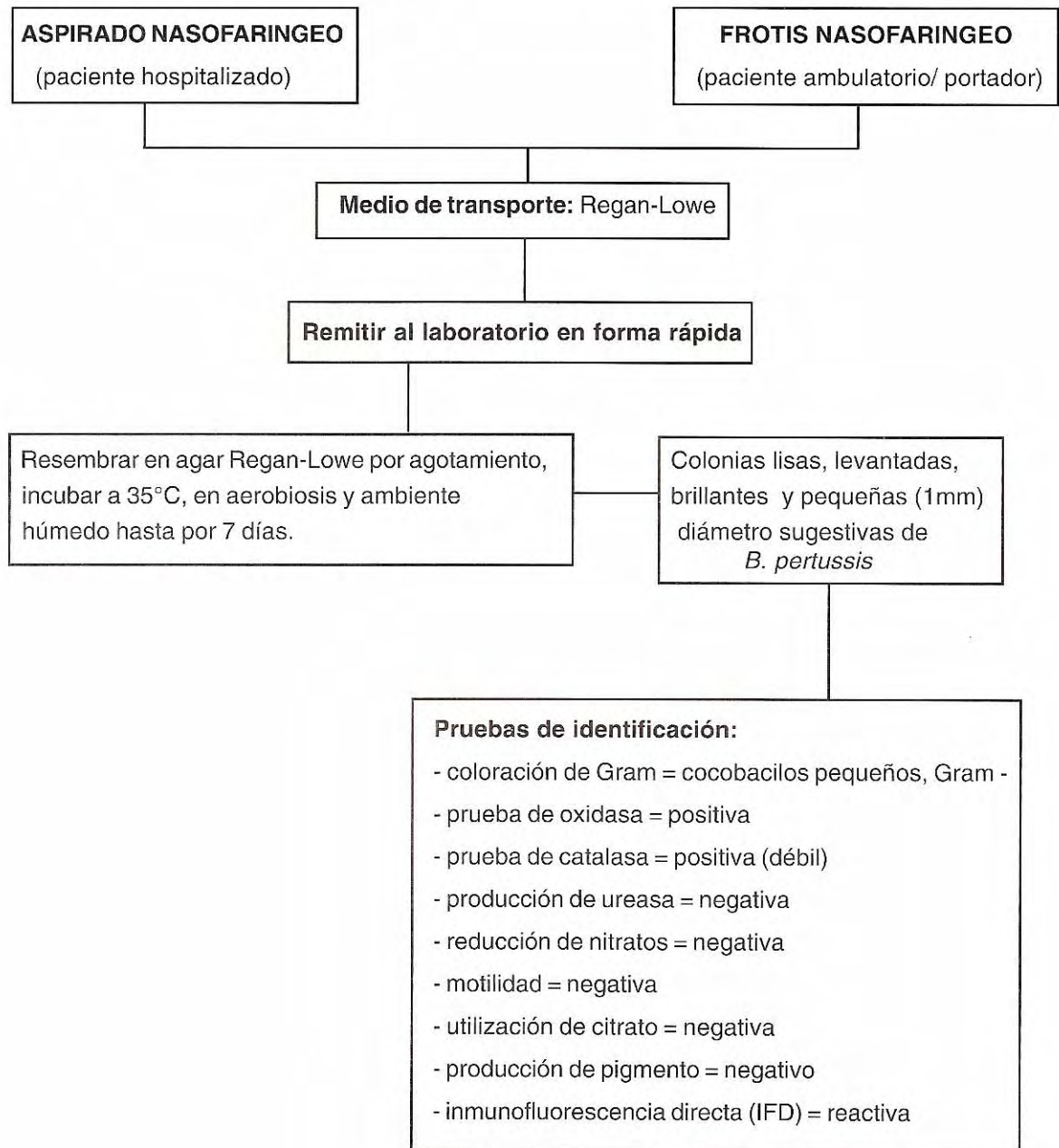
**Cuadro 3.** Sensibilidad y especificidad de la IFD en el diagnóstico de la tos ferina en los pacientes con diagnóstico de síndrome coqueluchoide (n=267).

I F D		Cultivo		Total
		+	-	
+	+	30	16	46
	-	6	215	221
<b>TOTAL</b>		<b>36</b>	<b>231</b>	<b>267</b>

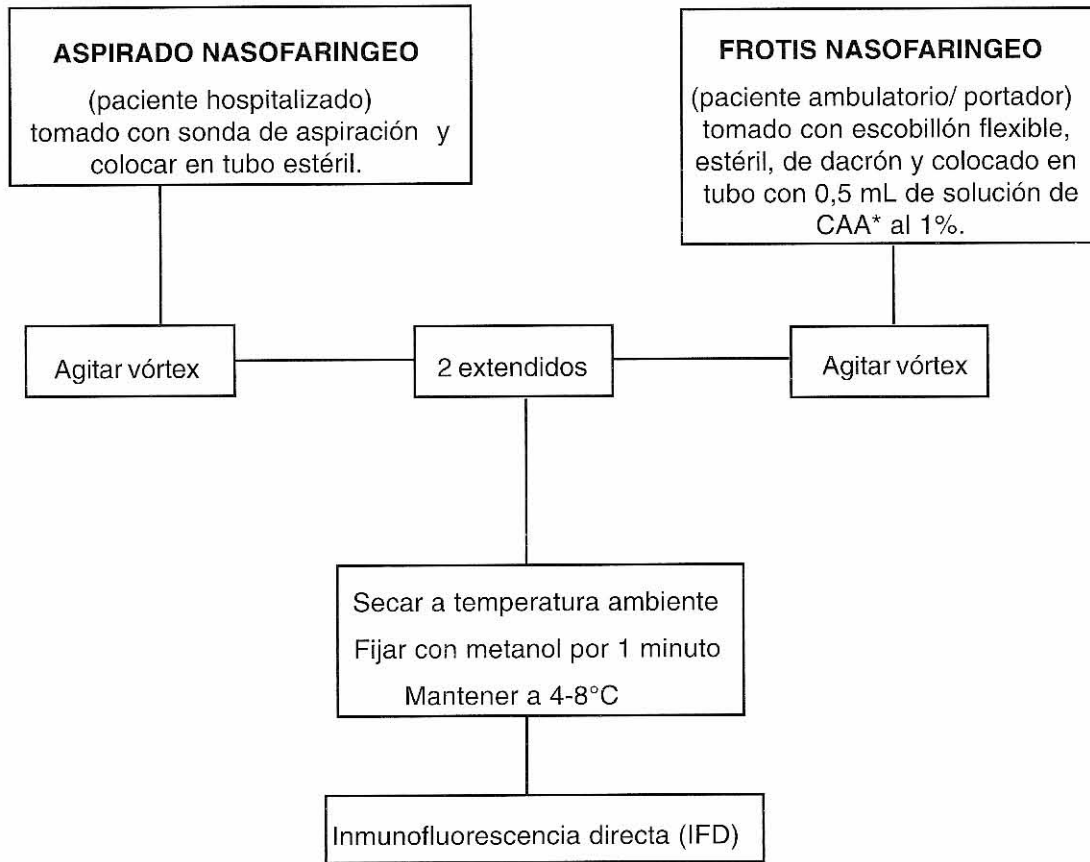
**Cuadro 4.** Aislamientos nasofaríngeos en el grupo control y reacciones cruzadas con IFD (n= 50).

Aislamientos	n	(%)	IFD (1 +)
<i>Bordetella pertussis</i>	0	(0)	0
<i>Bacillus</i> sp.	0	(0)	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	49	(98)	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	29	(58)	2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	(4)	0

DR: débilmente reactivo (+)

**Esquema 1.** Procesamiento de las muestras para el aislamiento e identificación de *Bordetella pertussis*.

**Esquema 2.** Procesamiento de la muestra para inmunofluorescencia directa (IFD) para *B. pertussis*-*B. parapertussis*.



\*CAA: casaaminoácidos (Difco)

La IFD para *B. parapertussis* fue no reactiva tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control.

**Discusión**

Debido a la compleja relación hospedero-parásito que se establece en la tos ferina entre el hombre y *B. pertussis*, el diagnóstico por el laboratorio es difícil (2). El principal problema en el estudio de la epidemiología de la tos ferina está en lograr confirmar su diagnóstico por el laboratorio.

Un alto porcentaje del síndrome coqueluchoide es de etiología viral; sin embargo, la etiología bacteriana es difícil de confirmar dado el escaso número de muestras que se obtienen y procesan adecuadamente para la búsqueda de *B. pertussis*.

Las muestras adecuadas son el aspirado nasofaríngeo tomado con sonda de aspiración en pacientes hospitalizados, así como el frotis nasofaríngeo en pacientes ambulatorios o en contactos. Para obtener esta muestra, se debe emplear un escobillón flexible estéril de dacrón o de alginato de calcio. Sin embargo, se recomienda el aspirado debido a que causa menor trauma y se puede obtener una mayor cantidad de muestra (5, 7).

Varios factores diferentes a los anteriormente mencionados contribuyen a la dificultad en el aislamiento de *B. pertussis*; entre ellos están el sobrecrecimiento en el cultivo de otras especies bacterianas o de hongos de la flora comensal y,

por ende, el requerimiento de un medio de cultivo selectivo y, adicionalmente, la falta de experiencia para reconocer el microorganismo (5, 8, 9).cultivo puede tener una sensibilidad de 80 a 90%, cuando se cumplen las condiciones enumeradas y la ausencia de tratamiento antibiótico previo en el paciente (3).

La IFD proporciona resultados más rápidos, pero, su sensibilidad ha sido cuestionada debido al número de microorganismos necesarios para la visualización microscópica y a la dificultad en la interpretación de los resultados por parte de los laboratoristas (3, 10). En general, el número de falsos positivos varía y depende de los controles positivos y negativos empleados, así como de la intensidad de la fluorescencia (6). Sin embargo, en investigaciones de brotes de tos ferina se considera que la IFD tiene una especificidad alta y, por ende, un valor predictivo positivo alto, debido al aumento de la frecuencia de la enfermedad en la población (10).

Con el grupo control, se pudo determinar que la flora bacteriana normal o patógenos potenciales residentes en la nasofaringe pueden dar lugar a reacciones cruzadas, aunque débiles (1+) con el conjugado anti-*B. pertussis*, lo cual enfatiza la importancia de cuantificar la intensidad de la fluorescencia.

Los resultados obtenidos indican que, en nuestra experiencia, la IFD se puede recomendar para confirmar el diagnóstico de la tos ferina, siempre y cuando se tenga en cuenta la morfología microscópica del microorganismo. Por tanto, se sugiere que la IFD débilmente positiva se confirme con la coloración de Gram y con el cultivo de la muestra en los medios de rutina (agar sangre y agar chocolate), dado que las reacciones cruzadas

se presentaron en su mayoría con gérmenes encapsulados que colonizan la nasofaringe. Adicionalmente, es de gran importancia la experiencia del profesional en la lectura de la IFD y el uso de cepas conocidas que se emplean como control positivo y negativo.

### Referencias

1. **López LA.** *Bordetella pertussis*: microbiología y diagnóstico. Publicación técnica N°5. México, D.F.: Instituto Nacional de Epidemiología; 1991.
2. **Gilligan PH, Fisher MC.** Importance of culture diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J Clin Microbiol 1984; 20:891-3.
3. **Friedman RL.** Pertussis: the disease and new diagnostic methods. Clin Microbiol Rev 1988;1:365-76.
4. **Ray CG, Minnich LL.** Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses and bacterias. J Clin Microbiol 1987;25:335-47.
5. **Ewanowich CA, Chui LWL, Paranchych MG, Pepler MS, Marusyk RG, Albritton WL.** Major outbreak of pertussis in Northern Alberta, Canada: analysis of discrepant direct fluorescent-antibody and culture results by using polimerase chain reaction methodology. J Clin Microbiol 1993;31:1715-25.
6. **Regan J, Lowe F.** Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. J Clin Microbiol 1977;6:303-9.
7. **Gilligan PH, Fisher M.** Importance of culture in laboratory diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J Clin Microbiol 1984;20:891-3.
8. **Nash P, Krenz MN.** Culture media. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. Manual of clinical microbiology. 5th. ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology; 1991:1226-88.
9. **WHO Acute Respiratory Infections.** Laboratory manual of bacteriology. Procedures. Manila: WHO; 1986.
10. **Onorato IM, Wassilak GF.** Laboratory diagnosis of pertussis: the state of the art. Pediatr Infect Dis J 1987; 6:145-51.