



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Carta científica

Rendimiento de 2 técnicas de PCR en tiempo real para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*



Performance of 2 automated real time PCR methods for the detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*

El agente etiológico de la tosferina es *B. pertussis*, pero *B. parapertussis* y *B. holmesii* pueden causar cuadros clínicos muy similares¹. La infección por *B. bronchiseptica* es infrecuente, clínicamente distinta y afecta a pacientes debilitados². Las dianas más empleadas para el diagnóstico de *Bordetella* spp. mediante PCR han sido las secuencias IS481 e IS1001. La IS481 está presente en *B. pertussis*, *B. holmesii* y también puede estarlo en *B. bronchiseptica*. La IS1001 se encuentra en *B. parapertussis* y ocasionalmente en *B. bronchiseptica*³⁻⁵. Una estrategia para distinguir especies puede basarse en el uso de cebadores concretos para la zona del gen promotor de la toxina pertussis (*ptxA-pr*), que es específica de *B. pertussis*^{3,5,6}. Otra alternativa es el gen de una porina de *B. pertussis* (*BPTD.0837*)⁴. El gen *BP283* también ha sido empleado para identificar *B. pertussis*⁷. En la actualidad existen numerosos kits para el diagnóstico molecular de tosferina. No obstante, su interpretación puede resultar compleja debido a esa posibilidad de detectar mismas secuencias en diferentes especies. El objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento de dos métodos de PCR en tiempo real, RealCycler[®] BORD-T, Progenie Molecular y DiaSorin Molecular Simplexa[™] Bordetella Direct, para el diagnóstico de tosferina.

Se estudiaron 50 muestras de exudado/lavado nasofaríngeo obtenidas de pacientes con sospecha clínica de tosferina entre julio de 2018 y enero de 2020, y como grupo control 44 muestras de

exudado nasofaríngeo recibidas en febrero de 2022 para diagnóstico de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR. Las muestras se conservaron congeladas a -80°C hasta su estudio. Todas las muestras procedían de estudios de vigilancia epidemiológica y se procesaron simultáneamente con los ensayos RealCycler[®] BORD-T previa extracción de ácidos nucleicos y Simplexa[™] Bordetella Direct directamente a partir de muestra sin extracción previa. La interpretación de resultados de las 2 técnicas se realizó siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Para las 50 muestras sospechosas de tosferina, los resultados con RealCycler[®] BORD-T fueron: 28 (56%) *B. pertussis*, 12 (24%) *Bordetella* spp., 6 (12%) *B. parapertussis* o *B. bronchiseptica*, 3 (6%) coinfección por diferentes *Bordetella* spp. y uno (2%) negativo. Con Simplexa[™] Bordetella Direct 39 (78%) *B. pertussis*, 6 (12%) *B. parapertussis*, 2 (4%) coinfección por diferentes *Bordetella* spp. 2 (4%) negativas y una (2%) inválida por inhibición de la amplificación (tabla 1). En 47 muestras bajo sospecha de tosferina (94%) ambos métodos coincidieron en la identificación a nivel de género o coinfección por *Bordetella* spp. En 27 (54%) de estos casos las dos técnicas identificaron la especie como *B. pertussis*. En 11 (22%) casos que Simplexa[™] Bordetella Direct clasificó el resultado como *B. pertussis* RealCycler[®] BORD-T lo catalogó como *Bordetella* spp. En los 6 (12%) casos identificados como *B. parapertussis* mediante Simplexa[™] Bordetella Direct el resultado de RealCycler[®] BORD-T fue *B. parapertussis* o *B. bronchiseptica*. Las 44 muestras tomadas para la detección de SARS-CoV-2 fueron negativas para *Bordetella* spp. por ambas técnicas.

El kit RealCycler[®] BORD-T detecta tanto IS481 como la región BP283. Esta combinación aún una alta sensibilidad y una elevada especificidad para el diagnóstico de tosferina. Este kit también incluye la IS1001 para detectar *B. parapertussis*.

Tabla 1

Distribución de los resultados de RealCycler[®] BORD-T y Simplexa[™] Bordetella Direct sobre el total de muestras sospechosas de tosferina estudiadas

	RealCycler [®] BORD-T			Simplexa [™] Bordetella Direct			Total	
	IS481	IS1001	BP283	IS481	IS1001	N	%	
<i>B. pertussis</i>	Positivo	Negativo	Positivo	<i>B. pertussis</i>	Positivo ^a	Negativo ^a	27	54
<i>Bordetella</i> spp.	Positivo	Negativo	Negativo	<i>B. pertussis</i>	Positivo ^a	Negativo ^a	11	22
<i>B. parapertussis</i> o <i>B. bronchiseptica</i>	Negativo	Positivo	Negativo	<i>B. parapertussis</i>	Negativo ^b	Positivo ^b	6	12
Coinfección por diferentes <i>Bordetella</i> spp.	Positivo	Positivo	Positivo	<i>B. pertussis</i> y <i>B. parapertussis</i>	Positivo ^b	Positivo ^b	1	4
	Positivo	Positivo	Negativo	<i>parapertussis</i>	Positivo ^b	Positivo ^b	1	
Coinfección por diferentes <i>Bordetella</i> spp.	Positivo	Positivo	Positivo	<i>B. pertussis</i>	Positivo	Negativo	1	2
<i>Bordetella</i> spp.	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	1	2
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	1	2
<i>B. pertussis</i>	Positivo	Negativo	Positivo	No válido ^c	No válido	No válido	1	2
							50	100

Los resultados de esta tabla solo son aplicables cuando se cumplen las especificaciones de calidad interna de cada una de las técnicas evaluadas (p. ej., amplificación de controles internos y/o Ct dentro de rango).

^a Esta combinación de resultados de Simplexa[™] Bordetella Direct no excluiría una infección por *B. holmesii*.

^b Esta combinación de resultados de Simplexa[™] Bordetella Direct no excluiría una infección por *B. bronchiseptica*.

^c No válido por inhibición de la amplificación.

Simplexa™ Bordetella incluye IS481 para detección de *B. pertussis* e IS1001 para *B. parapertussis*⁸ y, aunque la combinación de positividad y negatividad para cada una de estas dianas no excluye definitivamente a otras como *B. holmesii* o *B. bronchiseptica*, a efectos prácticos, en muestras con sospecha clínica de tosferina el resultado se podría considerar como «probable infección por» *B. pertussis* o *B. parapertussis* según el caso³. Este kit ha mostrado muy buena sensibilidad y especificidad⁹ y excelentes valores globales de porcentaje de acuerdo de resultados¹⁰.

En este estudio el número de muestras estudiadas es reducido. Además, no se contó con un «gold standard» para valorar la sensibilidad de las técnicas, no se dispuso de cepas control ni se confirmaron los casos discordantes con una tercera técnica alternativa. Sin embargo, ambas técnicas aportaron una buena coincidencia de resultados para la detección de *Bordetella* spp. Cada una de ellas muestra algún tipo de ventaja: RealCycler® BORD-T resultaría teóricamente muy específico para *B. pertussis* mientras que Simplexa™ Bordetella Direct no requiere extracción de ácidos nucleicos, convirtiéndolo en una alternativa sencilla y rápida.

Conflicto de intereses

En este estudio los reactivos de DiaSorin Molecular Simplexa™ Bordetella Direct fueron cedidos por DiaSorin Iberia S.A. Las autoras V.B. y E.M. son empleadas de DiaSorin Iberia S.A.

Este estudio ha sido parcialmente enviado y aceptado como comunicación al XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Bibliografía

1. Leber AL. Pertussis: Relevant species and diagnostic update. Clin Lab Med. 2014;34:237–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2014.02.003>.
2. Ducours M, Rispal P, Danjean MP, Imbert Y, Dupont E, Traissac EM, et al. *Bordetella bronchiseptica* infection. Med Mal Infect. 2017;47:453–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2017.05.012>.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance and protocol for the use of realtime PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*. Stockholm: ECDC; 2012; [consultado 19 Jun 2023]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/Guidance-protocol-PCR-laboratory-diagnosis-bordetella-pertussis-parapertussis.pdf>
4. Sanz JC, Abad R, Sanz C, Miguel A. Differential diagnosis by RT-PCR of *Bordetella bronchiseptica* in a child without previous pathologic antecedents suffering whooping cough. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019;37:679–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.016>.
5. Valero-Rello A, Henares D, Acosta L, Jane M, Jordan I, Godoy P, et al. Validation and implementation of a diagnostic algorithm for DNA Detection of *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* in a Pediatric Referral Hospital in Barcelona, Spain. J Clin Microbiol. 2019;57:e01231–1318, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01231-18>.
6. Mir-Cros A, Codina G, Martín-Gómez MT, Fàbrega A, Martínez X, Jané M, et al. Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain. Emerg Infect Dis. 2017;23:1856–9, <http://dx.doi.org/10.3201/eid2311.170960>.
7. Probert WS, Ely J, Schrader K, Atwell J, Nossoff A, Kwan S. Identification and evaluation of new target sequences for specific detection of *Bordetella pertussis* by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2008;46:3228–31, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00386-08>.
8. Dominguez DC. A profile of the Simplexa™ Bordetella Direct assay for the detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal swabs. Expert Rev Mol Diagn. 2020;20:889–94, <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2020.1819240>.
9. Lanotte P, Plouzeau C, Burucoa C, Grélaud C, Guillot S, Guiso N, et al. Evaluation of four commercial real-time PCR assays for detection of *Bordetella* spp. in nasopharyngeal aspirates. J Clin Microbiol. 2011;49:3943–6, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00335-11>.
10. Chow SK, Arbefeville S, Boyanton BL Jr, Dault EM, Dunn J, Ferrieri P, et al. Multicenter Performance Evaluation of the Simplexa Bordetella Direct Kit in Nasopharyngeal Swab Specimens. J Clin Microbiol. 2020;59:e01041–1120, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01041-20>.

Marta Pérez-Abeledo^a, Verónica Barrioluengo^b,
Elena Maeso^b y Juan Carlos Sanz^{a,c,*}

^a Unidad de Microbiología Clínica, Laboratorio Regional de Salud Pública de la Comunidad de Madrid, Dirección General de Salud Pública de la Comunidad de Madrid, Madrid, España

^b DiaSorin Iberia S.A., Madrid, España

^c CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: juan.sanz@salud.madrid.org (J.C. Sanz).