

## CONTROL DE CALIDAD DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (BM-1/11)

En el presente control, se envió a los distintos laboratorios participantes una alícuota que contenía una muestra de exudado nasofaríngeo resuspendido en medio de transporte, de un niño de 3 años de edad, que fue llevado por su madre a urgencias de Pediatría, por presentar, desde hacía 5 días, un cuadro de malestar general, febrícula, lagrimeo y coriza que había empeorado en las últimas 24 horas, apareciendo accesos de tos paroxística que habían llegado a provocar el vómito en el niño en varias ocasiones. A la auscultación, se detectaron sibilantes inspiratorios. La madre relató que en la clase del niño había habido un par de casos similares. Se tomó una muestra de aspirado nasofaríngeo que se remitió al Servicio de Microbiología para estudio de virus y detección de DNA de *Bordetella pertussis*.

Se solicitó a los participantes que procesaran la muestra del exudado nasofaríngeo para la detección de **genoma de *Bordetella spp*** mediante PCR, así como que formularan los comentarios que consideraran oportunos.

El laboratorio que actuó como centro de referencia informó positiva la detección de genoma de *B. pertussis*, realizada mediante PCR *real-time* con el equipo comercial SmartCycler (de Cepheid, distribuido por Izasa). Asimismo, la detección de genoma de *Bordetella parapertussis* fue negativa empleando el mismo sistema comercial.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE GENOMA DE *Bordetella*

La muestra de exudado nasofaríngeo fue enviada a 82 laboratorios de los que 60 remitieron hoja de respuesta (73,2%). De ellos, quince centros informaron que en su laboratorio no se realiza ninguna de estas determinaciones, por lo que en realidad fueron 45 los centros que aportaron resultados valorables, siendo el porcentaje de participación real del 54,9%. Este porcentaje es moderadamente superior al del control de Microbiología Molecular del 2010 que fue del 47,8% (en dicho control se solicitaba amplificación de DNA de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina en una alícuota de exudado nasal).

La detección de DNA para el género *Bordetella* fue realizada únicamente por 10 de los 45 laboratorios que enviaron hoja de respuesta con datos analizables (22,2%). De ellos, 6 (60,0%) aportaron un resultado positivo, concordante con el del centro de referencia. De las 10 determinaciones, 5 fueron por PCR convencional, 3 por PCR *real-time*, 1 por PCR seguida de hibridación, mientras que un centro no aportó información al respecto (tabla 1).

**Tabla 1. Métodos y marcas utilizados en la detección de genoma de género *Bordetella***

Método <sup>a</sup>	Marca comercial	Número (%)	Acierto (%)
PCR	GenoQuick (Hain)	3 (30,0)	2 (66,7)
	Speed-oligo (Vircell)	1 (10,0)	1 (100,0)
	No informa	1 (10,0)	0 (0,0)
PCR <i>real-time</i>	SmartCycler (Cepheid)	1 (10,0)	1 (100,0)
	Simplexa (Focus)	1 (10,0)	1 (100,0)
	Desarrollo propio	1 (10,0)	1 (100,0)
	No informa	1 (10,0)	0 (0,0)
PCR + hibridación	Tib Molbiol	1 (10,0)	0 (0,0)
No informa	No informa	1 (10,0)	0 (0,0)
Total		10 (100,0)	6 (60,0)

La detección por PCR de *B. pertussis* se realizó en 39 de los 45 centros que enviaron hoja de respuesta con datos analizables (86,7%). En total, esta prueba resultó positiva en 28 de los 39 participantes (71,8%). El método mayoritariamente empleado fue la PCR *real-time* y, dentro de este grupo, el equipo SmartCycler de Cepheid (30,7% de los participantes que realizaron la prueba, con un 100,0% de aciertos), seguido del LightCycler de Roche (17,9% de los mismos, con un 85,7% de aciertos). Un porcentaje importante de centros (el 20,5%) emplearon una PCR a tiempo real de desarrollo propio, aunque únicamente un 37,5% aportó un resultado positivo. La totalidad de métodos y marcas empleadas se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Métodos y marcas utilizados en la detección de genoma de *Bordetella pertussis***

Método <sup>a</sup>	Marca comercial	Número (%)	Acierto (%)
PCR	GenoQuick (Hain)	3 (7,7)	1 (33,3)
	Desarrollo propio	2 (5,1)	0 (0,0)
	No informa	1 (2,6)	1 (100,0)
Nested-PCR	Desarrollo propio	2 (5,1)	2 (100,0)
PCR <i>real-time</i>	SmartCycler (Cepheid)	12 (30,7)	12 (100,0)
	LightCycler (Roche)	7 (17,9)	6 (85,7)
	Argene	1 (2,6)	1 (100,0)
	Bio-Tech	1 (2,6)	1 (100,0)
	Simplexa (Focus)	1 (2,6)	1 (100,0)
	Desarrollo propio	8 (20,5)	3 (37,5)
	No informa	No informa	1 (2,6)
Total		39 (100,0)	28 (71,8)

Respecto a la detección por PCR de *B. parapertussis*, se realizó en 22 de los 45 centros que enviaron hoja de respuesta con datos analizables (48,9%). La práctica totalidad de los mismos (21 laboratorios, el 95,5%) obtuvo un resultado negativo, coincidiendo con el centro de referencia. Como ya sucedía con la determinación anterior, el método mayoritariamente empleado fue la PCR *real-time* y, dentro de este grupo, el equipo SmartCycler de Cepheid (54,6% de los participantes que realizaron esta prueba con un 100,0% de aciertos), seguido del LightCycler de Roche (18,2% de los mismos y 100,0% de aciertos). Estos datos se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Métodos y marcas utilizados en la detección de genoma de *Bordetella parapertussis***

Método <sup>a</sup>	Marca comercial	Número (%)	Acierto (%)
PCR	GenoQuick (Hain)	3 (13,7)	2 (66,7)
<i>Nested</i> -PCR	Desarrollo propio	1 (4,5)	1 (100,0)
PCR <i>real-time</i>	SmartCycler (Cepheid)	12 (54,6)	12 (100,0)
	LightCycler (Roche)	4 (18,2)	4 (100,0)
	Simplexa (Focus)	1 (4,5)	1 (100,0)
	Desarrollo propio	1 (4,5)	1 (100,0)
Total		22 (100,0)	21 (95,5)

### UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

Por lo que respecta a la necesidad de utilizar un laboratorio externo de referencia para la realización de la prueba solicitada, de los 45 centros que realizaron esta técnica, 38 (84,4%) afirmaron no haberlo utilizado, mientras que los 7 laboratorios restantes indicaron que sí lo habían utilizado (15,6%).

### COMENTARIOS

La mayoría de comentarios se referían a que en sus laboratorios no realizaban la PCR de *Bordetella* y que no la enviaban a su centro de referencia por razones económicas.

Dos centros indicaron que para la amplificación de DNA frente a *B. pertussis* se había utilizado *primers* que amplificaban la secuencia de inserción IS481 de este microorganismo. Un centro mencionó que aproximadamente un 30% de *B. pertussis* han sido identificadas en la actualidad por técnicas moleculares como *Bordetella holmesii*.

Por otra parte, un centro comentó que en dos muestras diferentes se obtuvo amplificación tanto del control interno ( $\beta$ -globina) como del gen de *B. pertussis* en ciclos muy tardíos (>35), por lo que sospechaban que la muestra podría estar muy diluida.