

Expertos Invitados

SINDROME PLURIMETABOLICA: UMA CONSEQUÊNCIA ENDOCRINO-METABOLICA EM MENINAS COM PUBARCA PRECOCE?



Columnista Experto de SIIC
Dra. Rosimere de Jesus Teixeira

Médica da Disciplina de Medicina Integral da UERJ - Medicina de Família e Endocrinologia.

Introdução

A PP é uma forma comum de precocidade sexual, ocorrendo geralmente entre seis a sete anos de idade e mais comumente no sexo feminino.¹⁻³ A adrenarca precoce (AP) é a etiologia mais comum da PP e tem sido atribuída à maturação precoce da zona reticular do córtex adrenal, visto que os androgênios adrenais alcançam níveis normalmente encontrados no início da puberdade. Outra causa seria uma maior sensibilidade dos folículos pilosos sexuais aos níveis normais dos androgênios.⁴

As demais causas de PP, como puberdade precoce central, hiperplasia adrenal congênita não clássica (HACNC) e tumores produtores de androgênios, podem causar consequências sérias, tais como estatura final baixa e virilização, sendo geralmente necessária terapia específica.^{3,5,6} Em contraste, a PP devido à AP tem sido considerada uma variante normal do desenvolvimento puberal porque não repercute negativamente no início da puberdade, na progressão da puberdade e na altura adulta final. Assim, não requer uma forma especial de tratamento, mas apenas observação clínica e orientação aos familiares.^{3,6,7}

Entretanto, nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que a PP também pode resultar em consequências futuras importantes, como a síndrome plurimetabólica (SPM) e a síndrome dos ovários policísticos (SOP), que frequentemente estão associadas à obesidade e a hiperinsulinemia.^{8,9} Nosso estudo tem como objetivo descrever a presença dos fatores associados à SPM em meninas com PP, mesmo antes do início do desenvolvimento puberal completo.

Casuística e métodos

Foi realizado levantamento retrospectivo de 101 prontuários. A PP foi definida como aparecimento de pêlos pubianos antes da idade limite normal, ou seja, 8 e 9 anos nas meninas e meninos, respectivamente. Selecionamos somente meninas com diagnóstico de AP e avaliação do perfil da insulina (n = 45). Foram excluídos os casos com desenvolvimento mamário (mamas \geq Tanner II) ou com PP atípica (presença de sinais de virilização, aceleração da velocidade de crescimento ou avanço da idade óssea: IO \geq 2SD). O diagnóstico de HACNC foi excluído pelo valor normal da 17-hidroxiprogesterona (17OHP \leq 1 500 ng/dl) após o teste de estímulo rápido com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), realizado sempre que a 17OHP basal era \geq 100 ng/dl ou na presença de PP atípica.¹⁰⁻¹² Também excluímos os casos com tumor adrenal, puberdade precoce central e história de administração e/ou ingestão acidental de esteróides sexuais.

Na história clínica, foram obtidos os dados referentes ao peso ao nascimento, história do parto e história familiar da SPM em parentes de primeiro grau. O peso ao nascer \leq 2 500 gramas foi considerado como BP ao nascer, sendo excluídos os casos de prematuridade. Todos os pacientes foram avaliados quanto ao estágio puberal de Tanner, estatura e peso. Foi realizado RX de mãos e punhos para análise da IO segundo os critérios de Greulich and Pyle. A presença de acantose *nigricans* foi avaliada clinicamente. O índice de massa corporal (IMC = kg/m²) foi calculado e empregamos a definição estatística do IMC ajustada para idade e sexo do *Centers for Disease*

Control and Prevention (CDC) 2000. Foi considerado como obesidade o IMC $\geq 95^{\circ}$ percentil e como sobrepeso o IMC $> 85^{\circ}$, mas $< 95^{\circ}$ percentil.¹³ A pressão arterial sistólica e diastólica (PAS e PAD) foram medidas através do método tradicional com manguito de tamanho apropriado para a idade. Consideramos como PA anormal aquela $\geq 85^{\circ}$, predominando o maior percentil entre PAS e PAD, avaliada através do gráfico para sexo e percentil estatural. A PA anormal foi classificada como pressão normal limítrofe ($90^{\circ} \leq PA < 95^{\circ}$) e hipertensão arterial ($HA \geq 95^{\circ}$).¹⁴

Os níveis séricos de globulina ligadora dos hormônios sexuais (SHBG), proteína ligadora 1 do fator de crescimento semelhante a insulina (IGFBP-1), testosterona total (T), sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), androstenediona (A), insulina (I), glicose (G), colesterol total (CT), triglicérido (TG), lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL) foram medidos após 12 horas de jejum e dieta livre. Calculamos a taxa de jejum da G/I como índice de RI, sendo considerado sugestivo de RI quando < 7.0 .⁹ O perfil lipídico foi avaliado em apenas 26 casos, sendo considerado alterado os valores acima dos limites da normalidade segundo *National Cholesterol Education Program*.¹⁵ Foram realizados os métodos PAP enzimático colorimétrico automatizado para a dosagem de G, CT, TG, HDL e LDL; Immulite para as dosagens do SDHEA e SHBG; Radioimunoensaio para as dosagens da T, A, 17OHP e I; e Imunoradiométrico para a dosagem de IGFBP-1. Os valores dos coeficientes intra e inter-ensaio foram de 7.6% e 15% para o SDHEA; 7.4% e 7.7% para a T; 4.3% e 4.7% para A; 3.0 e 8.0% para a SHBG; 4.6% e 6.0% para a IGFBP-1; e 8.4% e 10% para a I, respectivamente.

A ultra-sonografia pélvica foi avaliada sempre por VCGS. Foram calculados os volume uterino (VU) e ovariano (VO) pela fórmula do elipsóide, sendo considerados aumentados para o estágio pré-puberal quando $VU \geq 4 \text{ cm}^3$ e $VO \geq 2 \text{ cm}^3$. A estrutura ovariana (EO) foi dividida em 5 classes: homogênea (até 3 cistos $< 9 \text{ mm}$), microcística (4-10 cistos), multicística (+10 cistos com estroma normal), policística (+10 cistos com estroma hiperecogênico) e folicular (cisto $> 9 \text{ mm}$). Em somente três casos o ovário não foi visualizado por problemas técnicos. Os critérios de normalidade para os volumes uterino e ovariano e a classificação da EO foram baseados em estudo prévio com 140 meninas pré e pós-puberais normais.¹⁶

Trata-se de um estudo descritivo, analítico e de corte transversal. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE. Foi solicitado aos pais e/ou responsáveis o consentimento por escrito, após informação prévia, para a inclusão das crianças no estudo. Para a análise estatística das variáveis numéricas foram realizados os testes t de Student ou Wilcoxon. Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste não-paramétrico Qui-quadrado (χ^2), procedendo-se à correção de Yates nos casos indicados. A correlação linear simples de Spermán foi usada para descrever a associação entre duas variáveis. Para as variáveis que apresentaram $p < 0.05$, a regressão linear múltipla (*forward, stepwise ou backward*) foi realizada para identificar os modelos que melhor descrevem as variações nos níveis da insulina e IMC. Os resultados foram expressos em média \pm SD, e o valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

As 45 meninas com PP tinham idade média de 7.2 ± 1.4 ano. 73% dos casos encontravam-se no estágio de Tanner II e os demais nos estádios III e IV. Em 60% da amostra foi observado excesso de peso, sendo que 16 meninas eram obesas e 11 com sobre-pesos. Foi observada história familiar positiva para SPM em 21 casos (47%), sendo mais freqüente o relato de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), SOP e obesidade. O relato de baixo peso ao nascer ocorreu em 15%. A acantose foi encontrada em 36%, sendo 11 obesos, 4 sobre-pesos e apenas 1 caso com peso normal. A PA foi anormal em 16%, sendo 5 casos com pressão normal limítrofe e 2 compatíveis com HA. A estrutura ovariana mais comum foi a microcística (55%), seguida da homogênea (31%), multicística (5%), policística (5%) e folicular (4%). O volume ovariano estava aumentado para a faixa etária em 16% dos casos, enquanto todas as meninas apresentavam volume uterino normal. O perfil lipídico foi alterado em 77% das vezes. O HDL foi baixo em 8 casos, enquanto foram elevados os níveis de CT em 15, LDL em 13 e TG em 5 casos. Os níveis de glicose estavam dentro dos limites normais em todos os casos, mas em 36% a relação G/I foi compatível com RI ($n = 16$).

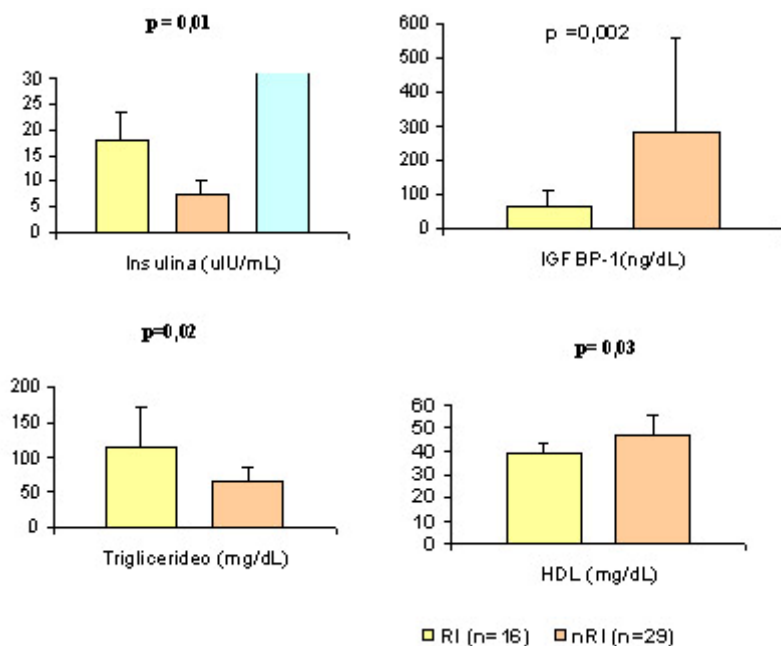


Figura 1. Os níveis de insulina e triglicerídeo foram significativamente maiores nas meninas com PP e resistência à insulina (RI) do que nas sem RI (nRI), enquanto os níveis de IGFBP-1 e HDL-colesterol foram significativamente menores.

Os níveis de insulina e TG foram significativamente maiores no grupo RI do que nRI, enquanto a glicose apresentou significância limítrofe. A relação G/I e os níveis de IGFBP-1, HDL e LDL foram menores no grupo RI (figura 1). O grupo RI mostrou maior percentual de hipertrigliceridemia e de HDL baixo, mas menor percentual de LDL elevado. Não houve diferença entre os dois grupos em relação ao IMC, androgênios e às demais variáveis estudadas (tabela 1).

Tabela 1

A insulina se correlacionou positivamente com os TG, PAS, PAD e G, mas negativamente com SHBG. O IMC mostrou correlação negativa com a SHBG e positiva com a PAS e a PAD. Na análise multivariada, o TG ($r^2 = 0.52$, $p = 0.019$) mostrou ser dependente da I e a SHBG ($r^2 = 0.42$, $p < 0.0001$) do IMC (tabela 2).

Tabela 2: Análise de correlação linear simples e múltipla

Varável dependente	Correlação simples (r)	Regressão múltipla (R2)
Insulina	Triglicerídeo	0.52**
	PAS PAD Glicose SHBG *p < 0.05	
IMC	SHBG	0.42***
	PAS PAD *p < 0.05	

PAS = pressão arterial sistólica.
PAD = pressão arterial diastólica.

Discussão

Alguns autores sugerem que a PP devido à adrenarca precoce em certas crianças deve ser adicionada a lista de características clínicas da "SPM" –uma constelação de achados associados à RI.^{9,17,18} Entre esses achados estão obesidade central, acantose nigricans, DM2, HA, dislipidemia e SOP. Neste estudo, 36% das meninas com PP tinham a taxa G/I sugestiva de RI. Além disso, o

achado comum de excesso de peso, dislipidemia, acantose e ovários microcísticos suportam essa hipótese.

A obesidade vem sendo considerada como um grande problema da saúde pública do mundo contemporâneo. Há dados referindo obesidade em 1/3 da população brasileira, entretanto as taxas não param de crescer em proporções epidêmicas nas últimas décadas e desafiar as recomendações das organizações de saúde. No inquérito Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde realizado no Brasil em 1996 a prevalência de sobrepeso na infância foi de 4.9%.¹⁹ No Brasil, estima-se que atualmente cerca de 15% das crianças e adolescentes são obesos.²⁰ Entretanto, temos descrito uma prevalência de obesidade na PP duas vezes maior do que o estimado na população pediátrica brasileira.²¹ Neste estudo, mais da metade dos casos de PP apresentava excesso de peso, sendo que 36% eram obesos.

A acantose *nigricans* –lesão dermatológica considerada indicadora da severidade da RI– foi observado em mais de um terço dos casos analisados, a maioria de obesos.²² Em outro estudo, demonstramos que a presença de obesidade, acantose *nigricans* e RI são relativamente comuns na PP apesar do hiperandrogenismo adrenal não ter um efeito adverso sobre a sensibilidade à insulina na infância.²³ Dados semelhantes têm sido descritos por outros autores. Di Martino-Nardi refere que muitas meninas de origem africano-americana e caribenho-hispânica com PP são freqüentemente obesas e com marcante hiperandrogenismo, sinais que se correlacionam com o grau de RI.⁹ Em contraste, Ibañez e cols descrevem que meninas e adolescentes com história de PP apresentam hiperinsulinemia, mas com IMC similar aos controles do mesmo estágio puberal e dentro da variação normal.⁸ Embora a alteração dos níveis de insulina e da sensibilidade à insulina pareça ocorrer independentemente da obesidade, os dois fatores parecem ser sinérgicos.^{23,24} Temos descrito o aumento significativo do IMC durante o *follow-up* de meninas com PP,²¹ o que está de acordo com os dados de Miller e cols que relatam correlação significativa entre o aumento do IMC do início do quadro de PP com o IMC pós-puberal.²⁵ É importante ressaltar que crianças e adolescentes obesos serão adultos obesos em potencial.²⁶ A persistência da obesidade através da vida é possivelmente um dos principais fatores relacionados com a morbidade prematura e a mortalidade no adulto.²⁷ Entretanto, devemos lembrar que o risco está aumentado mesmo que o indivíduo não permaneça obeso na vida adulta. Também é importante chamar a atenção de que as repercussões psicológicas e sociais causadas pelo estigma da obesidade podem ser especialmente graves nessa idade, pois a personalidade ainda está se estruturando.²⁶

O excesso de peso na infância também está associado ao aumento do risco de doença cardiovascular (DCV) e dislipidemia na vida adulta.^{26,28} A insulina é um hormônio aterogênico e constitui um fator de risco independente tanto para SPM quanto para DCV na vida adulta.²⁹ Neste estudo, em 16% dos casos foram observados níveis de pressão arterial anormal, que se correlacionaram com o grau de obesidade e com a hiperinsulinemia. Na maioria das vezes havia pelo menos uma alteração do perfil lipídico. O aumento dos níveis de colesterol e LDL foram comuns, o que poderia ser explicado pelos maus hábitos alimentares e sedentarismo da sociedade atual, já que não se correlacionou nem com o IMC e nem com os níveis de insulina. Mas, o achado mais relevante foi à presença de hipertrigliceridemia e HDL baixo no grupo com RI, que são alterações típicas da SPM. Além disso, houve correlação positiva do TG com a insulina. Outros autores têm descrito que em meninas com PP, a hiperinsulinemia e os distúrbios lipídicos podem ser detectadas em período pré-puberal e através de todos os estágios de desenvolvimento puberal, quando estão associados com síntese exagerada de androgênios ovarianos.^{8,10,30}

Estudos demográficos preliminares mostram que as mulheres caribenho-hispânicas têm duas vezes mais SOP, uma forma de hiperandrogenismo ovariano funcional, do que as africanas-americanas.³¹ Entretanto, a PP é comum em meninas africanas-americanas³² e o *follow-up* pós-puberal dessas meninas tem revelado uma prevalência maior que dez vezes de SOP.³³ Adicionalmente, a presença de fatores ambientais como a obesidade na infância também pode estar relacionada ao desenvolvimento da SOP.¹⁷ Esta associação entre PP e SOP tem sido descrita mesmo em pacientes não-obesas e parece estar relacionada ao grau de hiperandrogenismo. Em estudos prévios, descrevemos que meninas com PP e ovários microcísticos eram menos obesas do que as com ovários homogêneos, embora com um maior grau de hiperandrogenismo e níveis mais elevados de IGFBP-3, que tem sido considerado como fator preditivo negativo da sensibilidade à insulina durante a puberdade.^{34,35} Geralmente a evolução para a SOP ocorre durante o desenvolvimento puberal, principalmente naquelas meninas com predisposição genética. Nesta casuística, a presença de história familiar de SOP foi um achado comum.

Todos esses dados reforçam a hipótese de que meninas com PP e mulheres com SOP apresentam similaridades, em especial o hiperandrogenismo, a obesidade e a RI. Dunaif demonstrou que a

obesidade andróide e o hiperandrogenismo são associados independentemente à resistência periférica à insulina, embora, o mecanismo fisiopatológico responsável por essas associações ainda precise ser estabelecido. O mecanismo molecular pelo qual ocorre a RI na SOP está relacionado a fosforilação excessiva da serina no receptor de insulina. Segundo o autor, um fator extrínscico ao receptor de insulina irá dar origem a esta anormalidade, que teria como efeito à modulação da enzima P450c17, que é uma importante enzima regulatória da biossíntese dos andrógenos adrenais e ovarianos.³⁶ A insulina e o fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-I) são capazes de estimular a produção de androgênios pelas células da teca e intersticial dos ovários assim como aumentar a esteroidogênese e a responsividade ao ACTH de células adrenocorticais humanas em cultura.^{37,38} Adicionalmente, tem sido demonstrado que em adolescentes e mulheres com SOP a diminuição dos níveis de insulina através de agentes sensibilizadores da insulina reduz os níveis séricos dos androgênios, aumenta a concentração da SHBG e restaura a ovulação e os ciclos menstruais, provavelmente através da redução da atividade da P450c17 ovariana.^{39,40} A hiperinsulinemia é usualmente acompanhada pela diminuição dos níveis da SHBG e da IGFBP-1 em mulheres com SOP^{41,42,44} e em meninas pré e pós-puberais com PP,⁴³ embora na PP esses achados não sejam unânimes.⁴⁵ Neste estudo, os níveis da IGFBP-1 foram menores no grupo com RI enquanto a SHBG se correlacionou com o IMC. Previamente, temos demonstrado que o peso corporal e a insulina têm um papel sinérgico na regulação tanto dos níveis da SHBG quanto da IGFBP-1, sugerindo que ambos podem ser sutis marcadores da RI na PP.⁴⁶ Em crianças com PP,^{43,48} adolescentes com hiperandrogenismo⁴⁷ e crianças obesas⁴⁹ tem sido descrita uma forte correlação entre insulina e SHBG. Em geral, é aceito que a síntese da SHBG seja principalmente regulada pelos níveis dos androgênios.⁵⁰ Entretanto, na PP, a redução dos níveis da SHBG parece se correlacionar mais com o peso corporal do que com a testosterona, a dihidrotestosterona e os androgênios adrenais,^{48,51} mas o 3 α -androstenediol glucoronídeo também pode ser responsável pela regulação da síntese da SHBG na infância.⁵¹ Em meninas, a presença de pubarca precoce, hiperinsulinemia, baixos níveis de IGFBP-1, dislipidemia, disfunção ovulatória e hiperandrogenismo –e algumas combinações desses– têm sido relatados para redução do crescimento fetal, indicando que esses achados podem ter, pelo menos em parte, uma origem pré- natal.⁵² Parece existir associação entre retardo de crescimento intra-uterino e RI em adultos com DM2.⁵³ Ibañez e cols têm descrito tanto hiperinsulinemia quanto maior freqüência de BP ao nascer em meninas com história de PP.^{8,54} Di Martino-Nardi acredita que tanto o BP ao nascer quanto à obesidade contribuem para a redução da sensibilidade à insulina e o hiperandrogenismo em meninas africano-americanas e caribenho-hispânicas com PP.⁹ Não temos encontrado maior prevalência de BP ao nascer na PP em relação à população pediátrica brasileira e nem correlação entre o peso ao nascer com o IMC.²¹ Acreditamos que parte dessas discrepâncias nos diferentes estudos possa ser atribuída às diferenças étnicas das populações estudadas. O mecanismo que interliga PP, obesidade, hiperinsulinemia e hiperandrogenismo ovariano permanece enigmático. Vários achados típicos da SPM já estão presentes em meninas com PP desde a infância, suportando o conceito de que a SPM possa ser uma conseqüência endócrino-metabólica futura nessas meninas. Então, concordamos que a PP deva ser adicionada à lista de características clínicas da SPM. Adicionalmente, como as anormalidades aterogênicas começam ainda na infância devemos ficar atentos para uma maior incidência de DM2 e DCV na vida adulta. Neste contexto, percebemos que é preciso valorizar o impacto desses achados na infância, pois é possível, através de uma abordagem precoce, prevenir comorbidades e melhorar a qualidade de vida. Em especial, devemos estimular a mudança de estilo de vida com hábitos alimentares saudáveis e estímulo para a prática de exercícios físicos, com intuito de manter o peso e o perfil metabólico normais, até que outras medidas preventivas sejam identificadas. Los autores no manifiestan conflictos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ginzburg D, Teixeira RJ, Bordallo MAN et al. Pubarca precoce: variante normal do desenvolvimento puberal. *Arq Bras Pediat* 1995; 2:95-98.
2. Borges MF, Paula F, Nomeline MB et al. Pubarca precoce: estudo retrospectivo clínico e laboratorial. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2000; 44:405-412.
3. Saenger P, Reiter EO. Editorial: Premature adrenarche: a normal variant of puberty? *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:236-238.
4. Auchus RJ, Rainey WE. Adrenarche: Physiology, biochemistry and human disease. *Clin Endocrinol* 2004; 60:288-296.
5. Rosenfield RL. Puberty and its disorders in girls. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20:115-142.

6. Ibañez L, Viridis R, Potau N et al. Natural history of premature pubarche: an auxological study. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:254-257.
7. Rosenfield RL. Normal and almost normal precocious variations in pubertal development premature pubarche and premature thelarche revisited. *Horm Res* 1994; 41:7-13.
8. Ibañez L, Potau N, Chacon P et al. Hyperinsulinemia, dyslipaemia and cardiovascular risk in girls with a history of premature pubarche. *Diabetologia* 1998; 41:1057-1063.
9. Di Martino-Nardi J. Premature adrenarche: findings in prepubertal African- American and Caribbean-Hispanic girls. *Acta Paediatr* 1999; Suppl 433:67-72.
10. Ibañez L, Di Martino-Nardi J, Potau N et al. Premature adrenarche –normal variant or forerunner of adult disease? *Endocr Rev* 2000; 21:671-696.
11. Teixeira RJ, Ginzburg D, Bordallo MAN. Tipos de resposta ao teste de estimulação com ACTH em meninas com Pubarca Precoce. In: VIII Reunión Anual Sociedad Latinoamericana de Endocrinología Pediátrica, Pucón /Chile, 1994. p.57.
12. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1997; 11:281-306.
13. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS et al. 2000 CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 2002; 246:1-190.
14. Update on the 1987 Task force report on high blood pressure in children and adolescents: a working group report from the national high blood pressure education program. *Pediatrics* 1996; 98:649-658.
15. Report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents. National Cholesterol Education Program. *Pediatrics* 2000; 105:637- 638.
16. Teixeira Rj, Silva VCG, Freitas JR et al. Ultra-sonografía Pélvica em 140 meninas normais pré e pós-puberais. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1999; 43:210-216.
17. Rittmaster RS, Deshwal N and Lehman L. The role of adrenal hyperandrogenism, insulin resistance, and obesity in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1295-1299.
18. Silfen ME, Manibo AM, McMahon DJ et al. Comparison of Simple Measures of Insulin Sensitivity in Young Girls with Premature Adrenarche: The Fasting Glucose to Insulin Ratio may be a simple and useful measure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2863-2868.
19. Monteiro CA. Epidemiologia da Obesidade. In: Obesidade. Lemos Editorial, São Paulo, 1998, p. 15-30.
20. Parizzi MR. Obesidade na infância. In: Fonseca JGM, editor convidado. Obesidade e outros Distúrbios Alimentares. Clínica Médica. Rio de Janeiro: MEDSI; 2001. p. 279-289.
21. Teixeira RJ, Coelho RA, Perecmanis T et al. Prevalência de Obesidade e Baixo Peso ao Nascer na Pubarca Precoce. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; 47:166-170.
22. Ilyés I, Pósán E, Sári S. Insulin resistance in obese boys with *acanthosis nigricans*. *Acta Paed Hung* 1992; 32:325-332.
23. Teixeira RJ, Gazolla HM, Cunha SB et al. Resistência à Insulina na Pubarca Precoce –Relação com os androgênios. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1994;45:278-84.
24. Oppenheimer E, Linder B, Di Martino-Nardi J. Decreased insulin sensitivity in prepubertal girls with premature adrenarche and *acanthosis nigricans*. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:614-618.
25. Miller D, Emans SJ, Kohane I. Follow-up study of adolescent girls with a history of premature pubarche. *J Adolesc Health* 1996; 18:301-305.
26. Charney E, Goodman HC, McBride M et al. Childhood antecedents of adult obesity. Do chubby infants become obese adults? *N Engl J Med* 1976; 295:6-9.
27. Freedman DS. Clustering of coronary heart disease risk factors among obese children. *JPEM* 2002; 15:1099-1108.
28. Kiess W, Reich A, Muller G et al. Clinical aspects of obesity in childhood and adolescence. *Intern J Obesity* 2001; 25:75-79.
29. Orchard TJ, Becker DJ, Bates M et al. Plasma insulin and lipoprotein concentrations: an atherogenic association? *Am J Epidemiol* 1983; 118:326-337.
30. Ibañez L, Potau N, Zampoli M et al. Girls diagnosed with premature pubarche show an exaggerated ovarian androgen synthesis from the early stages of puberty: evidence from gonadotropin-releasing hormone agonist testing. *Fertil Steril* 1997; 67:849-855.
31. Dunaif A, Sorbara L, Delson R et al. Ethnicity and polycystic ovary syndrome are associated with independent and additive decreased in insulin action in Caribbean Hispanic women. *Diabetes* 1993; 42:1462-1468.
32. Banerjee S, Raaghavan S, Wasserman EJ et al. Hormonal findings in African- American and Caribbean Hispanic girls with premature adrenarche: implications for polycystic ovarian syndrome. *Pediatrics* 1998; 102:1-4.
33. Ibañez L, Potau N, Viridis R et al. Postpubertal outcome in girls diagnosed of premature pubarche during childhood: Increased frequency of functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1599-1603.
34. Teixeira RJ, Silva VCG, Freitas JR et al. The relationship between ovarian structure and hyperandrogenism in premature pubarche. *JPEM* 2001; 14:257-265.
35. Teixeira RJ, Silva VCG, Gazolla HM et al. The relationship between ovarian structure and serum insulin, Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its binding protein (IGFBP-1 and IGFBP-3) levels in premature pubarche. *JPEM* 2002; 15:69- 75.
36. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mecanismo and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997; 18:774-800.
37. Cara JF, Rosenfield RL. Insulin-like growth factor-I and insulin potentiate luteinizing hormone induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. *Endocrinology* 1988; 123:733-739.
38. Lálleman D, Penhoat A, Lebrethon MC et al. Insulin-like growth factor enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3892-3897.
39. Dunaif A, Scott D, Finegood D et al. The insulin sensitising agent troglitazone improves metabolic and reproductive abnormalities in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3299-3306.
40. Ibañez L, Potau N, Ferrer A et al. Anovulation in eumenorrheic, nonobese adolescent girls born small for gestational age: Insulin sensitization induces ovulation, increases lean body mass, and reduces abdominal fat excess, dyslipidemia, and subclinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5702-5705.
41. Nestler JE, Powers LP, Matt DW. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese

- women with the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1991; 72:83-89.
42. Peiris AN, Stagner JI, Plymate SR et al. Relationship of insulin secretory pulses to sex hormone-binding globulin levels in normal men. J Clin Endocrinol Metab 1993; 76:279-282.
 43. Ibáñez L, Potau N, Zampolli M et al. Hyperinsulinemia and decreased insulin-like growth factor-binding protein-1 are common features in prepubertal and pubertal girls with a history of premature pubarche. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:2283-2288.
 44. Nobels F and Dewailly D. Puberty and polycystic ovarian syndrome: the insulin/insulin-like growth factor I hypothesis. Fertil Steril 1992; 58:655-666.
 45. Vuguin P, Wasserman E, Linder B et al. The role of insulin sensitivity, IGF-I, IGFBP-1 and IGFBP-3 in the hyperandrogenism in Black and Hispanic girls with premature adrenarche. Horm Res 1997; 48 (suppl 2):104.
 46. Teixeira RJ, Ginzburg D, Freitas JR et al. Globulina ligadora dos hormônios sexuais e proteína ligadora 1 do IGF-1: marcadores para resistência à insulina na pubarca precoce? Arq Bras Endocrinol Metab 2003; 47:261-265.
 47. Ibáñez L, Potau N, Georgopoulos N et al. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 axis and insulin secretion in hyperandrogenic adolescents. Fertil Steril 1995; 64:1113-1119.
 48. Balducci R, Finocchi G, Mangiantini A et al. Lack of correlation between sex hormone-binding globulin, adrenal and peripheral androgens in precocious adrenarche. J Endocrinol Invest 1992; 15:501-505.
 49. Gascon F, Valle M, Martos R et al. Sex hormone-binding globulin as a marker for hyperinsulinemia and/or insulin resistance in obese children. Eur J Endocrinol 2000; 143:85-89.
 50. Hautanen A. Synthesis and regulation of sex hormone-binding globulin in obesity. Int J Obes Relat Metab Disord 2000; 24:64-70.
 51. Teixeira RJ, Dimetz T, Bordallo MAN et al. Papel dos androgênios adrenais e periféricos na modulação dos níveis da globulina ligadora dos hormônios sexuais na pubarca precoce. Arq Bras Endocrinol Metab 2002; 46:520-525.
 52. Ibáñez L, Potau N and Zegher F. Precocious pubarche in girls may be a marker of a polyendocrinopathy. In: Bourguignon JP and Plant TM, Elsevier editora. The onset of Puberty in Perspective. Amsterdam: Elsevier ed; 2000. p. 289-297.
 53. Barker DJP, Hales CHD, Osmond C et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. Diabetologia 1993; 36:62-67.
 54. Ibáñez L, Potau N, Francois I et al. Precocious pubarche, hyperinsulinism and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduce fetal growth. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:3558-3562.

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 comune*.

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 diarregénico en humanos, especialmente en niños. Las cepas de *E. coli* diarregénicas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos con diferentes propiedades de virulencia y epidemiología.

Categorías diarregénicas¹

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* patógenas. 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 diarraigénica, 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%.

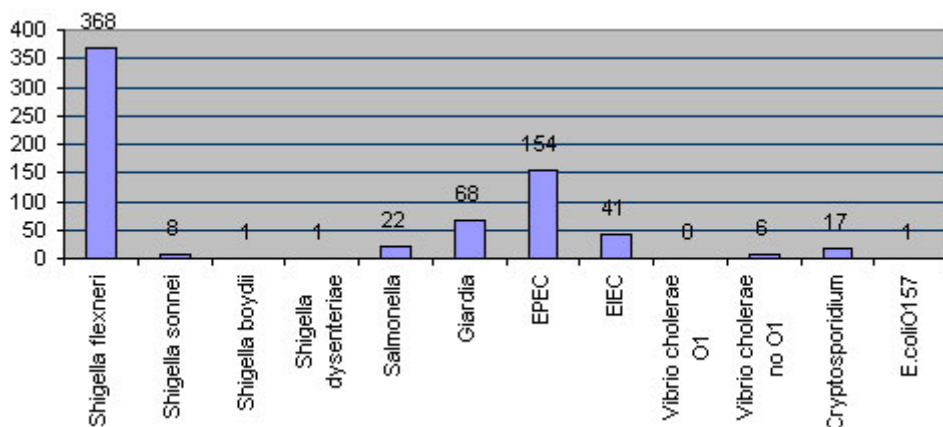


Figura 1. Distribución de frecuencias de patógenos aislados durante 1995 en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Materno Infantil Dr. Humberto Notti de la provincia de Mendoza, Argentina.

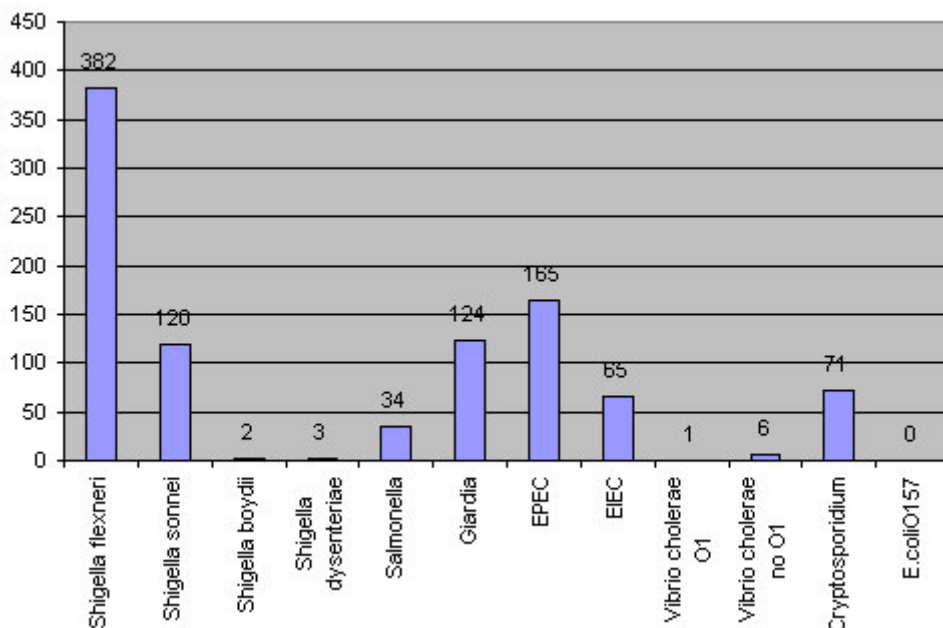


Figura 2. Distribución de frecuencias de patógenos aislados durante 1996 en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Materno Infantil Dr. Humberto Notti de la provincia de Mendoza, Argentina.

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 tactcattc ttgcaataaa tgcttatctg ttttcgacac
61 agactctggc gaaagactgt atcattgata atttcttca gaaaagcatc cagtttaatt
121 ctattctct tgcatacgaag gagtttagata ttaataaaca taacaatata aaancgatgt
181 taccagatat aastataggg ttaggcagat atataaacia caatcaatgg ttctcatcta
241 ttacagacag ccattttat ttatcattat cctataatct tctatcggct tatgaagcaa
301 aaatgcagaa taataaattg gatattgcta attatthaa atatattgaa atgcttagtg
361 agaggaacaa ctacataaatt aatttgctct cggaaattat taactataag ataaaaaat
421 ctcaactgat gttgatgctc gagagatata ggaagctcaa taagaatac gaaattgcaa
481 agcataaaat gtcasattgga ttaatatctg ctcttgatg agagatgata tataatattt
541 tacaaaaaat 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 ciclo

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 (*Enteroregative 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  ttggctatc  gatgaacgat  atcctcatcg  cctgtgtgga  tggcctgaaa  ggcttctcgg
61  atgccaataa  cacagtatat  ccgaaggccc  gcatccagtt  atgcatcgtg  catatggtgc
121 acaacagcct  gcgcttcgtg  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.

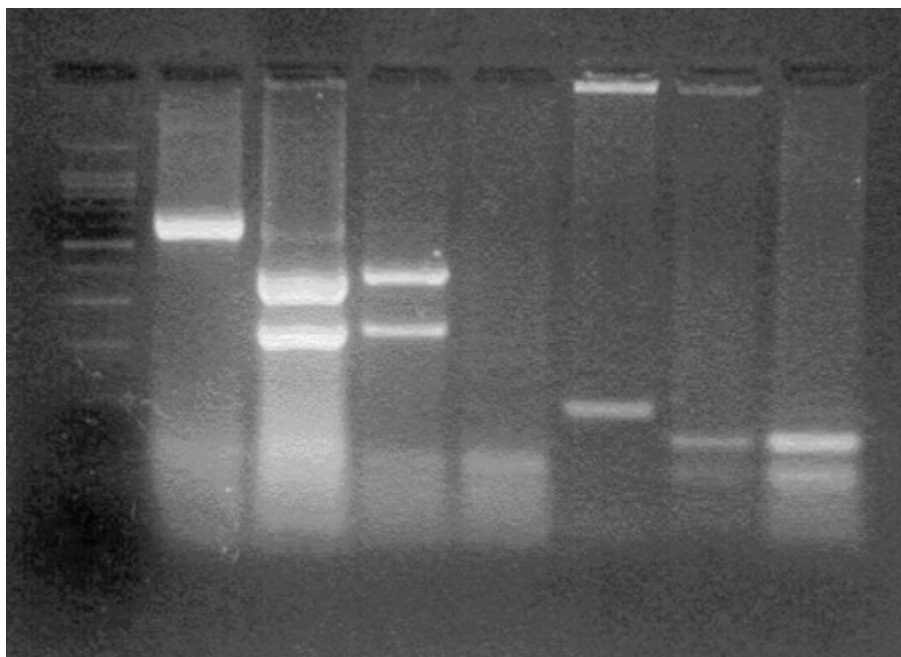


Figura 3. Productos de PCR de los *primers* pCVD 432 y *astA* y análisis con enzimas de restricción. *M*: Marcador de peso molecular 100 bp. *1*: Producto de amplificación de 630 bp de pCVD432. *2,3*: Producto de digestión del amplificado de pCVD432, de 391 bp y 239 bp obtenido con la enzima de restricción *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

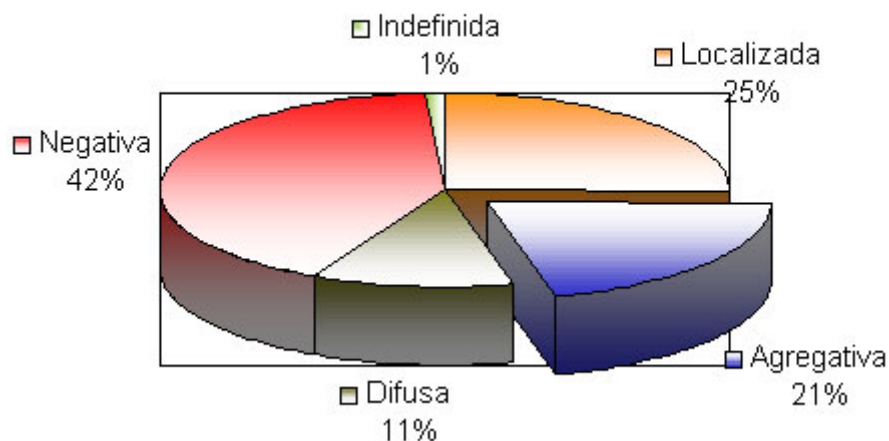


Figura 4. Distribución de los patrones de adherencia en células HEp-2. La figura muestra el porcentaje observado para cada patrón, sobre un total de 87 cepas.

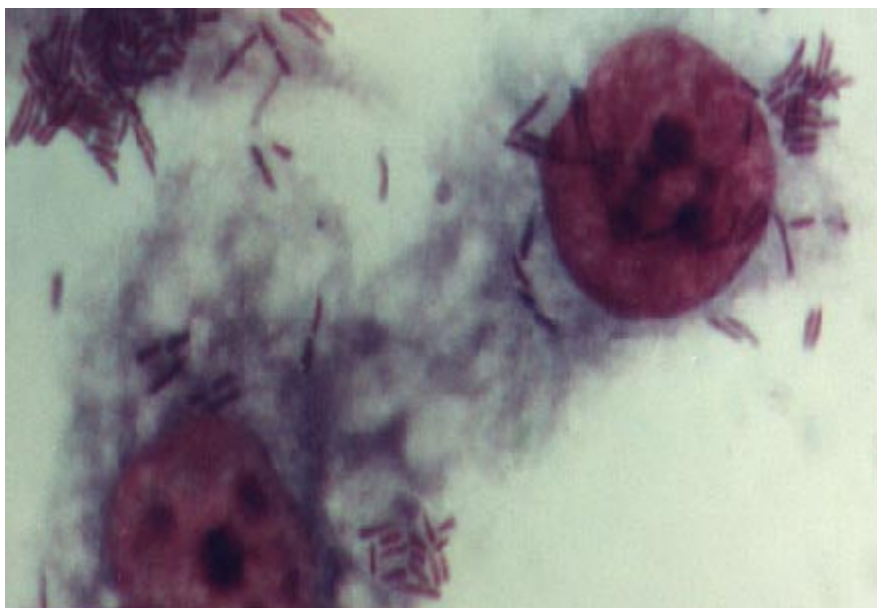


Figura 5. Patrón de adherencia localizada (1 000x) Las flechas señalan los acúmulos de bacterias típicos.

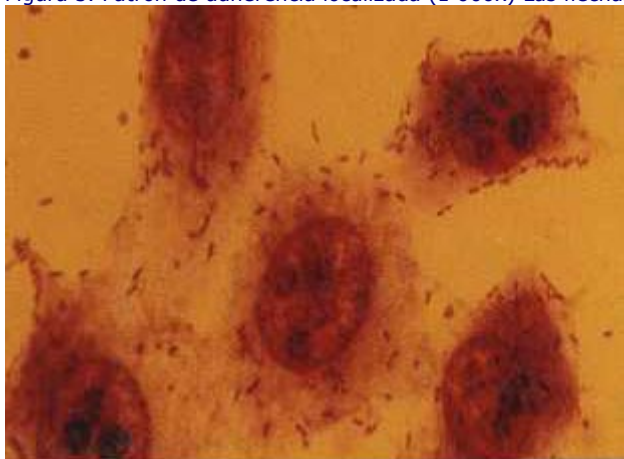


Figura 6. Patrón de adherencia difusa (1 000x). Se observa la distribución de las bacterias sobre la superficie de las células, con escasa o nula adhesión sobre el cubreobjeto.

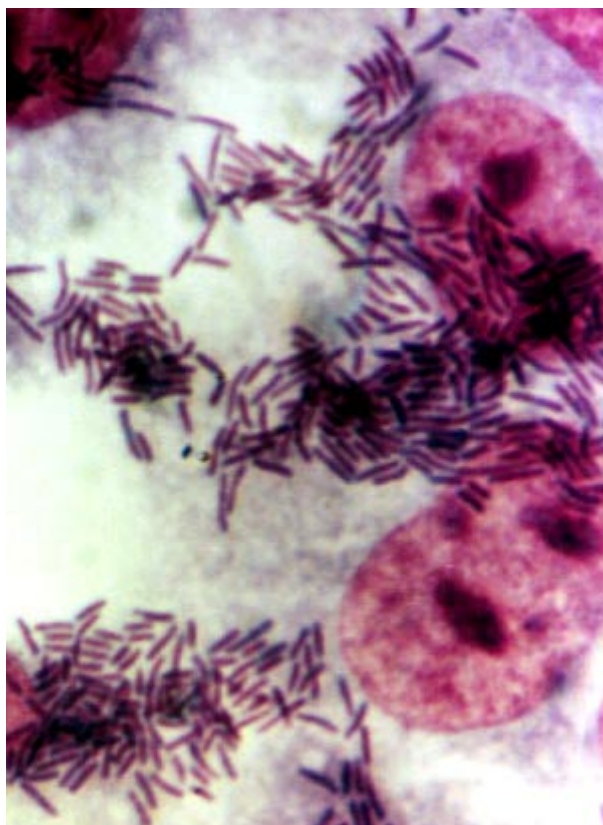


Figura 7. Patrón de adherencia agregativa (1 000x). Las bacterias forman acúmulos entre sí, sobre las células y sobre la superficie del cubreobjeto.

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, Vieira 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.

RIESGO DE MORTALIDAD NEONATAL EN UN CENTRO PERINATAL REGIONAL EN MERIDA, YUCATAN. INFLUENCIA COMBINADA DEL PESO DE NACIMIENTO Y LA EDAD GESTACIONAL



Columnista Experto de SIIC
Dr. Lorenzo Osorno Covarrubias

Jefe de Departamento Clínico de Neonatología. Campo de especialización Neonatología

Introducción

Las tasas de mortalidad neonatal son un indicador de la calidad de la atención perinatal que se otorga en un hospital, en una región o en un país.

En 1955 Schlesinger¹ observó mayor mortalidad neonatal a menor peso y edad gestacional y enfatizó la importancia de tomar en cuenta ambos parámetros y no solo la prematurez o el bajo peso.

En 1972 Lubchenco² y col. publicaron valores de riesgo de mortalidad neonatal en neonatos de 24 a 42 semanas y de 500 a 4 500 gramos de peso; los valores obtenidos en ese estudio se muestran sobrepuestos en las curvas de crecimiento intrauterino³⁻⁴ y con celdas que representan cada semana de edad gestacional y grupo de peso de 250 gramos.

En 1982 Koops y Battaglia actualizaron las tablas de riesgo de mortalidad neonatal presentándolas en forma de bloques de riesgo de mortalidad de los grupos de peso y edad gestacional.⁵

Aunque existen numerosos estudios que describen el riesgo de mortalidad neonatal en diversas circunstancias y poblaciones⁶⁻¹¹ ninguno de ellos muestra la amplia variabilidad del riesgo de acuerdo con los dos parámetros antes mencionados e interrelacionados, como los estudios realizados por Lubchenco, Battaglia y col. en la Universidad de Colorado.

Las tasas de mortalidad neonatal disminuyeron en los últimos 30 años en la mayoría de los países, el porcentaje de supervivencia en neonatos extremadamente prematuros y con peso extremadamente bajo se incrementó; esta tendencia es más marcada en los países desarrollados.¹²⁻¹³

Aunque en nuestro hospital conocemos la tasa de mortalidad neonatal, por grupo de edad gestacional y peso de nacimiento,¹⁴ el propósito de este estudio es actualizar la información sobre el riesgo mortalidad neonatal de acuerdo con la combinación de peso de nacimiento y la edad gestacional en relación con la conocida previamente en nuestro hospital.¹⁵

Material y métodos

Se estudiaron dos cohortes de recién nacidos vivos en los períodos comprendidos entre el 1 de enero de 1995 y el 31 de octubre de 1999, cuyos datos fueron publicados previamente,¹⁵ y del 1 de enero de 2000 al 31 de diciembre de 2003. Se excluyeron los neonatos cuyos datos estaban incompletos y aquellos que fueron trasladados a otras unidades.

La población estudiada estuvo conformada por recién nacidos vivos en el Centro Médico Nacional "Ignacio García Téllez" (CMN IGT), del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), que funciona como centro de atención perinatal de tercer nivel para toda la Península de Yucatán y atiende los embarazos de alto y bajo riesgo procedentes de las clínicas de medicina familiar de las zonas norte y oriental de la ciudad de Mérida.

Los datos se recopilaron de la hoja de codificación neonatal (forma SMG 002/75- IMSS) que funciona como historia clínica perinatal, contiene los datos prenatales, intranatales y posnatales inmediatos. Esta forma se completó al egreso y fue revisada diariamente por uno de los investigadores para verificar la congruencia y consistencia de los datos finales. Estos datos fueron capturados en la base de datos del Servicio de Neonatología en dBase IV. Antes del procesamiento estadístico se verificó nuevamente la congruencia de los siguientes datos: fecha de última menstruación (FUM), fecha de nacimiento del neonato, edad gestacional por FUM y por los métodos de Capurro¹⁶ o Ballard,¹⁷ peso de nacimiento, clasificación del neonato de acuerdo con las curvas de crecimiento intrauterino de la Universidad de Colorado, edad al egreso, condición y fecha de egreso; la estadía fue calculada restando la fecha de nacimiento de la fecha de egreso. Como control de calidad se comparó el número de casos captados en la base de datos con los

registros oficiales del sistema de información mecanizada del IMSS año por año para evaluar el número de pérdidas en la cohorte estudiada.

Se realizó el cálculo de riesgo absoluto (RA) de mortalidad por cada semana de edad gestacional y grupos de peso de 250 g, para simplificación en la presentación de los datos se redondearon las cifras decimales a la unidad más próxima, cuando el valor fue mayor de 2. Estos datos fueron procesados en el paquete estadístico del programa SPSS 8.0 para Windows.

Se obtuvo la diferencia en la mortalidad neonatal en ambos períodos comparando la observada por grupos de peso de nacimiento.

Resultados

En el lapso de 1995 a 1999 se registraron 26 380 recién nacidos vivos, con una pérdida de 901 casos (4.4%). La base de datos de 1997 se excluyó del análisis por pérdida del 42% de los casos. Por lo tanto se incluyeron 20 091 recién nacidos vivos.

Del total de neonatos captados en la base de datos se eliminaron 36 (0.1%) por datos incompletos o inconsistentes en el peso de nacimiento, 350 casos (1.7%) en la edad gestacional y 37 (0.18%) neonatos nacidos en su hogar, quedaron para el análisis 19 668 casos.

El número de neonatos de más de 500 g y de 24 semanas o más que fallecieron en los primeros 28 días de nacidos fue de 10.6/1 000 nacidos vivos (n.v.) (209/19 668).

En el segundo período estudiado se registraron 21 797 recién nacidos vivos: 176 fueron trasladados a otro hospital, de 144 se obtuvieron datos incompletos, el número de casos perdidos en la base de datos fue 1 073 (4.9%). Por lo tanto se incluyeron 20 404 recién nacidos vivos.

El número de neonatos con peso de nacimiento de 500 g o más y de 24 a 44 semanas de edad gestacional que fallecieron en el período neonatal (0 a 28 días) fue 216, con una tasa de mortalidad de 10.5/1 000 n.v. (216/20 404).

En las tablas 1 y 3 se muestra el riesgo absoluto de mortalidad para cada semana de edad gestacional y grupo de peso estratificado en intervalos de 250 g. Esta tabla tiene los datos de los neonatos estudiados en los períodos 1995-1999 y 2000-2003. El porcentaje referido en cada celda representa el riesgo porcentual para esa edad gestacional y peso.

[Tabla 1](#)

[Tabla 2](#)

Se obtuvo toda la gama de riesgo de mortalidad para neonatos con peso de nacimiento entre 500 y 4 500 g y de 24 a 44 semanas de gestación. Para facilitar el análisis se utilizaron distintos colores para señalar diversos rangos de riesgo de mortalidad.

[Tabla 3](#)

En el período 2000-2003 el RA de mortalidad observado en neonatos entre 24 y 29 semanas con peso de nacimiento de 500 a 749 g tuvo un rango de 77% a 100%; para la misma edad gestacional, con peso de 750 a 999 g, fue de 36% a 100%. Entre 28 y 31 semanas, con peso entre 1 000 y 1 499 g, fue de 7% a 54%. Neonatos con 1 750 g o más y con 33 semanas o más, presentaron mortalidad entre 0 y 8%.

[Tabla 4](#)

El número de muertes neonatales / el total de recién nacidos vivos para cada grupo de peso y edad gestacional se muestra en las tablas 2 y 4 para los períodos 1995- 1999 y 2000-2003, respectivamente.

[Tabla 5](#)

En la tabla 5 se muestra la comparación de la mortalidad neonatal en los dos períodos estudiados, el peso de nacimiento se estratificó en intervalos de 250 g.

Discusión

Se observó que el riesgo absoluto de mortalidad aumenta a menor edad gestacional y peso, como se observó en los estudios de Lubchenco.

La tasa de mortalidad neonatal observada en nuestra población, en un estudio previo, en 1993, fue

de 18.1/1 000 n.v.,¹⁴ la obtenida en los dos períodos de estudio fueron 10.6/1 000 (1995-1999) y 10.5/1 000 (2000-2003), la informada por Rodríguez y Enríquez¹¹ en Torreón Coahuila fue 12.9/1 000 n.v., y la observada en 1995 en Estados Unidos de Norteamérica¹³ fue 4.9/1 000 n.v. La reducción de la mortalidad neonatal en nuestro hospital –de 18.1 a 10.6 (42%)– está asociada con la inauguración de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales en el servicio y el funcionamiento del Hospital de Gineco Pediatría de nuestro centro médico con referencia perinatal regional.

No hubo disminución significativa en la tasa de mortalidad en nuestro hospital en los dos períodos estudiados ya que la tasa permaneció prácticamente sin modificación, 10.6 y 10.5 para cada período. Esta consistencia en la tasa de mortalidad se debe a la persistencia de una mortalidad muy alta en neonatos de peso extremadamente bajo al nacimiento e inmadurez extrema.

En los dos últimos años se observó en nuestro hospital (datos no publicados) una reducción de la mortalidad en neonatos muy inmaduros, probablemente esto se relaciona con la mayor disponibilidad y el uso más oportuno de surfactante exógeno y a la utilización con mayor frecuencia de esteroides como madurador pulmonar fetal en las mujeres en riesgo de parto pretérmino.

El riesgo observado en algunos grupos de peso y edad gestacional es mayor al esperado, esto se explica por no ser adecuado el tamaño de muestra (tablas 2 y 4), por tanto ese riesgo de mortalidad debe tomarse con reservas.

En los resultados obtenidos existe una subestimación de la mortalidad neonatal debido a que no se realizó el seguimiento de los neonatos egresados antes de los 28 días.

La tasa de mortalidad neonatal disminuyó en forma constante en los países desarrollados y en la mayoría de los países en desarrollo. Aún existe una brecha importante en la mortalidad neonatal comparando nuestro hospital con lo informado en los países desarrollados, particularmente por la mortalidad de los neonatos muy inmaduros.

Las datos proporcionados en este estudio ofrecen un cálculo del riesgo de mortalidad neonatal en toda la gama de pesos de nacimiento y edades gestacionales, lo cual puede ser útil para dar información para los familiares en condiciones semejantes, para el personal en la toma de decisiones, y como comparación tanto de la propia unidad en el tiempo, como con otras unidades en el ámbito nacional e internacional. Las tablas 1 y 2 fueron publicadas en *Salud Pública de México* 2002;44(4):345-348 y se reproducen con permiso del editor. Los autores no manifiestan conflictos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schlesinger E, Allaway N. The combined effect of birth weight and length of gestation on neonatal mortality among single premature infants. *Pediatrics* 1955;15:698.
2. Lubchenco LO, Searls DT, Brazie JB. Neonatal mortality rate: relationship to birth weight and gestational age. *J Pediatr* 1972;81:814.
3. Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M y col. Intrauterine growth as estimated from live births at gestational ages from 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics* 1963;32:793.
4. Battaglia FC, Lubchenco LO. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr* 1967; 71: 159-163.
5. Koops BL, Morgan LJ, Battaglia FC. Neonatal mortality risk in relation to birth weight and gestational age: update. *J. Pediatr* 1982;101:969-77.
6. Tejero Torres JC. Los límites de la viabilidad: consideraciones clínicas y éticas. *Rev Esp Pediatr* 1997; 53 : 119-125.
7. Jasso GL. Introducción. En: Asociación Mexicana de Pediatría, Editorial Interamericana. *Temas de Pediatría: Neonatología* . Mex 1996: 1- 12.
8. Rivera RS, Fernández CJM, Estrada FJV y col. Letalidad y morbilidad en neonatos con peso menor de 1000 gr. *Rev Mex Pediatr* 1995; 62: 88-93.
9. De la Garza QC, González SM. Muerte perinatal. *Ginecol Obstet Mex* 1995; 63:186.
10. Díaz del Castillo E. Morbilidad y mortalidad perinatales. En: Díaz del Castillo E. *Pediatría Perinatal*. Edit Interamericana 3ra ed., 1988:44-73.
11. Rodríguez y Enríquez de Rivera FC, Velásquez Trejo ML, Rois Hernández J. Mortalidad perinatal en unidades de atención médica del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) Centro Médico Nacional de Torreón. *Ginecol Obstet Mex* 1998 Jul;66:297-300.
12. Guyer B, McDorman MF, Martin JA y col. Annual summary of vital statistics- 1997. *Pediatrics*. 1998;102:1333-49.

13. Lemons JA, Bauer CR, Oh W y col. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child health and human development neonatal research network, January 1995 through December 1996. NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2001;107:E1.
14. Echeverría EM, Sauri PR, Osorno CL y col. Mortalidad perinatal en un hospital regional de tercer nivel. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994; 51: 765-769.
15. Osorno Covarrubias L, Vela Urtecho G, Dávila Velázquez J. Representación gráfica del riesgo de mortalidad neonatal en un centro perinatal regional en Mérida, Yucatán, México. *Salud Pública de México* 2002;44:345-8.
16. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D y col. A simplified method of fetal maturation of the newborn infant. *J Pediatr* 1978;93:120.
17. Ballard JL, Khoury-JC, Wedig-K y col. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991;119:417-423.

Trabajos Distinguidos, Pediatría , integra el Programa SIIC de Educación Médica Continuada