



Desarrollo y validación de una PCR múltiple para el diagnóstico de *Bordetella* spp.

 18 min.



El equipo de Bioquímicos del Laboratorio Central de la Subsecretaría de Salud de Neuquén y del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata nos presentan una nueva herramienta optimizada y validada que permite detectar la presencia de las distintas especies de *Bordetella* involucradas en el cuadro clínico de coqueluche



Luis Alfredo Pianciola ^{1a},
Melina Leonor Mazzeo ^{2a},
Darío Flores ^{2b},
Daniela Flavia Hozbor ^{3b}.

¹ Magister en Microbiología Molecular

² Bioquímico

³ Doctora en Bioquímica

^a Laboratorio Central. Subsecretaría de Salud de Neuquén. Gregorio Martínez 65. Neuquén.

^b Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. Facultad Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Calles 49 y 115. La Plata. Argentina.

Acta Bioquím Clín Latinoam 2012; 46 (4): 667-76



Correspondencia

Mag. en Microb. Mol. LUISA. PIANCIOLA
Gregorio Martínez 65
8300 - NEUQUÉN, Argentina
E-mail: luispianciola@yahoo.com.ar



Resumen

El objetivo del trabajo consistió en diseñar y validar una PCR en formato convencional que permita confirmar la presencia o ausencia de *Bordetella pertussis* y detectar otras especies del género, como *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*, que pudieran estar involucradas en el cuadro clínico de coqueluche. A tal fin se diseñó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple que amplifica una secuencia del promotor del gen de Toxina Pertussis y otra del gen de la Toxina Adenilato Ciclasa-Hemolisina. Se validó la metodología siguiendo esquemas publicados anteriormente. Se optimizaron las condiciones de la PCR. Se validó la metodología obteniéndose un límite de detección para ambas secuencias de 0,5 bacterias por reacción. Se validó, además, la especificidad y robustez de la técnica. Se presenta una nueva herramienta diagnóstica optimizada y validada, que permite detectar la presencia de las especies de *Bordetella* más frecuentemente involucradas en el cuadro clínico de coqueluche. Su uso combinado con alguna de las PCR habituales en diagnóstico, como la PCR IS481, permite aumentar la sensibilidad del diagnóstico de esta enfermedad, la especificidad del mismo discriminando los resultados falsos positivos/negativos y aumentar el conocimiento sobre los agentes etiológicos implicados en esta patología.

Palabras clave: *Bordetella pertussis* * *Bordetella parapertussis* * *Bordetella bronchiseptica* * reacción en cadena de la

polimerasa.

Introducción

Pertussis o coqueluche es una infección respiratoria aguda, altamente contagiosa y particularmente grave en menores de un año. Se estima que esta enfermedad inmunoprevenible, luego de más de 60 años de vacunación, aún produce en el mundo 30 millones de casos por año con más de 300 000 muertes (1) (2). El principal agente etiológico de esta enfermedad es una bacteria gran negativa perteneciente al género *Bordetella* denominada *Bordetella pertussis*. Otra especie del género, *Bordetella parapertussis*, también causa la enfermedad, aunque con menor frecuencia y generalmente presenta cuadros más leves (3). *Bordetella bronchiseptica* es primariamente un patógeno animal, pero también puede causar infecciones en seres humanos, generalmente en pacientes inmunocomprometidos (4).

Recientemente, esta especie ha sido asociada a cuadros similares a pertussis, aunque generalmente con evolución clínica menos severa (5). *Bordetella holmesii*, la última especie descrita asociada a infecciones respiratorias, se ha encontrado en sangre de adultos jóvenes y ocasionalmente en el tracto respiratorio. Ha sido relacionada también a cuadros similares a pertussis aunque su impacto epidemiológico en esta patología aún no se conoce (6) (7).

La presentación clínica de pertussis se caracteriza por la presencia de algunos de

los siguientes signos y/o síntomas: tos paroxística, estridor inspiratorio y vómitos después de toser. Sin embargo, ésta puede variar con la edad y el estado inmune del paciente. Así, los lactantes pueden presentar apneas y cianosis sin otro síntoma característico de la enfermedad mientras que los adolescentes y adultos, que aún cuentan con cierta inmunidad, pueden presentar síntomas más moderados e incluso en algunos casos, típicos. En la enfermedad clásica, el diagnóstico clínico puede realizarse sin dificultad. Sin embargo, en aquellos casos en los que la clínica dista de la presentación clásica, se requiere de confirmación por el laboratorio (8). Lo mismo ocurre cuando es necesario el diagnóstico etiológico diferencial entre las distintas especies de *Bordetella* (3). El cultivo es altamente específico y está considerado el estándar de oro pero su sensibilidad es baja, la metodología es compleja y demora varios días hasta tener un resultado. La serología es más sensible y específica pero el requerimiento, en el formato más difundido en este medio, de una muestra de la fase convaleciente, lo

hace un diagnóstico tardío y de escasa utilidad clínica (9). El desarrollo de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos ha tenido un impacto significativo en el diagnóstico y manejo de muchas enfermedades infecciosas (10), incluyendo pertussis (11). En Argentina se utiliza habitualmente una metodología dirigida específicamente a detectar ADN de *B. pertussis* (12), dada la importancia epidemiológica de esta especie sobre las demás. A pesar del buen desempeño de la metodología y el excelente aporte al diagnóstico clínico, su especificidad impide el conocimiento de la participación de las otras especies de *Bordetella* en el cuadro clínico. Se han descrito metodologías que amplifican otras regiones del genoma de *Bordetella* spp como la secuencia codificante de la toxina adenilato ciclasa-hemolisina (13), la del gen de la porina (14) (15), la secuencia de inserción IS481 (16), la secuencia de inserción IS1001 (17), la del gen de flagelina (4), etc. Cada uno de estos ensayos tiene especificidad variable para una especie de *Bordetella*, por lo tanto si se quiere obtener información sobre la

presencia o no de otras especies relacionadas a la patología, deben realizarse varios ensayos independientes. Recientemente se han descrito algunos ensayos en formato múltiple, pero todos ellos basados en PCR en tiempo real, con costos que dificultan o impiden su aplicación en este medio (18).

En este trabajo se presenta el diseño y validación de una PCR múltiple en formato convencional destinada al diagnóstico clínico en muestras respiratorias. La misma tiene la suficiente especificidad para confirmar presencia o ausencia de *B. pertussis* y a la vez la sensibilidad necesaria para detectar otras especies del género *Bordetella* (*B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*) que pudieran estar involucradas en el cuadro clínico. Para ello se seleccionó como uno de los blancos posibles la secuencia promotora del gen que codifica para la toxina pertussis, específica para *B. pertussis*, descartando la IS481 ya que, aunque más sensible, también está presente en *B. holmesii* (19) (20) y *B. bronchiseptica* (15). Para el otro blanco de la PCR, orientada a la detección de las otras

**Antes de solicitar un
análisis clínico,
lo primero que hay que
es el**

**analizar
laboratorio.**

Más de 30 años de trayectoria dedicados al cuidado de los pacientes.

OAA ✓

Organismo
Argentina de
Acreditación

Laboratorio Clínico

LM 013
Consulte acerca de acreditación
en: www.oaa.org.ar

La excelencia se construye desde
la calidad, la tecnología y el profesionalismo.
Resultados confiables para efectuar
diagnósticos certeros.



LABORATORIO DE MEDICINA
ANÁLISIS CLÍNICOS | Dr. Raul Gutman

www.labmedicina.com - Tel: 011 4514 9370 - Acreditado Norma ISO 15189

especies potencialmente involucradas en la patología, se eligió la secuencia del gen que codifica para la toxina Adenilato Ciclasa-Hemolisina (AC-Hly). Esta metodología fue descrita en 1993 por Douglas et al (13). La misma permite la amplificación de un fragmento de 522 pares de bases (pb), lo que la hace compatible con la amplificación múltiple junto con la PCR del gen promotor de toxina pertussis (191 pb).

Por otra parte, la evolución de los microorganismos con la aparición de secuencias polimórficas, podría afectar la especificidad e incluso la sensibilidad de las distintas PCR. Estos parámetros también pueden verse afectados por errores técnicos como en todo proceso analítico, además de otras fallas relacionadas a los sistemas abiertos de detección de amplicones. Los resultados falsos positivos y negativos causados por polimorfismos en las secuencias blanco, variaciones técnicas o ambos, pueden evidenciarse mediante la detección simultánea de múltiples secuencias blanco (15), como en la metodología propuesta en este trabajo.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas y extracción de ADN: Las cepas a utilizar en los distintos ensayos fueron repicadas en los medios adecuados, a partir de los cuales se realizó una suspensión en agua bidestilada hasta una turbidez equivalente al tubo 1 del estándar de Mc Farland. En el caso particular de las cepas de *Bordetella* spp la suspensión se preparó a partir del desarrollo bacteriano obtenido en placas de agar Bordet Gengou (Difco, Sparks, MD, EEUU) suplementado con sangre de carnero 15%, luego de 72 h de incubación a 37 °C y de un repique posterior de 24 h en el mismo medio y condiciones de incubación. La suspensión se realizó en agua bidestilada. El lisado para utilizar en las distintas experiencias se realizó calentando las suspensiones durante 10 min en baño de agua a 100 °C y centrifugando a 8000 x g durante 5 min. Las cepas utilizadas como controles positivos fueron: *B. pertussis* cepa Tohama (CIP 8132), *B. bronchiseptica* cepa HHH 2589 y *B. parapertussis* cepa HHH 3800.

La optimización de la PCR múltiple se realizó a partir del conocimiento de las condiciones de las dos PCR originales.

PCR de la secuencia promotora del gen de toxina pertussis: Se utilizó la PCR descrita por Grimprel et al en 1993 (12), con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio por los autores (21). Este ensayo amplifica la secuencia promotora del gen que codifica para toxina pertussis, obteniéndose una banda de 191 pb. Los cebadores utilizados fueron:

Ptp1: 5' CCAACGCGCATGCGTGCGATTTCGTC 3' y
Ptp2: 5' CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCTATTTTA 3'.

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, con concentraciones finales de 50 mM de KCl (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), 2,5 mM de MgCl₂, (Fermentas, UAB, Vilnius, Lithuania), 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), 1,0 µM de cada cebador (Operon, Huntsville, AL, EEUU) y 0,05 U/µL de Taq polimerasa (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania). Se utilizaron 3 µL de templado. La amplificación consistió en una primera desnaturalización de 75 s a 94 °C, seguida de 35 ciclos, cada uno de ellos compuesto por 20 s de desnaturalización a 94 °C, 10 s de hibridación a 60 °C y 15 s de elongación a 72 °C. La elongación final fue de 30 s a 72 °C.

PCR del gen codificante de Adenilato Ciclasa-Hemolisina: se utilizaron los reactivos y condiciones descritos por Douglas et al en 1993 (13). Este ensayo amplifica el gen que codifica para la toxina Adenilato Ciclasa-Hemolisina, obteniéndose una banda de 522 pb. La secuencia de los cebadores utilizados fue la siguiente:

Ac1: 5' ATGCAGCAATCGCATCAGGCTGGTTAC 3' y
Ac2: 5' GCCGATCACCTTGACCGCTCGAAAT 3'

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, con concentraciones finales de 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 0,5 µM de cada cebador y 0,05 U/µL de Taq polimerasa. Se utilizaron 3 µL de templado. La amplificación consistió en una primera desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos, cada uno de ellos compuesto por 25 s de desnaturalización a 94 °C, 10 s de

hibridación a 53 °C y 20 s de elongación a 72 °C. La elongación final fue de 20 s a 72 °C.

Puesta a punto de la PCR múltiple AC-Hly/PT (PCRAC-Hly/PT): se partió de las siguientes condiciones y reactivos (22), que son compatibles con las óptimas para cada PCR individual. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, conteniendo concentraciones finales de 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 0,5 µM de cada cebador y 0,05 U/µL de Taq polimerasa. Se utilizaron 3 µL de templado. La amplificación consistió en una primera desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos, cada uno de ellos compuesto por 25 s de desnaturalización a 94 °C, 15 s de hibridación a 56 °C y 20 segundos de elongación a 72 °C. La elongación final fue de 20 s a 72 °C.

Análisis de los productos de PCR: los productos de la PCR se analizaron en corridas electroforéticas empleando geles de agarosa al 2% (p/v) que contenían 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Las corridas se realizaron a 120 V durante 20 min. Los resultados se analizaron por visualización del gel a la luz ultravioleta y fueron registrados empleando una cámara fotográfica digital Panasonic Lumix (Kadoma, Osaka, Japón).

Procesamiento de muestras clínicas: se utilizaron aspirados o hisopados nasofaríngeos procesados según técnicas descriptas previamente (21).

VALIDACIÓN DE LA PCR AC-HLY/PT

Rango de trabajo: se utilizó la cepa *B. pertussis* TOHAMA (Colección Instituto Pasteur, París, Francia, CIP 8132), en diluciones que abarcaban desde 5x10² a 5x10⁻² bacterias/reacción. La prueba se realizó por triplicado por dos operadores distintos en tres días distintos. Se determinó el Límite de Detección para la PCR AC-Hly/PT y para cada una de las PCR individuales, PCR PT y PCR AC-Hly, en sus condiciones propias. También fue determinado el Límite de Corte mediante sucesivas repeticiones del ensayo.

Selectividad: para la prueba de Inclusividad se utilizaron 33 cepas de *Bordetella* spp (20 *B. pertussis*, 8 *B.*

bronchiseptica y 5 *B. parapertussis*) provenientes de aislamientos clínicos de los laboratorios de los autores o de otros laboratorios colaboradores. Para estimar la Exclusividad se utilizaron 32 cepas de distintas especies bacterianas, cuyo detalle se muestra en la Tabla I.

Robustez: se utilizaron cuatro cepas: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Bordetella pertussis* HHH 3066, *Bordetella parapertussis* HHH 3800 y *Bordetella bronchiseptica* HHH 2589. Se evaluaron las variables que podrían afectar el desempeño del ensayo, como cambios en equipo, operador y día de realización de la reacción.

Resultados

PUESTA A PUNTO DE LA PCR AC-Hly/PT

Se comenzó por evaluar el comportamiento de cada par de cebadores en las condiciones que se emplearían en la PCR múltiple. Para ello se preparó una mezcla de



Tabla I. Cepas utilizadas en los ensayos de Exclusividad

N°	Microorganismo	Cepa	N°	Microorganismo	Cepa
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	17	<i>Streptococcus</i> grupo G	HHH 38061
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	18	<i>Streptococcus</i> grupo G	HHH 38198
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	19	<i>Haemophilus influenzae</i>	HHH 38113
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	20	<i>Haemophilus influenzae</i>	HHH 38133
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	21	<i>Haemophilus influenzae</i>	HHH 38268
6	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	22	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	HHH 38206
7	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	23	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	HHH 38133-2
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	24	<i>Enterococcus faecium</i>	PNOCB E24
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	25	<i>Enterococcus raffinosus</i>	HHH 26356
10	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	26	<i>Enterococcus gallinarum</i>	PNOCB E24-2
11	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247	27	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	PNOCB E27
12	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766	28	<i>Escherichia coli</i>	HHH 39853
13	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 10211	29	<i>Escherichia coli</i>	HHH 39854
14	<i>Streptococcus agalactiae</i>	HHH 38159	30	<i>Enterobacter cloacae</i>	PEEC 08
15	<i>Streptococcus agalactiae</i>	HHH 38256	31	<i>Proteus mirabilis</i>	HHH 39715
16	<i>Streptococcus agalactiae</i>	HHH 38273	32	<i>Shigella flexneri</i>	HHH 39792

Eco™ Real-Time PCR System

El primer equipo de PCR en tiempo real de alta performance y precio accesible

illumina®



Aplicaciones

- Cuantificación absoluta
- Cuantificación relativa
- Discriminación alélica
- Genotipificación de SNPs y análisis de metilación por Melting de alta resolución (HRM)

Recursos

- Uniformidad térmica de hasta 0,1 °C
- Ciclos rápidos de PCR
- Capacidad de multiplex (4 filtros)
- Sistema flexible y plataforma abierta a todos los reactivos
- No necesita referencia pasiva (ROX)
- Sistema Óptico Fijo (elimina la necesidad de calibraciones periódicas)

Beneficios

- Alta performance incluyendo HRM
- Rapidez en el ciclado (40 ciclos en 40 min.)
- Valores de Cq altamente producibles: mayor precisión de datos
- Economía de reactivos (volumen recomendado de reacción de 5 a 20 ul)
- Calibrado para SYBR, FAM, HEX, VIC, ROX y Cy5

BioSystems también posee una línea completa de reactivos para PCR en tiempo real

KAPABIOSYSTEMS



Para detección de SNPs usando Melting de alta resolución:
 • KAPA HRM FAST qPCR kits (a partir de DNA o cDNA)



Para qPCR basada en sondas:
 • KAPA PROBE FAST qPCR Kits (a partir de DNA o cDNA)



Para qPCR basada en SYBR Green
 • KAPA SYBR FAST qPCR kits (a partir de DNA o cDNA)
 • KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Kits (a partir de RNA)

BioSystems S.A.

reactivos que contenían sólo cebadores que hibridan con la secuencia de PT y otra solo cebadores que hibridan con la de AC-Hly. En las condiciones estándar detalladas se produjo adecuada amplificación de las dos secuencias seleccionadas.

Cuando se emplearon ambos cebadores en la misma mezcla de reacción para realizar la PCR múltiple, se obtuvo amplificación de ambas secuencias. Sin embargo, la intensidad de las bandas indicaba un desempeño subóptimo de la amplificación en el formato múltiple y por lo tanto, la necesidad de mejorar la sensibilidad de la reacción. Con este objetivo se analizaron los cambios posibles en las condiciones de reacción y se realizaron distintas experiencias para evaluarlos. Las modificaciones consideradas fueron: distintos tiempos de elongación, distintas temperaturas de hibridación, diferentes concentraciones de cebadores de AC-Hly y de PT, agregado de agentes adyuvantes como dimetil sulfóxido (DMSO) y seroalbúmina bovina (BSA), así como distintas concentraciones de Mg y de Taq polimerasa (23). A continuación se detallan los resultados obtenidos al modificar cada una de las condiciones indicadas.

Tiempo de elongación: Se cambió de 20 a 30 segundos. La sensibilidad de la PCR mejoró significativamente en especial en lo que se refiere al amplicón de la secuencia correspondiente a AC-Hly.

Temperatura de hibridación: se realizó una experiencia en la que se emplearon distintas temperaturas cercanas a las óptimas para cada par de cebadores. Se determinó que a 60 °C se obtiene la mayor sensibilidad e intensidad de las bandas para cada uno de los amplicones.

Con estas modificaciones las condiciones de la PCR quedaron definidas de la siguiente forma: una primera desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos, cada uno de ellos compuesto por 25 s de desnaturalización a 94 °C, 15 s de hibridación a 60 °C y 30 s de elongación a 72 °C. La elongación final fue de 20 s a 72 °C.

Concentración de los cebadores: se diseñaron experiencias cuantitativas que permitieran conocer la concentración óptima de cada uno en la solución final de reacción. La máxima sensibilidad se logró

con cantidades equimoleculares de los 2 pares de cebadores, especialmente cuando se utilizó 1 µL de cada uno, lo que equivale a una concentración final en el tubo de reacción de 0,5 µM.

Concentración de cloruro de magnesio: se realizó una experiencia utilizando distintas cantidades de cloruro de magnesio. El límite de detección no varió con los cambios en la concentración de Mg en el rango estudiado (2,0 a 3,0 mM); sin embargo se pudo apreciar una baja en la intensidad de las bandas a medida que la misma disminuía. Se consideró como concentración óptima la de 2,5 mM ya que con ella se logró una disminución en la intensidad de las bandas inespecíficas sin repercusión apreciable en la intensidad de las bandas específicas.

Agregado de dimetil sulfóxido: para mejorar la sensibilidad general de la PCR, se evaluó el agregado de dimetil sulfóxido (Fluka-Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a la reacción en una concentración de 5%. Se observó que la adición de este componente incrementó el rendimiento de la PCR, especialmente la amplificación de la secuencia de AC-Hly.

Aumento de la concentración de Taq Polimerasa: el aumento en la cantidad de unidades de Taq polimerasa agregadas a la mezcla de reacción (de 1U a 1,5U por reacción) derivó en una mejoría en la detección de muestras muy débilmente positivas en la PCR PT y que hasta ese momento no habían podido detectarse con la PCR múltiple.

Agregado de seroalbúmina bovina: para mejorar la sensibilidad de la reacción se probó el agregado de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) a la mezcla de reacción en una concentración de 0,5 µg/µL. Con este cambio se detectaron muestras muy débilmente positivas que eran negativas en las condiciones anteriores.

En base a todas las experiencias anteriores las concentraciones finales de los reactivos de la PCR AC-Hly/PT quedaron definidas de la siguiente forma: 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 0,5 µM de cada cebador, 0,075 U/µL de Taq polimerasa, 5% v/v de dimetil

sulfóxido y 0,5 µg/µL de albúmina bovina. Se utilizaron 3 µL de templado para un volumen final de 20 µL.

VALIDACIÓN DE LA PCR AC-Hly/PT

Rango de trabajo: Tanto las PCR simples como las dos secuencias de la múltiple, presentaron el mismo límite de detección de 0,5 bacterias por reacción. Esto indica que se lograron las condiciones óptimas de la PCR múltiple para conservar la sensibilidad de las reacciones individuales (Figura 1). Luego de sucesivas repeticiones se obtuvieron idénticos resultados en la banda de PT pero la de AC-Hly varió entre 0,5 y 5 bacterias por reacción. De esta forma, se concluye que el límite de detección para PT coincide con el límite de corte (0,5 bacterias por reacción), mientras que para AC-Hly el límite de detección coincide con los anteriores pero el límite de corte es de 5 bacterias por reacción. Algunas de las repeticiones y sus variaciones se muestran en la Figura 2.

Selectividad: Al determinar la Inclusividad, la totalidad de las cepas estudiadas presentaron las bandas esperadas para el o los genes correspondientes, al evaluar el ADN equivalente a 103 UFC por reacción. Así, las cepas de *B. pertussis* presentaron las bandas de 191 pb y 522 pb, correspondientes a la amplificación de las secuencias de PT y AC-Hly, respectivamente. En el caso de *B. bronchiseptica* y *B. paraptussis*, se observó sólo la banda correspondiente a AC-Hly (522 pb). Con respecto a la Exclusividad, en su totalidad las cepas presentaron ausencia de señal para los dos fragmentos genómicos considerados, al evaluar la PCR con una concentración de ADN correspondiente a 103 UFC por reacción. Algunos de estos resultados se muestran en la Figura 3.

Robustez: las cuatro cepas estudiadas presentaron la señal o señales esperadas en un total de doce repeticiones que incluyeron dos operadores, dos termocicladores y realizadas en tres días distintos. Se demuestra así que la PCR es resistente al cambio de respuesta cuando se introducen cambios deliberados tanto de operador como de termociclador y se realizan en tres días distintos. Algunas de esas experiencias con las distintas situaciones citadas anteriormente, se muestran en la Figura 4.



¿Todavía espera? Cuando las decisiones rápidas son esenciales **cobas h 232**

En menos de 12 minutos:

Mioglobina

CKMB

Troponina T

Dímero D

Pro BNP



Productos Roche S.A.Q. e I.
División Diagnóstica
Rawson 3150 - Ricardo Rojas
Tigre - Buenos Aires
www.roche-diagnostics.com.ar

cobas[®]

Life needs answers



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) de los productos de las reacciones de PCR PT, AC-Hly y múltiple AC-Hly/PT. Límite de detección para las tres PCR. Como templado se utilizó el material obtenido de la lisis de suspensiones de *B. pertussis* (cepa Tohama) en concentraciones equivalentes a 5×10^2 a 5×10^{-2} bacterias/reacción. Calle 1: control negativo (agua bidestilada). Calle 2: *B. pertussis* 5×10^2 bacterias/reacción. Calle 3: *B. pertussis* 5×10^1 bacterias/reacción. Calle 4: *B. pertussis* 5×10^0 bacterias/reacción. Calle 5: *B. pertussis* 5×10^{-1} bacterias/reacción. Calle 6: *B. pertussis* 5×10^{-2} bacterias/reacción. Calle 7: Control positivo (material obtenido de la lisis de una suspensión de *B. pertussis*, cepa Tohama). Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/mL.

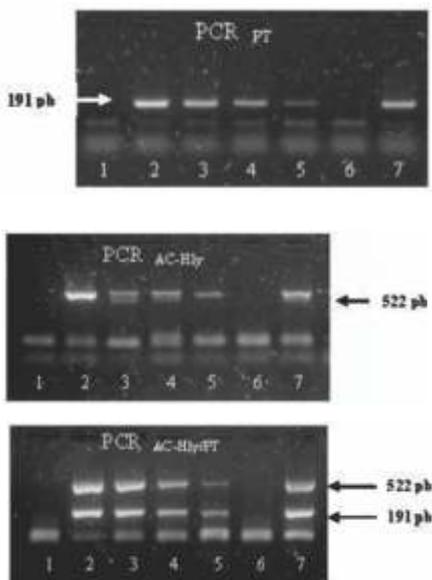


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) de los productos de la reacción de PCR múltiple AC-Hly/PT. Límite de corte. A a E: distintas repeticiones. Como templado se utilizó el material obtenido de la lisis de suspensiones de *B. pertussis* (cepa Tohama) en concentraciones equivalentes a 5×10^2 a 5×10^{-2} bacterias/reacción. Calle 1: control negativo. Calle 2: *B. pertussis* 5×10^2 bacterias/reacción. Calle 3: *B. pertussis*

5×10^1 bacterias/reacción. Calle 4: *B. pertussis* 5×10^0 bacterias/reacción. Calle 5: *B. pertussis* 5×10^{-1} bacterias/reacción. Calle 6: *B. pertussis* 5×10^{-2} bacterias/reacción. Calle 7: Control positivo. Para la visualización se empleó bromuro de etidio a 0,5 mg/mL.

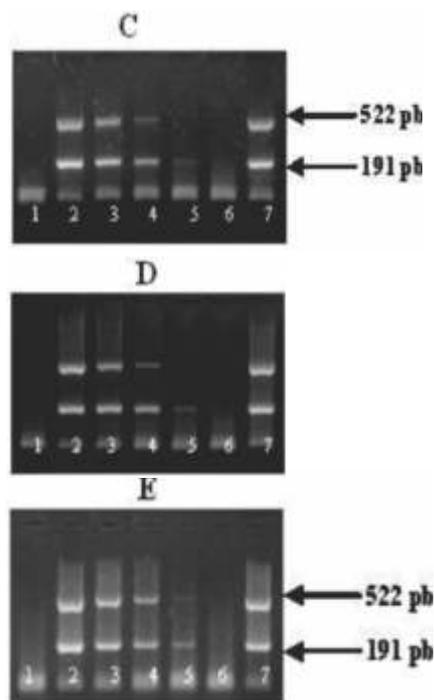
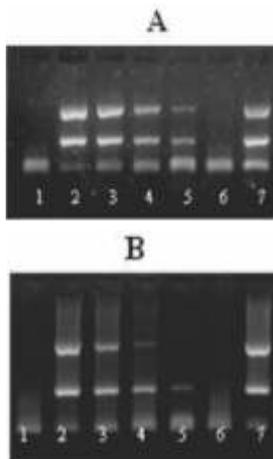


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) de los productos de la reacción de PCR múltiple AC-Hly/PT. Panel A: Prueba de Inclusividad. Calles 1 a 7: cepas de *B. pertussis*. Calle 8: control negativo. Calles 9 a 11: cepas de *B. pertussis*. Calle 12: control positivo. Calles 13 a 18: cepas de *B. pertussis*. Calle 19: control negativo. Panel B: Prueba de Inclusividad. Calles 1 a 4: cepas de *B. bronchiseptica*. Calle 5: control negativo. Calles 6 a 8: cepas de *B. bronchiseptica*. Calle 9: control positivo. Calles 10 a 14: cepas de *B. parapertussis*. Panel C: Prueba de Exclusividad. Calle 1: control negativo. Calles 2 a 7: cepas 3 a 8. Calle 8: control positivo. Calles 9 a 13: cepas 10 a 14.

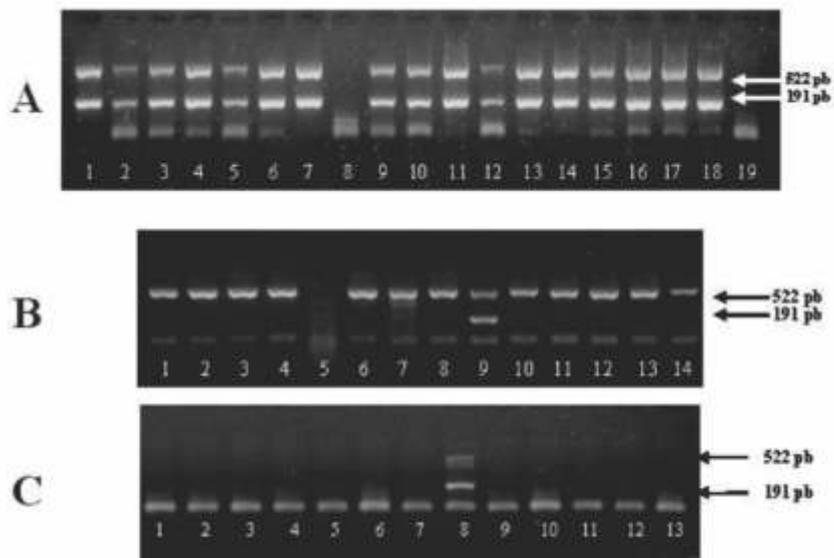
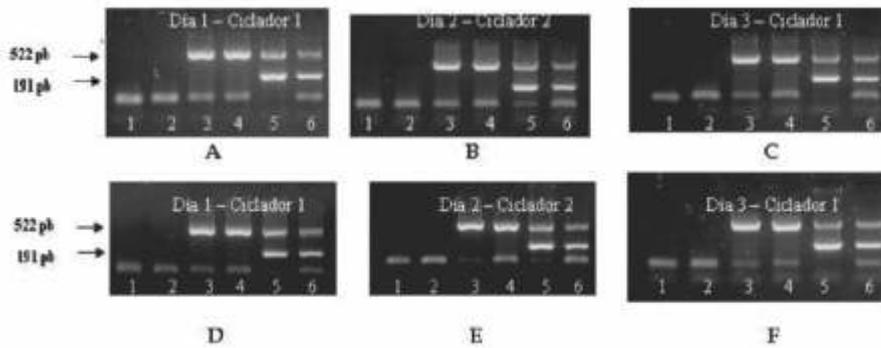




Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) de los productos de la reacción de PCR múltiple AC-Hly/PT. Prueba de robustez. Operador 1: A, B y C. Operador 2: D, E y F. Calle 1: control negativo. Calle 2: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Calle 3: *B. bronchiseptica*. Calle 4: *B. paraptussis*. Calle 5: *B. pertussis*. Calle 6: control positivo.



Discusión y Conclusiones

En coqueluche, como en muchas otras enfermedades infecciosas de alta contagiosidad, un diagnóstico rápido es de vital importancia. Especialmente porque permite que el tratamiento antibiótico tenga impacto en la reducción de los síntomas y en el bloqueo de la diseminación del patógeno (16). En este contexto es que el diagnóstico molecular basado en PCR realiza un aporte invaluable a la vigilancia y control de la enfermedad. Desde la introducción de esta metodología para el diagnóstico de coqueluche en 1989, se han publicado distintas metodologías en más de 100 trabajos. Se han usado como blanco en las distintas técnicas a diferentes regiones

del genoma de *Bordetella* sp: secuencias de inserción, gen de adenilato ciclasa, gen de porina, secuencia promotora del gen de la toxina pertussis, etc (16). A pesar del gran adelanto que significó el aporte de la PCR al diagnóstico, la metodología no fue aún completamente estandarizada.

Si bien existe un gran desarrollo de PCR en tiempo real, los costos para países como la Argentina impiden su uso en el diagnóstico de rutina. Así es que las técnicas de PCR en su formato convencional mantienen plena vigencia y es necesario avanzar en mejoras de las mismas. El desarrollo y validación de una PCR en formato múltiple implicaría un avance en este sentido. Por un lado, podría disminuir

los falsos negativos debidos a la existencia de variantes polimórficas o a errores técnicos en el proceso analítico. Por otra parte, permitiría ampliar el rango de especies detectables.

La elección de la secuencia blanco es crítica para cualquier ensayo de PCR. Es deseable que, además de los beneficios enunciados anteriormente, el uso de una metodología múltiple brinde información adicional sobre el o los agentes etiológicos presentes en la muestra estudiada. En el caso de diagnóstico de coqueluche, es altamente recomendable que la combinación de cebadores elegida permita la detección de las principales especies de *Bordetella* que causan la enfermedad, además de brindar información sobre la presencia o ausencia de *B. pertussis*, microorganismo que causa más del 90% de los casos.

En el presente trabajo se diseñó y puso a punto una PCR múltiple utilizando como secuencia blanco a la secuencia promotora del gen de la toxina pertussis ya que es específica para *B. pertussis* y el laboratorio de los autores tiene amplia experiencia con esta metodología. Se incluyó además, una secuencia interna del gen que codifica para Adenilato Ciclasa-Hemolisina ya que está presente en las tres especies más frecuentes que causan infecciones con sintomatología compatible con pertussis (*B. pertussis*, *B. paraptussis* y *B. bronchiseptica*) y además puede



INNO-LIA™ SCORE

tecnolab
s.a.

Tests Confirmatorios para HIV, HTLV y Hepatitis C por inmunoensayo lineal

INNO-LIA™ HIV I/II Score 80540 Inno-Lia HIV I/II Score, 20 determinaciones

INNO-LIA™ HTLV I/II Score 80541 Inno-Lia HTLV I/II Score, 20 determinaciones

INNO-LIA™ HCV Score 80542 Inno-Lia HCV Score, 20 determinaciones

Máxima sensibilidad y especificidad ■ Procedimientos cortos ■ Reactivos listos para usar ■ Automatizables

compatibilizarse con la PCR anterior en un formato múltiple. Los tamaños de los productos de amplificación (191 pares de bases para la PCR de la secuencia promotora de toxina pertussis y 522 para la de Adenilato Ciclasa-Hemolisina) son claramente diferenciables en un gel de agarosa. Adicionalmente, es posible compatibilizar las temperaturas de hibridación de los distintos cebadores.

En este trabajo se optimizaron las condiciones de reacción de la PCR múltiple y luego la metodología optimizada fue validada. Este es un requisito indispensable para que un método analítico pueda ser aplicado al estudio de muestras en forma habitual, dado que las características de su desempeño deben estar definidas y adecuadamente aseguradas (24). Las Normas ISO definen validación como la confirmación obtenida mediante la provisión de evidencia objetiva, de haber cumplido los requisitos particulares para un uso pretendido y específico (24) (25).

En estos ensayos se ha podido determinar que el desempeño en la validación de la PCR AC-Hly/PT fue óptimo ya que se obtuvo un límite de detección igual al de cada PCR realizada individualmente. El mismo fue de 0,5 bacterias por reacción, lo que implica una excelente sensibilidad para el diagnóstico de la patología.

Las pruebas de selectividad permitieron corroborar el excelente desempeño de la PCR, demostrando un 100% de resultados óptimos, tanto en los ensayos de inclusión como en los de exclusión.

Finalmente, quedó demostrada la robustez del ensayo obteniendo resultados 100% concordantes al variar el operador, el equipo utilizado y realizando la metodología en tres días diferentes. En total se probó para este parámetro el desempeño de la PCR en doce situaciones distintas.

En resumen, se presenta una nueva herramienta diagnóstica que puede significar un aporte importante al desafío de diagnosticar esta patología. Su uso combi-

nado con alguna de las PCR habituales en diagnóstico, como la PCR IS481, puede aumentar la sensibilidad del diagnóstico de coqueluche, la especificidad del mismo discriminando los resultados falsos positivos/negativos y aumentar el conocimiento sobre los agentes etiológicos implicados en la patología.

Teniendo en cuenta la probable presencia de agentes etiológicos distintos de *B. pertussis*, la posible presencia de microorganismos con variantes polimórficas en las secuencias blanco estudiadas y la posible ocurrencia de errores técnicos, se recomienda la utilización de esta PCR múltiple junto con la de IS481, basándose en el algoritmo diagnóstico que figura en la Tabla II.

En las primeras pruebas de la nueva herramienta diagnóstica con muestras clínicas y utilizando los algoritmos diagnósticos propuestos, se pudieron detectar varios pacientes infectados con *B. paraptussis* con cuadro clínico compatible con coqueluche, además de otros pacientes infectados con *B. pertussis*. Estos resultados que a entender de los autores son los primeros notificados sobre la circulación de *B. paraptussis* en Argentina, demuestran la utilidad de la PCR desarrollada en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio Nacional de Referencia de Coqueluche (Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata) y al Laboratorio de Microbiología del Hospital Horacio Heller de Neuquén, por haber cedido gentilmente la mayoría de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.



Tabla II. Algoritmo de interpretación de los resultados de PCR.

	PCR AC-Hly/PT			
	+/+ (1)	+/- (2)	-/+ (3)	-/- (4)
PCR (5481) Positiva	<i>B. pertussis</i>	Indeterminado (6)	Indeterminado	<i>B. holmesii</i> (6)
PCR (5481) Negativa	Indeterminado	<i>B. paraptussis</i> (7) ó <i>B. bronchiseptica</i> (7)	Indeterminado	Negativo

(1) significa presencia de amplicón de AC-Hly y PT. (2) significa presencia de amplicón de AC-Hly y ausencia del de PT.

(3) significa ausencia de amplicón de AC-Hly y presencia del de PT (4) significa ausencia de ambos amplicones

(5) considerar polimorfismo en alguna secuencia blanco, falla técnica y/o diferencia en los límites de detección de cada ensayo

(6) para confirmar realizar PCR RecA (26) (7) para confirmar realizar PCR IS1001 y PCRFlagelina.

Referencias bibliográficas

- Bonacorsi S, Farnoux C, Bidet P, Caro V, Aizenfisz S, Benhayoun M, et al. Treatment failure of nosocomial pertussis infection in a very-low-birth-weight neonate. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3830-2.
- Plotkin S. Aims, scope and findings of the Global Pertussis Initiative. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: S5-S6.
- Bergfors E, Trollfors B, Taranger J, Lagergård T, Sundh B, Zackrisson G. Paraptussis and Pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int J Infect Dis* 1999; 3: 140-6.
- Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1999; 150: 333-41.
- Koidl C, Bozic M, Burmeister A, Hess M, Marth E, Kessler HH. Detection and differentiation of *Bordetella* spp by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 347-50.
- Mazengia E, Silva EA, Peppe JA, Timperi R, George H. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2330-3.
- Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H. *Bordetella holmesii* like organism isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 441-3.
- Walsh PF, Kimmel L, Feola M, Tran T, Lim C, De Salvia L, et al. Prevalence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella paraptussis* in infants presenting to the emergency department with bronchiolitis. *J Emerg Med* 2011; 40: 256-61.
- 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: 2908-12.

10. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Can Med Assoc J* 2000; 163: 301-9.

11. Murdoch DR. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *APMIS* 2004; 112: 713-27.

12. Grimprel E, Bégué P, Anjak I, Betsou F, Guiso N. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2745-50.

13. Douglas E, Coote JG, Parton R, McPhee W. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. *J Med Microbiol* 1993; 38: 140-4.

14. Li Z, Jansen DL, Finn TM, Halperin SA, Kasina A, O'Connor SP, et al. Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 783-9.

15. Qin X, Galanakis E, Martin ET, Englund JA. Multi-target polymerase chain reaction for diagnosis of Pertussis and its clinical impli-

cations. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 506-11.

16. Glare EM, Paton JC, Premier RR, Lawrence AJ, Nisbet IT. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1982-7.

17. Van der Zee A, Agterberg C, van Agterveld M, Peeters M, Mooi FR. Characterization of IS1001, an insertion sequence element of *Bordetella parapertussis*. *J Bacteriol* 1993; 175: 141-7.

18. Proberts 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.

19. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 467.

20. Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MK. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1963-6.

21. Hozbor D, Regueira M, Fossatti S, Weltman

G. Diagnóstico de *Bordetella pertussis*-Manual de procedimientos. Ministerio de Salud y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Universidad Nacional de La Plata, 2005, p. 6-10.

22. Henegariu O, Heerema NA, Dlouby SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 1997; 23: 504-11.

23. Lopes RFF, Moreno Sena JP, Chies JM, Rodrigues JL. Pit-Stop PCR: An approach to increase final product yield of multiplex PCR. *BioTechniques* 1999; 26: 638-9.

24. Trullols E, Ruisánchez I, Xavier Rius F. Validation of analytical methods. *Trends Anal Chem* 2004; 23: 137-45.

25. Leotta GA, Chinen I, Epsztejn S, Miliwebsky E, Melamed I C, Motter M, et al. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 1-10.

26. Antila M, He Q, De Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, et al. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1043-51.



Iris[®]
Diagnostics Division

Sistema Automatizado de Urinalysis



BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar