

Diagnóstico de coqueluche por inmunofluorescencia directa

DRES.: VALERIA PRADO *, WALTER LEDERMAN **, JORGE VERGARA *, SRTA. MARIA C. DIAZ *.

Durante los últimos tres años en nuestro país hemos asistido a la aparición de brotes cada vez más importantes de cuadros catalogados clínicamente como coqueluche. Al intentar analizar en profundidad este fenómeno, ya sea evaluar la eficacia de medidas de control en vigencia o de las medidas terapéuticas, nos hemos tropezado con el grave problema de no tener en estos cuadros la confirmación del agente etiológico y se ha especulado acerca del papel que pueden estar jugando en la producción de estos cuadros catalogados como "síndrome coqueluchoso", la *Bordetella pertussis*, la *Bordetella parapertussis* o los adenovirus.

Es de todos conocido el hecho que por la biología particular de la *Bordetella pertussis*, agente del cuadro descrito clásicamente como coqueluche, se hace difícil obtener su crecimiento en medios artificiales de laboratorio, por ser un germen muy exigente y es así como su aislamiento es sólo un hallazgo ocasional en nuestro medio.

Por todas estas razones el propósito del presente trabajo fue desarrollar la técnica de Inmunofluorescencia directa aplicada al diagnóstico de *Bordetella pertussis*, ya que autores extranjeros como Donaldson han comunicado rendimiento de hasta un 80% usando esta técnica en enfermos de coqueluche que no habían recibido tratamiento antibiótico.

Al mismo tiempo que desarrollar un nuevo método diagnóstico, quisimos ensayar diferentes técnicas de toma de muestra para llegar a establecer la conducta más adecuada en este sentido, que nos permita acercarnos con mayor seguridad al diagnóstico etiológico de este cuadro, lo cual pensamos puede ser de gran utilidad en el control de la enfermedad.

MATERIAL Y METODO. Se estudiaron 42 enfermos, de los cuales 29 estaban hospitalizados por cuadro clínico de coqueluche en el Hospital Calvo Mackenna y 13 pacientes ambulatorios que acudían a control de policlínico por tos persistente en el Hospital Exequiel González Cortés.

A cada uno de estos pacientes se les tomó una muestra de secreción faríngea y una muestra de secreción nasal, con tórula humedecida en S. Fisiológico. A los 9 primeros pacientes incluidos en el estudio, se les tomó además una muestra con el método de la "placa de tos" el que fue desechado posteriormente por su nulo rendimiento.

Las muestras fueron sembradas de inmediato en medio de Bordet Gengou, se incubaron durante 48 hrs. a 37°C, sometiéndolo a estudios serológicos y Test de IFD para identificación de *Bordetella pertussis*.

El suero anti-*Bordetella* se fabricó en conejos de aproximadamente 2 kg-p., se inocularon por vía E.V. con dosis progresivas de antígeno de *Bordetella* preparado con cepa Connaught 1, 2, 3, 4 en solución formolada al 5%, ajustada a una concentración de 900 millones bact/ml.

Una vez obtenido un título satisfactorio de anticuerpos, se sangraron los conejos, se fraccionaron las globulinas del suero y se efectuó la conjugación con isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo la técnica de Beutner.

Se probó la especificidad del suero anti *Bordetella* efectuando reacciones de IF cruzada con *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* y *Staphylococcus aureus*. Reacción cruzada inespecífica con *Staphylococcus aureus* se eliminó, absorbiendo el conjugado con una suspensión de *Staphylococcus* en proporción 1:10, aislándose posteriormente los *Staphylococcus* por centrifugación.

Con la misma tórula con que se sembraron las muestras, se efectuaron frotis en lámina de vi-

* Departamento Medicina Experimental. Centro Microbiología. Facultad de Medicina Santiago Oriente. Universidad de Chile.
** Jefe Departamento adiestramiento Instituto Bacteriológico de Chile.

drio que fueron fijadas con acetona durante 10 minutos, para efectuar test de IFD, el cual consiste en incubar el frotis con 2 gotas del conjugado anti Bordetella y posteriormente lavar con buffer fosfato salino pH 7,2.

La observación se efectuó en microscopio de fluorescencia con filtro BG-12.

Para expresar los resultados de la lectura se siguió la pauta establecida por Donaldson:

3 cruces = + 25 gérmenes por 50 cm. campo microscópico.

2 cruces = 10 — 25 gérmenes por 50 cm. campo microscópico.

1 cruz = 3 — 10 gérmenes por 50 cm. campo microscópico.

T A B L A N° 1

RENDIMIENTO DE LOS METODOS DE CULTIVO
IFD* EN LA PESQUISA DE BORDETELLA
PERTUSSIS EN 42 NIÑOS

Técnica	Positivo		Total
	Nº	%	
I F D	27	64,2	42
Cultivo	5	11,9	42

* IFD = Inmunofluorescencia directa.

RESULTADOS. La tabla N° 1 muestra que la técnica de IFD tiene un rendimiento seis veces superior al cultivo en la pesquisa de Bordetella pertussis.

T A B L A N° 2

RELACION ENTRE POSITIVIDAD DE LA TECNICA
DE IFD Y METODO DE CULTIVO EN 101* MUESTRAS
DE NIÑOS CON COQUELUCHE

	Nº	%
IFD + y cultivo +	3	2,9
IFD + y cultivo (—)	43	42,5
IFD (—) y cultivo +	2	1,9
IFD (—) y cultivo (—)	53	52,7
T o t a l	101	100,0

* El número de muestras es mayor que el número de pacientes, pues se tomó un promedio de 2-6 muestras por enfermo.

En la tabla N° 2 vemos que en un 42,5% de las muestras la IFD tiene ventajas sobre el cultivo, y sólo en un 1,9% siendo el cultivo positivo fracasó la IFD.

T A B L A N° 3

ANALISIS DEL RENDIMIENTO DE DIFERENTES
TECNICAS DE TOMA DE MUESTRAS EN PACIENTES
CON HALLAZGO DE BORDETELLA

Técnica toma muestra	IFD +	Cultivo +
Secreción nasal	24	2
Secreción faríngea	22	3
T o t a l	46*	5

* El total de muestras positivas es mayor que el número de pacientes positivos, pues se tomó más de una muestra por paciente y en algunos de ellos se detectó la Bordetella en 2 localizaciones.

La tabla N° 3 muestra que al comparar el rendimiento de las muestras nasal y faríngea, no se observan diferencias apreciables.

T A B L A N° 4

POSITIVIDAD DEL TEST DE IFD EN RELACION A
TRATAMIENTO ANTIBIOTICO PREVIO EN PACIENTES
CON COQUELUCHE

	Nº	IFD*	
	estudiados	Nº	%
Sin AB previo	20	16	80,0
> 48 hrs. AB previo	12	7	58,3
< 48 hrs. AB previo	10	4	40,0
T o t a l	42		

* IFD = Inmunofluorescencia directa.

La tabla N° 4 muestra que en pacientes sin tratamiento antibiótico, la IFD alcanza un 80% de positividad, lo cual baja a 40% en el grupo que ha recibido antibiótico por más de 48 hrs.

La tabla N° 5 muestra que la mayor positividad de IFD en pesquisa de Bordetella pertussis se alcanza en el período catarral de la enfermedad con un 100%, disminuye en las dos primeras semanas del período de estado llegando a sólo un 33,3% en la 3ª semana.

T A B L A N° 5

POSITIVIDAD DEL TEST DE IFD EN RELACION A
ETAPA EVOLUTIVA DE LA ENFERMEDAD EN
PACIENTES CON COQUELUCHE

Etapa de enfermedad	N°		IFD + %
	estudiados	N°	
Período catarral	2	2	100,0
Período estado:			
1ª semana	21	12	66,6
2ª semana	13	9	69,5
3ª semana	6	2	33,3

COMENTARIOS. En primer lugar creemos de interés analizar algunos aspectos epidemiológicos inherentes al grupo de pacientes estudiados. En cuanto a distribución por edad 78,5% de ellos eran lactantes, de los cuales 57% eran menores de 6 meses, cifras que no reflejan incidencia general por tratarse en su mayoría de niños hospitalizados y los más pequeños ingresan al hospital con mayor frecuencia por presentar mayor gravedad clínica.

En cuanto al antecedente de inmunización anti pertussis en este grupo de niños, sólo un 28,5% de ellos tenía al menos 2 dosis de vacuna Triple, lo cual estaría indicando que en el desencadenamiento de este problema la falla principal estaría a nivel de cobertura.

En lo que respecta al objetivo principal de nuestra investigación, los resultados obtenidos son altamente promisorios, ya que la técnica de IFD para diagnóstico de Bordetella pertussis demostró una positividad de 64,2%, seis veces superior al cultivo (Tabla N° 1).

Es necesario destacar, de todos modos, el 11,9% de cultivos positivos, lo cual contrasta con hallazgos muy ocasionales anteriores, diferencia que creemos se debe a que en esta oportunidad los autores del trabajo efectuaron personalmente la toma de muestra y la siembra.

Aparte de haber evidenciado un rendimiento mayor, la IFD además sirve de complemento al cultivo ya que es posible efectuar reacción de IF en colonias tomadas de cultivo mixto, lo que no alteraría la especificidad de la reacción inmunológica, lo cual es importante si consideramos lo difícil que es llegar a obtener cultivo puro de Bordetella pertussis.

Los rendimientos de la IFD en nuestro estudio coinciden con lo señalado por Donaldson, ya que obtuvimos un 80% de rendimiento en enfermos sin tratamiento antibiótico previo, positividad que va decreciendo mientras más avanzado sea este tratamiento (tabla N° 4).

Llama la atención que en pacientes con más de 48 hrs. de antibióticos. se encontró IFD positiva en un 40% en contraste con resultados de experiencias extranjeras, lo cual podría explicarse por una mayor resistencia de nuestras cepas de Bordetella pertussis frente a la Ampicilina, que es el antibiótico que se usa en nuestro medio para erradicar Bordetella. Esto aconsejaría reconsiderar el antibiótico de elección frente a Bordetella.

En cuanto a la técnica de toma de muestra a la luz de nuestros resultados podemos decir que no es tan importante el lugar de toma de muestra ya que secreción nasal y faríngea dan igual rendimiento, sino que lo fundamental es que esta muestra sea bien tomada por personal entrenado.

Nuestro estudio además demostró categóricamente que el método de la placa de tos no es útil, puesto que prácticamente no se obtuvo desarrollo microbiano de ningún tipo en las placas tomadas.

En cuanto a la positividad de la IF en relación a etapa evolutiva, en concordancia con publicaciones extranjeras en la etapa catarral hay más posibilidad de obtener resultados positivos y esto va decreciendo con el tiempo llegando a un 30% a la 3ª semana, lo cual confirmaría que la etapa de mayor contagiosidad es el período catarral.

En conclusión el método de IF ha demostrado tener indiscutibles ventajas sobre el cultivo, su alto rendimiento hace plantear la necesidad de establecer centros de diagnóstico de coqueluche por esta técnica, al cual pueden enviarse muestras incluso por correo, en láminas de vidrio fijadas, las cuales pueden permanecer hasta 6 meses a temperatura ambiente sin que se altere la fluorescencia.

Creemos además, que este método, tendría a la larga un menor costo que el cultivo, aspecto que siempre es necesario considerar dentro de la realidad de los recursos para la atención médica de que dispone el país.

RESUMEN

Se estudiaron 42 niños, 78% de ellos lactantes, con cuadro clínico de coqueluche. A cada uno de ellos se les tomó una muestra de secreción nasal y una muestra de secreción faríngea que fueron sometidas a cultivo en medio de Bordet Gengon y test de IFD, para pesquisa de Bordetella pertussis.

Con el cultivo se obtuvo un 11,9% de positividad y con la IFD un 64,2%, rendimiento que amentó al 80% cuando el test de IFD se efectuó en pacientes que no habían recibido antibióticos previamente.

No se observaron diferencias en el rendimiento de ambos métodos con las dos técnicas de toma de muestra estudiadas.

SUMMARY

42 children, 78% of whom were infants, were studied, with clinical diagnosis of whooping cough. All of them had nasal and pharyngeal smears for Bordet - Gengou culture, and fluorescent antibody staining to identify *Bordetella pertussis*.

Culture gave a 11,9% positivity and fluorescent antibody staining (FAS) gave a 64,2% positivity. When (FAS) was done in patients without previous antibiotic treatment, positivity was 80%.

No difference was found in either method when nasal and pharyngeal samples were compared.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros sinceros agradecimientos al Dr. R. Sørensen y Sra. M. Meléndez del Departamento Inmunología del Instituto Bacteriológico de Chile por la asistencia técnica prestada en la conjugación del suero anti *Bordetella*.

REFERENCIAS

- 1.— *Brooks, A. M.* The method of nasopharyngeal culture in the diagnosis of whooping cough. *JAMA* 120: 883, 1942.
- 2.— *Nelson, J. D.; Hernpstead.* Fluorescent antibody diagnosis of infections *JAMA* 188: 1121, 1964.
- 3.— *Whiteteke J.; Dodnaldson, P.* Diagnosis of Pertussis by fluorescent antibody method. *N. Engl. J. Med.* 263: 850, 1960.
- 4.— *Donaldson, P. and Whiteker, J.* Diagnosis of Pertussis by fluorescent antibody staining of nasopharyngeal smears. *Am. J. Dis. Child.* 99: 423, 1960.