

Expertos Invitados

ESCHERICHIA COLI ENTEROAGREGATIVA, SU IMPORTANCIA COMO AGENTE CAUSANTE DE DIARREA INFANTIL EN MENDOZA, ARGENTINA



Columnista Experto de SIIC
Dra. María Elena Rüttler

Jefe de Trabajos Prácticos, dedicación exclusiva. Area de Química Biológica y Unidad de Admisión. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Campo de especialización Biología Molecular.

Introducción

Hace ya más de un siglo Escherich describió una bacteria aislada de heces de individuos sanos y la denominó *Bacterium coli commune*.

Este microorganismo anaerobio facultativo, conocido actualmente como *Escherichia coli* es un habitante normal del intestino grueso de los mamíferos, donde juega un papel importante en su fisiología; la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas y además pueden ejercer un efecto protector por impedir la proliferación de otras más virulentas. Pero la minoría de *E. coli* que causan enfermedad son un excelente ejemplo del modo por el cual mínimas variaciones en la estructura genética pueden permitir a las bacterias causar diferentes enfermedades como meningitis, septicemia, pielonefritis y diarrea. Recién en 1945 Bray pudo comprobar que *E. coli* puede ser diarreigénico en humanos, especialmente en niños. Las cepas de *E. coli* diarreigénicas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos con diferentes propiedades de virulencia y epidemiología.

Categorías diarreigénicas¹

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) se adhiere al intestino delgado mediante fimbrias y elabora dos tipos de enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST). *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) invade el enterocito y produce una diarrea similar a la producida por *Shigella*. *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) produce la lesión A/E (*attaching and effacing*) con destrucción de las microvellosidades. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) posee fimbrias de adherencia y elabora potentes citotoxinas SLT (*shiga-like-toxins*) que se relacionan con el síndrome urémico-hemolítico (SUH). *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) también posee fimbrias de adherencia y elabora dos enterotoxinas. *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC) posee una fimbria mediadora de este tipo de adherencia, pero aún no existen estudios epidemiológicos concluyentes con respecto a su capacidad diarreigénica.²

Factores de patogenicidad¹

Como la mayoría de los patógenos, *E. coli* sigue una estrategia de infección: 1) colonización de un sitio en la mucosa, 2) evasión de las defensas del huésped, 3) multiplicación, 4) daño al huésped. El hecho más destacable de las cepas de *E. coli* diarreigénicas es su habilidad para colonizar la superficie de la mucosa intestinal, a pesar de los movimientos peristálticos y de la competencia de los integrantes de la microbiota normal, incluyendo cepas de *E. coli* no patógenas.

La presencia de fimbrias de adherencia es una propiedad de todas las cepas de *E. coli*, incluidas las no patógenas. Sin embargo, las cepas diarreigénicas poseen antígenos fimbriales específicos que incrementan su habilidad colonizadora y permiten su adherencia al intestino delgado, sitio que normalmente no es colonizado.

Una vez que ha colonizado el intestino, sigue diferentes estrategias de patogénesis, según su tipo o

categoría, a saber:

- producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC),
- invasión (EIEC) y/o
- adherencia íntima con señales o eventos de membrana (EPEC y EHEC).

Cabe aclarar que el modo de interacción es específico para cada categoría.

La versatilidad en el genoma de *E. coli*, que le confiere las diferentes propiedades de virulencia, se fundamenta principalmente en dos configuraciones genéticas: plásmidos de virulencia e islas cromosomales de patogenicidad. Las seis categorías de *E. coli* diarreigénicas descritas son portadoras de al menos un plásmido de virulencia. Por una parte, EIEC, EHEC, EPEC y EAEC son portadoras de familias de plásmidos, cada uno de los cuales codifica para múltiples factores de virulencia. Asimismo, EPEC, EHEC y EAEC poseen además genes cromosomales organizados como un grupo denominado "isla de patogenicidad".

Los rasgos de patogenicidad individuales, como la producción de toxinas, pueden ser codificados por transposones (toxina ST de ETEC) o por fagos (toxina Shiga).^{3,4,5}

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

La observación de la adherencia de EPEC a células HEp-2, realizada por Cravioto y col. en 1979, fue crucial no sólo en el campo de la investigación de EPEC, sino que permitió, además, establecer dos categorías más de *E. coli* patogénicas. El patrón de adherencia de EPEC fue descrito como "adherencia localizada", denotando la presencia de microcolonias en la superficie de las células en cultivo. Las bacterias no EPEC adherían de una manera diferente que fue definida inicialmente como "difusa". Sin embargo, en un estudio realizado por Nataro, en Chile en 1987, se subdividió el fenotipo difuso en dos categorías: agregativas y difusas "verdaderas". Las agregativas se distinguen por la autoaglutinación de las bacterias y por su adhesión, además, a la superficie de vidrio del cubreobjetos. El patrón se define como *stacked-brick* (pilas de ladrillos). Mientras que en la adherencia difusa las bacterias se observan dispersas sobre la superficie de las células HEp-2 con poca agregación y poca adherencia al vidrio entre las células.

A fines de la década del '80 y comienzos de los '90, la relación inconsistente entre EAEC y diarrea condujo a dudar acerca de su papel como patógeno humano, de manera similar a lo ocurrido con EPEC en los '70.⁶

Si bien la patogenicidad de ETEC y EIEC pudo atribuirse a marcadores específicos y demostrarse en modelos animales, la evidencia de la patogenicidad de EPEC fue sólo epidemiológica hasta 1978, cuando dos cepas de EPEC demostraron su patogenicidad en adultos voluntarios. Y así como con EPEC, en los primeros aislamientos de EAEC no se pudo demostrar la presencia de ningún factor de virulencia conocido como diarreigénico. La observación de que estas cepas a menudo eran recuperadas de individuos aparentemente sanos condujo a un escepticismo sobre la patogenicidad de EAEC, hasta que dos estudios con voluntarios y un número de brotes de diarrea probaron que al menos algunas cepas de EAEC causaban diarrea en humanos. Además, estudios de casos y controles y de vigilancia en los últimos quince años sugieren fuertemente que EAEC constituye una causa importante de diarrea en personas de todas las edades en países industrializados y en vías de desarrollo.^{7,8}

Patogénesis

Las cepas EAEC producen aumento en la secreción de mucus con atrapamiento de las bacterias formando una biopelícula de mucus y bacterias. Se demostró a través de diversos experimentos que esta película se produce *in vivo*, y también se observó que la diarrea por EAEC es predominantemente mucosa, aunque no se ha dilucidado completamente el significado de esta característica. Además de esta propiedad, se ha observado que la infección por EAEC está acompañada por efectos citotóxicos en la mucosa intestinal. Vial y col., en 1988, observaron la lesión producida por EAEC a través de microscopía óptica. La lesión se caracteriza por acortamiento de las microvellosidades, necrosis hemorrágica de los extremos de la vellosidad y respuesta inflamatoria leve con edema e infiltración mononuclear de la submucosa. En biopsias de pacientes fallecidos por diarrea persistente causada por EAEC se evidenció la destrucción de la mucosa ileal. Los efectos citotóxicos se demostraron por cultivo en células T84, en las cuales la citotoxicidad causada por EAEC se manifiesta por vesiculización de la membrana, seguida de muerte celular y exfoliación de las células de la monocapa. Además, este efecto se acompaña de incremento en la formación de vacuolas y separación del núcleo del citoplasma circundante. Estos efectos citotóxicos requieren la presencia de genes codificados en un plásmido de 65 mDa, que contiene además los

genes que codifican la adherencia. Sin embargo, no todas las EAEC producen efectos citotóxicos sobre la mucosa, lo cual indica la elevada heterogeneidad que presentan estas cepas, y conduce a resultados inconsistentes entre su presencia y diarrea, como demuestran algunos estudios epidemiológicos.^{9,10,11}

Adherencia

Nataro y col. identificaron en 1992 una estructura fimbrial flexible de 2 a 3 nm de diámetro, denominada fimbria de adherencia agregativa I (AAF/I). La adherencia a células HEp-2 producida por la cepa 17-2 está mediada por esta fimbria. Los genes que codifican para la fimbria están organizados en dos grupos, separados por 9 Kb, dentro del plásmido pAA. La región 1 contiene un grupo de genes requeridos para la síntesis y el ensamblaje de la proteína, incluida la subunidad estructural de la fimbria misma. La región 2 contiene un gen activador de la transcripción, denominado *aggR*.

Más recientemente se identificó una fimbria que presenta una homología del 25% con la primera y fue denominada AAF/II, cuya cepa prototipo es la 042, aislada en Perú.

No existen datos concluyentes sobre la frecuencia de aparición de una u otra. Las fimbrias AAF son necesarias para la adherencia a células epiteliales y para la formación de la biopelícula. Una proporción considerable de EAEC presenta este fenotipo pero no expresa ninguna de las fimbrias citadas, lo que indica que podrían existir otras adhesinas de naturaleza no fimbrial, lo que aún no se demostró.^{12,13}

EAST1

Es una proteína de 38 residuos de aminoácidos, homóloga a ST (toxina termoestable de ETEC), sólo que en lugar de 6 residuos de cisteína, EAST1 presenta 4.^{14,15} También presenta homología con un péptido de la membrana de las células eucariotas, denominado guanilina, y se observó que produce aumento en la diferencia de potencial y corriente de cortocircuito a través de tejido ileal de conejo montado en *using chambers*. Se ha visto que el gen *astA* que codifica para esta proteína, está presente en el 40% de las cepas EAEC, pero también se lo ha encontrado, aun con mayor frecuencia, en cepas EHEC y también asociado a *E. coli* no patógenas. En un estudio reciente realizado en Japón, cepas de *E. coli* que presentaron EAST1 como única característica diarregénica, fueron incluidas como posibles patógenos.¹⁶

Otras citotoxinas

Los efectos tóxicos observados en modelos animales, en explantos de células intestinales y en células T84 no son acompañados por internalización de la bacteria o por adherencia íntima.¹ Diversos grupos informaron la identificación de citotoxinas secretadas por EAEC. Es el caso de Pet, una serinproteasa originalmente identificada como una proteína secretada capaz de reducir la resistencia e incrementar la corriente de cortocircuito a través de tejido yeyunal de rata montado en *using chambers*. Además de su actividad enterotóxica, Pet tiene efectos citotóxicos en células epiteliales en cultivo y sobre eritrocitos por un mecanismo que probablemente involucra la degradación de la proteína de membrana espectrina.^{17,18}

Modelo propuesto para el mecanismo patogénico de EAEC

Hasta el presente, con los datos disponibles, se puede formular sólo una hipótesis del mecanismo: Nataro propone un modelo en tres etapas basado en ensayos *in vitro* y con animales.

La primera etapa involucra la adherencia inicial a la mucosa intestinal o a la capa de mucus o a ambas. Tanto AAF/I como AAF/II parecen ser las mediadoras de esta primera etapa. En la segunda etapa se produciría un incremento en la producción de mucus, que conduciría a la formación de una biopelícula espesa conteniendo bacterias. Esta biopelícula podría facilitar la colonización persistente y contribuir a la mala absorción de nutrientes. La tercera etapa, sugerida por evidencias histopatológicas y moleculares, incluiría la elaboración de citotoxinas que podría resultar en daño de las células intestinales. Con respecto al sitio de colonización, los datos no son concluyentes, pero las evidencias señalan como más probable la colonización del intestino delgado.^{19,20}

Epidemiología

Un número creciente de publicaciones sostienen la asociación entre diarrea y EAEC en los países en vías de desarrollo, con mayor prominencia en diarreas persistentes (14 días o más).

Parece haber una asociación geográfica entre EAEC y diarrea. En la India, por ejemplo, se

publicaron diferentes trabajos en los cuales EAEC fue hallado en diarreas persistentes, pacientes ambulatorios e internados y casos esporádicos detectados durante estudios de vigilancia. También existen estudios realizados en Brasil, en los cuales EAEC se asoció con diarreas persistentes en un elevado porcentaje de casos. EAEC también ha sido implicada como agente causal en casos esporádicos en México, Chile, Bangladesh e Irán.

Si bien la mayoría de los trabajos implican a EAEC en casos esporádicos endémicos de diarrea, cada vez se informa un mayor número de brotes en los cuales este patógeno está involucrado.²¹ Un ejemplo es el trabajo de Eslava²² que describe dos brotes de diarrea ocurridos en el servicio de nutrición de un hospital de la ciudad de México. Smith y col. informaron cuatro brotes en Gran Bretaña en 1994, que involucraron 19, 10, 51 y 53 pacientes. Los síntomas en estos pacientes fueron vómitos y diarrea, habitualmente sin fiebre. Si bien cada uno de estos brotes estuvo relacionado con el consumo de comida en un restaurante, no se pudo identificar un origen único.

Detección y diagnóstico

La infección por EAEC se diagnostica mediante el aislamiento de *E. coli* de las heces del paciente y la demostración del patrón agregativo en células HEP-2. Esta prueba es el *gold standard*. Si bien se describieron diferentes variantes de esta técnica, varios estudios comparativos sugieren que la forma original de incubación de las bacterias con las células durante 3 horas, sin cambio de medio, es la que mejor permite discriminar entre los tres patrones, difuso, agregativo y localizado. Se demostró que el plásmido de 60 mDa presente en la mayoría de EAEC tiene un alto grado de homología entre las diferentes cepas. A partir de él se desarrolló una sonda de 1 Kb que, en general, presenta elevada especificidad.^{23,24} Se diseñaron *primers* para detectar diferentes regiones del plásmido de 60 mDa. Estos *primers* pueden estar dirigidos a las regiones estructurales o de regulación de la expresión de las fimbrias o a la identificación de los genes codificadores de toxinas.

Los laboratorios de bacteriología clínica no disponen, habitualmente, de un laboratorio de cultivo de células para poder arribar al diagnóstico preciso de EAEC. En nuestro medio, el esquema de diagnóstico no permite discriminar entre EPEC y EAEC, ya que la clasificación se realiza sobre la base de pruebas serológicas. En las figuras 1 y 2 se observa la distribución de frecuencias de patógenos aislados en el Hospital Materno Infantil Dr. Humberto Notti durante 1995 y 1996. Se observa que, en general, EPEC se aísla en segundo lugar entre los patógenos bacterianos, con una frecuencia de alrededor de 20%.

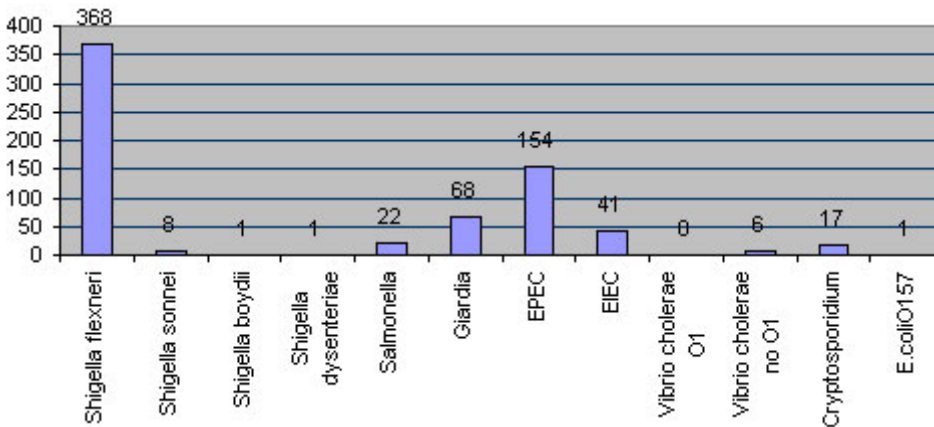


Figura 1. Distribución de frecuencias de patógenos aislados durante 1995 en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Materno Infantil Dr. Humberto Notti de la provincia de Mendoza, Argentina.

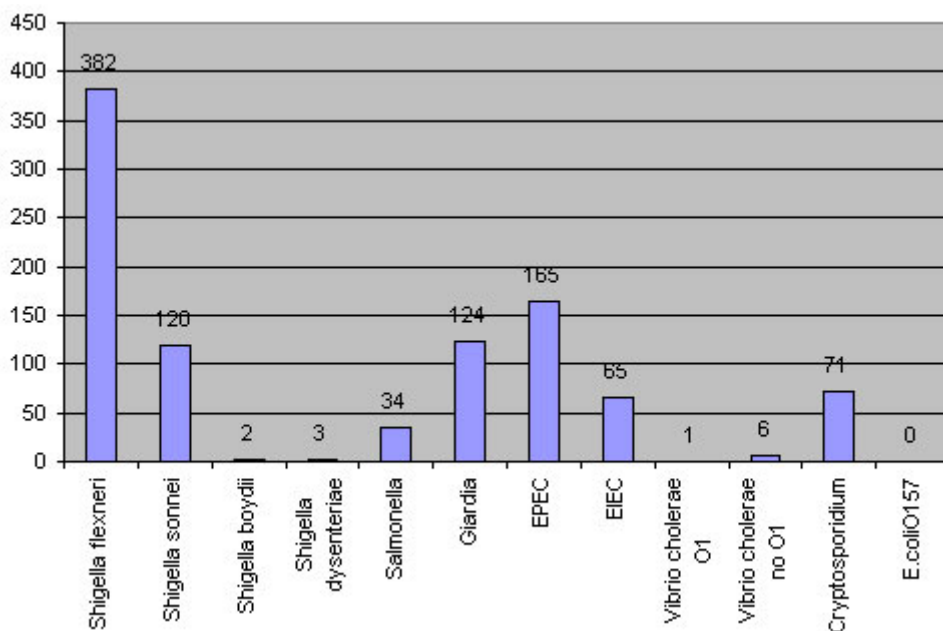


Figura 2. Distribución de frecuencias de patógenos aislados durante 1996 en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Materno Infantil Dr. Humberto Notti de la provincia de Mendoza, Argentina.

El interés por arribar a un diagnóstico certero que permitiera evaluar la importancia de EPEC no sólo en cuanto a su frecuencia, sino a las características de las cepas circulantes en nuestro medio condujo a la realización de un primer trabajo,²⁵ en el que se utilizaron ensayos de adherencia en células para distinguir entre los patrones localizado, difuso y agregativo, relacionados con diferentes categorías diarreigénicas, como se aclaró anteriormente. El fenotipo de adherencia localizada fue encontrado en 15% de las cepas y el agregativo en 21%. Estos resultados señalaron que entre las cepas clasificadas como EPEC sobre la base de la serología existía otra clase de cepas, con factores de patogenicidad específicos, diferentes de EPEC.

A partir de estos resultados se propuso un segundo trabajo, orientado a proponer una metodología alternativa, que se utilice como prueba de tamizaje y que permita restringir el cultivo de células para la confirmación del resultado.

Este estudio estuvo orientado a evaluar la utilidad de PCR como herramienta para el diagnóstico de EAEC, comparando los resultados con los obtenidos a través de la prueba de referencia.

Materiales y método

Se estudiaron 87 cepas de *Escherichia coli* aisladas durante 1995 y 1996, identificadas por pruebas bioquímicas y serología, correspondiendo cada cepa a un caso de diarrea. La población estudiada correspondió a niños menores de 2 años con diarrea aguda, atendidos en el Hospital Materno Infantil Dr. Humberto Notti de la provincia de Mendoza.

Las muestras fueron obtenidas por evacuación espontánea, recogidas en recipientes estériles y procesadas dentro de las 2 horas. Se realizaron extendidos para examen microscópico directo de materia fecal con tinción de Gram, tinción de azul de metileno (observación de leucocitos) y examen en fresco para la detección de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*; para la investigación de *Cryptosporidium* se realizó tinción de Ziehl-Neelsen modificada.

Una dilución adecuada de materia fecal se destinó a la siembra en placas de Petri con agar Mac Conkey. De cada placa se tomaron 3 colonias fermentadoras de lactosa y se les realizaron las pruebas bioquímicas de rutina.

En cada colonia tipificada bioquímicamente como *Escherichia coli* se investigaron los antígenos somáticos "O", por la técnica de aglutinación en portaobjetos, utilizando sueros monovalentes provistos por el Instituto Malbrán. Los serogrupos investigados fueron los siguientes: O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O136, O142. La investigación de factores de patogenicidad por PCR y ensayo de adherencia en células se realizó en las cepas que fueron positivas para alguno de los serogrupos mencionados.

Ensayo de adherencia en células HEp-2

Se utilizaron células HEp-2 (ATCC: American Type Culture Collection), adquiridas en la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC). Las células se cultivaron en Minimum Essential Medium (MEM) con sales de Earle (Sigma Co.), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gen) sin

antibióticos, en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Se adaptó el método descrito por Cravioto y col. en 1979. Los frascos de cultivo con monocapas de células fueron tripsinizados para desprender las células, que se resuspendieron en MEM con suero fetal bovino 2%. Se realizó recuento celular en cámara de Neubauer y luego 2.5x10⁴ células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio dentro de placas de Petri de vidrio de 50 mm y se incubaron hasta que alcanzaron el 70% de confluencia (24 hs.). Se retiró el MEM y se reemplazó por medio fresco con 0.5% de D-manosa. Se inocularon las placas con 20 µl de caldos de cultivos bacterianos, durante 3 horas a 37°C, se retiró el caldo, se lavó tres veces con PBS, se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa al 7.5%. Las cepas de referencia utilizadas en cada ensayo fueron: 2348/69: patrón de adherencia localizada; AA17-2: patrón agregativo; RS51-1: patrón difuso, HS (O9:H4): patrón negativo. Los ensayos se realizaron por duplicado. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos y se observaron con aumento 1 000x.

Amplificación de un fragmento de la fimbria AAF/I

Esta región forma parte del plásmido pCVD432 que está relacionado con el patrón de adherencia agregativa en el ensayo en células HEP-2. Se utilizó el siguiente set de *primers*: pCVD432/start (5' CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT 3') y pCVD432/stop (5' CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T 3'). El tamaño del fragmento amplificado es de 630 bp.²⁶
A continuación se transcribe la región amplificada y la ubicación de los *primers* en su interior:

```

1 atcgagtgag acacatatta tactcatttc ttgcaataaa tgcttatctg ttttcgacac
61 agactctggc gaaagactgt atcattgata attctttca gaaaagcatc cagtttaatt
121 cttattctct tgatatcgaa gagttagata ttaataaaca taacaatata aaancgatgt
181 taccagatat aaatataggg ttagggcagt atataaacia caatcaatgg ttctcatcta
241 ttacagacag ccatttttat ttatcattat cctataatct tctatcggct tatgaagcaa
301 aaatgcagaa taataaatg gatattgcta attattaaa atatattgaa atgcttagtg
361 agaggaacaa ctacataaatt aatttgctct cggaaattat taactataag ataaaaaaat
421 ctcacctgat gttgatgctc gagagatata ggaagctcaa taagaatac gaaattgcaa
481 agcataaaaat gtcaattgga ttaatatctg ctcttgatgt agagatgata tataatattt
541 tacaaaaaaat caggtttgat attgatgtcc ttgaggagga ggaaagtta ctgtcagata
601 aaatctcgag agaatatcat gttcctgaga gtgcaatccc agacattaca tatcataagt
661 taaaagagtg taaaacagcg gattctata cattattagc tgaaaacaaa aaactcaaga
721 ttaaggctgc tgatatagat aatgatataa ggaaactatc tgaga

```

Fuente: Genbank 1: X81423. *Escherichia coli*

Condiciones de la reacción

Mezcla de nucleótidos trifosfato (dNTP): 0.2 mM; MgCl₂: 1.5 mM; cebadores: 0.5 µM de cada uno; Taq polimerasa: 2 unidades; buffer 10x (usar 1X). Volumen final: 50 µl.

Esquema de ciclado

1 paso de 5 min a 94°C
30 ciclos de 40 s a 94°C
30 ciclos de 1 min a 53°C
30 ciclos de 1 min a 72°C
1 paso de 3 min a 72°C
Control positivo: cepa AA 17-3
Control negativo: cepa HS

Amplificación de un fragmento del gen de la enterotoxina EAST1 (*Enteraggregative Heat Stable Enterotoxin I*)

Los cebadores fueron diseñados para amplificar una región de 108 pares de bases (bp) del gen *astA-1*, que codifica para la enterotoxina EAST1 de EAEC.

Estos fueron diseñados en el *Institut für Hygiene und Mikrobiologie* de la Universidad de Würzburg, Alemania (datos no publicados).

START 5' GCC ATC ACA GTA TAT CCG 3'

STOP 5' GCG AGT GAC GGC TTT GTA GT 3'

A continuación se reproduce parte de la secuencia del gen obtenida del Genbank N° de acceso L11241

```

1 ttgggctatc gatgaacgat atcctcatcg cctgttggtgga tggcctgaaa ggcttctcgg
61 atgccatcaa cacagtatat ccgaaggccc gcatccagtt atgcatcgtg catatgggtc
121 acaacagcct gcgctcgtg tcatggaagg actacaaagc cgtcactcgc gacctgaaag

```

Condiciones de la reacción

Mezcla de nucleótidos trifosfato (dNTP): 0.2 mM; MgCl₂: 1.5mM; cebadores: 0.6 μM de cada uno; Taq polimerasa: 2 unidades; buffer 10x (usar 1X).

Esquema de ciclado

1 paso de 5 min a 94°C

30 ciclos de 40 s a 94°C

30 ciclos de 1 min a 65°C

30 ciclos de 1 min a 72°C

1 paso de 3 min a 72°C

Control positivo: cepa AA 17-3

Control negativo: cepa HS

Preparación del templado

Se incubó 1 ml de un caldo de cultivo bacteriano en TSB (*tripticosa soya broth*) durante 18 horas. Se centrifugó y el sedimento fue tratado con 150 μl de Tritón 1% y hervido durante 10 minutos a 100°C y centrifugado 5 minutos a 10 000 rpm. Para la reacción de PCR se emplearon 10 μl de templado.

Análisis con enzimas de restricción

El análisis con enzimas de restricción constituye una metodología para comprobar que el fragmento amplificado presenta la secuencia específica. Después de la reacción de PCR se llevó a cabo la digestión con *AluI* que corta el producto de PCR de los *primers* de AAF/I en dos fragmentos de 391 y 239 bp²⁶ y con *HhaI* que corta el producto de PCR de *astA-1* en dos fragmentos de 71 y 37 bp.²⁷ En la figura 3 se observa la fotografía que muestra los productos de PCR.

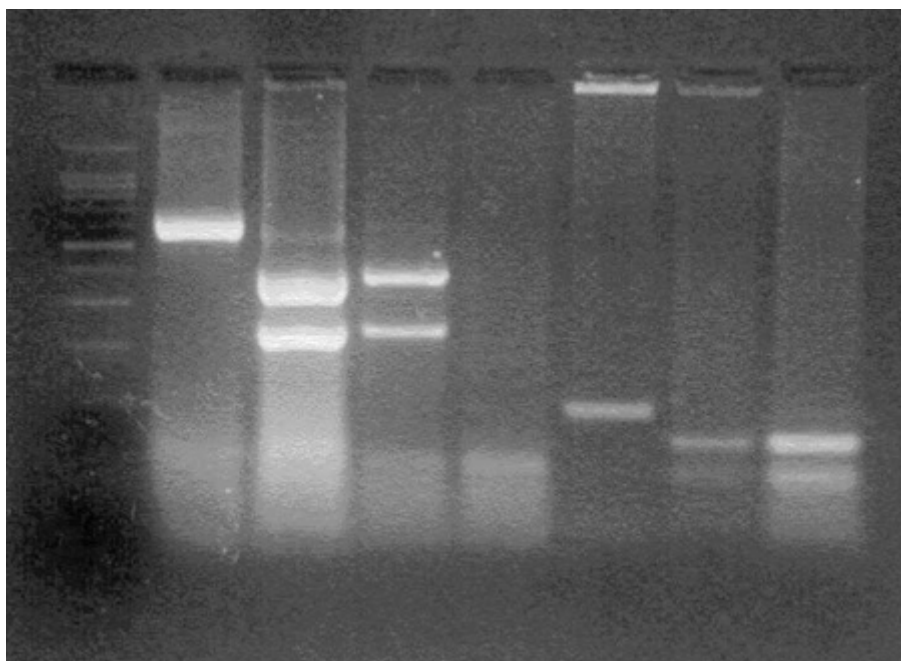


Figura 3. Productos de PCR de los *primers* pCVD 432 y *astA* y análisis con enzimas de restricción. M: Marcador de peso molecular 100 bp. 1: Producto de amplificación de 630 bp de pCVD432. 2,3: Producto de digestión del amplificado de pCVD432, de 391 bp y 239 bp obtenido con la enzima de restricción *Alu I*. 4: Control negativo. 5: Producto de amplificación de 108 bp de *astA*. 6,7: Producto de digestión del amplificado de *astA*, de 71 bp y 37 bp obtenido con la enzima de restricción *Hha I*.

Resultados

Como se observa en la figura 4, según el ensayo de adherencia en células HEp-2, 22 cepas (25%) mostraron el patrón de adherencia localizada; 18 cepas (21%) presentaron adherencia agregativa; 10 (11%) evidenciaron el patrón difuso. Estos resultados fueron similares a los hallados en un trabajo anterior.²⁵ En las figuras 5, 6 y 7 se observan las fotografías correspondientes a los patrones de adherencia.

Distribución de los Patrones de Adherencia

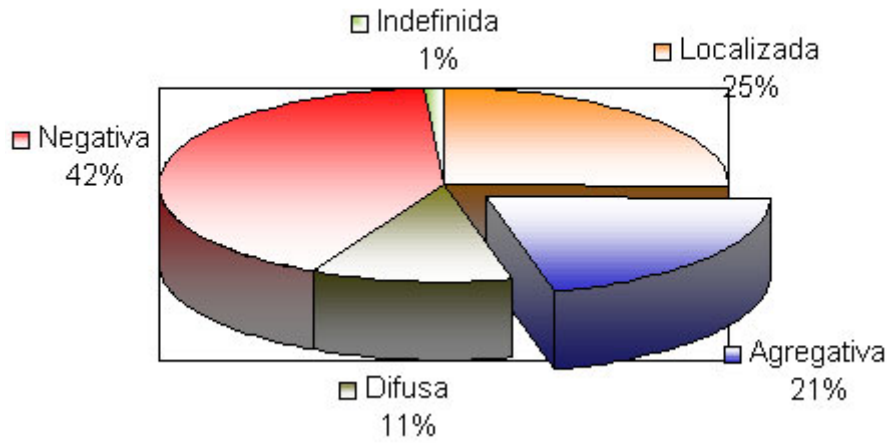


Figura 4. Distribución de los patrones de adherencia en células HEp-2. La figura muestra el porcentaje observado para cada patrón, sobre un total de 87 cepas.

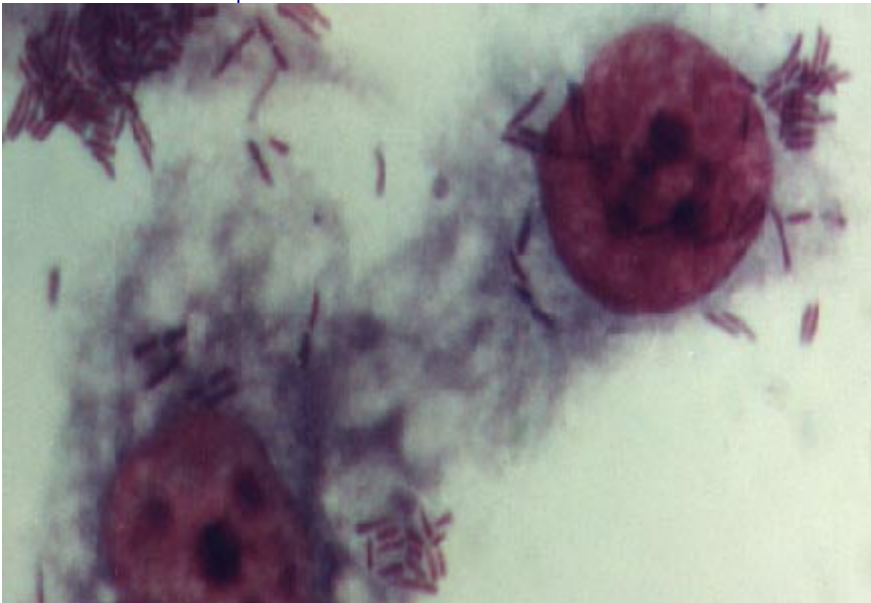


Figura 5. Patrón de adherencia localizada (1 000x). Las flechas señalan los acúmulos de bacterias típicos.

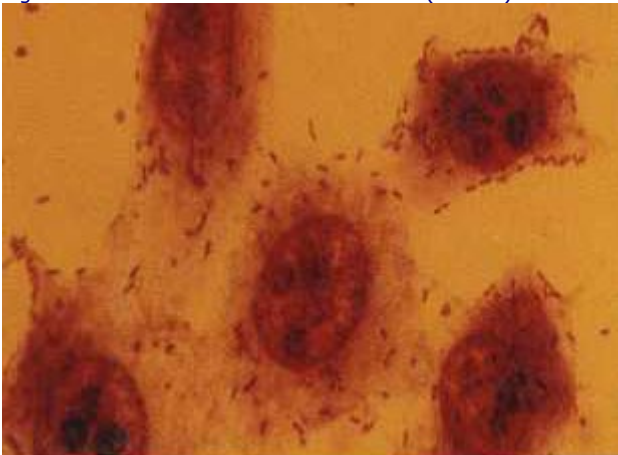


Figura 6. Patrón de adherencia difusa (1 000x). Se observa la distribución de las bacterias sobre la superficie de las células, con escasa o nula adhesión sobre el cubreobjeto.

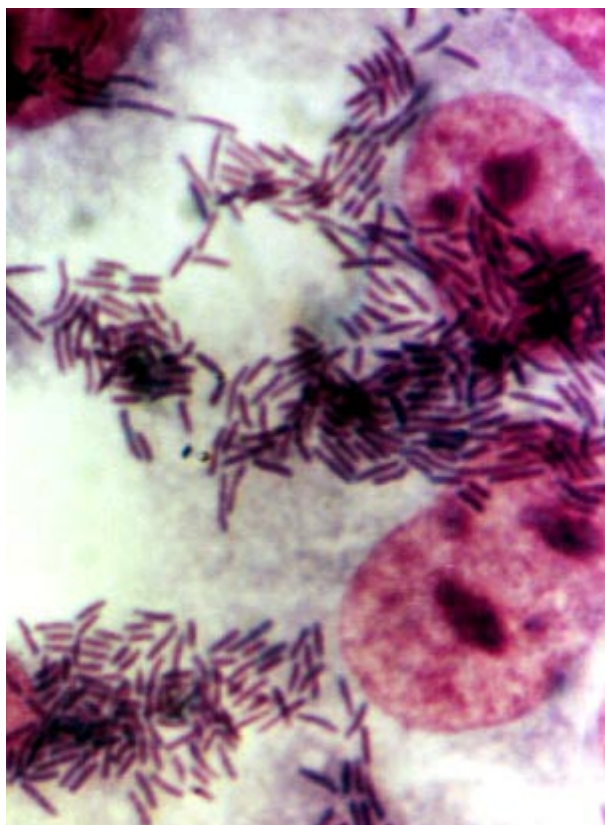


Figura 7. Patrón de adherencia agregativa (1 000x). Las bacterias forman acúmulos entre sí, sobre las células y sobre la superficie del cubreobjeto.

La tabla 1 muestra los resultados de PCR para AAF/I y de adherencia agregativa en el ensayo en células HEp-2. Ocho cepas de las 18 que presentaron el patrón de adherencia agregativa portaron el gen de AAF/I. Las 10 cepas que presentaron adherencia agregativa pero fueron negativas para AAF/I estarían indicando que otros factores, fimbriales o no, podrían estar involucrados en la adherencia. Cinco cepas positivas para AAF/I no presentaron el fenotipo agregativo, lo que señala la posibilidad de existencia de otras condiciones para la expresión de la fimbria de adherencia.

Nº de cepas	%	PCR AAFI	Adherencia Agg
8	9.2	Positiva	Positiva
10	11.4	Negativa	Positiva
5	5.7	Positiva	Negativa
64	73.5	Negativa	Negativa

Sensibilidad: 44.4 % I.C. 95% 22.4 – 68.5
 Especificidad: 92.7% I.C. 95% 83.2 – 97.3
 Valor Predictivo Positivo: 61.5 % I.C. 95% 32.3 – 84.9
 Valor Predictivo Negativo: 86.5% I.C. 95% 76.1 – 92.3
 Valor Global de la Prueba: 82.7 % I.C. 95% 72.8 – 89.7
 Prueba exacta de Fisher: P=0,0005

Tabla 1. Comparación de los resultados de PCR para AAF/I PCR y del patrón de adherencia agregativa en el ensayo en células HEp-2.

La tabla 2 compara el resultado de EAST1 PCR y el ensayo en HEp-2. Mientras que 25 cepas portaron el gen de EAST1, sólo 13 de éstas expresaron el patrón de adherencia agregativa en el ensayo en HEp-2, lo cual parece estar en relación con el hecho de que la presencia del gen de EAST1 fue encontrado en otras categorías de *E. coli* diarregiégicas como EPEC y EHEC. Cinco cepas que presentaron el fenotipo agregativo en el ensayo en HEp -2 fueron negativas para EAST1.

Nº de cepas	%	EAST1 PCR	Adherencia Agg
13	14.9	Positiva	Positiva
5	5.7	Negativa	Positiva
12	13.7	Positiva	Negativa
57	65.5	Negativa	Negativa

Sensibilidad: 72.2% I.C. 95% 46.4 – 89.2
 Especificidad: 82,61% I.C. 95% 71.2 – 90.3
 Valor Predictivo Positivo: 52% I.C. 95% 31.7 – 71.6
 Valor Predictivo Negativo: 91.9% I.C. 95% 81.4 – 96.9
 Valor Global de la Prueba: 80.4 % I.C. 95% 70.2 – 87.8
 Prueba exacta de Fisher: P< 0,0001

Tabla 2. Comparación de los resultados de PCR para EAST 1 PCR y del patrón de adherencia agregativa en el ensayo en células HEp-2.

La tabla 3 compara la presencia de uno o ambos genes con el ensayo en HEp-2. Treinta y dos cepas portan los genes, elevando considerablemente la sensibilidad de la reacción de PCR. El fenotipo agregativo se observó en 17 de las 32 muestras portadoras de los genes; en general las cepas EAST1 positivas fueron las que carecían de dicho fenotipo.

Nº de cepas	%	EAST1-AAF/I PCR	Adherencia Agg
17	19.5	Positiva	Positiva
1	1.1	Negativa	Positiva
15	17.2	Positiva	Negativa
54	62.0	Negativa	Negativa

Sensibilidad: 94.4 % I.C. 95% 70.6 – 99.7
 Especificidad: 78.2% I.C. 95% 66.3 – 86.9
 Valor Predictivo Positivo: 53.1 % I.C. 95% 35.0 – 70.4
 Valor Predictivo Negativo: 98.1% I.C. 95% 89.0 – 99.9
 Valor Global de la Prueba: 81.6 % I.C. 95% 71.5 – 88.8
 Prueba exacta de Fisher P<0,0001

Tabla 3. Comparación de los resultados de PCR para AAF/I/EAST 1 PCR y del patrón de adherencia agregativa en el ensayo en células HEp-2.

Discusión

Escherichia coli diarreigénica (DEC) representa un blanco elusivo a la hora del diagnóstico debido a que no resulta fácilmente distinguible de las cepas que no portan factores de virulencia y que son habitantes normales del intestino humano y de los animales.

En el primer trabajo realizado por nuestro grupo,²⁵ se detectó 21% de cepas EAEC, clasificadas sobre la base de su patrón de adherencia. Esto despertó un interés especial por investigar la distribución y relación epidemiológica de estas cepas en nuestra comunidad. Con el propósito de desarrollar una metodología rápida, sensible y específica que permitiera el estudio de un número considerable de cepas, se desarrollaron dos tipos de PCR, aplicables al diagnóstico de EAEC. Se utilizaron *primers* descritos y probados por otros autores, para identificar AAF/I y EAST1.²⁷ Una de las desventajas de PCR como método de diagnóstico lo constituye el hecho de que la observación de la banda del producto de amplificación otorga información sobre el tamaño de una molécula de ADN, pero no sobre su secuencia. Por ello es que si se utiliza esta reacción como método de diagnóstico único, debería acompañarse de un sistema que permita corroborar que el amplificado corresponde a la secuencia esperada. Existen diferentes metodologías disponibles; una de ellas es la de buscar un sitio de corte para alguna enzima de restricción dentro del sector amplificado que permita distinguir dos fragmentos de tamaño conocido. Para el caso de la PCR para AAF/I, los autores describieron un sitio de corte para la enzima *AluI*, que fragmentaba el amplificado de 639 bp en dos partes de 391 bp y 239 bp. Para el amplificado del gen *astA*, para el cual no se había descrito ningún sistema de confirmación, se realizó una búsqueda con el programa PCgene, detectando un sitio diana para *HhaI*. Los resultados de las digestiones enzimáticas se muestran en la figura 3.

Para poder establecer la utilidad de PCR en el diagnóstico de EAEC se compararon los resultados con los obtenidos por la prueba de referencia (ensayo de adherencia en células HEp-2). En la figura 4 se observa la distribución de los patrones de adherencia. El patrón agregativo apareció, al igual que en el primer trabajo de Ortiz,²⁵ en 21% de las cepas. Si se refieren estos resultados a los datos sobre los diferentes patógenos aislados de coprocultivos en el Hospital Notti, presentados en la Introducción, se observa que durante 1995 y 1996, período durante el cual se realizó este trabajo, el porcentaje de EPEC fue del 20% en promedio. De las 87 cepas estudiadas, 20% correspondieron a la categoría EAEC clasificada sobre la base de la prueba de adherencia. Si se proyecta este dato al total de patógenos aislados durante los dos años de estudio, EAEC tendría una prevalencia similar a la de *Salmonella*, que es aproximadamente del 3%, lo cual permite postular la importancia de caracterizar las cepas de *E. coli* por sus factores de patogenicidad, lo que a su vez podría tener impacto considerable en el conocimiento de la etiología de los casos esporádicos de diarrea.

En la tabla 1 se comparan los resultados entre PCR para AAF/I y el patrón agregativo, obteniéndose una sensibilidad del 44%. Se observa que 8 de las 18 cepas que presentaron el fenotipo agregativo eran portadoras de la fimbria I; las 10 cepas que presentaron adherencia agregativa pero fueron negativas para AAF/I, lo que parece indicar que otros factores, fimbriales o no, podrían estar involucrados en la adherencia. Cinco cepas, de las 13 que fueron positivas para AAF/I presentaron un patrón diferente al agregativo. Estos resultados podrían explicarse, por un lado, por la subjetividad del ensayo de adherencia en células, y por otro, por el requerimiento de otros factores, además de la presencia del gen estructural de la fimbria, para que se produzca la adherencia.

En la tabla 2 se muestra la comparación entre PCR para *astA* (proteína EAST1) y el patrón agregativo. Quince por ciento de las cepas resultaron portadoras del gen *astA* y presentaron el patrón agregativo, mientras que 6% presentaron el patrón agregativo pero no el gen *astA*. La prueba resultó con una sensibilidad del 72%, considerablemente mayor que la demostrada por AAF/I, reduciéndose la especificidad del 92.7% al 82.61%.

Se observa, además, que 13.7% de las cepas estudiadas fueron positivas para *astA* y no presentaron adherencia agregativa. Existen evidencias, descritas por diferentes autores, de que el gen *astA* tendría una distribución amplia entre las cepas de *E. coli* diarregénicas, no encontrándose restringido sólo a EAEC. De hecho, fue hallado en DAEC y EPEC,²⁸ en ETEC²⁰ y en EHEC,²⁹⁻³¹ razón por la cual fue incluido como posible *Escherichia coli* diarregénica (DEC).³²

Para el diseño de la tabla 3 se utilizó como criterio considerar positivas las cepas portadoras de AAF/I, de *astA*, o de ambos (prueba en paralelo). De este modo se observa que el porcentaje de cepas clasificadas como positivas por ambas pruebas es de 19.5%, bastante cercano al valor observado para el patrón de adherencia agregativa en la figura 4. La sensibilidad de la prueba fue 94.4% y la especificidad 78.2%. El valor global, es decir la posibilidad de que la cepa sea clasificada correctamente por la prueba, es de 81.6%.

Estos datos sugieren que la detección de ambos genes es la que otorga mayor utilidad a la prueba, por lo que se postula su empleo como método de tamizaje, limitando el empleo del ensayo de adherencia, más costoso y laborioso, a aquellas cepas portadoras de los genes.²⁷

Conclusión

La implementación de técnicas que detectan factores de patogenicidad específicos permitió identificar EAEC en los coprocultivos de la población infantil estudiada, pone en evidencia la heterogeneidad que presentan las cepas pertenecientes a esta categoría de *E. coli* diarregénicas y demuestra la necesidad de métodos de diagnóstico complementarios a los que rutinariamente se utilizan en los laboratorios bacteriológicos. La prevalencia estimada para EAEC fue de 3%; si la búsqueda se ampliara, realizándose en forma independiente del serogrupo, este porcentaje podría ser mayor. Teniendo en cuenta la importancia de EAEC como patógeno emergente se sugiere la implementación del diagnóstico diferencial por PCR y su posterior confirmación por el método de referencia.

Los autores no manifiestan conflictos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nataro JP and Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol.Rev. 1998. 11: 142-201.
2. Gomes TA, Viera MA, Abe CM y col. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in Sao Paulo city, Brazil. J. Clin. Microbiol. 1998. 36: 3609-13.
3. Gilligan PH. *Escherichia coli* EAEC, EHEC; EIEC, ETEC. Clin. Lab. Med.1999. 19(3):505-21.
4. Gioppo NM, Elías WP Jr, Vidotto MC y col. Prevalence of HEp-2 cell adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. 2000. FEMS Microbiol Lett 190:293-8.
5. Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR y col. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet 1978. i:1119-1122.
6. Vial PA, Robins Browne R, Lior H y col. Characterization of enteroadherent- aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis.1988. 158:70-79.
7. Okeke IN y Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli*. The Lancet Inf. Dis. 2001. 1: 304-13.
8. Rich Ch, Favre-Bonte S, Sapena F y col. Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates. FEMS Microbiol. Lett.1999. 173:55-61.
9. Hicks S, Candy DCA y Phillips AD. Adhesion of Enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa In Vitro. Am. Soc. Microb.1996. 64:4751-4760.
10. Knutton S, Shaw RK, Bhan MK y col. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa.Infect. Immun. 1992. 60:2083-2091.
11. Nataro JP, Steiner T y Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Em. Infect. Dis. 1998. 4:251-261.
12. Czczulin JR, Balepur S, Hicks S y col. Aggregative Adherence Fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in Enteroaggregative *Escherichia coli*. Am.Soc.Microb.1991. 65: 4135-4145.
13. Czczulin JR, Whittam TS, Henderson IR y col. Phylogenetic analysis of EAEC and diffusely adherent *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1999. 67(6):2692- 9.
14. Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC y col. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a Heat-Stable Enterotoxin demonstrable in an In Vitro rabbit intestinal model. J. Clin. Invest.1991. 87:1450-1455.
15. Savarino SJ, Fasano A, Watson J y col. Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* Heat-Stable toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1993. 90:3093-3097.
16. Zhou Z, Ogasawara J, Nishikawa Y y col. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 (EAST1). Epidemiol. Infect. 2002. 128(3):363-71.
17. Eslava C, Navarro-García F, Czczulin JR y col. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun.1998. 66:3155-63.
18. Henderson IR, Hicks S, Navarro-García F y col. Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in intestinal damage. Infect. Immun. 1999. 67 (10): 5338-44.
19. Benjamin P, Federman M y Wanke C A. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun.1995. 63:3417-3421.
20. Yamamoto T Echeverria P y Yokota T. Drug resistance and adherence to human intestines of enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Infect.Dis. 1992. 165:744-749.
21. Cobeljic M, Miljkovic-Selimovic B, Paunovic-Todosijevec D y col. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. 1996. Epidemiol. Infect. 117:11- 16.
22. Eslava C, Villaseca J, Morales R y col. Identification of a protein with toxigenic activity produced by Enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B-105, p. 44. In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
23. Baudry B, Savarino SJ, Vial P y col. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. J. Infect. Dis.1990. 161:1249-1251.
24. Debroy C, Bright BD, Wilson RA y col. Plasmid-coded DNA fragment developed as a specific gene probe for the identification of enteroaggregative *Escherichia coli* . J. Med. Microbiol.1994. 41: 393-8.
25. Ortiz A, Rüttler M, García B y col. Acumulación de actina y adherencia a células HEp-2 de cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en Mendoza, Argentina. Rev. Arg. Microbiol. 1998. 30:13 -19.
26. Schmidt H, Knop C, Franke S y col. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 1995. 33: 701-5.
27. Rüttler ME, Renna NF, Ortiz A y col. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. Rev. Arg. Microbiol.2002. 34: 167-170.
28. Yamamoto T y Nakazawa. Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea associated *E. coli*. FEMS Microbiol. Lett.1997. 147: 89-95
29. Yamamoto I, Taneike I. The sequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* that are homologous to the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin gene: cross-species transfer in evolution. FEBS Lett 2000. 472(1): 22-6.
30. Lai XH, Wang SY y Uhlin BE. Expression of cytotoxicity by potential pathogens in the standard *Escherichia coli* Collection of Reference (ECOR) strains. Microbiol.1999. 145:3295-3303.
31. Yatsuyanagi J, Saito S, Miyajima Y y col. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan.J.Clin. Microbiol.2003. 41: 2033-9.
32. Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A y col. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: Prevalence of Enteroaggregative *E. coli* Heat- Stable Enterotoxin 1 Gene-Possessing *E. coli*. Jpn. J. Infect. Dis. 2002. 55(6):183-90.

TAMIZAJE SEROLOGICO DE ANTICUERPOS ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* EN BANCOS DE SANGRE EN BUENOS AIRES, ARGENTINA



Columnista Experto de SIIC
Dra. Jorgelina Luisa Blejer

Jefe Área Serología, Sección Medicina Transfusional. Campo de especialización Enfermedades transmisibles por transfusión

Introducción

La enfermedad de Chagas es endémica en América latina. Su agente, el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), se transmite principalmente a través de las heces de los triatómidos infectados.¹

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, existen entre 16 y 18 millones de personas infectadas y 100 millones con riesgo de infectarse.² Se estima además, que se producen 700 000 casos nuevos anualmente, con un número de muertes que oscila entre 23 000 y 45 000 por año. Por otra parte, existe un número importante de personas que emigran a países no endémicos, lo que representa un riesgo de transmisión por vía transfusional.³

La vía transfusional es la segunda ruta más común de infección en regiones endémicas¹ y el riesgo de transmisión por unidad infectada transfundida es de 12% a 25%.⁴

En América latina, la prevalencia de donantes de sangre infectados con *T. cruzi* es variable, del 2% al 3% en grandes ciudades como Buenos Aires o Caracas al 62% en países como Bolivia.⁵⁻⁶

Los métodos de diagnóstico para la infección por *T. cruzi* en bancos de sangre se basan en la detección de anticuerpos, ya que los métodos parasitológicos son dificultosos de realizar y tienen una sensibilidad del 30% al 50%.⁷ Las pruebas convencionales utilizadas con mayor frecuencia son la hemoaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (EIA).⁸ Estos ensayos no son suficientemente específicos.^{9,10} Esto sucede principalmente porque las preparaciones antigénicas derivan de extractos de parásitos o fracciones semipurificadas de epimastigotes (la forma no infectiva del parásito) y los procedimientos técnicos difieren entre los laboratorios, por lo tanto son frecuentes los resultados indeterminados. Por otra parte, algunos pacientes chagásicos pueden presentar resultados falsos negativos.¹¹

Más recientemente surgieron las pruebas denominadas no convencionales, que incluyen pruebas por inmunocromatografía, por inmunofiltración, por *dot blot* (DB) y por aglutinación de partículas de gelatina (AP).^{12,13}

Entre las pruebas convencionales, la de EIA es la más confiable en cuanto a sensibilidad, pero como ya hemos comentado se observan reacciones cruzadas que perjudican la especificidad. Para resolver este problema surgieron investigaciones que tuvieron como objetivo mejorar la calidad de los antígenos utilizados. Por utilización de técnicas de ADN recombinante y el secuenciamiento de genes de antígenos de *T. cruzi* se obtuvieron antígenos recombinantes y péptidos sintéticos para uso diagnóstico.¹⁴⁻²⁰

En cuanto a la especificidad, la OPS sugiere el uso de al menos dos métodos para diagnosticar la enfermedad.⁹

Debido a los problemas en cuanto a la sensibilidad, la OMS¹⁴ recomienda el uso de al menos dos ensayos en el tamizaje serológico en bancos de sangre. Generalmente se utiliza una técnica de EIA y otra de HAI. En la Argentina esta práctica es obligatoria y en Brasil lo fue hasta diciembre de 2002. Esto se debe a que estudios recientes⁸ demostraron que la técnica de HAI presenta muy baja sensibilidad y no es una prueba segura en donantes de sangre. Por lo tanto se recomienda utilizar un ensayo de EIA que emplee antígenos recombinantes o péptidos sintéticos y presente mejor sensibilidad y especificidad como única prueba en el tamizaje de donantes de sangre.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la prevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en nuestra población de donantes de sangre, comparar la sensibilidad y la especificidad relativa de los dos ensayos que utilizamos rutinariamente y la de otros dos métodos: un EIA que utiliza proteínas recombinantes y otro método de HAI.

Materiales y métodos

Población estudiada

En el presente estudio se describen los resultados obtenidos desde mayo de 1995 hasta diciembre

de 2003. En este período se estudiaron 103 752 donantes consecutivos de reposición.

Ensayos serológicos

Todas las donaciones recibieron tamizaje serológico con dos ensayos comerciales:

1. HAI (Polychaco, Buenos Aires, Argentina);
2. EIA (dividido en dos grupos). Grupo A: 79 087 donaciones, con Chagatek (Biomerieux, Buenos Aires, Argentina), Grupo B: 24 665, con Chagas EIA (Abbott, San Pablo, Brasil).

Toda muestra inicialmente reactiva fue estudiada nuevamente, las muestras repetidamente reactivas en uno o ambos ensayos se estudiaron por un tercer método:

3. DB (Bio Chagas, Gador, Buenos Aires, Argentina)¹³ o
4. AP (Serodia, Fujirebio, Tokio, Japón).

Los sueros que reaccionaron en al menos dos pruebas se consideraron positivos.

Otros ensayos evaluados

5. Otro ensayo de EIA que utiliza proteínas recombinantes (Chagatest, ELISA recombinante v.3.0, Wiener Lab., Argentina). Esta técnica utiliza seis antígenos recombinantes, los cuales pertenecen a los estadios de tripomastigote y epimastigote, y son sintetizados a partir de fragmentos sumamente conservados de diferentes cepas de *T. cruzi*. Ellos son: Ag 1, Ag 30, Ag 36, Ag 2, Ag 13 y Ag SAPA; y además,

6. otro ensayo de HAI (Chagatest HAI, Wiener Lab., Argentina).

Evaluación de la especificidad para el ensayo 5 (EIA recombinante)

Se emplearon 784 muestras aleatorizadas de donantes y se compararon con los resultados de los dos ensayos empleados como rutina (ensayo 1: HAI y ensayo 2: EIA Grupo A, Chagatek) y el tercero utilizado como prueba de confirmación (ensayo 4: AP).

Evaluación de la especificidad para el ensayo 6 (HAI, laboratorios Wiener)

Se estudiaron paralelamente 475 muestras de donantes de sangre consecutivos con esta técnica y las otras tres utilizadas en nuestro banco de sangre, como acabamos de detallar.

Evaluación de la sensibilidad para los ensayos 5 y 6 (EIA recombinante y HAI, laboratorios Wiener)

La evaluación de la sensibilidad relativa de ambos ensayos se realizó paralelamente, utilizando muestras reactivas seleccionadas y en paneles de sueros estudiados previamente mediante las técnicas de rutina ya descritas.

Como se observa en la tabla 1, los criterios de positividad adoptados fueron los siguientes:

- Muestras positivas: a) reactivas con EIA RP > 2 y uno o dos de los otros ensayos reactivos, b) reactivas con EIA RP < 2 y otros dos ensayos reactivos.
- Muestras débiles positivas: a) reactivas con EIA < 2 y otro ensayo reactivo, b) con EIA no reactivo y los otros dos ensayos reactivos.
- Falsas positivas: reactivas en un solo ensayo.

Análisis estadísticos

Se calcularon la media, el error estándar y los intervalos de confianza con un nivel del 95%. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

Grupo	Ensayos reactivos	Nº muestras	Criterio
1	EIA RP >2 – HAI – AP	30	Positivo
2	EIA RP >2 – HAI	1	Positivo
3	EIA RP >2 – AP	12	Positivo
4	EIA RP <2 – HAI – AP	17	Positivo
5	EIA RP <2 – HAI	3	Débil positivo
6	EIA RP <2 – AP	14	Débil positivo
7	HAI – AP	1	Débil positivo
8	EIA RP >2	2	Falso positivo
9	EIA RP <2	27	Falso positivo
10	HAI	31	Falso positivo

Tabla 1. Criterios de clasificación de las muestras de acuerdo con su reactividad con los tres ensayos serológicos convencionales.

Referencias. EIA: enzimoimmunoensayo; HAI: hemoaglutinación indirecta; AP aglutinación pasiva; RP: positividad

relativa, densidad óptica (DO) de la muestra sobre el valor de corte.

Resultados

Seroprevalencia

La seroprevalencia fue 2.26 % (2 347/103 752 muestras fueron reactivas por uno o ambos métodos de tamizaje, ES: 0.146, IC: 1.974-2.556, $p < 0.05$) y 1.34% (1 396/103 752; ES: 0.113, CI: 1.123-1.576, $p < 0.005$) se confirmaron positivos.

En la tabla 2 se describen los porcentajes de sueros reactivos para 1, 2 y 3 ensayos. Mil sesenta y tres muestras (1.02%) fueron reactivas en las tres pruebas, 333 (0.31%) en dos y 951 (0.92%) sólo en una. Como podemos observar, del total de muestras reactivas en el tamizaje, el porcentaje de resultados falsos positivos (sólo reactivos en un ensayo) es elevado, 40.52%. El 45.29 % de las muestras son reactivas para tres pruebas y 14.19% para dos.

N° Ensayos reactivos	N° de muestras	% total	% reactivos
3	1063	1,02	45,29
2	333	0,31	14,19
1	951	0,92	40,52

Tabla 2. Seroprevalencia para anti-*T. cruzi* en 103 752 donantes de reposición evaluada con diferentes ensayos.

En la tabla 3 se detalla la positividad relativa (RP) que es igual a la densidad óptica (DO) de la muestra sobre el valor de corte, y los porcentajes correspondientes a las distintas marcas de EIA utilizadas.

Ensayos	Grupo A		Grupo B	
	N° muestras	RP<2 (%)	N° muestras	RP<2 (%)
1.EIA	419	396 (94,5)	377	233 (61,8)
2.HAI	132		23	
3.EIA+HAI	49	35 (71,4)	16	10 (62,5)
4.EIA+3°	210	154 (73,33)	54	37 (68,5)
5.HAI+3°	3		1	
6.EIA+HAI+3°	789	110 (13,94)	274	22 (8)

Seroprevalencia para anti-*T. cruzi* en 103 752 donantes de reposición evaluada con diferentes ensayos, discriminando por valor de relatividad positiva y por marca de EIA.

Referencias: RP: positividad relativa, densidad óptica (DO) de la muestra sobre el valor de corte.

En cuanto a los resultados falsos positivos de EIA, es interesante destacar que 94.5% (396 de 419 muestras) del Grupo A y 61.8% (233 de 377 muestras) del Grupo B, presentaron un valor de RP < 2.

Del mismo modo, las muestras reactivas para sólo dos técnicas presentan en su mayoría valores de EIA bajos, con RP < 2. En el patrón 3, donde observamos los falsos negativos del tercer ensayo, 35/49 (71.4%) del Grupo A y 10/16 del grupo B (62.5%) y en el patrón 4, los falsos negativos para el HAI, 154/210 (73.3%) del Grupo A y 37/54 del Grupo B (68.5%) presentaron valores bajos de DO.

Además, la mayoría de las muestras reactivas por las tres técnicas tienen un valor de RP para el EIA > 2 (931/1 063, el 87.6% en total).

Sensibilidad y especificidad relativa de las técnicas utilizadas en el tamizaje de rutina

	Reactivos	Confirmados positivos	Falsos negativos	Falsos positivos	Sensibilidad Relativa	Especificidad Relativa
EIA(A)	1467	1048	3	419	99,71%	99,46%
EIA(B)	721	344	1	377	99,71%	98,47%
HAI	1287	1132	264	155	81,09%	99,85%

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad relativa de los tres ensayos utilizados en el tamizaje de donantes de sangre.

Como se observa en la tabla 4, ambos EIA presentaron mayor sensibilidad relativa (99.71% para

cada uno de los ensayos), mientras que el HAI presentó 264 muestras falsas negativas (sensibilidad relativa 81.09%). Por otra parte, la especificidad relativa fue mayor para el HAI con respecto a los EIA (99.46%; 98.47% y 99.85% para EIA ensayo A, EIA ensayo B y HAI, respectivamente).

Notamos que la técnica de EIA correspondiente al Grupo B presenta menor especificidad relativa que el EIA utilizado en el Grupo A. En el ítem anterior, cuando detallamos la seroprevalencia, describimos en los resultados observados en la tabla 3 que el porcentaje de muestras con valores altos de DO es mayor para el ensayo con el grupo B; este hecho podría explicar la menor especificidad relativa registrada.

Especificidad relativa del EIA recombinante (Laboratorios Wiener) Los resultados se observan en la tabla 5.

N° muestras	HAI	EIA convencional	AP	EIA recombinante
775	Negativas	Negativas	Negativas	Negativas
7	Reactivas	Reactivas	Reactivas	Reactivas
1	Negativa	Negativa	Negativa	Reactiva
1	Negativa	Reactiva	Negativa	Reactiva

Tabla 5. Especificidad relativa del EIA recombinante (Laboratorios Wiener) utilizando muestras de donantes consecutivos.

Referencias: EIA: enzimoimmunoensayo; HAI: hemoaglutinación indirecta; AP aglutinación pasiva.

De las 784 muestras, 775 fueron negativas para los cuatro ensayos estudiados. Siete muestras fueron reactivas para todos, una fue reactiva sólo para el EIA recombinante y otra para ambos EIA. La especificidad fue del 99.74%.

Especificidad relativa del HAI (Laboratorios Wiener)

Los resultados se describen en la tabla 6.

N° muestras	EIA	HAI rutina	HAI Wiener	AP
462	Negativas	Negativas	Negativas	Negativas
4	Reactivas	Reactivas	Reactivas	Reactivas
1	Negativa	Reactiva	Reactiva	Negativa
1	Reactiva	Negativa	Reactiva	Reactiva
1	Negativa	Reactiva	Negativa	Negativa
5	Negativas	Negativas	Reactivas	Negativas
1	Reactiva	Negativa	Negativa	Negativa

Tabla 6. Especificidad relativa del HAI (Laboratorios Wiener) utilizando muestras de donantes consecutivos.

Referencias: EIA: enzimoimmunoensayo; HAI: hemoaglutinación indirecta; AP aglutinación pasiva.

De las 475 muestras, 462 fueron negativas para los cuatro ensayos estudiados. Cuatro muestras fueron reactivas para todos, una fue falsa positiva para ambos HAI, una falsa negativa para el HAI de rutina, otra falsa positiva para el HAI de rutina y 5 falsas positivas para el HAI de Wiener, mientras que una fue falsa positiva para el EIA.

En el estudio con estas muestras, la especificidad relativa del HAI de Wiener fue 98.74 %, mientras que para el de rutina fue mayor, del 99.58% (en el estudio con las 103 752 muestras fue similar: 99.85%).

Estudios de sensibilidad relativa de EIA recombinante y HAI (Laboratorios Wiener) en paneles de muestras positivas Los resultados pueden ser observados en la tabla 7.

Grupo	N° muestras	Criterio	EIA recomb. Reactivo	HAI Wiener reactivo
1	30	Positivo	30	29
2	1	Positivo	1	1
3	12	Positivo	12	7
4	17	Positivo	17	9
5	3	Débil positivo	3	1
6	14	Débil positivo	14	6
7	1	Débil positivo	1	0
8	2	Falso positivo	2	0
9	27	Falso positivo	19	5
10	31	Falso positivo	0	4

tabla 7. Sensibilidad relativa del EIA recombinante HAI Wiener empleando un panel de muestras positivas.
Referencias: EIA: enzimoimmunoensayo; HAI: hemoaglutinación indirecta.

Con respecto a la sensibilidad del EIA recombinante, las 60 muestras positivas (grupos 1, 2, 3 y 4) y las 18 muestras débiles positivas (grupos 5, 6 y 7), también fueron reactivas. De las 60 muestras falsas positivas, reactivas sólo en un ensayo, únicamente 21 fueron reactivas con el EIA recombinante, las dos muestras de grupo 8 (EIA RP > 2) y 19 del grupo 9 (EIA < 2). Por otra parte, todas las muestras del grupo 10 (HAI reactivo) fueron negativas con el EIA recombinante.

Es interesante destacar que los valores de densidad óptica fueron mayores con el EIA recombinante, considerando las muestras positivas y positivas débiles. La diferencia entre la media de la densidad óptica del EIA recombinante y el convencional fue significativa ($p < 0.01$). EIA recombinante: 1.71, 95% IC: 1.57- 1.84 y EIA convencional: 0.71, 95% IC: 0.63-0.78.

Con respecto a la sensibilidad del otro HAI ensayado, de las 60 muestras positivas, sólo 46 fueron reactivas; de las 18 débiles positivas, 7 resultaron reactivas y de las 60 falsas positivas, 9.

Es importante destacar que como las muestras de los distintos paneles fueron seleccionadas tomando como base los resultados obtenidos con las técnicas empleadas de rutina, existe un sesgo importante a favor de ellas.

Discusión

La prevalencia de donantes con anti-*T. cruzi* en nuestro banco de sangre fue 2.26% (2 347/103 752 muestras fueron reactivas por uno o ambos métodos de tamizaje), 1.02% fueron positivas en tres ensayos; 0.31% en dos, y 0.92% sólo en uno. Esto significa que la prevalencia confirmada fue de 1.34% (1 396/103 752). Es interesante hacer notar el alto grado de resultados falsos positivos, lo que lleva a un importante descarte de unidades.

Como ya comentamos, las técnicas serológicas para detección de anticuerpos son las recomendadas para identificar individuos infectados crónicamente con la enfermedad de Chagas. En general, las especificidades y sensibilidades de los ensayos comerciales son altas cuando se evalúan con sueros bien caracterizados, pero son muy comunes las discrepancias cuando se utilizan combinaciones de técnicas serológicas en estudios epidemiológicos o tamizaje en bancos de sangre en poblaciones que no son de riesgo.^{6,9,21}

Ninguno de los métodos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas es 100% seguro en bancos de sangre, además, en poblaciones de baja prevalencia es de esperar que el valor predictivo positivo sea bajo, dando lugar a una importante cantidad de falsos positivos que deben ser confirmados por otros ensayos.²² La utilización de diferentes métodos ha dado lugar a resultados contradictorios, debido probablemente a la utilización de diferentes cepas de *T. cruzi* y a diferentes procedimientos de fraccionamiento antigénico, lo que causa variaciones en la sensibilidad y especificidad.²³

Lo que realmente interesa en el tamizaje serológico es que se utilicen pruebas cuyos resultados sean reproducibles y confiables y no la asociación de ensayos que proporcionen un gran número de resultados discordantes de difícil interpretación, que además de constituir un problema de costo económico y de pérdida de material biológico valioso, como es la sangre, causa ansiedad en los donantes de sangre a los cuales hay que informarles los resultados.

Todos los EIA utilizados en nuestros estudios fueron más sensibles que los HAI con diferente grado de especificidad. De los EIA, el recombinante presentó la mayor especificidad relativa y se observó un muy buen resultado en cuanto a la sensibilidad en los paneles estudiados.

Otros autores describieron resultados satisfactorios con respecto a la sensibilidad y la especificidad de diferentes EIA comerciales pero menor sensibilidad para HAI.²⁴⁻²⁷

Sáez Alquézar y col.²⁸ evaluaron la eficacia en bancos de sangre en Brasil en cuanto al tamizaje de anti-*T. cruzi* y describen que 42% de los laboratorios informan errores, los que utilizaron sólo HAI fueron responsables de 49 de 64 falsos negativos, lo que implicaría que este ensayo tiene baja sensibilidad.

Otro estudio para evaluar el desempeño de 11 ensayos de HAI comercializados en Brasil mostró que solamente 4 de ellos presentaban sensibilidad aceptable para su uso en diagnóstico o en tamizaje serológico.²⁹

Podemos decir que aun si tenemos en cuenta la facilidad de procesamiento y el bajo costo del HAI no es una prueba segura para tamizaje en donantes de sangre.

Entre los ensayos convencionales, el de EIA es la más confiable debido a su mayor sensibilidad, pero hasta el momento la mayoría de los EIA comercializados utilizan antígenos crudos o semipurificados, lo que lleva frecuentemente a la aparición de reacciones cruzadas que perjudican la especificidad.

Para resolver estos problemas, la utilización de técnicas de ADN recombinante y secuenciamento de genes de antígenos dominantes de *T. cruzi* permitió la obtención de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos para uso diagnóstico.

Existen muchos estudios con paneles de sueros procedentes de países de Latinoamérica que muestran mejor desempeño en cuanto a sensibilidad y especificidad de los EIA que utilizan antígenos recombinantes.¹⁵⁻¹⁷ Los sueros individuales reaccionan con varios de los antígenos en formas diferentes, y se llegó a la conclusión de que deben utilizarse mezclas de antígenos recombinantes para obtener la mayor sensibilidad. Resultados similares se obtuvieron utilizando péptidos sintéticos.^{18,19}

Otro hecho interesante para destacar es el referido a los diferentes valores de DO en los distintos EIA. Por un lado, uno de los EIA convencionales (ensayo 2B) muestra valores de DO más elevados que el otro EIA convencional (ensayo 2A) pero con un mayor número de resultados falsos positivos y, consecuentemente, menor especificidad. Con respecto al EIA recombinante, al ser comparado con el EIA convencional (ensayo 2A), presenta valores de DO mayores sin afectar la especificidad. En conclusión, se podría comenzar a pensar en la posibilidad de emplear como única prueba un método de EIA mejorado que utilice antígenos recombinantes o péptidos sintéticos, los cuales presentan mayor sensibilidad y especificidad para el tamizaje en bancos de sangre. De esta forma se podría conseguir mayor seguridad para evitar la transmisión de la enfermedad de Chagas por vía transfusional y un menor descarte de unidades. Por otra parte, el hecho de contar con técnicas que presenten valores de DO más elevados, facilita la interpretación, siempre que no afecte la especificidad, y en el caso de contar con equipos de sensibilidad y especificidad comparables, sería de utilidad la elección de dichos reactivos.

Los autores no manifiestan conflictos

BIBLIOGRAFÍA

1. Schmuñis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 1991;31:547-557.
2. Moncayo A. Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health Stat Q* 1992;45:276-279.
3. Wendel S, Gonzaga AL. Chagas' disease and blood transfusion: A new world problem? *Vox Sang* 1993;64:1-12.
4. Wendel S. Current concepts on the transmission of bacteria and parasites by blood components. *Sao Paulo Med J* 1995;113:1036-1052.
5. Blejer JL, Saguier MC, Salamone HJ. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Buenos Aires, Argentina. *Int J Infect Dis* 2001;5:89-93.
6. Salles NA, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida-Neto C, Mendonca MC, Dorliach-Llacer P, Chamone DF, Sáez-Alquézar A. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion*

- 1996;36:969-973.
7. Kirchhoff LV. Chagas' disease: American trypanosomiasis. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7:487-502.
 8. Saéz-Alquézar A. Tamizaje y diagnóstico serológico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev Arg Transf* 2003;29:117-124.
 9. Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW, Pereira JB, Sáez-Alquézar A, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DF, Goldenberg S. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 1993;10:830-834.
 10. Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 1987;94:475-484.
 11. Luquetti AO. Megaesofago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Goiana Med* 1987;33:1-16.
 12. Rabelo A, Luquetti AO, Moreira EF, Gadelha MF, Santos JA, Melo L, Schwind P. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay-ID-PaGIA Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:77-82.
 13. Pastini AC, Iglesias SR, Carricarte VC, Guerin ME, Sánchez DO, Frasch AC. Immunoassay with recombinant *T. cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas disease. *Clin Chem* 1994;40:1893-1897.
 14. Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 2001; 17:286-291.
 15. Moncayo A, Luquetti AO. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:489-495.
 16. Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, da Silveira JF. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol* 1999;37:1554-1560.
 17. Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, da Silveira JF. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 2003;43:91-7.
 18. Vergara U, Lorca M, Veloso C, Gonzalez A, Engstrom A, Aslund L, Pettersson U, Frasch AC. Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. *J Clin Microbiol* 1991;29:2034-2037.
 19. Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM Jr, Sleath PR, Reed SG. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* 1994;32:971-974.
 20. Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, Skeiky YA, Leiby DA, Badaro R, Reed SG. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. *J Infect Dis* 1999;179:1226-1234.
 21. De Andrade AL, Martelli CM, Luquetti AO, De Oliveira OS, Almeida e Silva. Serological screening for *Trypanosoma cruzi* among blood donors in central Brazil. *Bol Oficina Sanit Panam* 1992;113:19-27.
 22. Wendel S. Blood banking preventive approaches for Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993;88:59-60.
 23. Sáez-Alquézar A, Salles NA, Sabino EC. Serological diagnosis of Chagas' disease in blood banks. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90 (Suppl 1):34-35.
 24. Brashear RJ, Winkler MA, Schur JD, Lee H, Burczak JD, Hall HJ, Pan AA. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. I. Evaluation of the sensitivity and specificity of an enzyme immunoassay for detecting antibodies to *T. cruzi*. *Transfusion* 1995;35:213-218.
 25. Oelemann WMR, Teixeira MGM, Da Costa GCV, Borges-Pereira J, De Castro JDF, Rodrigues Coura J, Peralta JM. Evaluation of three commercial Enzyme-Linked Immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1998;36:2423-2427.
 26. Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol* 2000;38:639-642.
 27. Pan AA, Rosenberg GB, Hurley MK, Schock GJ, Chu VP, Aiyappa A. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *J Infect Dis* 1992;165:585-588.
 28. Saéz-Alquézar A, Otani MM, Sabino EC, Ribeiro-dos-Santos G, Salles N, Chamone DF. Evaluation of the performance of Brazilian blood banks in testing for Chagas' disease. *Vox Sang* 1998;74:228-31.
 29. Sáez-Alquézar A, Luquetti AO, Borges-Pereira J, Moreira EF, Gadelha MFS, García-Zapata MT, Arruda AHS. Estudio multicentrico: Avaliacao do desempenho de conjuntos diadnosticos de hemaglutinacao indireta, disponiveis no Brasil, para o diadnostico sorologico da infeccao pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop* 1997;26:343-374.