
Anales

de la Fundación

Alberto J. Roemmers

Volumen XXIII

Libro de edición Argentina

Es propiedad
Derechos reservados.
© 2012, por la Fundación
Alberto J. Roemmers.
Buenos Aires, Argentina.
Queda hecho el depósito
que marca la ley 11.723

Impreso en la Argentina
Printed in Argentina
Libro de distribución gratuita
Prohibida su venta

Editado e impreso por
Ediciones Médicas del Sur S.R.L.
Junín 917 2º D - C.A.B.A.
ediciones@prensamedica.com.ar

INDICE

SUBSIDIOS 2008 - 2010

Introducción	13
 E. COLI ENTEROPATÓGENA (EPEC) TÍPICA Y ATÍPICA EN NIÑOS CON DIARREA DE LA CIUDAD DE CORRIENTES <i>Silvia Edid Balbachán; Luis Antonio Merino; Daniel Eduardo Merino; Lidia Natividad Acevedo</i>	 15
 ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE OBESIDAD ABDOMINAL, INFLAMACION Y CANCER DE PROSTATA <i>Gabriela Berg; Halina Grosman; Viviana Mesch; Bibiana Fabre; Miguel López</i>	 29
 GEOHELMINTOS EN SUELOS Y HECES DE PERROS DE LA CIUDAD DE BAHÍA BLANCA: ESTUDIOS DE PREVALENCIA, VIABILIDAD Y TIPIFICACIÓN DE LARVAS DE ANCYLOSTOMA SP, E INCIDENCIA DE TOXOCAROSIS OCULAR Y LARVA MIGRANS CUTÁNEA EN LA POBLACIÓN EN RIESGO. <i>Sixto Raúl Costamagna; Elena C. Visciarelli; Elisa Baillie; María L. Gertiser</i>	 41
 PREVENCIÓN EN DIABETES TIPO 1 <i>Juan C. Cresto</i>	 51
 CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES Y PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN ENTEROCOCOS AISLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL PROVENIENTES DEL ÁREA RURAL DE TANDIL, ARGENTINA <i>María Marta De Luca; Mónica Delfina Sparo; Celia María Schell</i>	 73

ESTUDIO DE LA ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS
INFECCIONES AGUDAS DEL TRACTO RESPIRATORIO EN UNA
POBLACIÓN PEDIÁTRICA

*Gerardo D. Deluca; Viviana Gutnisky; Gerardo Andino; Adrian Gerard;
Jesica Benegui; Miriam N. Salmón; María E. Horna; Viviana García
Saitoo; José O. Lotero*

87

ASOCIACIÓN DEL *HELICOBACTER PYLORI* AL ARDOR BUCAL,
LA HIPERTROFIA PAPILAR LINGUAL Y LA HALITOSIS

*Valeria Denninghoff; Isabel Adler; Andrea Muiño; Mariana dos Santos;
Juan Manuel Muiño; Liza Marina Marigo Klein; Alejandra Avagnina;
Alejandro García*

97

VALORACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DEL AIRE EN AMBIENTES
INTERNOS DE ASERRADEROS. SU ROL COMO FACTOR DE
RIESGO EN ESTE CONTEXTO DE TRABAJO

*Graciela Esquivel; Irma Arias; Magdalena Mangiaterra; Gustavo
Giusiano*

113

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DEL GRUPO *BACTEROIDES*
FRAGILIS A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

*Fernández Canigia L.; Litterio M.; Legaria M.C.; Castello L.; Predari
S.C.; Di Martino A.; Rossetti A.; Rollet R.; Carloni G.; Bianchini H.;
Radice M.; Gutkind G.; and the Anaerobic Group*

123

EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y
ALTERACIONES EN LA SECRECIÓN SALIVAL EN RESPUESTA
AL CONSUMO DE ALCOHOL Y AL TRATAMIENTO CON
CANNABINOIDES

Javier Fernández Solari

139

COLONIZACIÓN Y SEPSIS POR LEVADURAS EN NEONATOS EN
UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS

Gustavo Giusiano; Florencia Rojas

165

RESPUESTA INNATA Y ESPECÍFICA A AGENTES CAUSANTES DE
INFECCIONES RESPIRATORIAS BACTERIANAS EN PACIENTES

CON ASMA Y EN PACIENTES CON DEFICIENCIA ESPECÍFICA FRENTE A ANTÍGENOS POLISACÁRIDOS <i>Susana Fink; Rubén D. Paz</i>	177
DETECCIÓN DE MYCOPLASMA HOMINIS, UREAPLASMA UREALYTICUM Y CHLAMYDIA TRACHOMATIS EN MUESTRAS DE SEMEN MEDIANTE PCR MULTIPLE <i>María V. Gómez; Gerardo D. Deluca; Luis Antonio Merino</i>	189
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS. DETERMINACIÓN DE SU POSIBLE ROL EN LA RELACIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO Y SU POTENCIAL COMO BLANCO PROFILÁCTICO DE LA HIDATIDOSIS <i>Ariana Marcela Gutierrez</i>	197
DETECCIÓN DE CEPAS DIARREOGÉNICAS DE ESCHERICHIA COLI EN FUENTES DE AGUA DE LA PROVINCIA DEL CHACO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA <i>Liliana Silvina Lösck; Luis Antonio Merino</i>	223
DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS TIPOS PATOGENICOS CAGA, VACA Y BABA2 DE HELICOBACTER PYLORI EN MUESTRAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS EN POBLACIÓN ADULTA. <i>Marcelo Gabriel Medina; Myriam Lucrecia Medina; Liliana Silvina Lösck; Luis Antonio Merino</i>	233
SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: RELEVAMIENTO SEROEPIDEMIOLÓGICO DE ANTICUERPOS ANTI-ESCHERICHIA COLI O157 PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA, EN DIFERENTES GRUPOS POBLACIONALES. <i>Elizabeth Miliwebsky; Isabel Chinen; Marta Rivas</i>	241
ESTADO NUTRICIONAL Y PARASITOSIS EN ESCOLARES DEL MUNICIPIO DE BERISSO, PROVINCIA DE BUENOS AIRES <i>Marta Cecilia Minvielle; Betina Cecilia Pezzani; María Laura Ciarmela; Nora Beatriz Molina</i>	251

MICROAMBIENTE CELULAR Y DEL ESTROMA EN PIEL LESIONAL DE PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTÉMICA PROGRESIVA. <i>Gabriela Fernanda Mora</i>	277
AISLAMIENTO DE TRYPANOSOMA CRUZI DE MADRES CHAGÁSICAS CRÓNICAS QUE NO TRANSMITIERON LA INFECCIÓN CONGÉNITA A NINGUNO DE SUS HIJOS: PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA MEJORADA DE HEMOCULTIVO PARA SER USADA EN PACIENTES CRÓNICOS <i>María Celia Mora; Olga Sánchez Negrette; Federico Ramos; Cintia Fernández; Miguel Ángel Basombrío</i>	291
AVANCES EN LA COMPRENSIÓN DE LA LEISHMANIASIS A NIVEL REGIONAL: ANÁLISIS DE FACTORES INMUNOLÓGICOS Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA <i>Cecilia María Parodi Ramoneda</i>	307
EXPRESIÓN CLÍNICA DE HEMOFILIA EN MUJERES PORTADORAS. DIAGNÓSTICO DE LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X <i>Claudia Pamela Radic; Liliana Carmen Rossetti; Miguel Candela</i>	313
EPIDEMIOLOGÍA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, GENOTIPO 2 (HCV-2) EN LA REGIÓN CENTRAL DE ARGENTINA <i>Viviana Ré; Andrés Culasso; Silvia Mengarelli; Adrián Farías; Fabián Fay; Belén Pisano; Osvaldo Elbarcha; Marta Contigiani; Rodolfo Campos</i>	329
INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN-VITRO DE 6 DROGAS AZÓLICAS FRENTE A LEVADURAS AISLADAS DE EXUDADOS VAGINALES RECIDIVANTES <i>Florencia Rojas; Magdalena Mangiaterra; Gustavo Giusiano</i>	341
CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN BACTERIEMIAS POR ACINETOBACTER SPP. MULTIRRESISTENTE EN PEDIATRÍA <i>Silvina Ruvinsky; Graciela Fiorilli; Lidia Casimir; Horacio Lopardo; Rosa Bologna</i>	351

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A NEUMOCOCO SEROTIPO
ESPECÍFICA EN NIÑOS CON SOSPECHA DE INMUNODEFICIENCIA
PRIMARIA DESAFIADOS CON VACUNAS 23 VALENTE Y
HEPATAVALENTE CONJUGADA

*Jessica Sardaños; Verónica Natoli; Daniela Carelli; María Isabel Gaillard;
Liliana Bezrodnik*

365

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS
MESOTELIALES PLEURALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO:
APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
DERRAMES PLEURALES DE ORIGEN MALIGNO, INFECCIOSO Y
TRANSUDATIVO.

Luis Pablo Schierloh; Rosa M. Musella

377





ALBERTO J. ROEMMERS

1890 - 1974



FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

Creada por
Doña Candelaria N. Wolter de Roemmers e hijos
en el año 1975

Presidente
Dr. Rodolfo F. Hess

Vice-Presidente
Dr. Manuel Luis Martí

Secretario
Dr. Julio A. Bellomo

Vocales
Sr. Eduardo A. Macchiavello
Sr. Alberto Roemmers
Sr. Alejandro Guillermo Roemmers
Sr. Alfredo Pablo Roemmers
Dr. Miguel de Tezanos Pinto

Fiscalizadores
Dr. Eduardo L. Billinghamurst
Dr. Carlos Montero



INTRODUCCIÓN

En este volumen se publican los subsidios del Período 2008-2010, se han volcado todos los informes finales de los grupos de investigación que desarrollaron sus tareas en ese lapso.

Con esta publicación la Fundación Alberto J. Roemmers mantiene su compromiso, adquirido hace más de treinta y cinco años, de apoyar a la investigación médica en nuestro país a través de subsidiar planes rigurosamente seleccionados todos los años.

Se han visto beneficiados más de 1.000 grupos de trabajo, a lo largo de todo el país, en temas de Investigación Básica, Aplicada y de Epidemiología y Salud Pública.



E. COLI ENTEROPATÓGENA (EPEC) TÍPICA Y ATÍPICA EN NIÑOS CON DIARREA DE LA CIUDAD DE CORRIENTES

Balbachán, Silvia Edid; Merino, Luis Antonio; Merino, Daniel Eduardo
Personal de apoyo interviniente en el proyecto: Acevedo, Lidia Natividad
Instituto de Medicina Regional. UNNE. Facultad de Medicina. UNNE.

RESUMEN

***E. coli* Enteropatógena (EPEC) típica y atípica en niños con diarrea de la Ciudad de Corrientes**

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo que forma parte de la flora habitual del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales pero además presenta un amplio conjunto de serotipos incluyendo algunos que son responsables de causar enteritis en humanos, los que actualmente son categorizados en base a sus factores de virulencia o determinantes de patogenicidad y se denominan virotipos o patotipos.

Los virotipos de *Escherichia coli* productores de enfermedad diarreica se clasifican en: *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP), *Escherichia coli* Enteroinvasiva (ECEI), *Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA), *Escherichia coli* Enterohemorrágica (ECEH) y *Escherichia coli* de Adherencia Difusa (ECAD).

Escherichia coli Enteropatógena (ECEP) posee la capacidad de producir diarrea no inflamatoria por destrucción del ribete en cepillo siendo sus determinantes de patogenicidad la intimina (int) y el factor de attaching and effacing. Su frecuencia en estudios latinoamericanos, varía entre 5 y 40%, aumentando en niños menores de 12 meses y con diarrea grave. Afecta sobre todo a recién nacidos en hospitales, en forma de brotes epidémicos. Los serogrupos más frecuentes son: O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab y O142.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) conocer la prevalencia de las diarreas por *E. coli* enteropatógenas (EPEC) típicas y atípicas mediante la aplicación de técnicas de biología molecular para instaurar efectiva vigilancia y desarrollar estrategias racionales de control en casos de brotes y de infecciones intrahospitalarias; y b) contribuir al avance de los conocimientos y a la

atención médica mediante el análisis de la sensibilidad antimicrobiana para la utilización racional de la medicación y evitar la distorsión del gasto.

Se estudiaron 100 muestras de materia fecal, 6 (6%) de las cuales fueron positivas para EPEC. De ellas 3 fueron típicas (3%), y 3 casos EPEC atípicas (3%).

INTRODUCCIÓN

Las Enterobacterias son bacilos Gram negativos, fermentadores de glucosa y reductores de nitratos a nitritos que se adquieren por vía fecal-oral, variando el tamaño del inóculo necesario para producir la enfermedad de acuerdo al germen involucrado.

Escherichia coli es una enterobacteria que forma parte de la flora habitual del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales, con un amplio conjunto de serotipos incluyendo algunos que son responsables de causar enteritis en humanos. Es el más versátil de todos los enteropatógenos y cada vez que se obtiene un aislamiento de esta bacteria a partir de materia fecal de un paciente con diarrea se hace imprescindible diferenciar aquellos tipos capaces de producir enfermedad entérica de aquellos que sólo se encuentran como saprófitos intestinales. Esos serotipos actualmente son categorizados en base a sus factores de virulencia o determinantes de patogenicidad y se denominan virotipos o patotipos. ^{(1) (2) (3)}

Los virotipos de *Escherichia coli* productores de enfermedad diarreaica se clasifican en: *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP), *Escherichia coli* Enteroinvasiva (ECEI), *Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA), *Escherichia coli* Enterohemorrágica (ECEH) y *Escherichia coli* de Adherencia Difusa (ECAD).

Escherichia coli Enteropatógena (ECEP) posee la capacidad de producir diarrea no inflamatoria por destrucción del ribete en cepillo siendo sus determinantes de patogenicidad la intimina (int) y el factor de attaching and effacing. Su frecuencia en estudios latinoamericanos, varía entre 5 y 40%, aumentando en niños menores de 12 meses y con diarrea grave. Afecta sobre todo a recién nacidos en hospitales, en forma de brotes epidémicos. Los serogrupos más frecuentes son: O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab y O142. ^{(1) (2) (3)}

Es un miembro prototipo de la familia de patógenos relacionados a lesiones A/E (attaching and effacing) que produce enfermedad diarreaica relacio-

nada con la pérdida de la absorción de las microvellosidades de la mucosa intestinal y la reorganización de proteínas del citoesqueleto del huésped bajo la forma de estructuras semejantes a pedestales situados debajo de la bacteria adherente. Adhiere en un patrón característico a la célula epitelial, formando microcolonias, usualmente referidas como patrón de adherencia localizada (PAL), mediada por pili formadores de bandas o flagelos. Estas áreas están asociadas, en un 98 %, con la presencia de un plásmido llamado Factor Adherente Plasmídico. Desde esta zona secretan proteínas de dos tipos: una que se inserta dentro de la célula huésped y actúa como receptor de adhesinas (intiminas) bacterianas, y la otra que se llama Locus of Enterocyte Effacement (LEE) y que logra el borramiento del enterocito. Estas proteínas inducen alteraciones de las proteínas del citoesqueleto de las células vecinas adyacentes produciendo el borramiento de las microvellosidades mencionado precedentemente. ^{(1) (2) (3)}

La ECEP origina cambios en la célula huésped que sugieren muerte por apoptosis. Estos cambios consisten en expresión precoz de fosfatidilserina en la superficie de la célula huésped y desdoblamiento internucleosomal de su ADN.

Feno y genotípicamente las EPEC pueden clasificarse en típicas y atípicas, presentando cada una de ellas diferentes características en cuanto a su virulencia, patogenicidad, asociación con diarreas, prevalencia y reservorios.

La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos y los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas. ^{(1) (2) (3)}

Clínicamente puede causar diarrea acuosa, secretora y autolimitada. Se asocia frecuentemente a fiebre, dolor abdominal, vómitos, síndrome de malabsorción, etc. Frecuentemente en pacientes pediátricos de países subdesarrollados se han observado cuadros de diarrea crónica. Tiene una alta tasa de letalidad, al producir en algunos niños cuadros de diarrea grave y prolongada.

Dejan inmunidad específica de serogrupo. ^{(1) (2) (3)}

Se diferencia de otras *E. coli* por inducir una adhesión característica, por no producir toxina shiga y porque las lesiones que producen en los enterocitos pueden pasar inadvertidas. ^{(2) (3)}

Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido EAF que codifica para el Bfp; se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes *eae* pero no el plásmido EAF.

Para el aislamiento, la identificación y la caracterización de cepas de *E. coli* se aplican métodos tradicionales, métodos in vivo e in vitro y de biología molecular.

E. coli, como parte de la flora comensal intestinal, tiene particularmente un gran potencial para el desarrollo de la resistencia a antimicrobianos y podría constituirse en un reservorio diseminable de genes de multiresistencia a bacterias patógenas o viceversa.

Las infecciones causadas por bacterias multiresistentes a antibióticos estarían asociadas a mayores tasas de morbilidad y mortalidad. Este fenómeno derivado del uso inapropiado de antibióticos estaría influenciado por varios factores, como ser la ineficacia de los antibióticos y sus complicaciones en el tratamiento, el incremento de la virulencia microbiana por la asociación entre genes de virulencia y de resistencia a antibióticos y la ineficiente colonización de la microflora intestinal que favorecería la infección de organismos multiresistentes. (2) (3) (4) (5)

La resistencia a diferentes antimicrobianos se encuentra en genes localizados en cromosomas, plásmidos o transposones. La transferencia horizontal de genes de multiresistencia favorece su distribución entre diferentes bacterias de igual y diferente especie. (5) (6) (7)

La resistencia al Cotrimoxazol, es significativa por la alta proporción de aislamientos resistentes (60%), por presentar porcentajes similares de resistencia en *E. coli* no diarreogénica, *Shigella* y EPEC, así como por su asociación a la multiresistencia. (5) (6) (7)

Su frecuencia en distintos estudios latinoamericanos, varía entre 5 y 40%, siendo más frecuente en niños menores de 12 meses y con diarrea grave; después del año de edad no se observan diferencias entre los niños con diarreas y los controles para éste germen debido probablemente a la inmunidad adquirida. En niños asiáticos, la prevalencia es del 13% en Nepal y del 10,7% en Nigeria. (2) (3)

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea, afectando principalmente a niños menores de dos años, aunque también puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. (2) (3) (6) (7) (8)

Las cifras de letalidad en países subdesarrollados son elevadas (20 a 50%), además, se ha notificado en algunos países latinoamericanos que la infección por EPEC supera a la provocada por *Campylobacter* spp. y rotavirus en la población infantil. (9) (11) (12) (13)

Fisiopatogenia

En líneas generales, este proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína quinasas C. Este proceso se denomina adherencia y esfacelamiento (A/E). En el intestino delgado se adhieren de manera típica a las microvellosidades, en forma de densas microcolonias y constituyendo lo que se llama Patrón de Adherencia Localizada (PAL) mediada por pili formadores de bandas o flagelos. ⁽¹¹⁾ Con fines prácticos, el modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases: a) adherencia inicial, b) inyección de factores y transducción de señales, y c) contacto íntimo. ⁽¹²⁾

La adherencia es un proceso fundamental en el que pueden distinguirse dos fases; la primera implica la adherencia inicial entre las mismas bacterias, mientras que la segunda supone la adherencia de las bacterias a la célula del huésped. ^{(11) (12) (13) (14)}

Una vez que la bacteria está adherida, inyecta a la célula una serie de proteínas mediante el sistema de secreción tipo III (SSTT), por medio del denominado complejo aguja, que le permite a EPEC secretar proteínas hacia el medio extracelular y a través de él pasan tres proteínas codificadas en el LEE conocidas como proteínas translocadoras.

La última etapa de la infección por EPEC se caracteriza por la unión estrecha entre la bacteria y la célula del huésped, así como la formación de los pedestales de actina. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y fisiología normal de la región apical de las células, que lleva al final a la pérdida de las microvellosidades intestinales y su función. ^{(7) (11)}

Tipos virulentos de EPEC

De manera distintiva, todas las cepas de EPEC contienen una isla de patogenicidad denominada LEE en el cromosoma bacteriano, mientras que sólo los aislamientos más virulentos codifican al plásmido EAF. Debido a estas características genotípicas hoy día se clasifica a EPEC en dos tipos virulentos: I y II.

Las cepas que pertenecen al tipo I, además del LEE, codifican al plásmido de virulencia EAF, en tanto que las de menor virulencia denominadas de tipo II no codifican al plásmido EAF. ^{(11) (12) (15)}

Por otro lado, Trabulsi y colaboradores propusieron clasificar a las cepas de tipos I y II en cepas típicas y atípicas, respectivamente, con base en la pre-

sencia o ausencia del plásmido EAF y el fenotipo de adherencia. Las cepas típicas (de tipo I) presentan el patrón de adherencia localizada (LA, del inglés localized adherence) sobre cultivos de células epiteliales, mientras que las cepas atípicas (o de tipo II) poseen adherencia semejante a la localizada (LAL, por sus siglas en inglés), adherencia difusa o, en algunos casos, adherencia agregativa. ⁽¹²⁾

Manifestaciones clínicas

Su inóculo es elevado (10^6 - 10^{10}). ^{(2) (3)}

El período de incubación de 9 a 24 horas, luego del cual aparecen gradualmente deposiciones líquidas, con poca fiebre, dolor abdominal, afectando principalmente a recién nacidos en hospitales, en forma de brotes epidémicos. ^{(2) (3) (5)} Asimismo causa diarreas en lactantes, de tipo acuosa, con moco, y deshidratación. ^{(2) (3) (12)} Tiene una alta tasa de letalidad, al producir en algunos niños cuadros de diarrea grave y prolongada. ^{(2) (3)}

La infección es menos frecuente en niños alimentados con pecho materno.

Dejan inmunidad específica de serogrupo. ^{(2) (3) (12)}

Diagnóstico

El diagnóstico de EPEC incluye ensayos in vitro, en cultivos celulares y métodos moleculares. ^{(12) (15)}

EPEC se aísla en medios selectivos y diferenciales para enterobacterias, como el agar de MacConkey o el agar de eosina y azul de metileno, a partir de muestras de MF. Sin embargo, para diferenciar los aislamientos de EPEC de las *E. coli* de flora normal, y debido a que son indistinguibles desde el punto de vista bioquímico, se requieren pruebas adicionales diferentes, como: a) serotipificación, b) ensayo de adherencia con células HEP-2, c) prueba de FAS (tinción fluorescente para actina) y d) técnicas de biología molecular que amplifican genes que codifican a proteínas de virulencia. ^{(5) (8) (9) (10) (15)}

La prueba fenotípica de diagnóstico, considerada hoy el estándar de oro para la identificación de EPEC, es el ensayo de adherencia sobre células epiteliales HEP-2 que describieron de forma inicial Cravioto y colaboradores. Permite identificar bacterias agrupadas en cúmulos o microcolonias sobre las células epiteliales en cultivo; dicha disposición se conoce como adherencia localizada o fenotipo LA. Pueden también reconocerse por medio de esta técnica *E. coli* enteroagregativa (EAEC), que se agrupan y forman empalizadas que se adhieren a las células y al cristal; también puede identificarse *E.*

coli adherente difusa (DAEC), reconocible porque las bacterias se adhieren a las células de forma aleatoria o difusa. ^{(4) (5) (7) (14)}

La prueba de FAS (tinción fluorescente para actina) es una técnica alternativa que se ha empleado en estudios epidemiológicos y en la que se observa la acumulación de la actina del citoesqueleto en la forma de puntos fluorescentes en la célula, en los que se encuentran los pedestales y las bacterias adheridas.

Los estudios moleculares se realizan sobre todo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y con sondas genéticas. Los blancos genéticos para identificar EPEC son una secuencia genética del plásmido EAF que se emplea como sonda o la amplificación por PCR de la subunidad estructural de los BFP (*bfpA*) y el gen que codifica a la intimina (*eae*). ^{(4) (5) (6) (14) (15)}

En ensayos in vitro las cepas EPEC se caracterizan por formar microcolonias en el citoplasma de las células Hep-2 y su estudio incluye factores de patogenicidad como el efecto A/E, presencia de plásmidos y fimbrias. ^{(4) (5) (6) (14) (15)}

Asimismo se puede realizar la identificación genética de tres tipos de intimina (a, b y g), mediante PCR de la región variable del gen *eaeA*. ⁽¹⁵⁾

OBJETIVOS

Conocer la prevalencia de las diarreas por *E. coli* enteropatógenas (EPEC) típicas y atípicas mediante la aplicación de técnicas de biología molecular para instaurar efectiva vigilancia y desarrollar estrategias racionales de control en casos de brotes y de infecciones intrahospitalarias.

Contribuir al avance de los conocimientos y a la atención médica mediante el análisis de la sensibilidad antimicrobiana para la utilización racional de la medicación y evitar la distorsión del gasto.

METODOLOGÍA

A partir de estos conocimientos, decidimos investigar la presencia de cepas “típicas” (*bfp+*) y “atípicas” (*bfp-*) de EPEC en muestras de diarrea, utilizando técnicas de biología molecular.

Se realizó un estudio prospectivo, recolectándose muestras de diarreas de niños menores de 5 años provenientes de consulta externa de distintos centros asistenciales de la ciudad de Corrientes durante 18 meses.

Se definió como caso de diarrea a 3 o más deposiciones no formadas o líquidas en un período de 24 horas. Se excluyeron del muestreo aquellos pacientes con diarreas crónicas o antecedentes de otras patologías gastrointestinales como ser celiaquía y alergias alimentarias.

Dentro de la hora siguiente a la recolección, las muestras de materia fecal fueron inoculadas en un medio de transporte Cary-Blair, colocadas a 4°C y posteriormente trasladadas al laboratorio de bacteriología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste de la ciudad de Resistencia, Chaco. Allí se sembraron en agar SS, McConkey, Agar Sangre, Agar Mac Conkey - Sorbitol y TCBS para el aislamiento primario de especies de *Shigella* y otros enteropatógenos.

La identificación bioquímica de colonias sospechosas se realizó con métodos estándar y el grupo serológico se identificó por aglutinación con antiseros específicos (División de Antiseros, Instituto de Enfermedades Infecciosas Humanas ANLIS "Carlos G. Malbrán").

En aquellas cepas bioquímicamente compatibles con *Escherichia coli* se realizó PCR dirigida a la amplificación de los genes *eaeA*, *bfpA* y *stx* que codifican para la intimina, fimbrias de adherencia y toxina Shiga-like, respectivamente.

RESULTADOS

En el período comprendido entre el 1 de enero de 2009 y el 30 de junio de 2010 se estudiaron en total 100 muestras de MF provenientes de niños menores de 5 años que consultaron por diarrea aguda.

Del total de los coprocultivos realizados, en ninguno se recuperó *Salmonella* ni *Shigella* ni *E. coli* 0157.

En 6 muestras (6%) se detectó la presencia de EPEC (*eae+* *stx-*), 3 de ellas correspondieron a EPEC típicas (*bfp+*) y 3 a EPEC atípicas (*bfp-*) (Tabla 1)

	Sexo	Edad	Genes	Virotipo	<i>bfp</i>
1	F	18 m	<i>eae</i>	EPEC	si
2	M	30 m	<i>eae</i>	EPEC	si
3	M	54 m	<i>eae</i>	EPEC	no
4	M	27 m	<i>eae</i>	EPEC	no
5	F	54 m	<i>eae</i>	EPEC	si
6	M	36 m	<i>eae</i>	EPEC	no

Tabla 1: Características de las Cepas de EPEC.

DISCUSIÓN

En relación a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos compararlos con diferentes líneas de investigación, algunos de los cuales son similares y otros difieren fundamentalmente en relación al número de muestras y a la población objetivo.

Su frecuencia en distintos estudios latinoamericanos, varía entre 5 y 40%, siendo más frecuente en niños menores de 12 meses y con diarrea grave; después del año de edad no se observan diferencias entre los niños con diarreas y los controles para éste germen debido probablemente a la inmunidad adquirida. En niños asiáticos, la prevalencia es del 13% en Nepal y del 10,7% en Nigeria. ^{(2) (3)}

Las cifras de letalidad en países subdesarrollados son elevadas (20 a 50%), además, se ha notificado en algunos países latinoamericanos que la infección por EPEC supera a la provocada por *Campylobacter* spp. y rotavirus en la población infantil. ⁽⁹⁾

En México, se presenta en forma endémica hasta en 6% de la población, cifra semejante a la informada por Alemania y Australia, con 5.9 y 7.6%, respectivamente, de niños sanos portadores. Estudios actuales del Hospital Infantil de México, presentan aislamientos de *E. coli* con adherencia localizada (LA) en 7% de 208 casos de niños con un cuadro diarreico grave (cepas del tipo I), y 12% de cepas con adherencia parecida a la localizada (LAL) en este mismo grupo de pacientes (cepas del tipo II). ^{(5) (9) (10)}

En Brasil y Chile, la epidemiología de EPEC es similar. Gomes y colaboradores (1989) encontraron que 23% de cepas de *E. coli* con adherencia localizada (LA+) intervenía en niños con diarrea, aun por encima de otros patógenos importantes como rotavirus o ETEC. Tornieporth y colaboradores notificaron que EPEC intervino sólo en 8% de las diarreas agudas en el mismo país. En la República de China se demostró que cepas de EPEC se aíslan en 5% de los casos de diarrea de niños menores de tres años. ^{(6) (7) (8) (9)}

En Irán se ha encontrado ECEP en primer lugar, con una prevalencia cercana a 45 %, en Brasil fue encontrada en 8 % de los pacientes, mientras que en Finlandia solo se encontró en 5,5 % de pacientes con diarrea, un valor muy similar al encontrado en Chaco por Medina y cols, lo cual indica la gran variabilidad de frecuencia entre diferentes países.

La diferenciación de los aislamientos de ECEP en ECEP típico y atípico, permitiría conocer más aún acerca de la epidemiología de las enfermedades producidas por este grupo de bacterias. Se ha reportado mayor prevalencia

de cepas ECEP típicas en países en desarrollo, mientras que las atípicas constituyen los aislamientos más frecuentes en países industrializados. ⁽¹⁰⁾

Alikhani y cols, estudiaron 247 muestras de niños con diarrea y 1108 asintomáticos, en 140 (56,7%) fueron identificados patógenos entéricos, y dentro de ellos 111 fueron EPEC, determinados por la presencia de genes *eaeA*, *bfpA* y *stx* por PCR. Dentro de las EPEC, 35 casos (11,8%) fueron típicas, comparados con 8 (0,4%) en el grupo de los pacientes asintomáticos. Las EPEC atípicas fueron aisladas en 23 casos (9,3 %) de niños con diarrea, comparados con 13 casos (1,2%) dentro del grupo de los asintomáticos. Esto nos indica que estos agentes constituyen una causa importante de diarrea en niños. ⁽¹⁶⁾

Praerea y cols, por su parte, en 280 muestras analizadas provenientes de niños menores de 2 años de edad, recuperaron enteropatógenos en 55 pacientes, correspondiendo el hallazgo de EPEC en 30 pacientes. ⁽¹⁷⁾

CONCLUSIONES

A la luz de las técnicas de Biología Molecular podemos observar que EPEC es un importante agente etiológico de diarreas en niños pequeños, por lo que es importante su búsqueda en laboratorios de referencia, a los fines de contribuir al conocimiento de su perfil epidemiológico.

La identificación de la relación clonal, por biología molecular, de los aislamientos obtenidos a partir de un brote o el estudio de la persistencia endémica de ciertas cepas, es crucial para adoptar medidas orientadas a prevenir la diseminación de la infección y erradicar su fuente.

Los métodos basados en la amplificación mediante PCR de secuencias repetitivas (REP y ERIC) presentaron gran utilidad en la tipificación epidemiológica de las cepas estudiadas.

Son necesarios los estudios regionales a fin de monitorear periódicamente la epidemiología de los distintos serovares, ya que la prevalencia de cada uno de ellos responde a factores locales asociados a probables cambios en el nicho ecológico de un determinado lugar.

Como resultado de lo expuesto podemos concluir que se deben poner en marcha actividades de vigilancia orientadas a detectar y controlar la aparición de nuevas cepas.

SUMMARY

Escherichia coli is a gram-negative bacillus that is part of the normal flora of the gastrointestinal tract of man and animals but also presents a wide range of serotypes including some that are responsible for causing enteritis in humans. These serotypes are now categorized based on their virulence factors or pathogenicity determinants and are called virotypes or pathotypes.

The *Escherichia coli* virotypes producers of diarrheal disease are classified as Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), Enteraggative *Escherichia coli* (ECEA), Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and Diffuse Adherence *Escheichia coli* (ECAD).

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) has the ability to produce non-inflammatory diarrhea by destroying the brush border and its pathogenicity determinants are intimin (int) and the attaching and effacing factor. Its frequency in Latin American's studies varies between 5 and 40%, increasing in children under 12 months with severe diarrhea. It mainly affects newborns in hospitals, in the form of outbreaks. The most frequent serogroups are: O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O142 and O128ab.

The aims of this study were: a) to determine the prevalence of diarrhea by typical and atypical *E. coli* (EPEC) by applying molecular biology techniques in order to establish effective monitoring and control and to develop rational strategies in cases of outbreaks and nosocomial infections, and b) to contribute to the medical knowledge and health care service improvement by analyzing antimicrobial sensitivity in order to perform a rational use of medication and to avoid the misuse of the expense.

We studied 100 stool samples, 6 (6%) of which were positive for EPEC. Three of those were typical(3%) and 3 were atypical (3%) cases of EPEC.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Meneghello R, J. y col. Pediatría. Quinta edición. Año 1997. Tomo 2. Síndrome diarreico agudo. Capítulo 247. pag: 1537-1543.
- 2.- Mandell, Douglas y Bennet. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. Cuarta edición. Año 1997. Editorial Panamericana. Sección J. Infecciones gastrointestinales e Intoxicación alimentaria. pág:1051-1064.

- 3.- Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Mex 2002;44:464-475.
- 4.- Blanco J, Blanco M, Blanco J E, Mora A, Alonso M, Gonzalez E, Bernardez Hermida M. *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales. Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo.
- 5.- Sanchez S, Ropmecin P, Guachalla L, Iñiguez V. Caracterización genotípica de aislados de *Escherichia coli* (AEEC) de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos de la ciudad de La Paz: implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. Rev. Chil. Pediatr 2006; 77(4):412-427.
- 6.- Vidal J, Canizáles-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Publica Mex 2007;49(5):376-386.
- 7.- Medina M, Esquivel P, Lifschitz V, Medina M, Lösch S, Merino L. Detección de *Escherichia coli* diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. Rev Cubana Med Trop v.62 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2010. Versión Impresa ISSN 0375-0760.
- 8.- Paniagua Contreras G, Monroy Perez E, Vaca Pacheco S. Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas detectadas en infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex. Revista Médica del Hospital General de Mexico. Dic 2007; 70(4): 158-167.
- 9.- Sack R, Rahman M, Yunus M, Khan E. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. Clin. Infect. Dis. 1997; 24 (suppl I):S102-5.
- 10.- Rodas C, Habworsen K, Iñiguez V. Multiresistencia antimicrobiana asociada a integrones en enteropatógenos de la diarrea infantil y *Escherichia coli* de la flora normal en niños menores de 5 años en la ciudad de La Paz. Cuadernos del Hospital de Clínicas. 2005; 50(2):38-48.
- 11.- Sircili MP, Walters M, Trabulsi LR, Sperandio V. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. Infect Immun. 2004 Apr;72(4):2329-37.
- 12.- Kenny B. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. Int J Med Microbiol. 2002 Feb;291(6-7):469-77.
- 13.- Crane JK, Majumdar S, Pickhardt DF 3rd. Host cell death due to enteropathogenic *Escherichia coli* has features of apoptosis. Infect Immun. 1999 May;67(5):2575-84.
- 14.- Álvarez Martínez M, Buesa Gómez J, Castillo García J, Vila Estape J.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Procedimientos en Microbiología Clínica N° 30, 2ª ed. SEIMC; 2008 [Citado 20 Ago 2009]. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap30indice.htm>

15. Alikhani MY, Mirsalehian A, Aslani MM. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. J Med Microbiol. 2006;55(Pt9):1159-63.
- 16.- Varela G, Jasinkit C, Gadea P, Tanzi M, Mota M, Arenas C, y cols. Escherichia coli enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. Rev Med Urug 2007; 23: 153-163
- 17.- Prèrea S, Cohen Bacriea O, Barona O y cols. Bacterial aetiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups M.F. Pathologie Biologie 54 (2006) 600–602.



ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE OBESIDAD ABDOMINAL, INFLAMACION Y CANCER DE PROSTATA

Grosman Halina, Mesch Viviana, Fabre Bibiana, Lopez Miguel, Berg
Gabriela

Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas
“José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

La obesidad se ha transformado en uno de los mayores problemas de salud en los países occidentales. Íntimamente ligados a la obesidad se desarrollan distintos procesos crónicos entre los que se encuentran la enfermedad cardiovascular, el Síndrome Metabólico (SM), la diabetes y también algunos tipos de cáncer, principalmente los de naturaleza hormono-dependiente como el cáncer de mama y el de próstata (CaP).

El CaP es el segundo tumor de mayor prevalencia entre los varones occidentales mayores de 50 años, precediéndole el cáncer de piel. Asimismo, es también la tercera causa de muerte oncológica en el varón luego del cáncer de pulmón y de colon (1), dejando el segundo lugar que ocupaba a fines del siglo XX gracias al uso difundido del Antígeno Prostático Específico (PSA) como herramienta de *screening*, y a los tratamientos más efectivos en los tumores localizados. El uso del PSA (que sin ser un marcador tumoral, sino específico de la glándula prostática) tiene un insuperable valor desde la década del 80, permitiendo la detección más temprana y eficiente de esta patología, el que hasta ahora no ha podido ser superado por ningún otro marcador plasmático.

Se estima que un mayor conocimiento acerca de los factores que podrían facilitar la aparición del CaP haría reducir aún más el riesgo de su progresión y muerte. La obesidad sería una de las variables gravitantes en la aparición del CaP, conociéndose ya desde los años sesenta la relación entre mortalidad por cáncer y obesidad (2). En relación directa con la obesidad se encuentran factores exógenos como la dieta y endógenos como el metabolis-

mo lipídico. Existe literatura médica que correlaciona el consumo de grasa de origen animal con el CaP. Particularmente las grasas ricas en ácido araquidónico tendrían intervención en la proliferación de los tumores de próstata. Sin embargo los estudios con casos control, en cambio, no muestran evidencia contundente. Esto podría deberse a las diferentes características de las poblaciones estudiadas, y su relación genética y metabólica con la obesidad y el perfil lipoprotéico. Por su parte, la relación entre el metabolismo de las lipoproteínas y el CaP no se ha profundizado.

En el paciente obeso hay múltiples alteraciones hormonales que se podrían relacionar con el aumento de la incidencia del CaP, más aun en aquellos individuos con mayor Índice de Masa Corporal (IMC) se describe un mayor riesgo de cáncer de alto grado (3).

El análisis prospectivo más extenso llevado a cabo por la Sociedad Americana de Cáncer, registró que el 14% de las muertes por cáncer en hombres se atribuyen a la obesidad (4). Aún así, mientras algunos estudios encuentran relaciones positivas entre obesidad y CaP (5-7) otros no logran hallar esta correlación (8-10). Sin embargo, se describe una asociación entre el grado de obesidad, evaluada por el IMC y la severidad y progresión del proceso oncológico (11). Aún así, la evidencia epidemiológica que liga al CaP con la obesidad es inconclusa y controvertida.

Por otro lado, situaciones de IR/Hiperinsulinemia concomitante, subyacentes del Síndrome Metabólico (SM) y características de la obesidad, también se asocian al incremento del riesgo de CaP (12,13). Distintos podrían ser los factores responsables de esta asociación. Entre ellos, la mayor síntesis hepática y concentración plasmática de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1) libre (bioactivo), que estimula y regula la proliferación y diferenciación celular (14) se relacionó con mayor riesgo (15) y severidad (16) de CaP. Así mismo, en los estados de IR y obesidad abdominal se registra una mayor aromatización periférica de andrógenos a estrógenos en el tejido adiposo (17), con la consiguiente disminución relativa de andrógenos. Dada la naturaleza hormono-dependiente de este tipo de tumores, la relación andrógenos/estrógenos sería importante en el crecimiento prostático. Bajas concentraciones plasmáticas de testosterona se asocian con mayor severidad y menor diferenciación del tumor prostático (18,19). Sin embargo, para otros autores, la disminución de testosterona se asociaría con disminución en la progresión de la enfermedad. Es necesario profundizar el estudio del perfil hormonal en pacientes con CaP para esclarecer esta controversia.

En estudios previos, en el marco de un subsidio Roemmers (2006-2007), hemos observado en pacientes con CaP una disminución de adiponectina circulante. Así mismo, un incremento en los valores de PCR-hs, evaluada como marcador de inflamación, no llegó a ser significativo pero superó el límite deseable correspondiente a bajo riesgo, lo cual indicaría un mayor grado de inflamación en los pacientes con CaP, que podría asociarse con un tejido adiposo disfuncional. Por otra parte, los pacientes con CaP presentaron menores niveles de SHBG y aumento del índice triglicéridos/col-HDL en concordancia con mayor grado de insulino-resistencia, independientemente del índice de masa corporal. El mayor grado de inflamación e insulino-resistencia se asociaron con el incremento de PSA, independientemente del peso corporal. La evidencia actual indica que existe un nexo entre estos parámetros, sin embargo, es necesario evaluar otros que reflejen con mayor especificidad el comportamiento del tejido adiposo en los pacientes con CaP, así como su impacto directo sobre el tejido prostático.

En base a las consideraciones precedentes, el objetivo de este trabajo fue establecer las posibles asociaciones entre obesidad, insulino-resistencia e inflamación y la prevalencia de Cáncer de Próstata (CaP).

PACIENTES Y METODOS

Población estudiada

Entre el 11 y el 15 de mayo se llevó a cabo en el Hospital de Clínicas una campaña convocada para hombres, entre 50 y 70 años, de Detección Temprana de Cáncer de Próstata. Además del examen urológico se obtuvo una muestra de sangre de todos los individuos para determinar en forma totalmente gratuita el Antígeno Prostático Específico (PSA) y otros analitos que ayudarán al diagnóstico de Síndrome Metabólico e hipogonadismo. Los interesados (2906 varones) concurren en ayunas al entresque del Hospital de Clínicas, donde se les realizó una anamnesis detallada. Luego, eran acompañados hacia los boxes de extracción de sangre, donde además de obtener una muestra de sangre (para la evaluación del antígeno prostático específico, perfil lipídico y hormonal), fueron pesados y medidos por estudiantes de Bioquímica. Finalmente médicos del Servicio de Urología realizaron el examen digital rectal y la medida de la circunferencia de cintura y de tensión arterial de cada individuo.

Criterios de inclusión: varones con PSAt menor a 10,00 ng/ml y/o EDR sospechoso de cáncer, con edades comprendidas entre 50 y 65 años.

Criterios de exclusión: varones con valores de PSAt mayor o igual a 10,00 ng/ml y mayores a 65 años. Presencia de otras neoplasias, patología prostática previa y/o tratamiento hormonal, consumo de alcohol mayor de 20 g/día, tratamiento con hipolipemiantes.

Reparos éticos: todos Los varones participantes consintieron y fueron debidamente instruidos acerca de sus derechos como pacientes, así como acerca de la confidencialidad de los datos.

Muestras y Métodos

Para la toma de la muestra sanguínea los pacientes debieron concurrir con un mínimo de 12 horas de ayuno. A cada paciente se le extrajo 10 ml de sangre venosa en tubos con acelerador de la coagulación con aguja 21G x 1". La sangre fue centrifugada a 1600 rpm durante 15 minutos. Los sueros así separados fueron fraccionados en tubos Eppendorf rotulados y se confeccionó una seroteca conservada a -70°C con muestras de los 2906 individuos.

A todos los pacientes se les midió PSAt e insulina por enzimo-inmuno-ensayo de micro-partículas (MEIA), según indicaciones del proveedor (Abbott Laboratories, Chicago, USA) en autoanalizador IMX (Abbot Laboratories; Chicago USA). El coeficiente de variación (CV) para PSAt intra y entre-ensayos fue del 3,20 y 4,31% respectivamente. Glucosa, Colesterol (Col) total, col-HDL y triglicéridos (TG) se dosaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) en un autoanalizador Hitachi 917. Los CV intra e entre- ensayos fueron 1,1% y 2,2% respectivamente para Col y 1,3 y 2,4% respectivamente para TG. Se calcularon los índices Col-total/Col-HDL como indicador de riesgo cardiovascular y TG/Col-HDL como marcador secundario de insulino-resistencia (6).

En un subgrupo de 850 hombres menores de 65 años se midió:

-Testosterona total (To) y SHBG por quimioluminiscencia en autoanalizador Immulite (SIEMENS); To libre (TL) y biodisponible (TB) por método de cálculo, a partir de la medición de To y SHBG. Para completar la evaluación del estado hormonal se calculó el índice FAI $[(\text{To}/\text{SHBG}) \times 100]$.

En un subgrupo de 100 hombres menores de 65 años se midió:

-IGF-1, TNF- α , IL-1, IL-6 por quimioluminiscencia en autoanalizador Immulite (SIEMENS)

Control de calidad

Los laboratorios involucrados en este proyecto tienen implementado Control de Calidad Interno (controles CEFAS Roche y pools propios) para asegurar la reproducibilidad de sus resultados. El Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica está inscripto en los Programas de Control de Calidad Externo RIQAS (con trazabilidad al *Center for Disease Control and Prevention*) y Buenos Aires (CEMIC), para asegurar la exactitud de sus resultados. El citado Departamento está acreditado por la Fundación Bioquímica Argentina.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar ó desvío. Las correlaciones se calcularon utilizando el test de Pearson o Spearman, según correspondiere y las diferencias entre grupos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA de una vía o de Kruskal-Wallis, según el caso). La evaluación posterior de las diferencias se realizó mediante test de Bonferroni, Tukey o Dunn. Cuando se compararon solamente dos grupos (CaP y C) se utilizó test-t para muestras independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0.05$.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Al analizar los resultados de los 2906 pacientes se observó que el PSA se correlacionó en forma inversa con el BMI y con la circunferencia de cintura ($r = -0.117$, $p < 0.001$ y $r = -0.063$, $p < 0.001$ respectivamente). Este hallazgo es significativo y llamativo, y sostiene la teoría de que en situaciones de obesidad se produce una hemodilución del PSA y por lo tanto, se enmascara la detección del CaP. Muchos autores han desarrollado distintas fórmulas para corregir el valor de PSA según el BMI del paciente y de esa manera independizarse de la obesidad.

Asimismo, en un rastreo poblacional para la detección temprana de cáncer de próstata el valor límite establecido por consenso (con examen digital rectal normal) para realizar una biopsia prostática es de 2.50 ng/ml. Evaluamos el comportamiento de dos inmunoensayos quimioluminiscentes comercializados por la misma empresa para el dosaje del Antígeno Prostático Específico (PSA) Se procesaron 276 muestras, con valores de PSA $< 5,00$ ng/ml. Dicho marcador se midió por un método quimioluminiscente (Immulite

Siemens), CVe 4.4%, y otro de 3era generación de la misma empresa, CVe 3.8%. Para comparar ambos métodos se realizó el análisis de concordancia de Bland y Altman y la correlación de Sperman. En la tabla 2 se muestran los Bias y el coeficiente de correlación obtenidos al comparar ambos métodos.

Tabla 1. Coeficiente de correlación y Bias obtenidos para ambos métodos

Concentración PSA ng/ml	BIAS Immolute vs Immolute de 3ª	r Immolute vs Immolute de 3ª
<1.00 ng/ml	0.1163 (n=108)	0.9665
1.00-1.99 ng/ml	0.2587 (n=57)	0.7972
2.00-2.99 ng/ml	0.5908 (n=64)	0.7653
3.00-3.99 ng/ml	0.7523 (n=26)	0.5812
4.00-4.99 ng/ml	1.1195 (n=21)	0.5828
Análisis Total	0.6932 (n=276)	0.9778

El valor límite inferior por consenso (con examen digital rectal normal) para realizar una biopsia prostática al paciente es de 2.50 ng/ml y el Bias obtenido entre el método 1 y el método 2 en el rango entre 2.00 y 2.99 es de 0.5908 ng/ml, esto nos permitiría concluir que en caso de utilizar diferentes métodos el valor de corte debería ser modificado.

Por otra parte en el subgrupo de 850 muestras de pacientes entre 45 y 60 años evaluamos los cambios en las hormonas sexuales, a través de la medida de SHBG y perfil androgénico. La población se dividió según su peso corporal en individuos con normopeso (NP), sobrepeso (SP) y obesos (OP), y según la circunferencia de cintura (CC) en sujetos con (CC) ≤ 102 cm y >102 cm, presentando los OP un perfil androgénico alterado (tabla 2). Las diferencias fueron significativas aún después de corregir por edad.

Tabla 2: Perfil hormonal en hombres divididos por su índice de masa corporal (IMC) y circunferencia de cintura (CC)

	IMC			CC	
	NP (n=206)	SP (n=441)	OP (n=209)	≤ 102 cm (n=533)	>102 cm (n=323)
SHBG nmol/l	43 (1.1-158)	36 (2.1-124)	34 (2.5-153)*	42 (2.3-158)	37 (3-153) ∞
To ng/ml	5.0(2.0-12.6)	4.2(1.2-9.6)	3.7(1.7-8.6)*+	4.4(1.75-12.6)	3.8(1.7-10.7) ∞
TL pg/ml	75(5-245)	70(1-193)	66(5-247)**	78 (17-302)	74(26-247)£
TB ng/ml	1.9(0.6-5.6)	1.7(0.6-6.9)×	1.7(0.6-5.7)×	1.8 (0.6-6.9)	1.7 (0.6-5.7)α

ANOVA: * $\leq p < 0.001$ vs NP; + < 0.05 vs SP; ** < 0.01 vs NP; *** < 0.05 vs NP. Mann-Whitney: $\infty p < 0.001$, £ $p < 0.03$; α $p < 0.02$.

Las diferencias fueron significativas aun después de corregir por edad. IMC y CC correlacionaron en forma inversa con: SHBG ($r=-0.29$ en ambos casos), To ($r=-0.28$ y $r=-0.30$), TL ($r=-0.11$ y $r=-0.14$), TB ($r=-0.16$ y $r=-0.13$) $p<0.001$ en todos los casos.

Este estudio muestra que el perfil androgénico se deteriora a medida que aumentan el peso corporal y la distribución abdominal de la grasa.

Para poder interpretar adecuadamente los resultados que se obtengan en pacientes, es importante establecer los valores de referencia para cada población para el método que se utilizará y en las mismas condiciones en que se efectuarán los análisis. Para ello buscamos los valores de referencia de SHBG, TL y TB en una población de varones de 20 a 69 años divididos en diferentes rangos etareos. Se estudiaron 472 varones adultos divididos en rangos etareos de 20-69 años. Los resultados se muestran en la tabla 3

Tabla 3: Valores de SHBG, Testosterona Libre (TL) y Testosterona biodisponible (TB) en hombres divididos por edad.

Edad (años)	n	SHBG (nmol/l)	TL (pg/ml)	TB (ng/ml)
20-49	53	42.5 (18.2-158)	81.6 (59.5-199)	1.88(1.37-4.58)
50-59	253	41.3 (3.2-153)	86.1(34.6-247)	1.98 (0.80-5.7)
60-69	166	47.5 (2.3-158)	76.3(26.8-302)	1.76 (0.62-6.9)

Finalmente, se evaluó el desempeño de un método automatizado para la determinación de Testosterona en saliva (Tosal), en una población de hombres menores de 65 años. Se buscó correlacionar los valores de Tosal con las concentraciones séricas de Testosterona total (ToT), TB y TL.

La saliva es una muestra biológica que presenta ciertas ventajas en cuanto a que su obtención es sencilla, no invasiva, y no requiere de personal altamente capacitado para su extracción. La testosterona en la saliva (Tosal) representa la fracción libre del suero, es por eso que sus niveles son significativamente más bajos que los hallados en suero y por lo tanto se requiere un método de alta sensibilidad para su determinación. Se evaluaron 50 individuos, sexo masculino (edad 20-64 años). En todos ellos, se obtuvo una muestra de sangre y saliva a las 8 hs. En las muestras de saliva se determinó Tsal (pmol/L) mediante RIA adaptando un kit comercial para testosterona sérica (SIEMENS) y la misma muestra se midió por un método automatizado electroquimioluminiscente (EQL) (Elecsys-Roche). La testosterona total sérica (ToT) se determinó por el mismo método automatizado EQL (Elecsys-Roche). La Tob y la ToL se obtuvieron por cálculo a partir de la medición de

ToT y SHBG. La correlación entre parámetros se estableció utilizando el test de Spearman. La concordancia entre ambos métodos de determinación de Tsal se realizó mediante análisis de Bland y Altman.

La ToT, la ToL y Tob en los 50 individuos fue (mediana y rango) 4.3 (1.7-9.1) ng/ml; 75 (25.7-184) pg/ml y 1.7 (0.59-4.2) ng/ml, respectivamente. El valor de la Tosal medida por método EQL fue 372.7 (142-891.0) pmol/l y por RIA 332.7 (99.1-806.7) pmol/l (Figura 1).

En los 50 sujetos incluidos en este estudio la Tsal medida por método EQL y por RIA correlacionaron significativamente ($r=0,80$, $p<0,00001$) (Figura 2). La sensibilidad funcional para la Tosal por el método EQL fue de 142 pmol/l. En la población estudiada la Tosal medida por el método EQL correlacionó con la ToT, la Tob y la ToL ($r=0.78$; 0.71 y 0.70 respectivamente, $p<0.00001$). El BIAS obtenido cuando se comparó Elecsys vs RIA fue de 43.06 pmol/l.

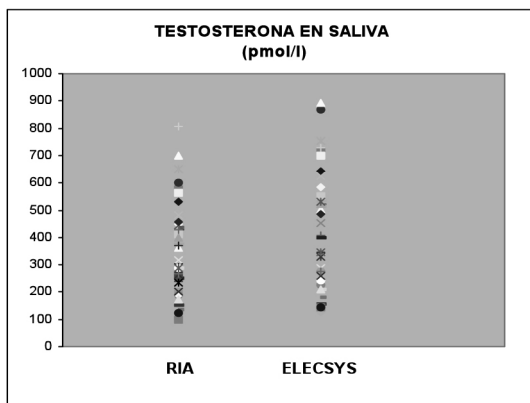


Figura 1. To en saliva en la población estudiada por Elecsys y RIA

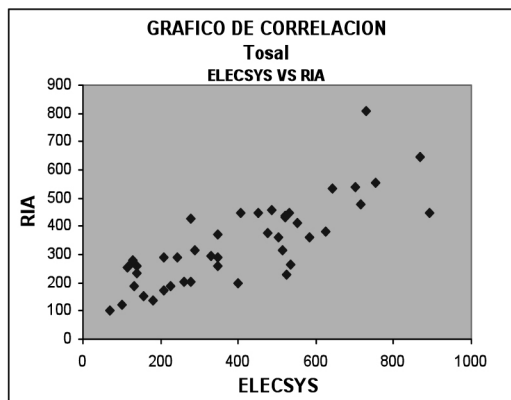


Figura 2. Correlación de Tosal medida por Elecsys y RIA

El método automatizado EQL Elecsys-Roche mostró un buen desempeño para el dosaje de testosterona en saliva como lo evidencian las correlaciones obtenidas tanto con el RIA modificado como con los valores de Tot y sus fracciones y a través de la concordancia hallada para ambas metodologías. La determinación de testosterona en saliva por el método descrito sería una herramienta útil en el estudio del perfil androgénico en hombres, recalcando la necesidad de que cada laboratorio defina sus valores de referencia.

Finalmente queda informar que parte de los resultados de los subsidios Roemmers 2006-2007 y 2008-2009 han sido aceptados para su publicación en la revista *The Aging Male*, y se encuentran actualmente en prensa:

Lipoproteins, sex hormones and inflammatory markers in association with prostate cancer. Grosman H, Fabre B, Mesch V, Lopez MA, Schreier L, Mazza O, Berg G. *Aging Male*. 2009 Nov 18. [Epub ahead of print].

Se adjunta prueba de galera del artículo, así como de todos los resúmenes presentados a distintos congresos.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J clin* 2003;53(1): 5-26.
2. Metropolitan Life Insurance Company. Overweight, its significance and prevention. New York: MLIC. 1960
3. Freedland JS, Terris MK, Platz EA, Priesti JC Jr. Body mass index as a predictor of prostate cancer; development versus detection on biopsy. *Urology* 2005;66:108-13
4. Calle E, Rodríguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348:1625-38.
5. Dal Maso L, Zucchetto A, La Vecchia C, Montella M, Conti E, Canzonieri V et al. Prostate cancer and body size at different ages: an Italian multi-centre case-control study. *Br J Cancer* 2004; 90: 2176-80.
6. Severson RK, Grove JS, Nomura AM, Stemmermann GN. Body mass and prostatic cancer: a prospective study. *BMJ* 1989; 297:713-5. G
7. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Total food consumption and body mass index in relation to prostate cancer risk: a case-control study in Sweden with prospectively collected exposure data. *J Urol* 1996; 155:969-74.
8. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willwt WC. Height, body weight, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:557-63.
9. Habel LA, Van Den Eeden SK, Friedman GD. Body size, age at shaving initiation, and prostate cancer in a large, multiracial cohort. *Prostate* 2000; 43:136-43.
10. Lee IM, Sesso HD, Paffenbarger RS Jr. A prospective cohort study of physical activity and body size in relation to prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*. 2001; 12:187-93.
11. Freedland SJ, Giovannucci E, Platz EA. Are findings from studies of obesity and prostate cancer really in conflict? *Cancer Causes Control*. 2006; 17:5-9.
12. Laukkanen J, Laaksonen D, Niskanen L, Pukkala E, Hakkarainen A, Salonen J. Metabolic síndrome and the risk of prostate cancer in Finnish men: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:1646-50.
13. Mistry T, Digby J, Desai K, Randeva H. Obesity and prostate cancer: a role for adipokines. *Eur Urol* 2007; 52:46-53.

14. Yu H, Ruhan T. Role of insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:1472-89.
15. Shaneyfelt T, Husein R, Bublely G, Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2000; 18:847-53.
16. Chan JM, Stampfer MJ, Ma J, Gann P, Graziano JM, Pollak M et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 1099-106.
17. Pasquali R, Casimirri F, De lasio R, Mesini P, Boschi S, Chierici R et al. Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:654-8.
18. Massengill JC, Sun L, Moul JW, Wu H, McLeod DG, Amling C et al. Pre-treatment total testosterone level predicts pathological stage in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 2003; 169:1670-5.
19. Schatzl G, Madersbacher S, Thurnidl T, Waldmüller J, Kramer G, Haitel A et al. High-grade prostate cancer is associated with low serum testosterone levels. *Prostate* 2001; 47:52-8



GEOHELMINTOS EN SUELOS Y HECES DE PERROS DE LA CIUDAD DE BAHÍA BLANCA: ESTUDIOS DE PREVALENCIA, VIABILIDAD Y TIPIFICACIÓN DE LARVAS DE *ANCYLOSTOMA* SP, E INCIDENCIA DE TOXOCAROSIS OCULAR Y LARVA *MIGRANS CUTÁNEA* EN LA POBLACIÓN EN RIESGO

Sixto Raúl Costamagna, Elena C. Visciarelli, Elisa Baillie y María L. Gertiser

Cátedra de Parasitología Clínica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670. (8000) BAHIA BLANCA, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Un diagnóstico de situación, sobre contaminación del medio ambiente por parásitos, relacionándolo con estudios de prevalencia en humanos, es, a nuestro criterio, muy importante para que los responsables de Salud Pública puedan implementar medidas preventivas pertinentes. Por este motivo, es que en el presente estudio investigamos la presencia de huevos de geohelminetos, en suelos y heces de perros en el medio ambiente de diferentes sectores de la ciudad de Bahía Blanca. Además, se relacionaron los hallazgos con resultados seroepidemiológicos sobre Toxocarosis en la población de BAHIA BLANCA, Provincia de Buenos Aires, Argentina. También se realizó un estudio prospectivo sobre queratitis y otras lesiones oculares, producidas por *Acanthamoeba* sp., *Toxocara* sp, y *Larva Currens Cutánea*.

Las Prevalencias de formas parasitarias, en heces de perro en barrios Napostá, San Roque y Villa Nocito (Bahía Blanca) fueron: 31,6%, 42% y 87% respectivamente (Prevalencia promedio: 53,53%), sobre un total de 336 muestras estudiadas. Se encontraron larvas de Nematodos en el 17,8% de las muestras de tierra estudiadas, con una viabilidad superior a los 400 días en el 31% de ellas.

Con referencia a la investigación de Amebas de vida Libre, detectamos *Acanthamoeba* sp. en el 71% de las piscinas cubiertas, en el 100% de muestras de agua del Arroyo Napostá, en el 28% de los tanques domiciliarios de agua para consumo y no fue detectada en agua de red directa. Los aislamientos correspondieron, a los Grupos II y III, según clasificación de Pussard & Pons.

Confirmamos un caso de queratitis acanthamoebiana, por aislamiento del protozoo (cultivo de biopsia de córnea) y uno por signos y síntomas clínicos.

Nuestros resultados, que se agregan a otros que este Grupo de Trabajo está realizando desde hace varios años, contribuye a conformar una base de datos epidemiológica referida a parásitos de importancia sanitaria en la Ciudad de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Habitualmente, cuando se habla de contaminación del Medio Ambiente, se hace referencia casi exclusivamente a la contaminación química, mientras que la contaminación que resulta de la interacción entre el hombre y sus mascotas (cada vez más exóticas) y otros contaminantes de origen parasitario, no son tenidos en cuenta.

En la ciudad de Bahía Blanca, existe una alta prevalencia de parásitos intestinales en niños y adultos residentes en áreas periféricas de la ciudad, especialmente las más cercanas a las zonas atravesadas por el arroyo Napostá (4, 5, 7, 8, 5, 19). Otros estudios han demostrado contaminación parasitaria en verduras de huertas de la ciudad, especialmente en las que se utiliza el agua del arroyo Napostá para el riego (20) al igual que en heces de perros halladas en la vía pública (1, 19). En todos los casos fueron encontrados huevos de *Toxocara* sp y *Ancylostoma* sp. Los parásitos más prevalentes hallados en heces de perros, presentes en la vía pública de un sector de Bahía Blanca (Argentina) fueron: *Ancylostoma* spp y *Trichuris vulpis* (81,6 % y 51,7% respectivamente). Por otra parte se encontró un 10,3% de muestras con huevos de *Toxocara canis*, estando el 33,3 % viables. El 11,1 % de los huevos de *T. vulpis* y el 64,8% de los de *Ancylostoma* spp. se encontraron larvados. También se detectaron huevos de *Capillaria* (2,2%) y *Taenia* sp (1,15%) y quistes de *Giardia* sp (1,15 %) y *Coccidios* (8,0 %) (1), lo que significa un importante riesgo ambiental. Además, sirven como información de referencia para la investigación de enfermedades tales como Toxocarosis, Larva Migrans Cutánea y otras, especialmente en los niños, para orientar la aplicación de medidas sanitarias correspondientes, ya que, uno de los factores que facilitan la transmisión de estas infecciones e infestaciones, son la presencia de heces de perros en la vía pública, la falta de desparasitación de los mismos y una adecuada información y toma de conciencia de lo que significa

la tenencia responsable de mascotas. La seroprevalencia encontrada por Costamagna y col (Trabajo sin publicar) indica que un 18,3% de la población de los sectores estudiados en Bahía Blanca, Argentina, tiene anticuerpos anti-*Toxocara*, detectables por test de ELISA.

Con referencia a las Amebas de Vida Libre, consultas efectuadas a nuestra Cátedra, demuestran un aparente aumento en la incidencia de queratitis producidas por estos protozoos, al igual que otras patologías oculares compatibles con Toxocarosis. Estudios preliminares efectuados en esta Cátedra de Parasitología Clínica, mostraron una prevalencia superior al 70% de *Acanthamoeba* en aguas recreacionales de uso público, en esta ciudad (9).

Consideramos que el estudio de la contaminación parasitaria en Bahía Blanca es de importancia regional, y a este diagnóstico de situación, referido a la contaminación del medio ambiente por parásitos, relacionándolo con estudios de prevalencia en humanos (donde pueden causar graves trastornos oculares en el caso de *Toxocara* sp., o queratitis que requerirán de transplantes de córnea producidas por AVL) los responsables de Salud Pública en la ciudad y región, podrán implementar medidas para la prevención de estas enfermedades.

Los objetivos del presente estudio, fueron: Investigar la presencia de huevos de geohelminthos en suelos y heces de perros en el medio ambiente de diferentes sectores de la ciudad de Bahía Blanca. Relacionar los hallazgos con los resultados seroepidemiológicos sobre Toxocarosis en la población de la ciudad de BAHIA BLANCA, Provincia de Buenos Aires, Argentina; y además, efectuar un estudio prospectivo sobre queratitis y otras lesiones oculares, producidas por *Acanthamoeba* sp., *Toxocara* spp, y *Larva Currens Cutánea* producida por *Ancylostoma* spp., en la ciudad de Bahía Blanca, Argentina y su prevalencia en el ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon tres sectores (Barrios) con características socioeconómicas, culturales e infraestructura de salud pública diferentes, donde se recolectaron todas las muestras de heces frescas de perros encontradas en la vía pública, las que se numeraron por sectores. Se recolectaron 1492 heces de perros encontradas en la vía pública: Villa Nocito (n: 647), Barrio Napostá (n: 745) y San Roque (n: 100). En el laboratorio, se seleccionaron 100 muestras de Villa Nocito, utilizando la tabla de números aleatorios, 136 del Barrio

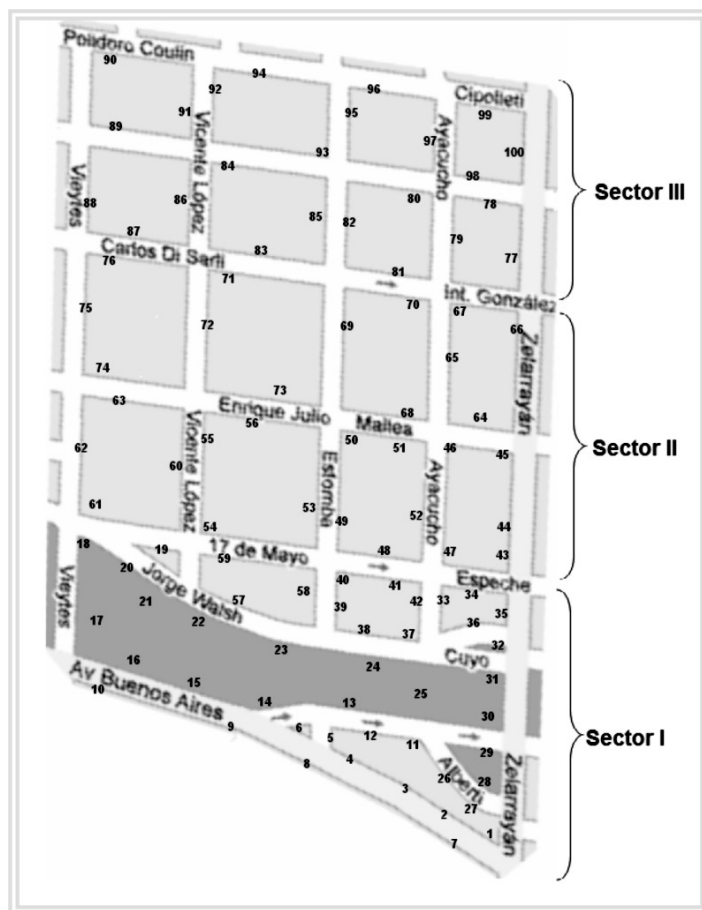


Figura2. Plano del barrio **San Roque** de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. Los números indican el sito de recolección de las muestras (heces de perro y tierra).

tween 80 + 500 ml de agua destilada) y 10 ml de agua destilada, se homogeneizó manualmente, y se centrifugó durante 3 min a 1500 rpm. El sedimento fue resuspendido con una solución de sulfato de zinc al 40%, para permitir la flotación de los elementos parasitarios, y se dejó reposar por 15 min. Transcurrido ese tiempo sobre el borde del tubo se colocó un portaobjeto y se llenó con solución de sulfato de zinc hasta hacer contacto con el tope del portaobjeto, y se dejó reposar 30 min. Se realizaron dos flotaciones por muestra y se observaron entre cubre y portaobjetos a 100 y 400 aumentos (12).

Se comenzó la puesta a punto de la técnica de PCR para lograr la identificación molecular de larvas de *Toxocara canis* en las muestras de tierra en las que se detectaron larvas de Nematodos. Estos primers amplifican una región interna (ITS-2) de ADN ribosomal de *Toxocara canis*:

Tcan (5'AGTATGATGGGCGCGCCAAT3') y
NC2 (5'TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT3') (13).

Para el estudio de **Amebas de Vida Libre** (AVL) se recolectaron muestras de agua de piscinas (públicas y privadas), de agua de red, y biopsias de retina (obtenidas en un Centro Oftalmológico privado, por Médicos Especialistas en Oftalmología) en la ciudad de Bahía Blanca, durante los años 2007/2009. El cultivo de las mismas se efectuó en agar no nutritivo con *Escherichia coli* durante 18 / 24 horas, en estufa de cultivo, a 37° C. Al tubo de cultivo de *E. coli* se le agregó solución de Page (16) y se realizó una emulsión. Se cubrió la superficie del agar con una película de la emulsión anteriormente preparada. Las muestras de agua recolectadas se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos. Se sembraron 100 microlitros del sedimento, en el centro de la placa y se incubaron a 37°C. Se revisaron las placas diariamente y si se observaba alguna imagen compatible morfológicamente con crecimiento de AVL, se efectuó el diagnóstico confirmatorio por microscopía óptica.

Identificación morfológica: El cultivo fue considerado positivo al observar trofozoítos y/o quistes de *Acanthamoeba* sp. Pruebas de exflagelación se realizaron para descartar *Naegleria* sp. (10, 15, 16). La revisión del cultivo fue realizada diariamente, y se descartaron recién a los 15 días en caso de no existir desarrollo.

RESULTADOS

Materia fecal canina y tierra

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras en los Barrios Villa Nocito, Napostá y San Roque, se muestran en las Tablas y gráficos siguientes:

Tabla I Prevalencia y número de especies de Huevos de Helmintos en heces de perro en barrios Napostá, San Roque y Villa Nocito (Bahía Blanca).

Barrio estudiado	Prevalencia de Huevos de Helmintos (sobre total de muestras)	Número de especies halladas (%)		
	%	UNA	DOS	TRES
Napostá	31.6	79.0	16.3	4.7
San Roque	42.0	69.0	28.6	2.4
Villa Nocito	87	79,0	18	3
Prevalencia promedio	53.53 %			

Gráfico 1. Distribución porcentual de elementos parasitarios en el Barrio Napostá.

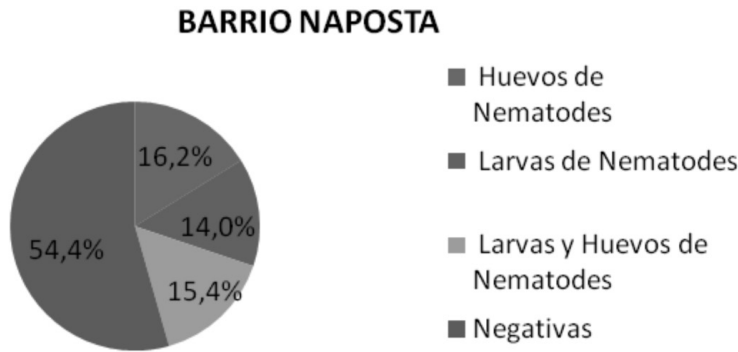


Tabla II. Prevalencia de parásitos en heces de perro en los barrios: Napostá, San Roque y Villa Nocito (Bahía Blanca).

Parásitos	Prevalencia (% sobre el total de muestras analizadas, excepto Villa Nocito donde los resultados se tomaron sobre las muestras positivas))		
	Napostá	San Roque	Villa Nocito
<i>Ancylostoma spp</i>	11.8	26.0	81.6
<i>Trichuris sp.</i>	17.6	24.0	51.7
<i>Toxocara sp.</i>	2.9	2.0	10.3
Familia <i>Ascarididae</i>	6.6	1.0	5.7
<i>Capillaria sp.</i>	0.7	0.0	2.2
Larvas Nematodes	39.4	13.0	52.9
Huevos de <i>Taenia sp.</i>	0.0	0.0	1.15
Quistes de Protozoos (Giardia, Amebas y Coccidios)	0.0	0.0	13.8

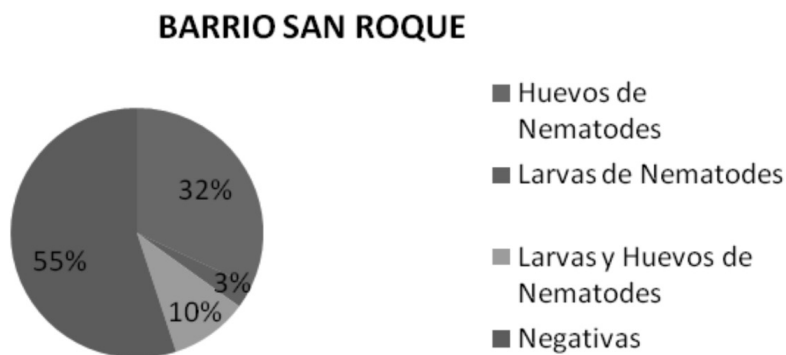
Gráfico 2. Distribución porcentual de elementos parasitarios en el barrio San Roque.

Tabla III. Porcentaje de heces de perro parasitadas en Barrio Napostá, Bahía Blanca, Argentina, 2009, por sector estudiado.

Área de recolección	N	N positivas	%
Sector I	67	27	40,6
Sector II	43	22	51,1
Sector III	26	13	50,0
Total	N: 136	62	45,6%

Tabla IV. Porcentaje de heces de perro parasitadas en Barrio San Roque, Bahía Blanca, Argentina, 2009/10, por sector estudiado.

Área de recolección	N	N positivas	%
Sector I	45	21	46.7
Sector II	31	13	42.0
Sector III	24	11	45.8
Total	N: 100	45	45.0%

Tabla V. Porcentaje de heces perros parasitadas en Villa Nocito, Bahía Blanca, Argentina, 2006, por sector estudiado.

Área de recolección	N	N positivas	%
Sector I	10	10	100
Sector II	10	10	100
Sector III	10	9	90
Sector IV	10	8	80
Sector V	10	9	90
Sector VI	10	7	70
Sector VII	10	8	80
Sector VIII	10	8	80
Sector IX	10	9	90
Sector X	10	9	90
Total	N: 100	87	87 %

De 100 **muestras de suelo** recolectadas se analizaron 30, de las cuales 7 fueron positivas. En todos los casos la positividad se debió a la presencia de Larvas de Nematodos. La tabla presenta los resultados obtenidos en las muestras de suelo y de materia fecal canina recolectadas en el mismo sitio.

Tabla VI. Prevalencia de elementos parasitarios en muestras de heces de perro y tierra (N: 30) obtenidas en los mismos barrios y sitios de recolección de heces. Promedios.

	Positivas	Negativas	Prevalencia de elementos parasitarios (sobre 30 muestras estudiadas)
Heces de perro	14 %	16 %	46.6%
Tierra	7 %	23 %	23.3%

Con referencia a la **vabilidad de las larvas de Nematodos**, presentes en las muestras de tierra analizadas (N: 30), el 31% de las larvas halladas, permanecieron vivas por más de 400 días. Se tomaron 10 muestras de tierra de cada sector, seleccionadas aleatoriamente (del total de las recolectadas), pero de sectores con heces caninas positivas.

Respecto de la puesta a punto de la técnica de PCR para lograr la identificación molecular de larvas de *Toxocara canis* en las muestras de tierra en las que se detectaron larvas de Nematodos, aún no hemos logrado resultados confiables y continuamos con el trabajo.

La investigación, retrospectiva, referida a casos de Larva Currens, arrojó resultados negativos, aunque podrían deberse a que los pacientes no consultaron al Médico, o a que fueron diagnosticados y tratados pero sin documentar el caso en la ficha correspondiente.

Investigación de *Amebas de Vida Libre*

En Piscinas cubiertas: En 5 de 7 piscinas estudiadas, aislamos *Acanthamoeba* sp. en el 71% de las mismas, al menos, en una época del año.

Arroyo Napostá: el 100% de las muestras fueron positivas para *Acanthamoeba* sp., en todas las estaciones.

Agua de consumo: aislamos *Acanthamoeba* sp. en el 28,6% de tanques domiciliarios de agua de consumo, pero en las muestras tomadas de grifos conectados en forma directa a la red de distribución de agua potable, sin pasar por el tanque intermediario, no se aisló el protozoo en ningún caso.

Los aislamientos correspondieron, según clasificación de Pussard & Pons, (17) a:

Piscinas: 15 aislamientos pertenecientes al Grupo II y 7 al Grupo III.

Aguas del Arroyo Napostá: 2 cepas del Grupo II y 7 del Grupo III.

Tanques domiciliarios, 2 muestras al Grupo II y otras 2 al Grupo III.

Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: un caso confirmado por aislamiento del protozoo por nosotros (cultivo de biopsia de córnea) y uno por signos y síntomas clínicos (9, 11).

CONCLUSIONES

Las prevalencias globales de elementos parasitarios en heces de perro en dos de los barrios estudiados fueron similares (45.6% en el barrio Napostá y 45.0% en el barrio San Roque) mientras que en Villa Nocito fue superior (87 %). Esta diferencia podría estar relacionada con un menor control veterinario de los perros de ese sector, debido a las diferencias socioeconómicas, de salud pública y donde las calles son de tierra. En las tablas presentadas se puede ver que todos los barrios estudiados estaban parasitados.

Un alto porcentaje (39.0%) de las muestras de materia fecal canina del barrio Napostá presentaron larvas de Nematodos y al no haber podido determinar las especies de las larvas, queda el interrogante acerca de su potencial peligrosidad. Precisamente el barrio Napostá es el que se encuentra más cercano al arroyo Napostá y cuenta por lo tanto con un terreno más húmedo que el barrio San Roque y Villa Nocito.

La prevalencia de huevos de *Ancylostoma* spp fue, en promedio, la más elevada, siendo mayor en el barrio más carenciado: Villa Nocito. Es pertinente recordar que esta zoonosis produce el síndrome llamado Larva Migrans Cutánea, provocando reacciones inflamatorias y alérgicas, e infecciones bacterianas secundarias (14).

El porcentaje de heces que presentaron huevos de *Toxocara* sp concuerda con lo publicado por distintos autores que señalan frecuencias de infestación por este parásito entre 2% y 100% en distintas partes del mundo (2, 3). También se debe considerar que en los perros adultos la larva de *Toxocara canis* se disemina en tejido somático deteniendo su desarrollo, en lugar de migrar al intestino como ocurre en los perros jóvenes quienes eliminan gran cantidad de huevos con las heces. La presencia de perros adultos y la

ausencia de cachorros, observada en los barrios estudiados, concuerda con la baja prevalencia de huevos de *Toxocara* sp determinada por los autores: 18,3 % (trabajo sin publicar).

En la tabla VI, podemos ver que la contaminación del suelo, con elementos parasitarios, se detectó en el 53.3 % de las muestras donde las heces fueron positivas. En ningún caso se observó contaminación del suelo y heces sin elementos parasitarios, recogidas en el mismo sitio, lo que indicaría que la siembra indiscriminada de deposiciones caninas en la vía pública y su viabilidad durante prolongado periodo de tiempo, serían factores importantes en la contaminación del suelo con formas parasitarias de importancia sanitaria.

El diagnóstico de la situación ecoepidemiológica, referido a la contaminación del medio ambiente por parásitos de importancia zoonótica, realizado en el presente trabajo de investigación permitirá a los responsables de Salud Pública, en la ciudad y en la región, adoptar las medidas pertinentes para la prevención y control de las enfermedades, tales como Larva Migrans Visceral y Larva Migrans Cutánea (*Currens*) (9), provocadas por estos microorganismos, y problemas derivados de la alta prevalencia de *Acanthamoeba* en el ambiente, lo que sumado a que la ciudad de Bahía Blanca presenta un clima ventoso, es un microorganismo a tener muy en cuenta, especialmente en usuarios de lentes de contacto y en la consulta oftalmológica..

Agradecimientos: A la Fundación “Alberto J. Roemmers” por financiar el presente estudio.

SUMMARY

A situation analysis from environmental pollution by parasites, related with studies of prevalence of parasitosis in humans is, in our opinion, very important for what Public health officials can implement preventive measures relevant. For this reason, is that in our study investigated the presence helminthes eggs in soil and feces dog in the environment different sites of the city of Bahía Blanca. Findings also were associated with seroepidemiologic toxocarosis results found in population Bahía Blanca, Province Buenos Aires, Argentina. Also was performed a prospective study on keratitis and other eye damage, produced by *Acanthamoeba* sp., *Toxocara* sp., and *Larva Currens*. The Prevalence of parasites, in dog feces of Napostá neighborhoods, San Roque and Villa Nocito (Bahía Blanca) were: 31.6%, 42% and 87% respectively (Mean prevalence:

53.53%) on a total of 336 samples. It Nematode larvae found in 17.8% of soil samples studied, with a viability exceeding 400 days in 31% of them.

With reference to research Free-living amoebae, we found *Acanthamoeba* sp. in 71% of the pools covered, in 100% of water samples the Napostá Arroyo, in 28% of water tanks for household consumption and was not detected in tap water directly. The isolates corresponded to the Groups II and III, according to classification Pussard & Pons. We confirmed a case of keratitis acanthamoebiana, by isolation of protozoa (corneal biopsy culture) and for signs and symptoms clinics.

Our results are added to others studies that this Working Group is conducting for several years, to form an epidemiological database relating to parasites of public health importance in the City Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baillie E, Argañín L y Costamagna SR. Contaminación de la vía pública con parásitos de importancia zoonótica, en un sector de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev AMBB*. 2007; 17(2): 29-33.
2. Castillo Y, Bazán H Alvarado D y Sáez G. Estudio epidemiológico de *Toxocara canis* en parques recreacionales del distrito de San Juan de Lurigancho, Lima – Perú. *Parasitol al Día*. 2001; 25 (3-4):76-80.
3. Córdoba A, Ciarmela M, Pesan B, Gamboa I, de Luca M, Minvielle M y Basualdo J. Presencia de parásitos intestinales en paseos públicos urbanos en La Plata, Argentina. *Parasitol Latinoam*. 2002; 57 (1-2):25-29.
4. Costamagna SR, García S, Gutiérrez M, Visciarelli E, Torno Cafasso O, Prat MI. Investigación de entero y ectoparasitosis en el área periférica de Bahía Blanca (Argentina). *Rev AMBB*. 1991; 2:21-27.
5. Costamagna SR, García S, Visciarelli E y Casas N. Epidemiología de las parasitosis en la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). *Parasitología Latinoamericana*. 2002; 57(3-4):103-110.
6. Costamagna SR, Gertiser M, Visciarelli, Basabe N, y Felice V. *Acanthamoeba* spp.: ecoepidemiología, biología, ultraestructura, patogénesis y diagnóstico en el hombre. “*Salud (i) Ciencia*”. 2010; 17(8):821-826.
7. Costamagna SR, López J, Torno Cafasso O, Visciarelli E, Sagua M, Dasso P. Investigación de enteroparasitosis en área periférica de Bahía Blanca (República Argentina). Parte I. *Rev AMBB*. 1988; 7:13-16.

8. Costamagna SR, Visciarelli E, Lucchi L y Basualdo J. Investigación de parásitos de importancia sanitaria en aguas del arroyo Napostá, aguas de recreación y de consumo en la ciudad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Parasitol Latinoam.* 2005; 60(3-4):122-126.
9. Costamagna SR. Larva Migrans Visceral. En: *PARASITOSIS REGIONALES*. Editor: Costamagna SR. Y Visciarelli E. Editorial: EdiUNS. Bahía Blanca, Argentina. 2008, pp. 435.
10. Dunand VA, Hammer SM, Rossi R, Poulin M, Albrecht MA, Doweiko JP, et al. Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 267-272.
11. Gertiser ML, Giagante E, Sgattoni E, Basabe N, Rivero F, Lujan H, Occhionero M, Paniccia L, Visciarelli E and CostamagnaSR. Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular, en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología.* 2010. 42(2):122-125.
12. Hornn K, Schneider T, Stoye M. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. *J Vet Med B.* 1990; 37: 241-50.
13. Jacobs DE, Zhu X, Gasser RB and Chilton NB. PCR-based method for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Trópica.* 1997;68: 191-200.
14. Kim T, Lee B and Sohn W. Three clinical cases of cutaneous larva migrans. *Korean J Parasitol.* 2006; 44(2):145-149.
15. Molet B, Kremer M. Techniques d'études et criteres morphologiques pour l'identification des amibes libres. *Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon.* 1976; 78: 215-24.
16. Page WC. An ilustrated key to freshwater and soild amoebae, with notes on cultivation and ecology. *Fresh Boil Ass Sci Publ.* 1976; 34: 1-155
17. Pussard M, Pons R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica.* 1977; 13: 557-610.
18. Randazzo, V y Costamagna SR. Coloración de azul de metileno como alternativa para determinar viabilidad de larvas libres de *Trichinella spiralis*. *Revista Argentina de Microbiología.* 2010; 42(2): 95-97.
19. Torno Cafasso O, García S, Prat M, Santamaría B. Enteroparásitos del perro en un sector de Bahía Blanca, Argentina. *Parasitol Al Día.* 1996; 20:144-146.

-
20. Visciarelli E, García S, Costamagna SR, Torno Cafasso O y Santamaría B. Contaminación parasitaria en Bahía Blanca. Ier Congreso de la Salud de Bahía Blanca. 2 al 5 de octubre de 2000. *Rev AMBB* Vol. 10 Supl. 1:65.

PREVENCIÓN EN DIABETES TIPO 1

Dr. Juan C. Cresto

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET), Endocrinología,
Htal. De Niños R. Gutierrez.

INTRODUCCIÓN

Para llevar a cabo una prevención en diabetes tipo I, es necesaria la selección de los pacientes en riesgo inminente de enfermedad. Si bien es posible trabajar sobre una población de riesgo potencial pero sin riesgo inmediato, para la obtención de resultados confiables en un plazo razonable es conveniente la selección de una población de “alto riesgo”. La selección de esta población es el paso indispensable para cualquier conducta de prevención futura y la homogeneidad de esta selección es la única garantía para una evaluación correcta de los resultados del tratamiento.

Se ha demostrado que hermanos de niños con diabetes tipo I tienen entre el 6-10% de riesgo potencial de enfermar. El hallazgo de marcadores inmunológicos que indican riesgo de enfermedad reduce el porcentaje de riesgo potencial pero incrementan el valor estadístico de enfermar. Además, si los familiares en primer grado, sanos, de un paciente con diabetes tipo I comparten con éste la base genética predisponente (sobre todo los alelos HLA DQB1 *0302/*0201 de alta susceptibilidad) aumenta en ellos el riesgo de diabetes. Finalmente, cuando a los marcadores inmunológicos y a los genotipos de susceptibilidad se asocia la caída del primer pico de secreción de insulina y de la pendiente de desaparición de la glucosa (K_9) esta posibilidad se transforma en muy elevada.

Mecanismos de acetil-L-carnitina y nicotinamida en la inhibición de apoptosis

Uno de los mecanismos conocidos “in vitro e in vivo” de inhibición de la apoptosis es el aporte exógeno de L-carnitina (1, 2), acetil-L-carnitina (3) y nicotinamida (4, 5).

Se ha postulado que el grado de inhibición de la enzima carnitina-pal-

mitoil-transferasa I (CPT-I) es uno de los mecanismos mitocondriales que llevarían a la apoptosis, sin embargo los estudios actuales sugieren que la apoptosis es más dependiente del ácido graso transportado que del nivel de activación de CPT-I. La palmitoil-carnitina favorece la apoptosis cuando esta se encuentra en desarrollo, pero en ausencia de apoptosis no la induce (6). El palmitato inhibe CPT-I, induce la acumulación de ceramida e inhibe el transporte de electrones induciendo la liberación de citocromo-c (7). Una posible interpretación del mecanismo de acil-carnitinas en la inhibición de apoptosis y su contraste con palmitoil-carnitina que facilita la apoptosis, podría estar referido a la competencia que ejerce el palmitato y especialmente el palmitoil-CoA sobre las acetiltransferasas mitocondriales (8) con incremento de palmitato en el interior mitocondrial. Por otra parte el palmitoil-CoA es el paso limitante para la síntesis de ceramida y su incremento puede contribuir a un aumento de ceramida.

Las acil-carnitinas activan a CPT-I (8). La L-carnitina y las acil-carnitinas protegen el desarrollo de apoptosis inducida por "dead receptors" como CD95 (también conocido como Fas o Apo1) mientras que la palmitoil-carnitina la incrementa (6). La carnitina "in vivo" incrementa la producción de IGF-I, que es antiapoptótica (9). En la membrana interna mitocondrial L-carnitina interactúa con la cardiolipina estabilizando la estructura de la membrana y protegiendo la función mitocondrial (10). La carnitina, una vez ingresada a la matriz mitocondrial sirve como transportador de residuos metabólicos hacia el exterior (acetil-carnitina, propionil-carnitina, malonil-carnitina, etc y diferentes xenobioticos) facilitando la desintoxicación mitocondrial (10). La actividad antiapoptótica de la carnitina se demuestra en su capacidad de prevenir la formación de ceramida y regular la actividad de las caspasas (8 iniciadora de apoptosis y 9 que continúa la cadena de activación) (11). El desarrollo molecular de este mecanismo anti-apoptótico de la L-carnitina no es conocido.

En hepatocitos aislados el aporte exógeno de L-carnitina no incrementa la b-oxidación aunque aumenta la disponibilidad de acil-carnitinas intramitocondriales (8), sugiriendo que con una disponibilidad normal de carnitina la b-oxidación se produce a su máxima velocidad. También se ha observado que acil-carnitinas de origen peroxisomal pasan a la mitocondria por difusión, sin la activación previa con CPT-1 (12) aunque su significación metabólica no está cuantificada.

Por otra parte se demostró que el aporte permanente de dosis elevadas de carnitina disminuye el contenido graso de los tejidos y aumenta el contenido proteico. En este modelo experimental realizado en salmones, se

demostró que la síntesis de aminoácidos a partir de los carbonos del ciclo de Krebs está incrementado, la degradación de aminoácidos ramificados está disminuída y el flujo metabólico de la piruvato carboxilasa (PC) está sumamente aumentado para poder aportar oxalacetato. En condiciones normales de ingesta el aumento de oxalacetato lleva a un incremento de citrato con activación de la acetil-CoA-carboxilasa (ACC) y secundariamente de malonil-CoA e inhibición de CPT-1 y del ingreso de ácidos grasos a la mitocondria para la β -oxidación, pero eso no ocurre en este modelo experimental con aporte elevado de carnitina (13).

En este modelo, el aporte de carnitina incrementa el transporte y la β -oxidación de los ácidos grasos con un aumento del 73% en la oxidación del palmitato, un aumento del 81% en el flujo a través de la PC (por aumento de la síntesis de la enzima) y probablemente una disminución de la actividad de la 2-oxoacido deshidrogenasa de aminoácidos ramificados (BCKAD). Hay un aumento de los aminoácidos ramificados y de la síntesis de aminoácidos (entre 7 y 112% dependiendo de los aminoácidos considerados). El aumento del flujo de la PC con aumento del oxalacetato, aumenta la gluconeogénesis entre 120 y 210%. La disponibilidad de un "pool" de aminoácidos esenciales y no esenciales facilita el aumento de la síntesis proteica (entre un 20 y 60%) (13). En las condiciones descriptas no se observa el mecanismo de retro-inhibición por incremento de citrato y malonil-CoA, porque:

El "pool" de acetil-CoA no aumenta porque está en equilibrio con su consumo.

La relación ATP/ADP no se modifica porque el consumo de acetil-CoA es hacia la síntesis de aminoácidos "de novo".

No hay incremento de citrato que permanece en equilibrio al igual que el acetil-CoA. Por lo tanto no hay aumento de la actividad de la acetil-CoA-carboxilasa.

El consumo de grasa no se detiene porque no hay aumento de malonil-CoA.

La actividad metabólica es similar al modelo de "knock out" de la isoenzima mitocondrial de la acetil-CoA-carboxilasa (14).

Por lo tanto se puede postular que un aporte incrementado de L-carnitina produce un mayor consumo de grasa en forma de energía y un mayor anabolismo a partir de piruvato. El pez tratado presenta mayor contenido proteico y menor masa grasa que el no tratado, con una cantidad significativamente mayor de aminoácidos ramificados en tejidos y sangre (13). Esto último coincide con el hiperinsulinismo primario experimental o en pacientes, donde el

aumento de la lipogénesis se acompaña de un aumento en la masa corporal por el mayor depósito de grasas y proteínas, asociado a un aumento de los aminoácidos ramificados en plasma (15). El mecanismo propuesto para esta respuesta es la activación de la glucólisis inducida por la insulina para una mayor disponibilidad de ADP (shunt de la hexoquinasa) (16) y piruvato en la matriz mitocondrial, un mayor aporte de oxalacetato, una mayor velocidad oxidativa en el ciclo de Krebs con un incremento en la síntesis proteica (16) y una disminución en la degradación de los aminoácidos ramificados por inhibición del complejo cetoadido-deshidrogenasa. Tanto la insulina como la palmitoil-carnitina inhiben este complejo aumentando la disponibilidad de los aminoácidos ramificados (17, 18).

La acetil-L-carnitina posee similar comportamiento antiapoptótico que la L-carnitina, aunque sus efectos son menos intensos. Como la L-carnitina incrementa la síntesis proteica y disminuye los depósitos de grasa al incrementar la β -oxidación de los ácidos grasos, aumenta la producción de ATP y reduce la resistencia a la leptina en los animales viejos (5). Además disminuye la apoptosis, como ha sido demostrado en cultivos de "Jurkat cells" (6) y de células neuronales (19). El incremento en la producción de ATP es rápida porque la acetil-L-carnitina entra directamente a la mitocondria donde participa del "pool" de acetil-CoA y se consume en el ciclo tricarboxílico (20). La acetil-L-carnitina tiene efectos directos a nivel del sistema nervioso central en la recuperación de la membrana celular y sináptica, en la síntesis de glutamato como asimismo en el control de proteínas por acetilación de grupos NH_2 u OH- en aminoácidos como lisina, serina, treonina o tirosina (21).

Otro mecanismo de inhibición de apoptosis está dado por el aporte de nicotinamida, que al aportar NAD^+ inhibiría la activación de las caspasas 3 y 9 manteniendo la estabilidad de Vdac (4). En el endotelio vascular la nicotinamida no solo mantiene el potencial de la membrana mitocondrial previniendo la liberación de citocromo-c sino que previene la inducción de la caspasa 8, 1 y 3 (22). La nicotinamida inhibe al gen de la poli-(ADP-ribosil)-polimerasa (PARP) que es un generador de necrosis celular (5). Su activación se produce por el clivaje proteolítico producido por una proteína de bajo peso (cisteína-proteína-32-simil proteasa)(CPP) llamada apoptain. La activación de PARP también se logra por la proteólisis inducida por la interleukina-1 β - α -simil-enzima-convertidora. Dicha enzima α ha sido descrita como iniciadora de apoptosis en la diabetes tipo I (23). El PARP reconstruye el ADN alterado y para funcionar requiere de una disponibilidad normal de NAD^+ . Cuando el NAD^+ disminuye el PARP se activa en forma irreversible, consumiendo ATP

hasta producir la necrosis celular. La nicotinamida basaría su respuesta anti-apoptosis y anti-necrosis no solamente en su capacidad de inhibir a la enzima PARP sino en su potencial para ser sustrato en la síntesis de NAD⁺.

Objetivos del aporte de acetil-L-carnitina y nicotinamida

En el caso de una respuesta celular de autoagresión con producción de óxido nítrico como ha sido demostrado en la diabetes autoinmune (24, 25) (pro-apoptótica al inducir ROS por incremento del óxido nítrico) el aporte de acetil-L-carnitina y nicotinamida podrían actuar disminuyendo la respuesta apoptótica, favoreciendo y dando tiempo para la regeneración celular. Además la carnitina mejora el depósito de glucosa en los diabéticos (26). Este razonamiento es aplicable a la prediabetes autoinmune, demostrada en su evolución por la determinación de autoinmunidad y la caída del primer pico de secreción de insulina.

En la etapa de prediabetes los efectos del tratamiento propuesto no deben diferir de lo observado en los estudios metabólicos mencionados anteriormente. En la célula beta pancreática, su recuperación estaría favorecida por el incremento de los aminoácidos ramificados, puesto que ha sido demostrado que un aumento de los mismos en la dieta favorece su regeneración (27). La acetil-L-carnitina, posee la ventaja sobre la L-carnitina de que no requiere activación previa para ser transportada a la mitocondria donde aumenta el pool de acetil-CoA y de carnitina al ceder el grupo acetilo. La acetil-L-carnitina solo puede transportar palmitato (pro-apoptótico) en un segundo pasaje mitocondrial y de acuerdo a la disponibilidad de sustratos.

A su vez, la nicotinamida al actuar sobre otra parte de la cadena de apoptosis y necrosis celular es complementaria de las acciones de la acetil-L-carnitina. Pero como precursor de NADH tiene importantes efectos en la velocidad del ciclo tricarboxílico, en la producción de ATP y en la capacidad de producir glutamato incrementando los niveles de oxalacetato.

Demostración experimental del aporte combinado de acetil-L-carnitina y nicotinamida

En un trabajo de diabetes autoinmune desarrollado en ratones de la cepa C57BL/6J con múltiples subdosis de estreptozotocin, la asociación de 50 mg/Kg de acetil-L-carnitina y 25 mg/Kg de nicotinamida revirtió los valores metabólicos de la diabetes, normalizó la concentración de la insulina en plasma y disminuyó la agresión inmune (**Cresto y cols, Páncreas 33: 403-411, 2006**).

La importancia de este trabajo consiste en que el tratamiento es la administración de suplementos nutricionales que carecen de toxicidad.

OBJETIVOS

Normalizar la evolución metabólica de los niños seleccionados con el fin de prevenir su posible evolución hacia la Diabetes Tipo 1.

Debido a que los individuos estudiados son niños y el desarrollo de Diabetes Clínica no tiene retorno puesto que no se conoce un tratamiento efectivo, se pondrá un parámetro de control evolutivo que permita el pase de los niños no tratados al grupo tratado para frenar su evolución.

Estudios a realizar en los niños seleccionados

- En los pacientes previamente seleccionados, se evaluará el primer pico de secreción de insulina (1 + 3) luego de una prueba de tolerancia endovenosa a la glucosa (PTEVG). Se tomarán aquellos pacientes con un primer pico por debajo del percentilo 3 (48 μ U de insulina de una población normal). En ellos se determinará cada 4 meses si este primer pico cae en forma progresiva a partir de la determinación inicial. Este período de estudio no puede considerarse en forma rígida debido a que la enfermedad puede evolucionar rápidamente. En aquellos niños en donde se sospeche una evolución rápida los estudios podrán ser realizados en forma más próxima.

El primer pico es tomado por todos los autores como el parámetro que define la pérdida de sensibilidad a la glucosa y es la señal de "alto riesgo" de evolución hacia la diabetes. Nosotros mantendremos el valor del primer pico como parámetro de selección de los pacientes al igual que todas las publicaciones internacionales.

- La pendiente de desaparición de la glucosa (K_9 : descenso de la glucosa en mg/min) deberá ser menor de 1.40 (percentilo 10) y se controlará su evolución cada 4 meses para determinar si continúa descendiendo. Para ello se representará en forma logarítmica el valor de glucemia durante la prueba y se valorará la pendiente de la correlación lineal. No se substituirá el valor basal a las glucemias post-estímulo.
- Se empleará la fórmula **logⁿ (área de insulina) x Kg** como expresión de la actividad de la insulina. Esto es, la respuesta de la glucemia que induce la cantidad de insulina secretada durante la prueba de tolerancia EV

a la glucosa (una expresión funcional). Se considera que un valor menor de 15 implica “riesgo” en la evolución hacia una Diabetes Clínica.

- Al efectuar la PTEVG se tomará sangre para determinación de carnitina plasmática como forma de evaluación de riesgo metabólico.
- Se determinará la hemoglobina glucosilada para conocer hiperglucemias subyacentes y su seguimiento.

Diseño estadístico

Hemos realizado algunas modificaciones que son el resultado de la experiencia en el tratamiento de los niños que se fueron incorporando y la necesidad de no incurrir en la espera de la evolución que conlleva el riesgo de la aparición de una diabetes clínica.

El trabajo pretende demostrar que el tratamiento normaliza la evolución metabólica y posterga el desarrollo de la enfermedad (no evita la respuesta inmune). Los niños son tratados con **nicotinamida** (25 mg/Kg/día) y **acetil-L-carnitina** (50 mg/Kg/día) y el estudio es abierto porque los pacientes y el médico tratante conocen el tratamiento instituido.

En la diabetes autoinmune, considerada una enfermedad evolutiva crónica con posibles períodos de mejoría o retroceso (como otras enfermedades crónicas autoinmunes, ej: artritis reumatoidea) es posible el diagnóstico definitivo (clínicamente establecido) con una observación prolongada.

En las enfermedades autoinmunes la presencia de anticuerpos es un elemento diagnóstico, pero no representa déficit hormonal hasta que pruebas funcionales no demuestren un déficit de respuesta ante un estímulo adecuado.

Diversos estudios han demostrado que en las formas con “alto riesgo” el 50% evolucionan en 5 años hacia la diabetes. Los dos estudios más contundentes en sus estimaciones sobre diabetes tipo 1 en una población con consanguinidad directa, (hijos, hermanos y primos hermanos de diabéticos tipo 1) son el DPT1 y el ENDIT (**Diabetes Care 31: 146-150, 2008** y **J. Pediatr 150 (1): 31-36, 2007**). Ambos son el análisis posterior de los tratamientos con nicotinamida e insulina oral emprendidos varios años antes. En estos estudios se considera de “alto riesgo” una PTEVG que muestre un primer pico de secreción de insulina disminuído, ubicado dentro del primer cuartil, o una PTOG cuyo valor de glucemia se encuentre por arriba del cuartil 3. Debido a la variabilidad del Primer Pico de secreción de insulina mencionado en ese mismo trabajo (también observado por nosotros), desarrollamos una ecuación: **$\log^n (\text{área ins}) \cdot x K^9$** que en esencia representa la respuesta de la glucosa a la insulina secretada (una expresión funcional).

El estudio está programado a 5 años, en donde de acuerdo a las condiciones conocidas y relatadas más arriba, se espera una evolución diabética espontánea mayor del 50%. El estudio propuesto es prospectivo y abierto.

Los pacientes fueron obtenidos de un estudio previo de selección de pacientes en riesgo. Debido a las dificultades para tener un grupo control, todos los niños que se presentan fueron tratados y se los agrupó por su riesgo en PREVENCIÓN Y RESCATE.

Modificaciones al Protocolo inicial

Condiciones de inclusión al estudio y tratamiento

- Las condiciones generales son: cosanguíneos de diabetes tipo 1 con autoanticuerpos .
- Primer pico de secreción de insulina <48 μ U.

Condiciones para solicitar con urgencia el tratamiento.

- Ecuación <15.
- Valor de la pendiente de desaparición de glucosa (Kg) $\leq$ 1.40.
- Glucemia basal $\geq$ 110 mg%.
- Glucemia a los 60 min $\geq$ 126 mg%

La Asociación Americana de Diabetes estableció que glucemias en ayunas mayores de 110 mg% significan hiperglucemia y que valores mayores de 125 mg% representan diabetes clínica. Es aceptado además que una PTOG con glucemias mayores a 126 mg% a las dos horas significan pruebas patológicas. Es aceptado que en la PTEVG el valor a los 60 min debe ser igual o menor a la glucemia en ayunas. Por todo ello se considera que un valor a los 60 min mayor de 126 mg% es patológico, expresa alto riesgo y debe ser tratado.

Grupos en estudio

Dividimos los grupos en aquellos niños a los cuales en el curso de la selección de pacientes en riesgo de diabetes tipo 1, mostraron valores de inclusión en el estudio. De acuerdo al Protocolo unos eran tratados y otros eran observados. Pero debido al riesgo que implica no tratar los niños, todos los pacientes fueron tratados, y en aquellos casos en que las condiciones eran de riesgo estadístico fueron los padres los que solicitaron el tratamiento ya que la conducta terapéutica no presenta contraindicaciones ni toxicidad.

Este grupo pertenece el de **Prevención** de una posible evolución diabética y los mismos padres solicitaron el tratamiento: lo llamamos **Grupo A**.

Aquellos niños que en su evolución mostraron valores de riesgo inminente, a los que consideramos como **Rescate** de la evolución diabética lo llamamos **Grupo B**, y en este grupo nosotros le solicitamos a los padres comenzar con el tratamiento como un intento de cambiar la evolución.

Es necesario precisar que el tratamiento requiere un tiempo mínimo para tener efectos favorables. Fue observado en los estudios experimentales previos que el tratamiento tiene varias fases: en la *primera* se acentúa la hiperglucemia y hay un deterioro en el número de las células beta debido a la agresión inmune, en la *segunda* fase existe un aumento de la celularidad pero que no se traduce a nivel de la glucemia y en el *tercero* hay una hipertrofia con recuperación del tamaño celular, se restablecen los niveles de insulina y se normaliza la glucemia. Este proceso requiere tiempo y nosotros hemos estimado en los pacientes (sobre la base de la experiencia adquirida) que este lapso mínimo es de aproximadamente un año de tratamiento.

En ninguno de los niños hemos observado signos tóxicos debidos al tratamiento. Los niños crecen normalmente, se desarrollan durante la pubertad sin dificultades y tienen una escolaridad normal. No se observaron cambios de carácter ni de conducta.

RESULTADOS

Aquellos valores que se encuentran por fuera de los aceptados en el Protocolo se han impreso en rojo para hacerlos resaltar.

Grupo A (prevención)

Cuadro I.
GRUPO - A (PREVENCIÓN)

Nombre	Fecha Estudio	Fecha Tratam.	Primer Pico (μU)	Pendiente "K"	Area Insulina (μU)	HOMA-IR	Ecua-ción	Glu-cemia Basal (mg%)	Glu-cemia 60 min (mg%)	Hb A1c
B.L. 4a 8m DQB1 0201/0604	16/2/01	6/8/01	30	1,34	526	0,63	8,4	64	57	4,8 5,1
	29/4/02	"	74	2,03	1156	1,04	14,31	84	75	
	20/3/03	"	106	3,47	751	0,70	22,98		96	
	4/8/03	"	31	2,88	774	2,93	19,16	88	79	
	2003/06	*2003								
	31/8/06	21/7/06	116	2,62	2546	1,72	20,55	71	135	
	22/6/07	*5/9/07	270	4,94	4753	6,29	41,82	78	106	
	7/2/08	"	223	2,56	4044	3,04	28,65	61	123	
	3/9/08	"	164	2,64	3398	1,90	21,47	75	103	
	25/3/09	" "	134	2,81	2054	1,73	21,43	71	89	
	24/9/09	"	157	4,41	2739	1,60	34,91	77	105	
	30/3/10	"	98	3,27	1719	0,98	24,36	74	137	
	28/5/10	S/T						78	89	
		13/12/10								
O.M. 6a 5m DQB1 0301/0601	6/10/09	4/11/09	47	3,33	778	0,44	22,17	97	121	6,0
	12/1/09	"	--	4,27	430	0,74	25,89	112	114	5,9
	10/6/10	"	72	5,33	808	1,18	35,68	98	56	
	9/11/10	"	40	3,62	803	0,84	24,21	104	132	
A.F. 7 a DQB1 0302/0201	13/11/07	12/5/10	59	3,08	571	1,06	19,55	117	108	6,0 6,3 6,1
	19/6/08		53	3,98	424	0,50	24,08	106	84	
	10/11/08		55	3,90	696	0,94	25,53	131	123	
	2/2/09		108	4,55	1051	1,75	31,66	125	130	6,0 5,8
	24/8/09		117	5,74	865	2,37	38,82	99	114	
	1/3/10		48	4,19	752	1,67	27,75	103	102	
	27/4/10		68	4,20	752	1,36	27,82	99	158	6,0 6,9
	24/8/10		72	3,76	651	1,82	24,36	121	107	
	14/12/10									
	21/12/10		54	5,36	603	1,18	34,31	118	94	5,3 5,4
A.N. 15 a DQB1 0201/0201	12/2/09	20/4/10	59	2,06	818	0,42	13,82	58	95	5,3 5,4
	20/4/10		44	4,55	806	0,76	30,45	64	78	
	17/8/10		67	2,76	784	0,80	18,39	80	106	
	21/12/10		29	1,87	627	0,23	12,04	72	141	

* Tratamiento: nicotinamida = 12,5 mg/Kg/día; acetil-L-carnitina = 25 mg/Kg/día.

S/T: sin tratamiento.

Observaciones: se hallan en rojo aquellos valores que se encuentran por fuera de los determinados en el Protocolo.

En el caso de la niña BL el tratamiento se ha suspendido luego de haberse mantenido durante largo tiempo a la mitad de la dosis estipulada. La niña se perdió entre los años 2003 y 2006. La madre por su cuenta le siguió aportando el tratamiento a la mitad de la dosis estipulada. Al recuperar la niña, el 21/7/2006 se incremento la dosis ajustándola de acuerdo al Protocolo. Cuando se incrementó la dosis la niña presentó hiperinsulinismo con aumento del HOMA-IR que requirió bajar la dosis de acetil-L-carnitina y nicotinamida (5/9/2007, insulina secretada durante la PTEVG: 4753 μ U). La niña con la mitad de la dosis recuperó valores normales de HOMA-IR y el tratamiento fue suspendido el 13 de Diciembre de 2010. La paciente sigue asintomática.

Los otros niños no llevan 1 año de tratamiento y evolucionan favorablemente aunque requieren más tiempo de observación para tener una conclusión sobre su evolución final.

Grupo B (rescate)

Cuadro II
GRUPO – B (RESCATE)

Nombre	Fecha Estudio	Fecha Tratam.	Primer Pico (μ U)	Pen-diente "K"	Area I insuli-na (μ U)	HOMA-IR	Ecua-ción	Glucose-mia Basal (mg%)	Glucose-mia 60 min (mg%)	Hb A1c
H.P. 17a 4m DQB1 0302/0402	26/4/07	26/4/07	9	0,88	1152	1,05	6,2	72	152	5,0 5,2
	16/8/08	"	36	1,06	574	0,39	7,73	73	169	
	3/1/08	"	38	2,39	494	0,17	14,82	71	128	
	30/7/08	"	32	2,26	689	0,32	14,77	72	98	
	2/2/09	"	45	2,50	981	0,39	17,22	66	214	
	29/8/09	"	34	1,74	751	0,37	11,52	76	130	
		S/T de 1/9/09 a 20/9/10								
	21/9/10	*21/9/10	49	2,07	1429	1,64	15,04	83	162	
PVT.S. 8a 10m DQB1 0302/0402	5/7/07		51	2,14	727	1,18	14,10	76	74	7,0 5,1
	31/10/07	13/11/07	<2	0,92	611	0,4	5,90	56	169	
	17/3/08	"	60	3,72	797	0,5	24,85	77	92	
	22/8/08	"	41	2,18	474	0,56	13,19	82	74	
	5/1/09	"	38	4,86	749	0,56	32,17	76	72	
	27/7/09	*11/8/09	85	5,66	967	0,76	39,03	74	52	
	29/12/09		186	6,14	1650	1,68	45,49	80	56	
	21/9/10	S/T- 1/3/10 "	100	3,27	1756	2,26	24,43	90	111	

R.U. 5a 9m	12/3/08	16/10/08	41	2,39	299	0,74	13,62	95	93	6,2
	15/5/08		34	2,62	296	1,97	14,91	108	117	6,4
	8/10/08		41	3,22	446	0,58	19,64	125	134	6,5
	5/2/09		28	3,23	248	0,53	17,81	111	120	6,5
	12/5/09	"	<2	2,48	156	0,43	12,52	102	103	6,5
	16/8/09		64	3,50	596	0,53	22,36	104	106	5,9
	18/1/10		104	3,03	713	1,32	19,90	103	126	6,5
	15/6/10	"	95	3,49	822	1,11	23,42	108	111	7,5
DQB1 0402/0302	12/10/10		44	2,70	568	0,68	17,12	115	138	7,0
	30/11/10		84	2,91	649	0,42	18,84	104	114	
P.M. 7a 5m	24/8/09	4/11/09						117	205	
	10/10/09		41	2,46	361	0,74	13,62	99	135	6,1
	1/3/10		70	4,12	509	1,51	25,67	98	116	6,3
	29/6/10		18	3,50	288	0,71	19,82	107	185	
	3/8/10	"						121	194	6,3
	7/9/10		11	1,93	257	0,37	10,71	99	162	
	9/11/10		19	3,12	350	0,71	18,28	113	179	6,4
	11/1/11	"						92	136	

* Tratamiento: nicotinamida = 12,5 mg/Kg/día; acetil-L-carnitina = 25 mg/Kg/día

El niño HP que tenía en el momento de su ingreso 17 años no cumplió una dieta normal y tomaba cerveza sin control. Solamente mantenía el tratamiento por decisión de los padres. En Septiembre del 2009 abandonó el tratamiento y fue recuperado en Septiembre de 2010 en que comenzó con la mitad de la dosis. Su ejemplo es una muestra del efecto residual del tratamiento ya observado en la niña BL.

El niño PVTS presentó inicialmente valores sumamente alterados que se recuperaron luego de 1½ año de tratamiento. En ese momento comenzó con síntomas de hipoglucemia (valores en la PTEVG de 50 mg%) y la dosis fue disminuida a la mitad. Como continuaba asintomático en Marzo 2010 se suspendió el tratamiento hasta la actualidad.

El niño RU presentó en su evolución ausencia del primer pico de secreción de insulina asociado a un valor total durante la PTEVG menor de 200 µU, solo observable en los diabéticos de reciente diagnóstico como secreción residual de insulina. El niño se recuperó y mejoró sus valores de primer pico y solo queda recuperar sus valores de glucemia. Es importante destacar que en este lapso el niño permaneció asintomático y siguió creciendo normalmente.

El niño PM es el más difícil de evaluar porque se encuentra en el límite del tiempo para establecer una evolución favorable. Comenzó el tratamiento con una hiperglucemia manifiesta en una PTEVG donde no se pudo determinar la insulina.

Observación - En el Grupo B (rescate) resulta objetivo que los niños tienen una gravedad inusitada, tanto que se puede afirmar si no fuera porque participan en un Protocolo de estudio, mucho de ellos hace tiempo estarían tratados con insulina. Basta ver los valores en rojo para tener una idea del riesgo de los pacientes y varios de ellos han tenido un HbA1c en un rango diabético.

Estos niños no cumplen la premisa básica del estudio: PREVENCIÓN EN DIABETES TIPO 1, y se los ha tratado por razones de humanidad, corriendo el riesgo de deslegitimar el trabajo, exponiéndose a fracasos en el tratamiento.

Fracaso del tratamiento

Cuadro III
PACIENTE CON FRACASO DEL TRATAMIENTO

Nombre	Fecha Estudio	Fecha Tratam.	Primer Pico (μU)	Pen-diente "K"	Area I insulina (μU)	HOMA-IR	Ecua-ción	Glucose-mia Basal (mg%)	Glucose-mia 60 min (mg%)	Hb A1c
R.P. 9ª DQB1 0302/0201	16/1/07		108	3,22	1705	2,53	23,96	94	87	6,5
	3/6/09	3/6/09	27	2,31	534	0,83	14,51	80	171	
	22/12/09	"	31	3,61	950	4,37	24,75	183	244	
	29/12/09	"						93		
	14/4/10	*14/4/10	3	2,56	173	2,53	13,19	271	310	

* Comienza con insulina. No presentaba acidosis ni cetosis y las glucosurias eran negativas.

La niña RP se estudió inicialmente en Enero 2007 y no se realizó más controles. Cuando en Junio 2009 se comenzó nuevamente con el estudio presentaba un deterioro notable de su situación metabólica. Comenzó el tratamiento pero no logró revertir la evolución. El tratamiento fue tardío y no superó un año consecutivo. En ese momento presentaba una insulina total en la PTEVG menor de 200 μU. Debe mencionarse que la niña es una hipertiroides tratada con Danantizol.

Comentario

Se presenta el estudio final de 9 pacientes tratados por lapsos variables con acetil-L-carnitina y nicotinamida. De ellos BL y PVTs prosiguen sin medicación y HP la retomó a la mitad de la dosis.

Podemos hacer un balance del estudio propuesto. De los 64 niños previamente seleccionados para estudiar, se fueron apartando aquellos que requirieron tratamiento mientras se analizaba la realización de un "TRIAL" que asegure un resultado estadístico confiable. Gracias al aporte de este subsidio se pudo tratar un número de pacientes que aporta datos objetivos sobre la potencialidad del tratamiento propuesto. Antes del tratamiento, de los 64 niños dos desarrollaron diabetes clínica y requirieron tratamiento con insulina, demostrando en el corto tiempo de observación que la población seleccionada era de muy elevado riesgo diabético.

De los pacientes tratados, uno fracasó y está en tratamiento insulínico. De los ocho restantes seis continúan con tratamiento y dos lo han discontinuado y permanecen asintomáticos. Como se expresa claramente en la presentación, cuatro de ellos comenzaron en una situación crítica y hubieran sido medicados con insulina si no estuviesen protegidos por un protocolo de estudio. Dos de ellos presentaron hemoglobinas glucosiladas en un rango diabético y uno de ellos presentó en un momento de su evolución una insulina total en la PTEVG $<200 \mu\text{U}$. Todos los niños continúan con el tratamiento, sin insulina, haciendo vida normal, crecen normalmente y presentan una escolaridad normal.

Se puede concluir que el estudio ha sido satisfactorio y que el tratamiento es correcto y resulta exitoso aun en las condiciones extremas en las que ha sido usado.

Este estudio piloto debe confirmarse con un "TRIAL" que defina estadísticamente su valor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Athanassakis I, Mouratidou M, Sakka P, Evangeliou A, Spilioti M, Vassiliadis S: L-carnitine modifies the humoral immune response in mice after in vitro or in vivo treatment. *Int Immunopharmacol* 1: 1813-22, 2001.
2. Di Marzio L, Alesse E, Roncaioli P, Muzi P, Moretti S, Marcellini S, Amicosante G, De Simone C, Cifone M: Influence of L-carnitine on CD95 cross-linking-induced apoptosis and ceramide generation in human cell lines: correlation with its effects on purified acidic and neutral sphingomyelinases in vitro. *Proc Assoc Am Physicians* 109: 154-163, 1997.
3. Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G: Acetyl-L-carnitine supplementation differently influences nutrient par-

- tititioning, serum leptin concentration and skeletal muscle mitochondrial respiration in young and old rats. *J Nutr* 132: 636-642, 2002.
- 4 Wosikowski K, Mattern K, Schemainda I, Llasmann M, Rattel B, Loser R: WK175, a novel antitumor agent, decreases the intracellular nicotinamide adenine dinucleotide concentration and induces the apoptotic cascade in human leukemia cells. *Cancer Res* 62: 1057-1062, 2002.
 - 5 Hyo Chol H, Solomon HS: Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13978-13982, 1999.
 - 6 Mutomba MC, Yuan H, Konyavko M, Adachi S, Yokoyama ChB, Esser V, McGarry D, Babior BM, Gottlieb RA: Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. *FEBS letter* 478: 19-25, 2000.
 - 7 Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB: Fatty acid-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes: redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 3: 71-79, 2001.
 - 8 Bremer J: Carnitine – Metabolism and functions. *Am J Physiol* 63: 1420-1480, 1983
 - 9 Heo YR, Kang CW, Cha YS: L-carnitine changes the levels of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in streptozotocin-induced diabetic rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 47: 329-334, 2001.
 - 10 Arrigoni-Martelli E, Caso V: Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. *Drugs Exp Clin Res* 27: 27-49, 2001.
 - 11 Gottlieb RA: Mitochondria: execution central. *FEBS letters* 482: 6-12, 2000.
 - 12 Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR: Molecular enzymology of arnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta* 1546: 21-43, 2001.
 - 13 Bradley JH, Tremblay GC: Atlantic salmon (*salmo salar*) fed L-carnitine exhibit altered intermediary metabolism and reduced tissue lipid, but no change in growth rate. *J Nutr* 126: 1937-50, 1996.
 - 14 Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KAH, Wakil SJ: Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291: 2613-2616, 2001.
 - 15 Chaussain JL, Geoges P, Gendrel D, Donnadiou M, Jobb JC: Serum branched-chain amino acids in the diagnosis of hyperinsulinism in infancy. *J Pediat* 96: 923-926, 1980.
 - 16 Giolshani-Hebróni, Shiva G, Bessman SP: Hexokinase binding to mitochondria: basis for proliferative energy. *J Bioenerg Biomembr* 29: 331-338, 1997.

- 17 Thomas AP, Halestrap AP: The role of mitochondrial transport in the stimulation by glucagon and phenylephrine of gluconeogenesis from L-lactate in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 198: 551-560, 1981.
- 18 Corkey BE, Martin-Requero A, Walajtys-Rode E, Williams RJ, Williamson JR: Regulation of the branched chain alpha-ketoacid pathway in liver. *J Biol Chem* 257: 9668-9676, 1982.
- 19 Ishii T, Shimpo Y, Matsuoka Y, Kinoshita K: Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine in primary cultured neurons. *Jpn J Pharmacol* 83: 119-124, 2000.
- 20 Tommaso A, Puccetti C, Di Cocco ME, Arduini A, Ricciolini R, Scalibastri M, Manetti C, Conti F: Entry of [(1,2-¹³C₂)acetyl]-L-carnitine in liver tricarboxylic acid cycle and lipogenesis. *Eur J Biochem* 263: 287-291, 1999.
- 21 Chong ZZ, Lin SH, Maiese K: Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J Vas Res* 39: 131-147, 2002.
- 22 Ferrannini E, Buzzigolo G, Bevilacqua S, Boni C, Del Chiaro D, Oleggini M, Brandi L, Maccari F: Interaction of carnitine with insulin-stimulated glucose metabolism in humans. *Am J Physiol* 255: (Endocrinol Metab 18) E946-E952, 1988.
- 23 Mathis D, Vence L, Benoist C: Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature* 414: 792-798, 2001.
- 24 Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M: Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10845-10850, 2001.
- 25 Karabatas LM, Bruno LF de, Pastorale CF, Cullen C, Basabe JC: Inhibition of nitric oxide generation: normalization of in vitro insulin secretion in mice with multiple low-dose streptozotocin and in mice injected with mononuclear splenocytes from diabetic syngeneic donors. *Metabolism* 45: 940-946, 1996.
- 26 Ido Y, McHowat J, Chang KC, Arrigoni-Martelli E, Orfalian Z, Kilo C, Borra PB, Williamson JR: Neural dysfunction and metabolic imbalances in diabetic rats. Prevention by acetyl-L-carnitine. *Diabetes* 43: 1469-1477, 1994.
- 27 Karabatas LM, L Fabiano de Bruno, Pastorale C, Lombardo YB, Basabe JC: Branched-chain amino acid-enriched diet: effects on insulin secretion and cellular immune aggression. *PSEM* 224: 159-165, 2000.

CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES Y PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN ENTEROCOCOS AISLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL PROVENIENTES DEL ÁREA RURAL DE TANDIL, ARGENTINA

De Luca María Marta, Sparo Mónica Delfina, Schell Celia María.

Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 120 s/n 3º piso. (1900) La Plata. Provincia de Buenos Aires.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar y determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de enterococos aislados de alimentos de origen animal provenientes del área rural de Tandil. Las muestras de alimentos fueron: salamines artesanales ($n=18$), carne picada ($n=21$), leche de cabra ($n=30$) y quesos artesanales ($n=15$). El número total de cepas aisladas fue $n=40$, identificándose *E. faecalis* ($n=32$), *E. faecium* ($n=5$), *E. raffinosus* ($n=2$) y *E. gallinarum* ($n=1$). La determinación de la sensibilidad antimicrobiana *in vitro* se realizó mediante pruebas cualitativa de difusión en agar y cuantitativa de dilución en caldo (CIM) y la cinética inhibitoria de antimicrobianos por la técnica de curva de muerte microbiana (*Killing curve*). Los antibiogramas por difusión mostraron heteroresistencia en la mayoría de las cepas de *Enterococcus*. De muestras de leche de cabra, se obtuvieron las cepas con menor porcentaje de resistencia. No se encontró ningún *E. faecalis* resistente a vancomicina (VAN) por CIM. En *E. faecium* el 80% resultó con resistencia (R) y solo una cepa de *E. raffinosus* fue R, mientras que en *E. gallinarum* no se observó resistencia a VAN. Frente a teicoplanina (TEI), únicamente en cepas de *E. faecium* se observó R (60%) acompañada de R a penicilina (PEN). Las cepas con R a glucopéptidos presentaron fenotipos Van A y Van B. Mediante la prueba de *killing curve* se observó que cepas de enterococos frente a diferentes concentraciones de VAN presentaron comportamiento similar al descripto para cepas aisladas de muestras clínicas humanas. Los tests de sinergia con VAN y gentamicina, VAN y PEN mostraron correspondencia con los valores obtenidos en la CIM. Esta investigación confirma que los alimentos de origen animal son reservorios y podrían actuar como vehículos de cepas emergentes de *Ente-*

rococcus spp. con heteroresistencia asociada a la mayoría de las opciones terapéutica de uso clínico en medicina humana.

INTRODUCCIÓN

Enterococcus spp. son microorganismos ubicuos que integran el tracto gastrointestinal de humanos y animales, capaces de sobrevivir en condiciones ambientales adversas, pudiendo colonizar diversos nichos ecológicos. Son considerados patógenos oportunistas. Sin embargo, especies del género *Enterococcus* han surgido recientemente como importantes patógenos hospitalarios y agentes etiológicos de diversos cuadros infecciosos. Su rol como agente infeccioso en el hombre está relacionado con su presencia en el tracto gastrointestinal, su resistencia (R) asociada a varios antimicrobianos (ATM), como glucopéptidos y β -lactámicos y a la presencia de diversos factores de virulencia. Por su resistencia a la vancomicina (VAN) fueron reportados por el CDC como una emergencia internacional desde 1990, constituyendo un riesgo para salud. Existen diferentes fenotipos según la resistencia a glucopéptidos, VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG. El fenotipo VanA se caracteriza por presentar resistencia inducible de alto nivel tanto a VAN como a teicoplanina (TEI) (VAN= 64->1024 $\mu\text{g/ml}$; TEI= 16-512 $\mu\text{g/ml}$) y el fenotipo VanB que se caracteriza por resistencia inducible, de moderado ó alto nivel a VAN pero no a TEI (VAN= 4-1024 $\mu\text{g/ml}$; TEI= $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$).

Existe evidencia científica de la propagación de cepas de enterococos resistentes a ATM dentro de la cadena alimenticia a través de productos animales y alimentos contaminados. Dichas cepas se encuentran presentes en los alimentos tales como productos cárnicos, lácteos, vegetales y se han aislado de comidas rápidas. En Argentina, son escasos los estudios que documentan el aislamiento de cepas de *Enterococcus* con R antimicrobiana asociada, aislados de alimentos de origen animal.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo general

Caracterizar y determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de especies de enterococos aisladas de alimentos de origen animal provenientes del área rural de Tandil.

Objetivos específicos del proyecto:

- 1) Caracterizar fenotípicamente cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de alimentos de origen animal.
- 2) Evaluar la sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de las especies aisladas mediante la prueba de difusión en agar.
- 3) Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a diferentes ATMs de utilización clínica.
- 4) Estimar la cinética inhibitoria de ATMs con mecanismos de acción bactericida.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Toma y procesamiento de las muestras: las muestras de alimentos seleccionadas al azar para la recuperación de *Enterococcus* spp. fueron: salamines artesanales, carne picada, leche de cabra y quesos artesanales. Para su procesamiento se siguieron las recomendaciones del Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food (APHA, 2001).

b) Aislamiento e identificación de cepas de *Enterococcus* spp.: en agar bilis esculina-azida (A-BE-A), incubado a 37°C durante 24 h, las típicas colonias negras aisladas presuntivas de enterococos, fueron tomadas al azar e identificadas siguiendo la metodología propuesta por Facklam *et al.* (1989). Cada muestra fue procesada por duplicado.

c) Determinación de la sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de las especies aisladas.

Prueba cualitativa de difusión en agar: el estudio de sensibilidad *in vitro* cualitativa se realizó por la prueba de difusión en agar siguiendo la metodología establecida por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Estos ensayos se realizaron utilizando discos de antibióticos de uso clínico: ampicilina (AMP), tetraciclina (TET), minociclina (MIN), cloranfenicol (CMP), gentamicina de alta carga (G, 120µg), linezolid (LZD), tigeciclina (TGC), eritromicina (E), ciprofloxacina (CIP), estreptomina de alta carga (S, 300 µg), penicilina (PEN) y vancomicina (VAN). Como control se utilizaron cepas patrones: *E. faecium* ATCC 51299, *E. faecalis* ATCC 29212.

Prueba cuantitativa de dilución en caldo: *Concentración Inhibitoria Mínima* (CIM). Para la determinación de la CIM se siguieron las recomendaciones estandarizadas según las Guías del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) empleándose drogas antimicrobianas de pureza analítica certificada. Los puntos de corte para los ATM fueron los recomendados por los documentos CLSI, año 2009.

Cinética inhibitoria por metodología de Killing curve: fueron seleccionadas al azar cepas de diferentes alimentos correspondientes a 2 especies de *Enterococcus* spp. (*E. faecalis* y *E. faecium*) que presentaron CIM con categorías sensible, intermedia y resistente, según puntos de corte para vancomicina, gentamicina y penicilina.

Para estimar la cinética inhibitoria se utilizó la técnica de curva de muerte microbiana sin agitación, por el método estandarizado de *Killing curve*. La actividad bactericida fue definida como el descenso $\geq 3 \log^{10}$ UFC/ml a partir del inóculo inicial. La inhibición fue definida como $< 3 \log^{10}$ UFC/ml. Este ensayo fue realizado por duplicado.

RESULTADOS

El número total de cepas identificadas y la distribución a nivel de especies de *Enterococcus* spp. recuperadas de alimentos de origen animal se detallan en la tabla N° 1.

Tabla N° 1. Distribución de especies de *Enterococcus* spp. (n=40) recuperadas de alimentos de origen animal del Partido de Tandil. Año 2008-2009.

Muestras de alimentos	Número de especies recuperadas de <i>Enterococcus</i> spp.				Total
	<i>E. faecalis</i> n=32	<i>E. faecium</i> n=5	<i>E. raffinosus</i> n=2	<i>E. gallinarum</i> n=1	N= 40 cepas
Salamin	8	2			10
Carne picada	14				14
Leche de cabra	4	1	2		7
Queso	6	2		1	9

Los puntos de corte para la investigación del perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *Enterococcus* spp. utilizando la prueba cualitativa de difusión en agar (antibiograma) fueron definidos como S (*sensible*), I (*intermedio*) y R (*resistente*) siguiendo las normas del CLSI.

Los resultados de antibiogramas de cepas de *Enterococcus* spp. que se obtuvieron a partir de salami artesanal tandilero, carne picada, leche de cabra y quesos artesanales tandileros, se muestran en la Tabla N° 2.

La CIM solo fue realizada a cepas de *Enterococcus* spp. que mostraron categoría de resistencia y de resistencia intermedia por método de disco frente a CMP, CIP, VAN, TEI y PEN.

Los resultados de la CIM se detallan en las Tablas N° 3 a N° 7.

Tabla N° 2. Perfil de resistencia antimicrobiana obtenido por discos de cepas de *Enterococcus* spp. recuperadas de salami artesanal tandilero (n=10), de carne picada (n=14), de leche de cabra (n=7) y de quesos artesanales (n=9). Años 2008-2009.

ATM*	Salamin						Carne picada						Leche de cabra									Quesos								
	<i>E. faecalis</i> n=8 (80%)			<i>E. faecium</i> n=2 (20%)			<i>E. faecalis</i> n=14 (100%)			<i>E. faecalis</i> n=4 (57,1%)			<i>E. faecium</i> n=1 (14,3%)			<i>E. raffinosus</i> n=2 (28,6%)			<i>E. faecalis</i> n=6 (66,7%)			<i>E. faecium</i> n=2 (22,2%)			<i>E.gallinarum</i> n=1 (11,1%)					
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMP	8	0	0	0	0	2	14	0	0	4	0	0	0	1	0	2	0	0	6	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0
TET	1	1	6	0	0	2	6	0	8	4	0	0	0	1	0	2	0	0	2	0	4	1	0	1	1	0	0	1	0	0
MIN	2	6	0	0	1	1	6	3	5	4	0	0	0	1	0	2	0	0	2	2	2	1	0	1	1	0	0	1	0	0
CMP	4	2	2	2	0	0	8	4	2	4	0	0	1	0	0	2	0	0	3	3	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0
G	5	0	3	0	0	2	7	0	7	4	0	0	0	0	1	2	0	0	5	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
LZD	5	1	2	2	0	0	4	6	4	0	4	0	0	1	0	1	1	0	4	1	1	2	0	0	1	0	0	1	0	0
TGC	8	0	0	2	0	0	14	0	0	4	0	0	1	0	0	2	0	0	6	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0
E	0	2	6	0	0	2	0	5	9	0	4	0	0	0	1	0	2	0	0	2	4	0	0	2	0	0	0	0	1	0
CIP	0	7	1	0	0	2	1	7	6	0	4	0	0	0	1	1	1	0	1	2	3	0	1	1	0	0	1	0	0	0
S	3	1	4	0	0	2	8	1	5	4	0	0	0	0	1	2	0	0	6	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PEN	8	0	0	0	0	2	13	0	1	4	0	0	0	0	1	2	0	0	6	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
VAN	2	6	0	0	0	2	0	12	2	0	4	0	0	0	1	1	1	0	1	4	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0

* antimicrobiano

Tabla N° 3. Cepas de *Enterococcus* spp. recuperadas de alimentos de origen animal con categoría de resistente a cloranfenicol por CIM. Años 2009-2010.

Cepas	Alimentos	CIM (ug/ml)	Resultados
<i>E. faecalis</i> HS 224	Salamin	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 226	Salamin	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 229	Salamin	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 230	Salamin	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 231	Carne picada	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 232	Carne picada	≥ 128	R
<i>E. faecalis</i> HS 233	Carne picada	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 237	Carne picada	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 239	Carne picada	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 242	Carne picada	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 408	Queso	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 411	Queso	≥ 64	R
<i>E. faecalis</i> HS 412	Queso	≥ 64	R

R: resistente

Tabla N° 4. Cepas de *Enterococcus* spp. recuperadas de alimentos de origen animal con categoría de resistente a ciprofloxacina por CIM. Años 2009-2010.

Cepas	Alimentos	CIM (ug/ml)	Resultados
<i>E. faecium</i> HS 221	Salamin	≥ 4	R
<i>E. faecium</i> HS 222	Salamin	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 226	Salamin	4	R
<i>E. faecalis</i> HS 230	Salamin	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 231	Carne picada	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 232	Carne picada	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 233	Carne picada	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 238	Carne picada	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 241	Carne Picada	4	R
<i>E. faecalis</i> HS 242	Carne picada	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 243	Carne picada	≥ 4	R
<i>E. faecium</i> HS 426	Leche de cabra	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 406	Queso	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 408	Queso	≥ 4	R
<i>E. faecium</i> HS 409	Queso	≥ 4	R
<i>E. faecalis</i> HS 411	Queso	≥ 4	R

R: resistente

Tabla N° 5. Cepas de *Enterococcus* spp. recuperadas de alimentos de origen animal con categoría de resistente a vancomicina por CIM. Años 2009-2010.

Cepas	Alimentos	CIM (ug/ml)	Resultados
<i>E. faecium</i> HS 221	Salamín	≥ 32	R
<i>E. faecium</i> HS 222	Salamín	≥ 32	R
<i>E. raffinosus</i> HS 423	Leche de cabra	≥ 32	R
<i>E. faecium</i> HS 426	Leche de cabra	64	R
<i>E. faecium</i> HS 410	Queso	16	R

R: resistente

Tabla N° 6. Cepas de *Enterococcus* spp. recuperadas de alimentos de origen animal con categoría de resistente a teicoplanina por CIM. Años 2009-2010.

Cepas	Alimentos	CIM (µg/ml)	Resultados
<i>E. faecium</i> HS 221	Salamín	256	R
<i>E. faecium</i> HS 222	Salamín	128	R
<i>E. faecium</i> HS 426	Leche de cabra	128	R

R: resistente

Tabla N° 7. Cepas de *Enterococcus* spp. recuperadas de alimentos de origen animal con categoría de resistente a penicilina por CIM. Años 2009-2010.

Cepas	Alimentos	CIM (ug/ml)	Resultados
<i>E. faecium</i> HS 221	Salamín	64	R
<i>E. faecium</i> HS 222	Salamín	32	R
<i>E. faecium</i> HS 426	Leche de cabra	32	R

R: resistente

Los resultados del estudio de la cinética inhibitoria mediante el método estandarizado de *Killing curve* se muestran en gráficos semi-logarítmicos (Figuras N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6).

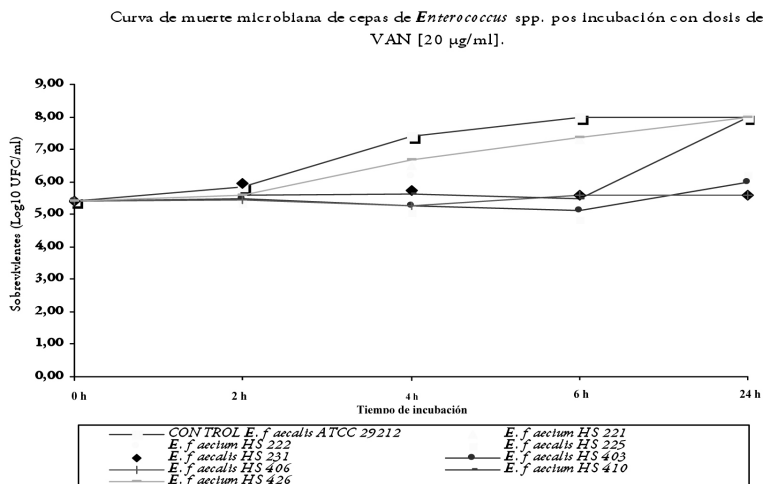


Figura N°1. Cinética inhibitoria de VAN frente a cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de alimentos de origen animal.

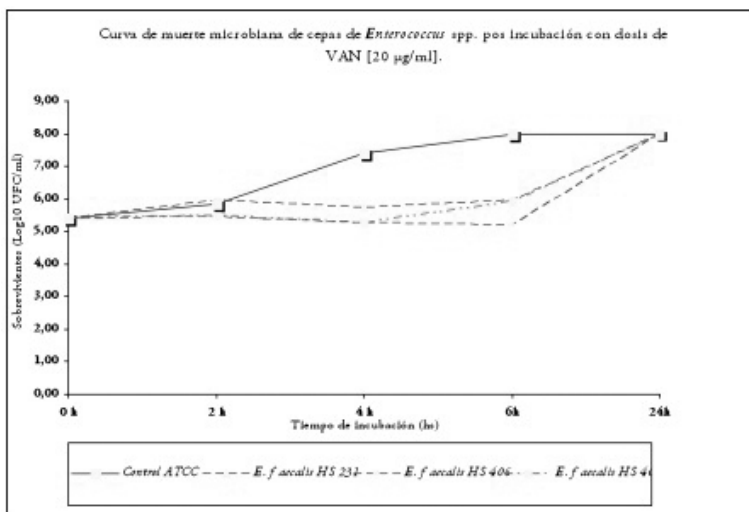


Figura N° 2. Cinética inhibitoria de VAN (20 µg/ml) frente a cepas de *Enterococcus* spp. seleccionadas según resultados de CIM aisladas de alimentos de origen animal.

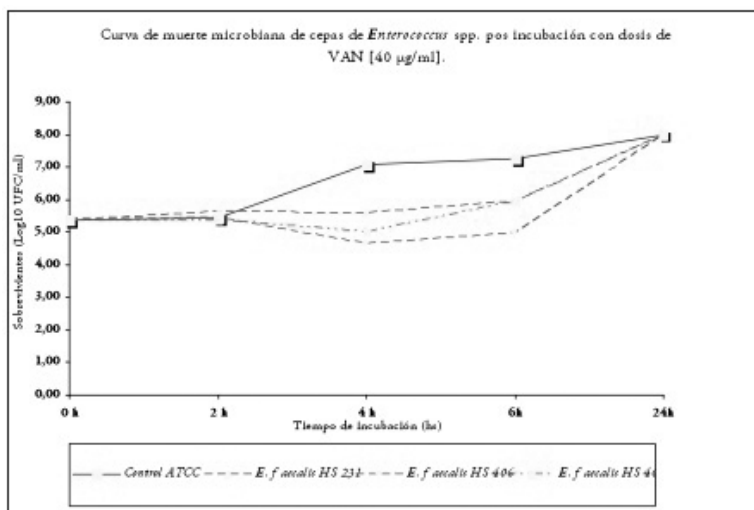


Figura N° 3. Cinética inhibitoria de VAN (40 µg/ml) frente a cepas de *Enterococcus* spp. seleccionadas según resultados de CIM aisladas de alimentos de origen animal.

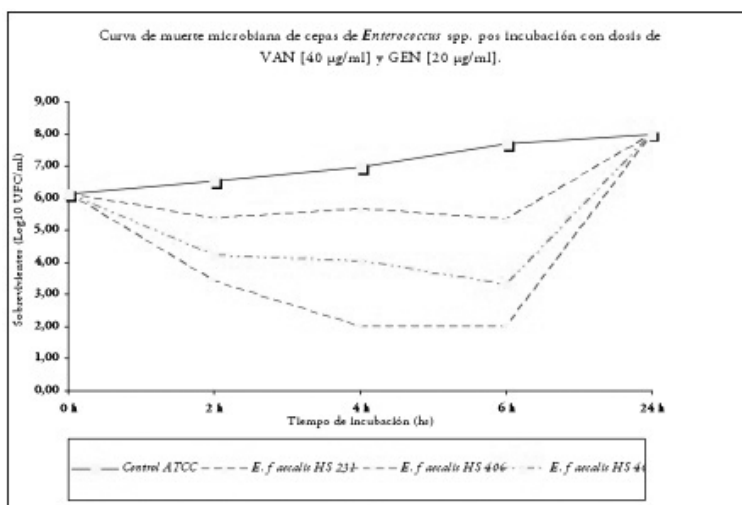


Figura N° 4. Sinergia inhibitoria de VAN (40 µg/ml) y GEN (20 µg/ml) frente a cepas de *Enterococcus* spp. seleccionadas según resultados de CIM aisladas de alimentos de origen animal.

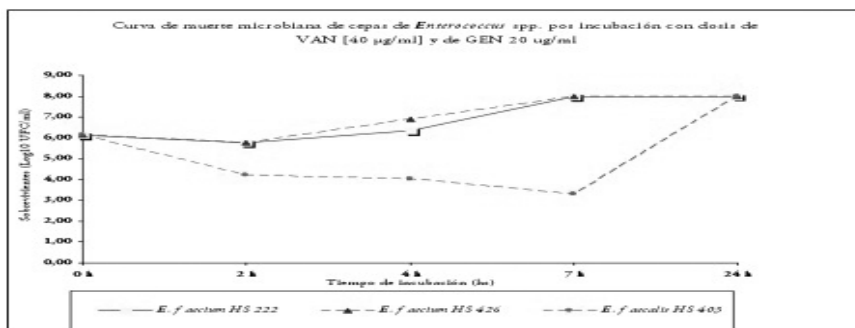


Figura N° 5. Sinergia inhibitoria de VAN (40 µg/ml) y GEN (20 µg/ml) frente a cepas de *Enterococcus* spp. seleccionadas según resultados de CIM aisladas de alimentos de origen animal.

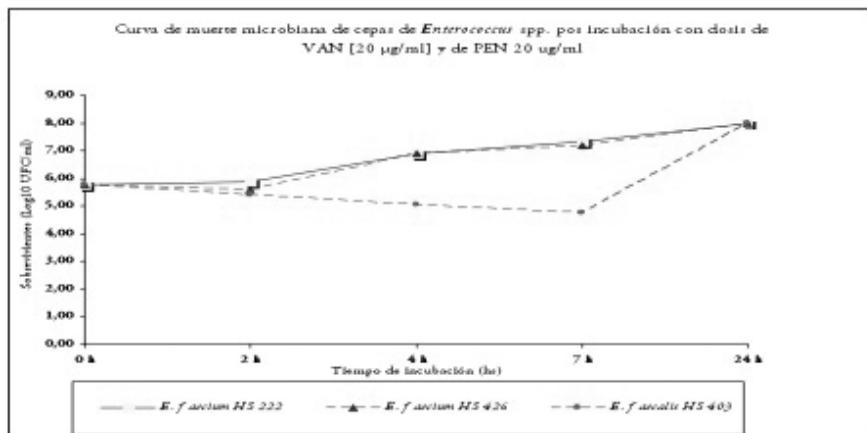


Figura N° 6. Sinergia inhibitoria de VAN (20 µg/ml) y PEN (20 µg/ml) frente a cepas de *Enterococcus* spp. seleccionadas según resultados de CIM aisladas de alimentos de origen animal.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De los alimentos de origen animal, (salamín artesanal, leche de cabra, quesos artesanales y carne picada) provenientes de Tandil, se recuperaron e identificaron fenotípicamente cepas de *Enterococcus* spp: *E. faecalis* (n=32), *E. faecium* (n=5), *E. gallinarum* (n=1) y *E. raffinosus* (n=2). Al igual que en muestras clínicas humanas, *E. faecalis* fue la especie aislada con mayor frecuencia, coincidiendo con lo citado en la literatura internacional.

E. faecium fue la especie que presentó mayor multirresistencia a los ATM ensayados. En *E. gallinarum* y *E. raffinosus* no se observó multirresistencia asociada.

En el estudio de resistencia antimicrobiana por la técnica cualitativa de disco se observó heteroresistencia en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* recuperadas de carne picada, salamín y quesos, mientras que en leche de cabra solo una cepa resultó con multirresistencia asociada (*E. faecium*).

Los resultados obtenidos por técnica de CIM, evidenciaron la presencia de perfiles de resistencia antimicrobiana. No se encontró ningún *E. faecalis* resistente a VAN por CIM. En *E. faecium* el 80% resultó con resistencia (R) y solo una cepa de *E. raffinosus* fue R, mientras que en *E. gallinarum* no se observó resistencia a VAN. Frente a TEI, únicamente en cepas de *E. faecium* se observó R (60%) acompañada de R a PEN. Las cepas con R a glucopéptidos presentaron fenotipos VanA y VanB.

Mediante la prueba de *killing curve* se observó que ciertas cepas de enterococos recuperadas de las muestras de alimentos frente a diferentes concentraciones de VAN (20 µg/ml y 40 µg/ml) presentaron comportamiento similar al descrito para cepas aisladas de muestras clínicas humanas. Por otra parte, VAN no originó una mayor inhibición de los organismos a concentraciones más altas, corroborando lo referido en las publicaciones científicas ya que el mismo es ATM tiempo-dependiente. Los resultados obtenidos en las *killing curves* frente al test de sinergia realizado con VAN y GEN, VAN y PEN mostraron correspondencia con los valores obtenidos con la técnica de CIM en las cepas estudiadas.

El hallazgo de fenotipos resistentes en los alimentos puede deberse a la manipulación de los mismos bajo prácticas de manufactura deficientes. Idénticas conclusiones fueron encontradas por Marguet *et al.* (2008) quién describió el hallazgo de cepas multirresistentes aisladas de quesos ovinos.

Los valores elevados obtenidos por CIMs demuestran la presencia de cepas emergentes con alta resistencia a glucopéptidos y cloranfenicol recu-

peradas de alimentos de origen animal. En medicina humana, los glucopéptidos VAN y TEI suelen ser ATM de reserva para el tratamiento de infecciones causadas por enterococos resistentes a la ampicilina (Arias *et al.*, 2010). Si bien todavía no se ha demostrado el pasaje de cepas de enterococos desde un alimento al hombre, es evidente que este microorganismo posee capacidad para adquirir y compartir material genético asociado a multiresistencia adquirida a través de la transferencia de genes extracromosómicos, tanto interespecie como intraespecie (Woodford *et al.*, 1995; Huycke *et al.*, 1998; Garza Velasco *et al.*, 2002).

Esta investigación confirma que los alimentos de origen animal son reservorios que podrían actuar como vehículos de cepas emergentes de *Enterococcus* spp. con heteroresistencia asociada a la mayoría de las opciones terapéutica de uso clínico en medicina humana. Este hallazgo, motiva la necesidad de implementar un sistema de vigilancia para su detección, ya que pueden ingresar al hombre vía cadena alimenticia.

En consecuencia, en seguridad alimentaria, es imprescindible el examen exhaustivo de las cepas de *Enterococcus* que puedan ser aisladas de alimentos.

SUMMARY

The objective of this study was to characterize and determine the antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from food of animal origin from the rural area of Tandil. Food samples were selected: artisanal salami ($n=18$), beef ($n=21$), goat's milk ($n=30$) and artisanal cheeses ($n=15$). The total number of isolates strains was $n=40$, identifying *E. faecalis* ($n=32$), *E. faecium* ($n=5$), *E. raffinosus* ($n=2$) and *E. gallinarum* ($n=1$). The in vitro antimicrobial susceptibility was performed by agar diffusion test and minimum inhibitory concentrations (MIC). Time-kill studies for vancomycin (VAN), gentamicin (GEN) and penicillin (PEN) was performed by Killing curve. Diffusion susceptibility testing showed heteroresistance in most strains of *Enterococcus*. From goat's milk samples were obtained strains with the lowest percentage of resistance. We found no *E. faecalis* resistant to VAN from MIC. In *E. faecium*, 80% were resistant (R) and only one strain of *E. raffinosus* was R, while in *E. gallinarum* there was no resistance to VAN. With teicoplanin (TEI), only in strains of *E. faecium* was observed R (60 %) accompanied of R to PEN. Enterococci resistant to glycopeptides (VAN and TEI) showed phenotypes

VanA and VanB. By *Killing curve* test showed that enterococci strains against different concentrations of VAN showed similar behavior to that described for strains isolated from human clinical specimens. The synergy test with VAN and GEN, VAN and PEN showed correspondence with the values obtained in the MIC. This research confirms that the food of animal origin are reservoirs and they could act as vehicles of emerging strains of *Enterococcus* spp. with heteroresistance associated with most therapeutic options for clinical use in human medicine.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vanderzant C., Splittstoesser D. *Compendium of methods for the microbiological examination of food*. 3 ed., American Public health association. Estados Unidos, 1992.
2. Facklam R. R. Hollis D. and Collins M.D. *Identification of Gram positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria*. J. Clin. Microbiol. 1989;27: 724-730.
3. Facklam, R.R. and Washington II J.A. Streptococcus and related catalase-negative Gram positive cocci. In: (Balows, A; Hausler Jr., W.J.; Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D and Shadomy, H.J. Eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 5th Ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.: 1991;238-257.
4. *Nacional Commitee for Clinical Laboratory Standards*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement, M100-S12. Wayne (PA): The Committee; 2002.
5. *Nacional Commitee for Clinical Laboratory Standards*. Methods for disk diffusion antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. In Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Document M2-A9. Wayne, Pennsylvania, USA, 2006;26 (1):1-35.
6. *Nacional Commitee for Clinical Laboratory Standards*. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard M7-A5. Wayne (PA): USA, 2000.
7. Marguet E.R., Vallejo M., Olivera N.L. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2008;42(4): 543-548.
8. Arias C.A., Contreras G.A. and. Murray B. E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 555-562.

9. Woodford N., Jonson A., Morrison D. *et al.* Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995;8: 585-615.
10. Huycke M.M., Sahm D. F. and Gilmore M. S. Multiple drug resistant enterococci: the nature of the problem and agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 239-249.
11. Garza Velasco R., Hernández Acosta K. and Mejía Chávez A. G. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *Lab. Acta.* 2002; 14(1):11-20.

Agradecimiento

A la Fundación Alberto J. Roemmers por el subsidio otorgado.

ESTUDIO DE LA ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES AGUDAS DEL TRACTO RESPIRATORIO EN UNA POBLACIÓN PEDIÁTRICA

Gerardo D. Deluca¹, Viviana Gutnisky², Gerardo Andino³, Adrian Gerard²,
Jesica Benegui³, Miriam N. Salmón⁴, María E. Horna⁴, Viviana García
Saitoo⁴, José O. Lotero⁴.

Asignatura de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA), particularmente las neumonías adquiridas en la comunidad, son la causa más común de morbi-mortalidad en niños en todo el mundo, siendo en los países en vías de desarrollo responsables de un 30% de la mortalidad en esta población. Los objetivos del presente trabajo fueron la puesta a punto de una técnica de amplificación de ácidos nucleicos (AN) que permita la detección simultánea de nueve microorganismos frecuentemente implicados en infecciones respiratorias agudas (IRA), y determinar la frecuencia de los mismos en una población de niños con neumonía adquirida en la comunidad (NAC).

Se estudiaron aspirados nasofaríngeos de 200 niños menores a seis años que requirieron internación en un hospital pediátrico de la ciudad de Corrientes (Argentina) con diagnóstico de NAC, en el período de febrero de 2009 a enero de 2010. Se empleó para ello una técnica de retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa múltiple (RT-mPCR).

El agente más frecuentemente encontrado fue el Virus Sicial Respiratorio en el 45% de los casos, principalmente en la estación invernal y principios de primavera. Le siguieron el Adenovirus y el Enterovirus en un 4.5%, el virus Influenza A en un 3.5%, virus Parainfluenza-3 en un 1.5% y el virus Parainfluenza-1 en un 1%.

El diagnóstico etiológico de una IRA es importante para lograr una utilización más racional de los antimicrobianos. Además, las PCR múltiples para detectar AN de agentes productores de IRA resultan rápidas, sensibles, específicas y de bajo costo, características que ameritan incentivar su desarrollo y aplicación en el ámbito de la Salud Pública.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son la causa más común de morbi-mortalidad en niños en todo el mundo, siendo en los países en vías de desarrollo la causa de un 30% de la mortalidad en esta población.

Los agentes causales de IRA comprenden un amplio abanico de microorganismos. Las bacterias *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* son las más comúnmente encontradas, pero dado que también suelen ser comensales habituales del tracto respiratorio, el diagnóstico etiológico no siempre resulta concluyente. No obstante, su aislamiento e identificación no conlleva mayores problemas. En contraste, la detección de *Mycoplasma pneumoniae* (MP) y *Chlamydia pneumoniae* (CP), así como la detección de virus en niños con síntomas respiratorios, es considerada evidencia de infección aguda. Si bien se sabe que existe un gran número de virus que afectan el árbol respiratorio, su detección siempre ha generado dificultades desde el punto de vista metodológico. Además, el hecho de que las infecciones virales sean por lo general autolimitadas y la no existencia por mucho tiempo de tratamiento específico, relegaba su diagnóstico a una inferencia clínica. En la actualidad, un diagnóstico rápido y preciso de las IRA es fundamental en pediatría y ayuda al médico a adoptar conductas que favorezcan una evolución con mínimas complicaciones.

En este sentido, las técnicas moleculares han abierto las puertas hacia la implementación de metodologías de diagnóstico más amplias, simples, seguras y con probada sensibilidad y especificidad. El primer objetivo de este trabajo ha sido la adaptación y puesta a punto de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección simultánea de los siguientes microorganismos productores de patologías respiratorias agudas: Enterovirus (ENV), Virus Influenza A y B (FluA y FluB), Virus Sincicial Respiratorio (VSR), Virus Parainfluenza tipo 1 y 3 (PI-1 y PI-3), Adenovirus (ADV), MP y CP. El segundo objetivo ha sido establecer la prevalencia de infección de estos agentes en niños con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad de la ciudad de Corrientes, Argentina.

¹ Área de Biología Molecular, Asignatura de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes.

² Área de Biología Molecular, Laboratorio Central de Redes y Programas, Provincia de Corrientes.

³ Área de Virología, Laboratorio Central de Redes y Programas, Provincia de Corrientes.

⁴ Hospital Pediátrico "Juan Pablo II", Corrientes Capital, Provincia de Corrientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: En el período comprendido entre febrero de 2009 y enero de 2010 se recolectaron 200 muestras de aspirados nasofaríngeos (ANF) de niños con edades menores a 6 años y con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad y que requirieron de internación en el Hospital “Juan Pablo II” de la Ciudad de Corrientes (Corrientes, Argentina). Se excluyeron los casos de niños con enfermedad pulmonar crónica, neumonía recurrente, cardiopatía congénita, inmunodeficiencias, daño neurológico, requerimiento inicial de cuidados intensivos y/o con infecciones mixtas (Bacterias-Virus)

Previo a la toma de la muestra se solicitó al tutor la firma de un consentimiento informado a fin de efectuar la investigación del agente etiológico, completándose una ficha con datos clínico-epidemiológicos y datos personales.

Extracción de ADN: Las muestras de ANF fueron tomadas en forma aséptica y de acuerdo a normas estandarizadas, de modo de evitar cualquier tipo de contaminación que pudiera interferir en el diagnóstico. Luego, cada muestra fue transferida de la sonda y el contenedor correspondiente a un tubo estéril de 10 mL, para ser enviadas en forma refrigerada (4°C) hasta el laboratorio de procesamiento. Una vez en el Laboratorio, las muestras fueron homogeneizadas en vórtex por 10 seg y posteriormente se transfirió una alícuota de 1.2 mL a un microtubo estéril de 1.5mL. Este material se almacenó a -70°C hasta su procesamiento.

Para la obtención de los ácidos nucleicos, las muestras fueron previamente descongeladas y luego centrifugadas en forma refrigerada (4°C) durante 15 min a 15000 rpm. Seguidamente se tomaron 200 μ L del líquido sobrenadante para realizar la extracción del material genómico. Este procedimiento se realizó mediante el kit comercial QIAamp® MinElute Virus Spin (Qiagen, USA).

Para controlar la calidad e integridad del ADN obtenido, todas las muestras fueron amplificadas para el exon III del gen de la β -actina humana.

Detección de Virus Respiratorios y de MH y CP: Se realizó mediante una retrotranscripción (RT) y PCR múltiple, utilizando cebadores previamente descritos por Gröndahl y col. La RT y la PCR se realizaron en un solo paso, y para esto se utilizó el kit de amplificación SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Qiagen, USA).

El volumen final de reacción fue de 20 μ L. Las condiciones de reacción fueron: buffer de reacción optimizado para RT y PCR (composición comer-

cial desconocida), 1.5 mM Cl_2Mg , 0.2 uM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 0.2 mM de cada cebador, 0.4 uL del mix comercial de retrotranscriptasa y Taq polimerasa y 2 μL de suspensión de ácidos nucleicos. Las condiciones de ciclado fueron: un primer paso de retrotranscripción a 50°C por 30 min seguido de un paso de activación de la Taq Platinum a 94°C por 2 min; y un segundo paso correspondiente a la amplificación de 39 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 30 seg y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de amplificación se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 110 V durante 1 h, luego se tiñeron con solución de bromuro de etidio y se observaron por exposición a luz UV en transiluminador de 320 nm.

RESULTADOS

El principal agente infeccioso encontrado fue el Virus Sincicial Respiratorio (VSR) en 90 muestras (45%), seguido del Adenovirus (ADV) y Enterovirus (ENV) en 9 muestras cada uno (4.5%), Influenza A (FluA) en 7 casos (3.5%), Parainfluenza-3 (PI3) en 3 casos (1.4%) y Parainfluenza-1 (PI1) en 1 caso (0.5%). Además, se observaron 4 coinfecciones virales correspondiendo 2 a ADV y VSR, una a FluA y VSR y una a ENV y VSR. En esta serie no se observaron casos de CP, MP y FluB. En la Tabla 1 se resumen los virus identificados y los casos procesados por mes.

DISCUSIÓN

Los virus y bacterias de difícil desarrollo que afectan el tracto respiratorio siempre han sido una dificultad diagnóstica al momento de determinar la etiología de una patología respiratoria aguda. Los métodos tradicionalmente empleados para su detección se basan en la respuesta serológica o en la detección de antígenos. Los primeros tienen la desventaja de ser metodologías indirectas y de requerir muestreos en etapa aguda y convaleciente para un diagnóstico apropiado, los segundos limitan a los laboratorios de menor complejidad dado que requieren de equipamiento especial. Además, en la mayoría de los casos el diagnóstico es individual para cada virus o bacteria. La metodología empleada en este trabajo ofrece un diagnóstico directo, rápido, sensible, específico, de bajo costo y con la ventaja de evaluar nue-

ve microorganismos que generan patologías respiratorias agudas en forma simultánea. En esta serie se evaluaron los agentes etiológicos involucrados en casos de niños con afectación del árbol respiratorio inferior, que representan alrededor el 5% del total de las IRA. El VSR resultó el más frecuente y su pico de incidencia en los meses invernales y principios de primavera coincide con lo reportado en la bibliografía nacional e internacional. Le siguieron en importancia el ADV y el ENV, dos agentes que en determinadas ocasiones se asocian a neumonías en niños menores a 5 años. Ambos presentaron la mayor incidencia en el período de mayo-junio y de Agosto-Octubre y fueron responsables del 9% de las neumonías estudiadas, un valor que marca la importancia del diagnóstico diferencial de estos microorganismos. El virus influenza A fue detectado sólo en 7 casos de neumonías (3.5%), mostrando una incidencia similar a la de los ADV y ENV. Si tenemos en cuenta que durante el año 2009 se generó la pandemia por Flu-A H1N1, la proporción de casos en que este agente afectó el árbol respiratorio inferior fue baja. Completan la epidemiología los virus PI-1 y PI-3 que si bien generan cuadros muy similares a los producidos por el VSR, su incidencia es menor y el número casos que requieren hospitalización es significativamente más bajo, coincidiendo esto con lo reportado en este trabajo. Por otro lado, no se han observado casos por MP y CP; sin embargo, esto no resulta extraño dado que son dos agentes que afectan mayormente a niños entre 5-15 años de edad y las neumonías atípicas que producen en menores de 5 años no suelen ser de pronóstico grave y muy raramente requieren de hospitalización.

Reconocer en forma efectiva el agente etiológico de una IRA es cada vez más relevante en la medicina moderna; por un lado permite hacer un uso más racional de la antibioticoterapia y por otro se facilitan las decisiones y conductas médicas, particularmente en pacientes especiales. En este sentido, contribuir con metodologías de diagnóstico superadoras y aplicarlas al sistema público de salud es un objetivo que debiera mantenerse en forma permanente.

Tabla 1. Frecuencia de los agentes etiológicos involucrados en casos de neumonía NAC en niños que requirieron hospitalización en el Hospital Pediátrico “Juan Pablo II” de Corrientes (Argentina), durante el período febrero de 2009-enero 20

	Total	Negativos (%)	ADV+ (%) ^a	ENV+ (%)	FLU-A+ (%)	PI-1+ (%)	PI-3+ (%)	VSR+ (%)
Feb. 2010	6	5						
(83.3)	-	-	-	-	-	1 (16.7)		
Mar. 2010	20	16						
(80)		1						
(5)			1					
(5)	2							
(1)								
Abr. 2010	13	8						
(61.5)	-	-	-	-	-	5 (38.5)		
May. 2010	11	2						
(18.2)	3							
(30)	5 (45.4)	-	1					
(9.1)	-	-						
Jun. 2010	22	6						
(27.3)	2							
(9.1)	1							
(5.5)	1							
(4.5)	1							
(4.5)	1							
(4.5)	10							
(45.4)								
Jul. 2010	30	8						
(26.7)	1							
(3.3)	-	4						
(13.3)	-	1						
(3.3)	16							
(53.3)								
Ago. 2010	52	8						
(15.4)	2							
(3.8)	1							
(1.9)	2							
(3.8)	-	-	39 (75)					
Sep. 2010	12	3						
(25)	-	1						
(8.3)	-	-	-	8 (66.7)				
Oct. 2010	13	9						
(69.2)	1							

	Total	Negativos (%)	ADV+ (%) ^a	ENV+ (%)	FLU-A+ (%)	PI-1+ (%)	PI-3+ (%)	VSR+ (%)
(7.7)	-	-	-	-	3 (23.1)			
Nov. 2010	13	10						
(76.9)	-	-	-	-	-	3 (23.1)		
Dic. 2010	8	5						
(62.5)	-	-	-	-	-	3 (37.5)		
Ene. 2011	0	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	200	72						
(36)	9							
(4.5)	9							
(4.5)	7							
(3.5)	2							
(1)	3							
(1.5)	90							
(45)								

^a Los porcentajes están referidos al total de casos de NAC analizados en el laboratorio en cada mes.

ABSTRACT

The acute respiratory infections (ARI), particularly the community-acquire pneumonia (CAP), are the most common cause of morbimortality in children around the world. In developing countries 30% of this children die annually because of ARI.

The aims of the present work were to assess a nuclei acid amplification technique (NAAT) to simultaneous detect nine respiratory pathogens and to determine their frequency in children with community-acquire pneumonia.

Between February 2009 and January 2010 there were studied 200 nasopharyngeal aspirates (NPA) from children under six years old who required hospitalization due to CAP. To detect the respiratory pathogens we employed a multiple polymerase chain reaction (mPCR).

Respiratory syncytial virus was the most frequent microorganism found (45%), mainly in winter and early spring. Adenovirus and Enterovirus were present in 4.5% of the cases, Influenza A virus in 3.5%, Parainfluenza-3 virus in 1.5% and Parainfluenza-1 virus in 1% respectively.

Early identification of causative agents in ARI of paediatric patients can prevent an overuse of antimicrobials. Moreover, the mPCR assays for the detection of respiratory pathogens are fast, sensible, specific and low cost; therefore, these techniques should be taken into account in routine diagnosis of ARI

BIBLIOGRAFÍA

1. Baumeister EG, Hünicken DS, Savy VL. *RSV molecular characterization and specific antibody response in young children with acute lower respiratory infection*. J. Clin. Virol. 2003 May;27(1):44-51.
2. Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, Mani K, Cherian J, Tyagi V, et al. *Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007*. Virol. J. 2009;6:89.
3. Dorigo-Zetsma JW, Zaat SA, Wertheim-van Dillen PM, Spanjaard L, Rijntjes J, van Waveren G, et al. *Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infection in children*. J. Clin. Microbiol. 1999 Jan;37(1):14-17.
4. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. *Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology*. Clin. Microbiol. Rev. 2000 Oct;13(4):559-570.
5. Gröndahl B, Puppe W, Hoppe A, Kühne I, Weigl JA, Schmitt HJ. *Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study*. J. Clin. Microbiol. 1999 Jan;37(1):1-7.
6. Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M, Vreede WB, Pilon J, Bruisten SM. *Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children*. J. Clin. Microbiol. 2004 Dec;42(12):5596-5603.
7. Klein MI, Coviello S, Bauer G, Benitez A, Serra ME, Schiatti MP, et al. *The impact of infection with human metapneumovirus and other respiratory viruses in young infants and children at high risk for severe pulmonary disease*. J. Infect. Dis. 2006 Jun 1;193(11):1544-1551.
8. Kumar S, Wang L, Fan J, Kraft A, Bose ME, Tiwari S, et al. *Detection of 11 common viral and bacterial pathogens causing community-acquired pneumonia or sepsis in asymptomatic patients by using a multiplex reverse transcription-PCR assay with manual (enzyme hybridization) or automated (electronic microarray) detection*. J. Clin. Microbiol. 2008 Sep;46(9):3063-3072.
9. Lam WY, Yeung ACM, Tang JW, Ip M, Chan EWC, Hui M, et al. *Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses*. J. Clin. Microbiol. 2007 Nov;45(11):3631-3640.
10. Lee J, Chun J, Kim DS, Park Y, Choi JR, Kim H. *Identification of adenovirus, influenza virus, parainfluenza virus, and respiratory syncytial virus by*

- two kinds of multiplex polymerase chain reaction (PCR) and a shell vial culture in pediatric patients with viral pneumonia.* Yonsei Med. J. 2010 Sep 1;51(5):761-767.
11. Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. *Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens.* J. Clin. Microbiol. 2001 Aug;39(8):2779-2783.
 12. Mahony JB. *Detection of respiratory viruses by molecular methods.* Clin. Microbiol. Rev. 2008 Oct;21(4):716-747.
 13. Martínez T MA, Pino P Y, Salazar B T, Jover L E, Caroca C C, Espinoza N MA, et al. *Diagnostic utility of the polymerase chain reaction for the diagnosis of Mycoplasma pneumoniae in elderly patients with community-acquired pneumonia.* Rev Chilena Infectol. 2005 Sep;22(3):251-256.
 14. Olsen SJ, Thamthitiwat S, Chantira S, Chittaganpitch M, Fry AM, Simmerman JM, et al. *Incidence of respiratory pathogens in persons hospitalized with pneumonia in two provinces in Thailand.* Epidemiol. Infect. 2010 Dec;138(12):1811-1822.
 15. Osiowy C. *Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay.* J. Clin. Microbiol. 1998 Nov;36(11):3149-3154.
 16. Syrmis MW, Whitley DM, Thomas M, Mackay IM, Williamson J, Siebert DJ, et al. *A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples.* J Mol Diagn. 2004 May;6(2):125-131.
 17. Videla C, Carballal G, Misirlian A, Aguilar M. *Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina.* Clin Diagn Virol. 1998 May 1;10(1):17-23.
 18. Viegas M, Barrero PR, Maffey AF, Mistchenko AS. *Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis.* J. Infect. 2004 Oct;49(3):222-228.



ASOCIACIÓN DEL *HELICOBACTER PYLORI* AL ARDOR BUCAL, LA HIPERTROFIA PAPILAR LINGUAL Y LA HALITOSIS

Valeria Denninghoff, Isabel Adler, Andrea Muño, Mariana dos Santos,
Juan Manuel Muño, Liza Marina Marigo Klein, Alejandra Avagnina,
Alejandro García.

Servicio de Patología. Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas
“Norberto Quirno” (CEMIC). Galván 4102, 1º Piso. Ciudad de Buenos Aires
(Cp1421)

INTRODUCCIÓN

El Ardor, la Hipertrofia Papilar Lingual y la Halitosis (AHH) en conjunto, no han sido descriptos hasta el momento como una entidad clínica. Sin embargo los pacientes que presentan este cuadro no encontraban respuesta efectiva a su demanda. Se les realizaba en algunos casos un diagnóstico terapéutico de Candidiasis Crónica con relación a la Hipertrofia Papilar Lingual y eran derivados a servicios de Periodoncia por su Halitosis Crónica para su evaluación y tratamiento. Muchos de estos pacientes, al concurrir a sus controles posteriores no habían resuelto su cuadro clínico. El ardor de su boca era diagnosticado como Estomatodinia o Síndrome de Ardor Bucal. Un porcentaje considerable (60%) de estos pacientes en los Antecedentes de su Enfermedad Actual, referían padecer malestar gástrico crónico, sin tratamiento dado que tratados cuando consultaban con el médico clínico o con el especialista en gastroenterología, su sintomatología quedaba relativizada a su estado nervioso. Warren y Marshall describieron que el 98 % de los pacientes con gastritis crónica activa y el 80% con úlcera gástrica, tenían microorganismos helicoidales en la superficie de la mucosa gástrica (Marshall BJ *et al.*, 1984). La infección gástrica por *Helicobacter pylori* (HP) es tratada con terapia antibiótica sistémica. El porcentaje de erradicación está comprendido entre el 80% y el 90% con la triple terapia (Lanzoprazol, Amoxicilina y Claritromicina), suministrado por un período de 7 a 10 días como mínimo (Gabryelewicz A, 1996). Sin embargo la reinfección bacteriana es observada en un número considerable de pacientes y las tasas anuales de reinfección en el mundo oscilan entre 0 y el 30% (Della Libera E *et al.*, 2001). Los interrogantes que surgen son de qué modo se

transmite esta infección bacteriana y a que se debe el proceso de reinfección. Algunos investigadores encontraron al HP en placa y saliva, y han sugerido que la diseminación oral sería la principal vía de transmisión. Tanto la placa dental como la saliva podrían actuar como reservorio y tener implicancias en la reinfección una vez erradicada la bacteria del tracto gástrico. Las discrepancias en cuanto al diagnóstico de los pacientes que consultan por AAH con malestar gástrico crónico nos hizo pensar en la acción del HP tanto en la lengua como en el estómago. Nosotros hemos reportado en el 2001 su asociación con el AHH, en un paciente de sexo masculino que padecía de gastritis crónica. Tanto el cuadro bucal como el gástrico estaban relacionados con la acción de esta bacteria. Los métodos de diagnóstico realizados fueron biopsia bucal y gástrica. Las muestras fueron evaluadas con técnica de Giemsa y Biología Molecular con resultados positivos (Adler I *et al.*, 2001; Adler I *et al.*, 2005). El diagnóstico precoz es esencial, para el tratamiento temprano y la curación de estos individuos que consultan con AHH con relación al HP y su posible compromiso gástrico. Por eso es necesario elaborar diseños de investigación que permitan demostrar la asociación entre el cuadro clínico descrito y la infección bacteriana. Así como establecer la sensibilidad y especificidad de los distintos test de diagnóstico implementados para determinar la infección en la cavidad bucal. El objetivo del estudio es estimar el riesgo de infección por la acción del *Helicobacter pylori* en la boca, en los pacientes que presentan ardor, hipertrofia papilar lingual y halitosis, y evaluar la eficacia diagnóstica de la halimetría en relación con la PCR.

MATERIALES Y METODOS

Entre Junio de 2009 y Marzo de 2010 fueron estudiados en forma prospectiva pacientes con sintomatología AHH que refieran malestar gástrico.

Se excluyeron:

- Pacientes menores de 21 años.
- Pacientes con patologías dentales y gingivoperiodontales.
- Pacientes con diagnóstico de: hepatitis C, HIV, enfermedad renal.
- Individuos con valores alterados en el coagulograma.
- Pacientes que recibían medicación antibiótica en forma local-general en los últimos ocho meses, o habían sido sometidos a algún tratamiento antibiótico profiláctico, o que se encontraban en tratamiento gastroenterológico con diagnóstico de infección por HP.

- Pacientes fumadores.
- Pacientes que no Firmaron el consentimiento Informado.

En todos los casos el procedimiento de investigación fue el siguiente:

A-Diagnóstico Estomatológico. A todos los pacientes se les efectuó una historia clínica protocolarizada. El ardor fue evaluado por autoreporte. La hipertrofia de las papilas del dorso lingual se considero con la inspección clínica (Figura 1).

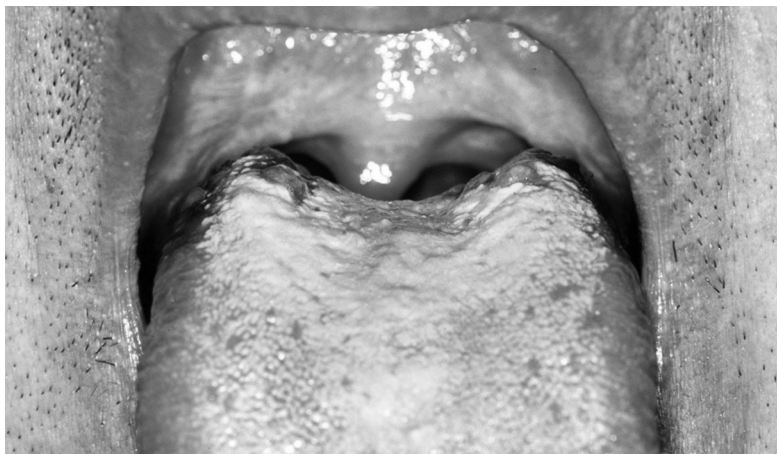


Figura 1: Paciente con AHH.

La halitosis fue evaluada con el *Halimeter® Interscan* modelo RH-17D diseñado para monitorizar el aliento de un individuo, midiendo la concentración de CSV en niveles de partes por billón (ppb), (Figura 2). Se utilizó una boquilla descartable en cada determinación. Se le indicó al paciente que introduzca la boquilla en la boca (aproximadamente 4 centímetros). A cada individuo participante en el estudio se le entregó una hoja informativa con las instrucciones que debía cumplir para la realización de la determinación. Desde la noche anterior evitar tomar cualquier tipo de alimento de efectos reconocidos sobre el aliento (ajo, cebolla, etc.) o comidas fuertes o con especias, no tomar alcohol. Dos horas antes de la atención no ingerir ningún tipo

de alimento o líquido (excepto agua), evitar cepillarse los dientes o utilizar hilo de seda dental, no emplear enjuagues de ningún tipo, no masticar chicles o caramelos y no usar perfume ni lápiz de labios. Las pruebas se realizaron por la mañana entre las diez y las doce horas. Se hicieron tres determinaciones consecutivas, las cuales fueron promediadas y si el valor encontrado en los pacientes superaba 100 ppb, se consideró que presentaban halitosis. Se solicitó la rutina de laboratorio y se efectuó raspaje del área afectada lingual.



Figura 2: La halitosis fue evaluada con el *Halimeter® Interscan*

B-Diagnóstico Serológico: Del suero de los paciente se determino el título de IgG anti-HP (Trinit EIA-G). Se considero un título positivo cuando la muestra presento valores iguales o superiores a 1,1.

C-Diagnóstico por Biología Molecular. Del material en fresco del raspaje se extrajo ADN. Se centrifugo a 15000 rpm por 30 min. y se recupero el *pellet* del tubo por inversión. La muestra fue digerida en Buffer-PK (100mM Tris ClH-ph=8, 25mM EDTA, 0.5 % SDS, 0.01% PK) a 42 °C ON. Las fracciones lipo-proteicas fueron extraídas con Fenol-Cloroformo-Isoamílico (CAR-

LO ERBA, Italia). El ADN purificado fue precipitado con C1Na/Isopropanol y resuspendido en T10E1 (Tris-EDTA). La pureza y el rendimiento del ADN obtenido fueron medidos por espectroscopia. Se analizó la presencia del genoma del *Helicobacter pylori* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con *primers* homólogos a una región que codifica para el antígeno especie-específico, cuya secuencia nucleotídica fue la siguiente: *primer* HP3: (5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC-3') y *primer* HP4: (5'-CCTGCTGGGCATACTTCACCATG-3') que se identifican con los residuos 474 al 496 y 776 al 754 respectivamente. La amplificación fue realizada en un volumen de reacción de 50 µl usando entre 500-1000 ng de ADN total. Cada tubo de reacción contenía 50 pmoles de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ y 1 U de Taq polimerasa (Promega, WI, USA). Después de un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min. fueron realizados 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 1 min., annealing a 58 °C durante 1 min. y elongación a 72 °C durante 1 min.) con una elongación final a 72 °C durante 5 min. Por otro lado se realizó una PCR en condiciones similares para un fragmento de 110 pb del gen de la beta-globina humana como control de amplificación (Saiki R *et al.*, 1985). Todas las PCR fueron evaluadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% en buffer TBE 1X (Tris-Bórico-EDTA), visualizadas con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta (figura 3).

Por otro lado se identificó el genoma del HP mediante una segunda PCR. Se utilizaron *primers* homólogos a una región que codifica para el gen 16S rRNA, cuyas secuencias nucleotídicas fueron las siguientes: *primer* 16S-880fw (5'-ATAGACGGGGACCCGACAAG-3'), y *primer* 16S-999rv (5'-TGGCAAGCCAGACACTCCA-3') que se identifican con los residuos 1030 al 1050 y 1131 al 1149 respectivamente (Glocker E *et al.*, 2005). Se analizó mediante el programa de alineación de secuencias BLAST, la especificidad del fragmento amplificado, este programa permite identificar similitudes entre el amplicon obtenido y las base de datos de ADN del programa (Altschul SF *et al.*, 1997). Para verificar la correcta especificidad del amplicon, se secuenciaron los fragmentos obtenidos por PCR. La secuenciación se realizó con un *kit* comercial *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England). La secuencia fue separada por electroforesis capilar (ABI PRISM™ 310 *Genetic Analyzer*, Applied Biosystem-Perkin Elmer Corporation, Foster City, CA, EEUU). La secuencia obtenida fue analizada con el *ABI PRISM™ DNA Sequencing Analysis Software* (Applied Biosystem-Perkin Elmer Corporation, Foster City, CA, EEUU).

Análisis Estadístico: Se confecciono una base de datos utilizando el *Data Entry* del paquete estadístico SPSS fijándose rango de valores admisibles para las variables dependientes (AAH/otras Patologías) y las variables independientes (HP: si/no) para el procesamiento de la información. Para el análisis de los datos descriptivos, las variables continuas fueron analizadas, con su media, mediana, modo, rango y el error estándar. Las variables categóricas fueron representadas en porcentajes o frecuencias relativas. Se efectuó un análisis factorial de todas las variables y la determinación de un coeficiente de correlación, con un grado de significación del 5% ($< 0,05$). Se realizó el X^2 Mantel-Haenzel-OR-IC (0.95). Se determinó la sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo y Negativo de los estudios realizados en los individuos con AHH, en los cuales se investigó la presencia del mediante serología, histopatología (Giemsa), inmunohistoquímica y biología molecular.

La muestra quedó constituida por 27 pacientes, cuyo rango de edad fue de 24-78 años con una mediana de 64, siendo el 67 % del sexo femenino. (Tabla 1).

Tabla 1

	SEXO FEMENINO N° 18	SEXO MASCULINO N° 9	TOTAL N° 27
EDADES	27-78	24-69	24-78
MEDIA /ES	59,83/3,22	47,33/5,75	55,66/3,13
MEDIANA	65	45	64
%	67	33	100

RESULTADOS.

Se muestran en la Tabla 2 los resultados de la halimetría y de la PCR, y en la Figura 3 se observa la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 9% del producto de amplificación por PCR de la región que codifica para gen 16S rRNA del HP (120 pb). Calle 1-4: Muestras positivas en diferente concentración. Calle 5: Ladder 100pb como marcador de PM. Calle 6: Control positivo. Calle 7: Control negativo.

Tabla 2

N°	Bx	PCR	Halimeter (ppb)
1	495150	neg	98
2	497625	neg	100
3	499872	pos	549
4	499652	pos	265
5	499653	neg	54
6	500420	neg	93
7	500417	neg	88
8	500419	neg	72
9	501301	pos	241
10	501694	neg	48
11	502408	neg	501
12	503004	neg	113
13	503005	neg	95
14	503326	neg	117
15	504040	neg	78
16	504602	neg	65
17	504882	neg	62
18	505695	neg	97
19	505696	neg	53
20	505219	pos	162
21	507028	pos	306
22	507029	neg	254
23	507593	pos	285
24	500418	pos	141
25	500416	neg	34
26	501491	neg	61
27	501547	neg	76

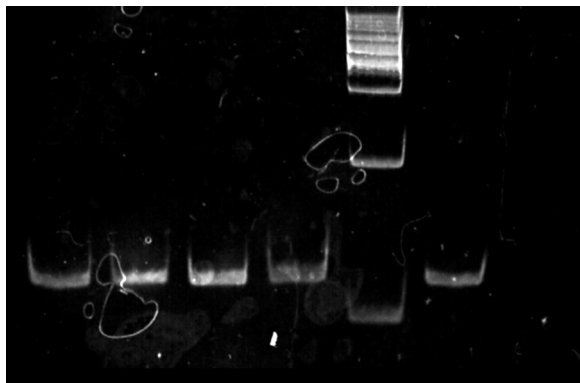


Figura 3

La secuencia obtenida a partir del productos de la segunda PCR coincidió con la *NCBI Reference Sequence* U00679.1, permitiendo verificar la secuencia y el PM teórico calculado de 120 pb de la banda obtenida.

atagacggggacccgcacaagcggaggagcatgtggttaattcgaagatacacgaagaaccttacctag

cttgacattgagagaatccgctagaaatagtgagggtgtctggccttgcca

120 pb

El estudio estadístico se puede observar en las tablas 3-5.

Tabla 3

SEROLOGÍA	HALITOSIS SI	HALITOSIS NO	TOTAL
HP POSITIVO	6	2	8
HP NEGATIVO	6	13	19
TOTAL	12	15	27

OR: 6,5 IC 1,09-36,81

χ^2 : 4,29 $p < 0,03$

Tabla 4

PCR	HALITOSIS/SI	HALITOSIS/NO	TOTAL
HP POSITIVO	7	0	7
HP NEGATIVO	4	16	20
TOTAL	11	16	27

RR: 5 IC 2,08-12,01

 χ^2 (YATES): 10,63 $p < 0,001$ **Tabla 5**

HALIMETRIA	PCR POSITIVA	PCR NEGATIVA	TOTAL
POSITIVO	7	4	11
NEGATIVO	0	16	16
TOTAL	7	20	27

	Valor	IC (95%)
Sensibilidad (%)	100,00	92,86-100,00
Especificidad (%)	80,00	59,97-100,00
Índice de validez (%)	85,19	69,93-100,00
Valor predictivo + (%)	63,64	30,66-96,61
Valor predictivo - (%)	100,00	96,88-100,00
Prevalencia (%)	25,93	7,54-44,31
Razón de verosimilitud	5,00	2,08-12,01
Razón de verosimilitud	—	—

DISCUSIÓN

La infección por HP es una de las más frecuentes a nivel mundial. Esta asociada con el desarrollo de la gastritis crónica, la úlcera gástrica, y constituye un factor de riesgo en el adenocarcinoma gástrico y el linfoma MALT. Sin embargo, estas enfermedades solo se manifiestan en un 15% de las personas infectadas, dependiendo de la virulencia de la especie, la susceptibilidad genética del huésped y los cofactores ambientales (Atherton JC, 1998). Los datos epidemiológicos referentes a la infección por esta bacteria hacen que el tema sea relevante, ya que su incidencia va en aumento en gran número de países, sobre todo aquellos en vías de desarrollo. Los países con alta incidencia de cáncer gástrico tienen también una alta prevalencia de infección por HP. Paralelamente en aquellos países donde la prevalencia de infección por HP es baja también lo es la incidencia de cáncer gástrico. Parkin y colaboradores han referido que cerca del 75% de los cánceres de estómago se

producen en países en vías de desarrollo. Observando una alta incidencia de adenocarcinoma gástrico en el este asiático, el este de Europa y el sur y centro del continente americano (Parkin DM *et al.*, 2001). El diagnóstico precoz es esencial para el control de esta infección. En los últimos años se ha incrementado progresivamente el interés con respecto a la infección por HP en la cavidad bucal, debido a que en el mundo ha surgido la inquietud por establecer las vías de infección, postulándose la oral-oral como la de mayor envergadura (Goodman KJ *et al.*, 1996; Salimi-Khayati A *et al.*, 2003). Desde que en 1983 Warren y Marshall publicaron los primeros datos informando que el 98 % de los pacientes con gastritis crónica activa y el 80% con úlcera gástrica, tenían microorganismos helicoidales en la superficie de la mucosa gástrica (Marshall BJ *et al.*, 1984), diferentes trabajos han demostrado que la bacteria se hallaba presente en la cavidad bucal. El primer trabajo de investigación sobre la presencia del HP en la boca fue reportado en 1989 en Canadá, cuando la bacteria fue cultivada a partir de muestras de placa dental de 71 pacientes con enfermedad gástrica (1,4% HP+ 1/71). Actualmente existen aproximadamente unas 130 investigaciones publicadas que han reportado las implicancias de la bacteria en la placa dental y la saliva. Unos sostienen que el HP en la cavidad oral es una bacteria patógena transitoria y que la boca no es el reservorio natural de este microorganismo (Shames *et al.*, 1989; Améndola R *et al.*; 1998, Mattana CM *et al.*, 1998). En relación a los estudios realizados a nivel mundial, la placa dental ha sido identificada como el segundo reservorio del HP, y el primer reservorio extra gástrico (De Sousa L *et al.*, 2006). En nuestra investigación hemos excluidos los pacientes con patologías dentales y gingivoperiodontales. En Argentina existe una alta prevalencia de infección por HP. Estudios realizados por distintos autores en nuestro país han evidenciado un 70 % de seroprevalencia en poblaciones infantiles de bajo nivel socioeconómico y variaciones de 20 % a 90 % en adultos de diferentes zonas del país. Las condiciones socioeconómicas e higiénicas así como las características ambientales y genéticas de la población son factores determinantes en la adquisición de la infección. En el nordeste de nuestro país, Merino y colaboradores, encontraron una seroprevalencia del 70% en las áreas rurales y del 31% en las áreas urbanas, en niños menores de 14 años, sospechando los investigadores en la calidad del agua como un factor de riesgo y sugiriendo que el alto consumo del mate en esas zonas puede ser una vía de transmisión importante (Merino D *et al.*, 2002). En nuestros pacientes se encontró una seroprevalencia, del 30% (8/27). La prevalencia de infección encontrada coincide con los patrones epidemiológicos

urbanos, teniendo en cuenta que son pacientes residentes de la ciudad de Buenos Aires, que asisten a consulta estomatológica privada y pertenecen a un buen nivel socioeconómico donde las condiciones sanitarias, higiénicas y ambientales no son un problema para ese núcleo social. Debemos destacar que a nivel serológico nosotros investigamos por primera vez en el mundo la presencia de anticuerpos IgM anti HP en pacientes con patologías bucales. En 1992, en Israel, reportaron que pacientes con halitosis e infección gástrica por HP, resolvieron su sintomatología con la medicación antibacteriana (Tiomny E *et al.*, 1992). En la universidad de Bari (Italia) Ierardi y colaboradores asociaron la halitosis con la infección causada por el HP. Evaluaron a 58 pacientes con dispepsia, de los cuales 30 eran HP positivos. Ellos establecieron los niveles de los Compuestos Volátiles Sulfúricos en cada paciente al incluirlo en el momento del diagnóstico y el control posterior después de instaurado el tratamiento antibiótico, el 63% (19/30) de los pacientes solucionaron su halitosis con la erradicación del microorganismo (Ierardi E *et al.*, 1998). En el departamento de Gastroenterología de la Universidad de Tel Aviv comunicaron que no observaron correlación entre la infección por HP y la Halitosis. Esta diferencia con nuestro trabajo se debería a que los pacientes con Glositis concurren a la consulta por su Halitosis, cuyos niveles se determinaron con el Halimeter, mientras que en la investigación llevada a cabo en Tel Aviv recolectaron los datos para medir la Halitosis con una encuesta. Sí reportaron correlación entre el reflujo y la halitosis (Moshkowitz M *et al.*, 2007). En cuadros de Glositis informaron positividad un grupo de investigadores de Croacia, quienes emplearon técnica de PCR y detectaron la presencia del HP en el 16% (43/268) de los pacientes con síndrome de boca ardiente, siendo los controles HP negativos (Gall-Trosejl K *et al.* 2001). En ese país, Brailo y colaboradores, en el año 2006 detectaron anticuerpos anti-HP en 19 % de los pacientes con ardor bucal y glositis (Brailo V *et al.*, 2006). No existen trabajos que hayan evaluado hasta el momento la efectividad de los métodos para arribar al diagnóstico de la infección por HP en la boca. De todo lo observado en este trabajo hemos construido un algoritmo diagnóstico para tal fin (Figura 4)

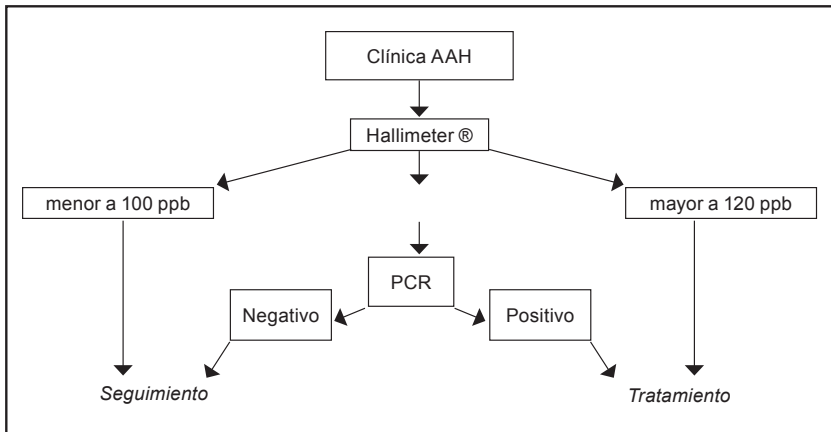


Figura 4: Algoritmo diagnóstico para HP en AHH no invasivo.

En conclusión, a pesar que el numero de individuos reclutado es escaso, el reporte preliminar indica que la medición objetiva de la halitosis es una herramienta que podría incorporarse al diagnostico de AHH, teniendo en cuenta que para los valores comprendidos entre 100 y 120 ppb, sería indispensable la confirmación de la presencia del genoma viral del HP mediante técnicas moleculares.

RESUMEN

El Ardor, la Hipertrofia Papilar Lingual y la Halitosis (AHH) en conjunto, no han sido descriptos hasta el momento como una entidad clínica. Warren y Marshall reportaron que el 98% de los pacientes con gastritis crónica activa y el 80% con úlcera gástrica tenían microorganismos helicoidales en la superficie de la mucosa gástrica. Tanto el cuadro bucal como el gástrico estaban relacionados con la acción de esta bacteria, el *Helicobacter pylori* (HP). El diagnóstico precoz es esencial para el tratamiento temprano y la curación de estos individuos que consultan por AHH con relación al HP y su posible compromiso gástrico. El objetivo del estudio es relacionar el AHH con la acción del HP en la boca. Entre Junio de 2009 y Marzo de 2010 fueron estudiados

en forma prospectiva pacientes con sintomatología AHH que manifeastaban malestar gástrico. A todos los pacientes se les efectuó una historia clínica protocolarizada, solicitud de rutina de laboratorio y raspaje del área lingual afectada. **Del suero de los paciente se determinó el título de IgG anti-HP (Trinití EIA-G).** Del material en fresco del raspaje del área afectada de la lengua se extrajo ADN. Se analizó la presencia del genoma del HP mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con *primers* homólogos a una región que codifica para el antígeno especie-específico. La muestra quedó constituida por 27 pacientes, cuyo rango de edad fue de 24-78 años con una mediana de 64, siendo el 67% del sexo femenino. Siete pacientes fueron doble positivos (halimetría y PCR), 18 doble negativos y 2 halimetría positiva y PCR negativa. Los parámetros estadísticos de la halimetría en relación con la PCR fueron: Sensibilidad 88,89%, Especificidad 77,78%, Valor Predictivo Positivo 66,67%, Valor Predictivo Negativo 93,33%, y Prevalencia 33,33%. En conclusión, a pesar de que el numero de individuos reclutado es escaso, el reporte preliminar indica que la medición objetiva de la halitosis es una herramienta que podría incorporarse al diagnostico de AHH, teniendo en cuenta que para los valores comprendidos entre 100 y 120 ppb sería indispensable la confirmación de la presencia del genoma viral del HP mediante técnicas moleculares.

ABSTRACT

Mouth burn, lingual papillary hypertrophy and halitosis (BHH) together, have not yet been described as a clinical entity. Warren and Marshall reported that 98% of patients with chronic active gastritis and 80% with gastric ulcer, had helicoidal microorganisms on the gastric mucosal surface. Both mouth and gastric profiles were related with the action of this bacteria, the *Helicobacter pylori* (HP). Early diagnosis is essential for early treatment and cure of these individuals who consult on BHH related with HP and its likely gastric compromise. The aim of the study is to relate BHH with HP action in the mouth. Patients with BHH symptoms who manifested gastric disturbance were prospectively studied from June 2009 and March 2010. All patients were subject to protocol clinical history, routine lab tests, and lingual area scraping. Title of IgG anti-HP (Trinití EIA-G) drawing from patient serum was determined. DNA was extracted from fresh scrapes in the lingual area affected. Presence of HP genome was analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR)

with primers homologous to a region encoding for specific-species-antigen. The population was constituted by 27 patients, age ranging from 24 to 68 with a median of 64, being 67% females. Seven patients were double positive (halimetry and PCR), 18 were double negative and 2 were halimetry positive and PCR negative. Halimetry statistical parameters related with PCR were: Sensitivity 88,89%, Specificity 77,78%, Positive Predictive Value 66,67%, Negative Predictive Value 93,33%, and Prevalence 33,33%. In conclusion, despite the low number of patients recruited, the preliminary report shows that objective halitosis measuring is a tool that could be added to BHH diagnosis, taking into account that for values between 100 and 120 ppb, it would be essential to confirm the presence of HP viral genome by molecular techniques.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adler I, Denninghoff V, Álvarez MI, Neffen E, Avagnina A, Elsner B. (2001). Evidencia observada en el paciente. Infección intrabucal por *Helicobacter* en paciente de sexo masculino. Caso clínico. Rev. Del Ateneo Argentino de Odontología. Volumen XL (2): 10-5
2. Adler I, Denninghoff VC, Álvarez MI, Avagnina A, Yoshida R, Elsner B. (2005) *Helicobacter pylori* associated with glossitis and halitosis. *Helicobacter*. Aug;10(4):312-7.
3. Amendola, R; Roldán, C. D; Morgade, L; Solagna, A; Lineado, A; Musi, A. O; Valero, J; Zerbo, O; Kogan, Z; Ferro, F. E; Schenone, L; Corti, R. (1998). Es la placa dentaria reservorio habitual de *Helicobacter pylori*? *Acta gastroenterol. latinoam*; jun 28(2):199-201
4. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-402.
5. Atherton JC. (1998) *H. pylori* virulence factors. *British Medical Bulletin*; 54: 105-120
6. Brailo V, Vučičević-Boras V, Alajbeg IZ, Alajbeg I, Lukenda J, Aeurković M. (2006) Oral burning symptoms and burning mouth syndrome-significance of different variables in 150 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. May 1;11(3):E252-5
7. Della Libera E, Rohr MR, Moraes M, Siqueira ES, Ferrari AP Jr. (2001) Eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal

- ulcer and non-ulcer dyspepsia and analysis of one-year reinfection rates. *Braz J Med Biol Res.* Jun;34(6):753-7.
8. De Sousa L, Vásquez L, Velasco J, Parlapiano D. (2006) Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa, dental plaque and saliva in a population from the Venezuelan Andes. *Invest Clin.* Jun;47(2):109-16.
 9. Gall-Trosejl K, Mravak-Stipetic M, Jurak I, Ragland WL, Pavellic J. (2001) *Helicobacter pylori* colonization of tongue mucosa-increased incidence in atrophic glossitis and burning mouth syndrome (BMS). *J Oral Pathol Med*;30:560-563.
 10. Gabryelewicz, A. (1996) Critical evaluation of the treatment of peptic ulcer diseases associated with *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 47, 51-58.
 11. Glocker E, Berning M, Gerrits MM, Kusters JG, Kist M. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3166-70.
 12. Goldman C, Barrado A, Janjetic M, Balcarce N, Cueto Rua E, Oshiro M, Calcagno ML, Sarraque MM, Fuda J, Weill R, Zubillaga M, Perez-Perez GI, Boccio J. (2006) Factors associated with *H. pylori* epidemiology in symptomatic children in Buenos Aires, Argentina. *World J Gastroenterol.* Sep 7;12(33):5384-8.
 13. Ierardi E, Amoroso A, La Notte T, Francavilla R, Castellaneta S, Marrazza E, Monno RA, Francavilla A. (1998) Halitosis and *Helicobacter pylori*: a possible relationship *Dig Dis Sci.* Dec; 43(12):2733-7.
 14. Marshall BJ, Warren JR. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*;i:1311-4.
 15. Mattana CM, Vega AE, Flores G, de Domeniconi AG, de Centorbi ON. (1998) Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaque. *Rev Argent Microbiol.* Apr-Jun;30(2):93-5
 16. Merino D, Galván M, Fabre A, Balbachán S, Miranda O, Gorodner J, Alonso J (2002) *Helicobacter pylori* infection in children from Northeast Argentina: seroprevalence and its relation with nutritional status and socio-sanitary conditions. *Enf. Emergentes.*; 4 (1): 24-29
 17. Moshkowitz M, Horowitz N, Leshno M, Halpern Z (2007) Halitosis and gastroesophageal reflux disease: a possible association. *Oral Dis.* Nov;13(6):581-5.
 18. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. (2001) Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*; 37 Suppl 8: S4-S66

19. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N. Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
20. Shames B, Krajden S, Fuksa M, Babida C, Penner JL (1989) Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J. Clin Microbiol.*; 27: 2849-2850
21. Salimi-Khayati A, Sharami H, Mansour-Ghanaei F, Sadri S, Fallah MS. (2003) *Helicobacter pylori* aeropositivity and the incidence of hyperemesis gravidarum. *Med Sci Monit.* Jan;9(1):CR12-5
22. Tiomny E, Arber N, Moshkowitz M, Peled Y, Gilat T. (1993) Halitosis and *Helicobacter pylori*. A possible link? *J Clin Gastroenterol.* Oct;15(3):236-7.

VALORACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DEL AIRE EN AMBIENTES INTERNOS DE ASERRADEROS. SU ROL COMO FACTOR DE RIESGO EN ESTE CONTEXTO DE TRABAJO.

Esquivel; Graciela; Arias Irma; Mangiaterra Magdalena; Giusiano Gustavo.

RESUMEN

La concentración y composición de la micota del aire de los aserraderos varía de acuerdo a las condiciones climáticas, al tipo de madera que se procesa y a la tecnología de la producción. La contaminación del aire con microorganismos es el resultado de la contaminación previa de la madera. Las patologías asociadas a esta exposición se relacionan con diversos trastornos respiratorios.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la composición y concentración de la micota aérea de aserraderos localizados en la ciudad de Machagai, provincia del Chaco.

Se tomaron muestras del aire de tres aserraderos con un colector de aire SAS super 100, cada 15 días, durante la primavera de 2009 y el otoño de 2010.

Los mohos fueron identificados por su macro y micromorfología. Se aislaron 43 especies agrupadas en 21 géneros. Sólo se pudieron identificar 12 cepas de levaduras.

La concentración media de UFC/m³ encontrada en los aserraderos fue de 2487 en primavera y 1399 en otoño. Estos valores son menores que los hallados en estudios similares realizados en otros países, donde las condiciones ambientales y el tipo de madera procesada son diferentes.

La mayoría de los géneros encontrados son alergénicos y potencialmente patógenos lo que justifica la realización de estudios para conocer las especies prevalentes y su efecto sobre la salud de los trabajadores. Sería también un aporte llevar a cabo estudios similares en invierno y verano para evaluar el patrón de ocurrencia de los taxa.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los ambientes interiores por microorganismos y subproductos biológicos presentes en el aire puede causar problemas de naturaleza infecciosa y/o alérgica. Los bioaerosoles son aerosoles formados por partículas de origen biológico o con actividad biológica que pueden afectar a seres vivos a través de procesos infecciosos, alérgicos, tóxicos e irritantes.

Los trabajadores de aserraderos están expuestos a la inhalación de los bioaerosoles que contienen diversos agentes alergénicos e inmunotóxicos. Estos pueden ser derivados químicos de la madera (por ej., terpenos, ácidos resínicos) o microorganismos asociados a ella. Las patologías asociadas a esta exposición se relacionan con diversos trastornos respiratorios como la disminución de la función pulmonar, la bronquitis crónica, la hiperreactividad bronquial con irritación de mucosas, la rinitis, y la bronquitis alérgica entre otros (Skórska y col., 2002).

Existe una importante variabilidad cuali – cuantitativa en la micota anemófila de los distintos ambientes, así como la de un mismo lugar si se la estudia en diferentes épocas del año. En este sentido influyen definitivamente factores tales como la velocidad de los vientos y su dirección, temperatura, humedad, tipo de vegetación del área, etc (Samson y col., 1994).

La concentración y composición de la micota en suspensión en el aire de aserraderos varía de acuerdo al tipo de madera que se procesa y la tecnología de la producción. La contaminación del aire con microorganismos es el resultado de la contaminación previa de la madera con estos patógenos. La contaminación de la madera se produce en las etapas en las cuales ésta permanece almacenada, ya sea en forma de rollizo al aire libre o semi procesada dentro de los aserraderos (Dutkiewicz y col., 2001).

La calidad del aire es un factor importante para la salud ambiental y esta calidad está relacionada, en parte, por la carga fúngica presente (Samson y col., 1994). El conocimiento de la misma contribuye a la prevención de afecciones relacionadas con el contacto y la inhalación de conidias o partículas fúngicas.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la concentración y la composición de la micota fúngica del aire de aserraderos localizados en el centro maderero de la provincia de Chaco.

MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se realizó en la ciudad de Machagai, (26°55'35"S y 60°02'56"O), cabecera del Departamento 25 de Mayo en la provincia del Chaco, situada aproximadamente a 150 Km al noroeste de la ciudad de Resistencia. Se halla en la región subtropical con estación seca, donde predomina el viento norte. El suelo es franco limoso arcilloso.

La superficie del ejido urbano es de 35,16 km² y la cantidad de habitantes es, según INDEC 2001, de 18.346 habitantes. Su producción es agrícola, ganadera y maderera. Aproximadamente 180 establecimientos, entre aserraderos y carpinterías artesanales de algarrobo (*Prosopis* sp), quebracho (*Aspidosperma quebracho-blanco*) y de otras maderas autóctonas, están radicados en la ciudad y sus alrededores.

Los aserraderos, en general, presentan una planta techada, con dos o tres paredes y el acopio de los rollizos se realiza próximo a la planta.

Se muestreó el aire de 3 aserraderos (A1, A2, A3) con un colector de aire SAS super 100, utilizando placas de agar papa con cloranfenicol 25%. El volumen de aire impactado (VA) sobre cada placa fue de 100 lt.

Los muestreos se realizaron en la primavera del año 2009 y el otoño de 2010, cada 15 días, entre las 13 y las 14 hs y a una altura de 1,50 m. del nivel del suelo.

En la planta techada (PT) de cada aserradero se tomaron 5 muestras siguiendo un diseño diagonal (Fernández y col., 2009). Se tomó una muestra alejada ± 20 m de cada planta, considerada como ambiente control (AC) para comparar tanto la carga como la diversidad fúngica. También se tomaron muestras (una placa en cada muestreo) en la plaza central (P) de la ciudad, la cual se encuentra equidistante de los tres aserraderos.

Las placas se incubaron a 28°C durante 72 hs. Una vez cumplido el periodo de incubación se determinó el número de colonias (NC) de cada una de las placas de Petri. Se calculó el número de unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire (UFC/m³), aplicando la fórmula según manual del fabricante ($\text{UFC/m}^3 = (\text{NC} \times 1000) / \text{VA}$ – donde VA = 100).

NC = número de colonias; VA = Volumen de aire impactado.

Las cepas de mohos fueron identificadas por su macro y micromorfología. Cada taxa se contabilizó una sola vez por placa, no importando cuantas veces se repetía o si aparecía en las otras placas del mismo aserradero.

Para identificar las especies de determinados géneros se utilizaron medios de cultivo especiales como Nash Snyder, Czapek o Agar malta. Las

colonias que no desarrollaron órganos de fructificación en los subcultivos tras 20 días de incubación a 25-28° C, fueron agrupadas como micelio sin fructificación.

Para la clasificación taxonómica de los mohos se utilizaron las claves de Nelson y col., 1983; Gams, 1971; Onions y col.,1981; Von-Arx, 1981; de Hoog y col.,2000; Samson y col.,2000; Rifai,1969; Bissett,1991; Piontelli y col.,1994; Sivanesan, 1987; Pitt,1986; Ellis, y col.,1987; Klich, y col.,1988 y Carmichael, y col.,1980.

Las levaduras fueron identificadas por las características morfológicas y por pruebas bioquímicas y fisiológicas basadas en la metodología de Krieger van Rij y el sistema comercial API ID 32 C.

Las cepas puras se incorporaron al cepario de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología (área Microbiología e Inmunología) de la Facultad de Medicina (Universidad Nacional del Nordeste), manteniéndose viables por conservación de colonias frescas en viales de plástico con agua destilada estéril.

La correlación estadística de variables discretas se estudió mediante el test de Student, considerándose un nivel de significancia de $p < 0,05$. Se trabajó con el programa Epi info versión 6.

RESULTADOS

Se realizaron 6 muestreos en primavera y 6 en otoño, totalizando 114 placas.

En algunas placas se observó el sobrecrecimiento del género *Rhizopus* y en otras la de *Chrysosporium sitophilum* (*similis*) lo que impidió el recuento de las colonias y obligó a su descarte.

La concentración promedio de las colonias recuperadas en el aire de las 3 plantas techadas y sus respectivas áreas control, como así también, de la plaza se muestran en la **Tabla 1**

Tabla 1 - UFC/ml en las áreas muestreadas en otoño y primavera

	PRIMAVERA		OTOÑO	
	AC	PT	AC	PT
A1	375	2625	1770	1723
A2	1065	2070	565	767
A3	2090	2766	625	1708
Promedio	1177	2487	787	1399
Plaza	405		470	

Referencias Tabla 1: A1: Aserradero 1; A2: Aserradero 2; A3: Aserradero 3.
AC: área control. PT: Planta techada

No se encontró diferencia significativa entre el número de colonias recuperadas de cada PT y su AC en primavera ni en otoño. Lo mismo ocurrió cuando se compararon los resultados obtenidos en cada AC.

Sólo se halló diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las UFC/m³ en primavera y en otoño en el A2.

El promedio de UFC/m³ en todos los casos, excepto en A1 en otoño, fue mayor en PT que en AC.

En algunas placas se observó el crecimiento de dos o tres colonias encimadas en el mismo punto de impacto del aire lo que impidió la separación de las mismas y en algunos casos su identificación.

Se aislaron 43 especies agrupadas en 21 géneros, además de micelios hialinos sin fructificación y levaduras. En la **Tabla 2** se presentan los hallazgos cualitativos, en cada establecimiento discriminados por sector y estación.

Los géneros más frecuentes fueron *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Rhizopus* y *Bipolaris* que estuvieron presentes en más del 50% de las muestras. Las levaduras y el micelio sin fructificación también se encuentran dentro de este grupo.

En todos los casos y en las dos estaciones la diversidad de especies hallada en cada PT fue superior a la encontrada en la AC correspondiente a la misma.

Se separaron 36 colonias levaduriformes de las cuales solo se pudieron identificar 12 debido a la dificultad de algunas de las cepas para desarrollar *in vitro* y a que en muchos casos fue imposible separar las levaduras de los hongos filamentosos, por lo que las pruebas bioquímicas, que necesitan cepas puras, no pudieron aplicarse a la identificación de aquellas. Las cepas de levaduras identificadas correspondieron a los géneros *Rhodotorula*, *Trichosporon* y *Cryptococcus*.

DISCUSIÓN

Los muestreos se realizaron en las estaciones de otoño y primavera, las cuales se corresponden, respectivamente, con los períodos más y menos lluviosos para la región geográfica donde se realizó la experiencia. El objetivo fue observar si las condiciones climáticas influenciaban sobre la composición de la micota aérea. No se observó diferencia significativa relacionada con esta variable, por lo que sería interesante realizar el mismo estudio en invierno y verano donde las temperaturas son extremas.

La franja horaria en el cual se realizó la toma de muestra coincidió con el horario en el que todo el personal de las plantas se encontraba trabajando, las máquinas estaban operativas al 100% y el polvo en movimiento era mayor. La altura del muestreo se corresponde con la zona de respiración de los trabajadores. Cabe comentar, que si bien los trabajadores eran provistos de mascarillas, la mayoría no las usaban alegando incomodidad.

En este trabajo se encontró menor carga fúngica que en los aserraderos de Suiza (Oppliger y col., 2005) Canadá (Duchaune y col., 2000) y Polonia (Dutkiewicz y col., 2001) donde se estudiaron establecimientos cerrados que procesan coníferas, robles (*Quercus* sp) y abedules (*Betula* sp). Los aserraderos muestreados en este trabajo procesaban sólo madera de especies deciduas, palo lanza (*Phyllostylon rhamnoides*), guaraniná (*Brumelia obtusifolia*) y palo piedra (*Diplokeleba floribunda*) en el A1, urunday (*Astronium balansae*) en el A2 y guayaibí blanco (*Patagónula americana* L.) en el A3 y son semiabiertos. Esto último permite el mayor intercambio de aire entre el espacio interior y el exterior. Esta circulación posibilita que la carga fúngica en el aire del lugar donde se encuentran los trabajadores no sea tan elevada como en las plantas donde el espacio es totalmente cerrado.

Los géneros hallados con mayor frecuencia, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Rhizopus* y *Fusarium* son alergénicos e inmunotóxicos y son reconocidos factores de riesgo para enfermedades respiratorias ocupacionales. Han sido asociadas con cuadros de asma, de rinitis y de alergias respiratorias en pacientes atópicos. Las personas que están expuestas a estos alérgenos constantemente son proclives a sufrir alergia respiratoria fúngica (Dutkiewicz y col., 2001). La hipersensibilidad en personas sanas puede presentarse como sinusitis fúngica y si están expuestas en forma continua a altas concentraciones, como alveolitis alérgica extrínseca (Ibañez Henríquez y col., 1998; Ibañez Henríquez y col., 1999; Picco y col., 2000; Antico, 2000; Fluckiger y col., 2000).

Estos mismos géneros afectan al ser humano provocando micotoxicosis por inhalación. Es importante destacar que en las conidias, no en el micelio vegetativo, de algunos mohos se ha demostrado la presencia de mezclas de micotoxinas típicas de la especie en concentración variable. Algunos de éstos fueron aislados en esta experiencia *A. flavus* (aflotoxina), *A. versicolor* (sterigmatocistina), *P. auranteogriseum* (aurantiamina), *P. citrinum* (citrinina) (Fluckiger y col., 2000; Pitt, 1986).

Aspergillus y *Penicillium* fueron informados como agentes causales de alveolitis alérgicas o ODTS (organic dust toxic syndrome) en trabajadores madereros y en otras personas expuestas.

Los resultados obtenidos en este proyecto:

Aportarán al conocimiento de la micota del aire de los aserraderos de una región subtropical, tema sobre el que no hay antecedentes.

Contribuirán al entendimiento de muchas afecciones que padecen las personas que desarrollan sus actividades en este ambiente

Serán información válida en el campo de la medicina para los médicos alergistas, clínicos y epidemiólogos y para la orientación en las medidas profilácticas y estratégicas.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a las bioquímicas Rojas, F. y Cattana, M. por su asistencia técnica en la tipificación de las levaduras.

ABSTRACT

Concentration and composition of sawmills' airborne fungi changes according to climate conditions, type of wood and technology of production. Contaminated wood brings as a result micro-organism air pollution. Pathologies associated to this exposure are related to several respiratory disorders.

The aim of this work was to study the composition and concentration of air borne fungi in sawmills located in Machagai city in Province of Chaco.

Three sawmills' air samples were taken by super 100 SAS collector every 15 days, during spring 2009 and autumn 2010.

Mold strains were identified by their macro and micro-morphology. Forty three species belonging to 21 genera were isolated. Only 12 strains of yeast could be identified.

The average concentration in sawmills was 2487 UFC/m³ in spring and 1399 UFC/m³ in autumn. These values are lower than those found in similar studies in other countries where the environmental conditions and processed wood are different.

Most of the isolated genera are highly allergenic and potentially pathogenic which justifies further studies to know prevailing species and their effect on worker's health.

It would also be a contribution to conduct similar studies in winter and summer to assess the occurrence pattern of taxa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Antico, A. (2000). Environmental factors and allergic airways diseases. *Aerobiología* 165:321-329.
2. William, S.; Beckett, M.D. (2000). Occupational Respiratory Diseases Review Article. *N Engl J Med* 342:406-413
3. Bissett, J. (1991). A Revision of the Genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification, *Can. J. Bot.* 69:2357 - 2372.
4. Bunse, T.; Merk, H.(1992). Mycological aspects of inhalative mould allergies. *Mycoses* 35:61-66
5. Carmichael, J.W.; Kendrick, W.B.; Connors, I.L.; Sigler, L. (1980). General of Hyphomycetes. The University of Alberta Press. Canada.
6. de Hoog, G.; Guarro, J.; Figueras, M.J. (2000). Atlas of Clinical Fungi, 2^a ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, Universitat Rovira I Virgili Reus, España.
7. Duchaine, C. and Mériaux, A.(2000). Airborne microfungi from eastern Canadian sawmills. *Can. J. Microbiol.* 46(7): 612-616
8. Dutkiewicz, J.; Olenchock, S.A.; Krysińska-Traczyk, E.; Skórska, C.; Sitkowska, J.; Prazmo, Z.(2001). Exposure To Airborne Microorganisms In Fiberboard And Chipboard Factories. *Ann Agric Environ Med* 8:191-199
9. Dutkiewicz, J.; Krysińska-Traczyk, E.; Prazmo, Z.; Skórska, C.; Sitkowska, J. (2001). Exposure To Airborne Microorganisms In Polish Sawmills. *Ann Agric Environ Med* 8:71-80
10. Dutkiewicz, J.; Krysińska-Traczyk, E.; Skórska, C.; Milanowski, J.; Sitkowska, J.; Dutkiewicz, E.; Matuszyk, A.; Fafrowicz, B.(1996). Microflora of the air in sawmills as a potential occupational hazard: concentra-

- tion and composition of microflora and immunologic reactivity of workers to microbial aeroallergens. *Pneumonol Alergol Pol* 64(Suppl 1):25-31
11. Ellis, M.B. and Ellis, J.P. (1987). Microfungi on land plants. An identification handbook. Croom Helm. Australia.
 12. Fernández, M.; Mangiaterra, M.; Giusiano, G. (2009). Micota ambiental en la unidad de terapia intensiva de un hospital pediátrico. *Boletín Micológico* 24:41 - 49
 13. Fluckiger, B.; Koller, T.; Monn, C. (2000). Comparison of airborne spore concentrations and fungal allergen content. *Aerobiología* 16: 393-396
 14. Gams, W. (1971). *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze Hyphomycetes. G Fisher Verlag. Stuttgart.
 15. Gómez, M.; Cáceres, M.E.; Granados, M.(2002). Discriminación de la sensibilidad a aeroalergenos en pacientes asmáticos de la ciudad de Salta. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 33(1):532
 16. Ibañez, V.; Thompson, L.; Mañalich, J. (1998). Fluctuación estacional de hongos anemófilos en Santiago- norte- Chile. *Boletín Micológico* 13(1-2): 47-56
 17. Ibañez Henríquez, V.; Rojas Villegas, G. (1999). Aerosporas fúngicas del área oriente de Santiago - Chile (1996-1997). *Boletín Micológico* 14(1-2): 83-89
 18. Kenny, L. (2003). Scientific Principles and Pragmatic Solutions for the Measurement of Exposure to Inhalable Dust. *Ann. occup. Hyg.* 47(6):437-440
 19. Klich, M.A. and Pitt, J.I. (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Reprinted. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of food Processing. Australia.
 20. Krysińska-Traczyk, E.; Skórska, C.; Milanowski, J.; Cholewa, G.; Sitkowska, J.; Dutkiewicz, J.; Fafrowicz, B. (1996) Microflora of the in furniture factors as a potential occupational hazard: concentration and composition of microflora and immunologic reactivity of workers to microbial aeroallergens. *Pneumonol Alergol Pol.* 64 Suppl 1:38-44
 21. Lisbeth, L. (1994). Fungal allergies. En: Samson, R.A.; Flannigan, B.; Flannigan, M.E.; Verhoeff, A.P., Adan, O.C.G.; Hoekstra, E.S. eds. Health implications of fungi in indoor environments. Air quality monographs Vol 2
 22. Nelson, P.E.; Tousson, T.A.; Marasas, F.O. (1983). *Fusarium* species. An illustrated Manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park. London.
 23. Onions, A.H.S.; Allsopp, D.; Eggins, H.O.W. (1981) Smiths's introduction to industrial Micology. 7ª ed. John Wiley & Sons. New York.

24. Oppliger, A.; Rusca, S.; Charrière, N.; Vu Duc, T.; Droz, P. (2005). Assessment of Bioaerosols and Inhalable Dust Exposure in Swiss Sawmills. *Ann. occup. Hyg.* 49(5)385–391
25. Picco, A.M.; Rodolfi, M. (2005). Airborne fungi as biocontaminants at two Milan underground stations. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45: 43-47.
26. Piontelli, L.E. & Toro, M.A. (2003). Manual de identificación para microhongos comunes en alimentos. Universidad de Valparaíso. Escuela de Medicina. Cátedra de Micología. Valparaíso.
27. Pitt, J.I. (1986). A laboratory guide to common *Penicillium* species, Reprinted. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of food Reserch. Australia.
28. Rifai, M.A. (1969). A Revision of the Genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* N° 116
29. Samaniego, A.; Galimany, J.R.; Giaccio, K. (2002). Sensibilidad a aeroalérgenos en pacientes con asma bronquial y/o rinitis alérgica de la ciudad de Formosa. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 33(1):538.
30. Samson, R.A.; Flannigan, B.; Flannigan, M.E.; Verhoeff, A.P.; Adan, O.C.G & Hoekstra, E.S. (1994). Health implications of fungi in indoor environments. *Air quality monographs* Vol 2. Elsevier. Amsterdam.
31. Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. (2000) Introduction to food and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht.
32. Schlunssen, V.; Vinzents, P.S.; Mikkelsen, A.B. Schaumburg I. (2001). Wood Dust Exposure in the Danish Furniture Industry using Conventional and Passive Monitors. *Ann. occup. Hyg.* 45(2)157–164
33. Sivanesan, A. (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological papers*, N° 158. C.A.B. International Mycological Institute.
34. Skórska, C.; Krysinska-Traczyk, E.; Milanowski, J.; Cholewa, G.; Sitkowska, J.; Góra, A.; Dutkiewicz, J. (2002). Response Of Furniture Factory Workers To Work-Related Airborne Allergens. *Ann Agric Environ Med* 9: 91–97
35. Von-Arx, J.A. (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. 3^a ed. Edit J. Crame. Vaduz.

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DEL GRUPO *BACTEROIDES FRAGILIS* A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

Fernández Canigia L (1,11), Litterio M (2,11), Legaria MC (3,11), Castello L (4,11), Predari SC (4,11), Di Martino A (5,11), Rossetti A (6,11), Rollet R (7,11), Carloni G (8,11), Bianchini H (9,11), Radice M (10), Gutkind G (10),
and the Anaerobic Group

1- Hospital Alemán, 2- Hospital Nacional de Pediatría "Prof. Dr J. P. Garrahan", 3- Hospital General de Agudos "Dr. E. Tornú, 4- Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari - UBA 5- Sanatorio Mitre, 6- HIGA Pte. Perón, Avellaneda, 7- Hospital de Infecciosas "F. Muñiz", 8- Facultad de Ciencias Veterinarias - UBA, 9- Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Dr. Norberto Quirno (CEMIC), 10- Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA, 11-Subcomisión de Bacterias Anaerobias, SADEBAC, AAM.

INTRODUCCIÓN

Las tasas de resistencia a los antibióticos se encuentran en permanente aumento especialmente para los microorganismos aislados con más frecuencia de infecciones en humanos, como son las bacterias aerobias: enterobacterias, bacilos gram negativos no fermentadores, estafilococos y enterococos. En oposición a esta realidad la actividad de los antimicrobianos frente a las bacterias anaerobias se ha considerado relativamente estable, mostrando patrones de resistencia predecibles.

Sin embargo, en las dos últimas décadas se ha observado un incremento en la resistencia a los antibióticos en este grupo de bacterias. Entre las especies anaerobias, las pertenecientes al grupo *Bacteroides fragilis* son las que han mostrado mayores variaciones, documentándose inclusive aislamientos resistentes a los antibióticos considerados más activos, como son los b-lactámicos con inhibidores de b-lactamasa, los carbapenemes y el metronidazol, lo cual hace poco predecible la terapia empírica inicial (12, 15, 18, 16, 29, 31) . Por otro lado, el grupo *B. fragilis*, es el que se aísla con más frecuencia de infecciones intra-abdominales, de piel y partes blandas y en bacteriemias (18).

Debido a las variaciones observadas en las tasas de resistencia en nuestro país y en otras zonas geográficas, es necesario realizar estudios periódicos de vigilancia para monitorear los cambios que ocurren a través del tiempo (18).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la sensibilidad *in vitro* a 10 antibióticos frente a especies del grupo *B. fragilis* provenientes de muestras clínicas, aisladas de diferentes centros de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de otras ciudades de la República Argentina.

MATERIALES Y METODOS

Aislamientos. Se incluyeron 363 aislamientos únicos y consecutivos del grupo *B. fragilis* colectados durante el período 2006 a 2009. Los 17 centros participantes y el número (n) de cepas recuperado fueron: por la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, el Hospital General de Agudos “Dr. E. Tornú (n=77), el Hospital Nacional de Pediatría “Prof. Dr. J. P. Garrahan” (n=70), el Hospital Alemán (n=69), el Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari - UBA (n=22), el Hospital de Infecciosas “F. J. Muñiz” (n=22), el Sanatorio Mitre (n=7), el Hospital “Dr. P. Piñero” (n=5) y el Sanatorio Mater Dei (n=2); por la provincia de Córdoba, la Clínica Reina Fabiola, (n=25), el Hospital Nacional de Clínicas (n=14) y la Clínica Privada de Río Cuarto (n=2); por la provincia de Chaco, el Hospital Dr. J. C. Perrando, Resistencia (n=21); por la provincia de Neuquén, el Hospital Provincial de Neuquén (n=10); por la provincia de Buenos Aires, HIGA “Dr. A. Piñero”, Junin (n=9) y el Hospital Eva Perón, San Martín (n=2), por la provincia de Santa Fe, la Clínica Regional Privada, San Genaro (n=5); y por la provincia de Mendoza el Hospital Central Mendoza (n=1).

Las distribución de especies estudiadas fue la siguiente: *Bacteroides fragilis* (198), *Bacteroides thetaiotaomicron/ovatus* (69), *Bacteroides caccae* (30), *Bacteroides vulgatus* (27) y “otros” *Bacteroides* del grupo *B. fragilis* (39). Los aislamientos se conservaron en freezer de -70°C hasta ser utilizados.

Antibióticos. Se realizaron las pruebas de sensibilidad a los siguientes antibióticos: ampicilina/sulbactama, piperacilina/tazobactama, cefoxitina, imipenem, moxifloxacina, clindamicina y metronidazol provistos por el Servicio de antimicrobianos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”; ertapenem provisto por Merck & Co, West Point, PA, EE.UU.; doripenem provisto por Janssen-Cilag, Argentina y tigeciclina, por Wyeth Pharmaceutical, Argentina.

Pruebas de sensibilidad. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) (mg/ml) utilizando el método de dilución en agar de acuerdo a las normas del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), M11-A7, 2007

(6). Se utilizó agar Brucella suplementado con vitamina K 1 µg/ml, hemina 5 µg/ml y 5% de sangre lacada, el inóculo inicial fue @ 1×10^8 UFC/ml. Se incubó en cámara de anaerobiosis (4% CO₂, 5% H₂, 91% N₂) durante 48 h a 35 °C. Las cepas de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 fueron usadas como controles. Se utilizaron los puntos de corte propuestos por el CLSI, documento M11-A7, 2007. Debido a que no existen puntos de corte para doripenem y tigeciclina se utilizaron los puntos de corte establecidos para imipenem y ertapenem para el primer antibiótico y los propuestos por la Food and Drug Administration (FDA) para el segundo (30). Para los carbapenemes se consideró sensibilidad disminuida cuando la CIM resultó ≥ 4 mg/ml [incluye aislamientos sensibles (CIM=4 mg/ml) e intermedios (CIM= 8 µg /ml)].

Screening fenotípico para evaluar la presencia de metalo-b-carbapenemasas (MBL). Se evaluó la inhibición de las MBL con EDTA (0,4 mM) realizando en paralelo la CIM a imipenem y la CIM a imipenem+EDTA a las cepas con CIM ≥ 4 µg/ml a alguno de los carbapenemes. Se consideró positiva una disminución ≥ 3 títulos de la CIM a imipenem con el inhibidor con respecto a la CIM a imipenem.

Detección del gen de la MBL. En los aislamientos que presentaron CIM ≥ 4 µg/ml a algunos de los carbapenemes se estudió la presencia del gen *cfiA* por el método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) empleando ADN total. Dicho gen codifica para la carbapenemasa y ha sido descrito en *B. fragilis*. Se utilizaron los cebadores descritos por Kato *et al.* (13): GBI-1CCCAACTCTCGGACAAAAGTG y GBI-2 AGTGAATCGGTGAATCCATG.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los resultados de CIM⁵⁰, CIM⁹⁰, rango y porcentajes de sensibilidad para los 10 antibióticos probados.

Las tasas de sensibilidad a los antibióticos b-lactámicos para el total de las especies por orden de actividad fueron: imipenem 99%, piperacilina/tazobactam 99%, doripenem 98%, ertapenem 96%, ampicilina/sulbactam 92 % y cefoxitina 72%. Para los antibióticos no b-lactámicos las tasas fueron: metronidazol 100%, tigeciclina 99%, moxifloxacina 91% y clindamicina 52%.

Los aislamientos de *B. fragilis* fueron los más sensibles a los antibióticos comparado con las otras especies del grupo, especialmente con respecto a ampicilina sulbactama, cefoxitina y clindamicina. Por otro lado, *B. vulgatus* fue la especie que presentó menor sensibilidad a los b-lactámicos con inhibidores de betalactamasa, pero no se observaron aislamientos con sensibilidad disminuida a los carbapenemes. Esta especie junto con las agrupadas como "otros" *Bacteroides*, fueron las que presentaron mayor resistencia a moxifloxacina, aproximadamente el doble que en las otras especies.

Las tasas globales de sensibilidad a moxifloxacina fueron de un 91%, sin embargo se observa un corrimiento de las CIM a valores de resistencia (Fig. 1).

Al igual que lo observado en estudios previos, cefoxitina y clindamicina fueron los antibióticos menos activos. Clindamicina fue el que presentó los niveles más bajos de sensibilidad dentro de los antibióticos probados, con un rango de 42% a 74,7% frente a *B. thetaiotomicron/ovatus* y a *B. fragilis*, respectivamente.

Tabla 1. Actividad *in vitro* de 10 antibióticos frente a 363 aislamientos del grupo *Bacteroides fragilis*.

Microorganismos (n)/ Antibióticos	Rango	CIM (µg/ml) CIM50	CIM90	Sensible	Categoría % Intermedio	Resistente
<i>Bacteroides fragilis</i> (198)						
Ampicilina/sulbactama	0,125 - 128	1	8	97,0	1,5	1,5
Piperacilina/tazobactama	≤0,03->512	0,25	2	99,0	0,0	1,0
Cefoxitina	1 - 256	16	32	82,8	11,1	6,1
Ertapenem (126)	0,06->64	0,125	0,5	98,5	0,0	1,5
Imipenem	≤0,015 - >64	0,125	0,5	98,5	0,0	1,5
Doripenem (159)	0,03 - >64	0,25	1	97,5	0,6	1,9
Clindamicina	≤0,125 - >256	1	>256	74,7	2,5	22,7
Metronidazol	≤0,06 - 4	0,5	1	100,0	0,0	0,0
Moxifloxacina	0,06 - 64	0,5	2	89,9	2,0	8,1
Tigeciclina	≤0,03 - 4	0,125	1	99,5	0,5	0,0
<i>Bacteroides thetaiotomicron/ovatus</i> (69)						
Ampicilina/sulbactama	0,5 - 32	0,5	1	87,0	8,7	4,3
Piperacilina/tazobactama	≤0,03 - 64	≤0,03	4	98,6	1,4	0,0
Cefoxitina	4 - 128	4	32	49,3	27,5	23,2
Ertapenem (49)	0,125 - >64	0,12	1	89,8	4,1	4,1
Imipenem	≤0,015 - 16	≤0,015	0,125	98,6	0,0	1,4
Doripenem (58)	0,125 - 64	0,125	0,25	96,6	0,0	3,4
Clindamicina	≤0,125 - >256	≤0,125	4	42,0	18,8	39,1
Metronidazol	≤0,06 - 2	≤0,06	0,5	100,0	0,0	0,0
Moxifloxacina	0,125 - 64	0,125	1	89,9	2,9	7,2
Tigeciclina	≤0,03 - 2	≤0,03	0,125	100,0	0,0	0,0

Tabla 1. Continuación

<i>Bacteroides caccae</i> (30)						
Ampicilina/sulbactama	0,5 - 16	1	4	90	10	0
Piperacilina/tazobactama	≤0,03 - 8	0,25	4	100	0	0
Cefoxitina	4 - 128	16	64	63,3	16,7	20
Ertapenem (19)	0,125 - 8	0,5	4	94,7	5,3	0
Imipenem	≤0,015 - 2	0,125	0,5	100	0	0
Doripenem (25)	0,125 - 8	-,25	1	96	4	0
Clindamicina	≤0,125 - >256	1	>256	63,3	10	26,7
Metronidazol	≤0,06 - 4	0,5	1	100	0	0
Moxifloxacina	0,125 - 16	0,5	4	86,7	6,7	6,7
Tigeciclina	≤0,03 - 4	0,5	1	96,7	3,3	0,0
<i>Bacteroides vulgatus</i> (27)						
Ampicilina/sulbactama	0,125 0 128	4	16	74,1	18,5	7,4
Piperacilina/tazobactama	0,25 - 512	2	8	96,3	0,0	3,7
Cefoxitina	0,5 - 128	8	32	81,5	7,4	11,1
Ertapenem (24)	0,125 - 2	0,5	1	100,0	0,0	0,0
Imipenem	≤0,015 - 4	0,25	1	100,0	0,0	0,0
Doripenem	0,06 - 1	0,25	0,5	100,0	0,0	0,0
Clindamicina	≤0,125 - >256	0,5	>256	66m7	3,7	29,6
Metronidazol	0,25 - 4	0,5	1	100,0	0,0	0,0
Moxifloxacina	0,06 - 128	1	8	81,5	3,7	14,8
Tigeciclina	≤0,03 - 2	0,06	0,5	100,0	0,0	0,0
Otros <i>Bacteroides</i> del grupo <i>B. fragilis</i> (39)1						
Ampicilina/sulbactama	≤0,125 - 32	2	16	87,2	10,3	2,6
Piperacilina/tazobactama	≤0,03 - 64	1	8	97,4	2,6	0,0
Cefoxitina	4 - 128	16	64	61,5	20,5	17,9
Ertapenem (34)	0,06 - 16	0,5	2	87,1	0,0	2,9
Imipenem	0,03 - 4	0,25	0,5	100,0	0,0	0,0
Doripenem (37)	0,125 - 4	0,25	1	100,0	0,0	0,0
Clindamicina	≤0,125 - >256	2	>256	51,3	7,7	41,0
Metronidazol	0,06 - 4	0,5	2	100,0	0,0	0,0
Moxifloxacina	≤0,03 - 64	1	16	79,5	5,1	15,4
Tigeciclina	≤0,03 - 4	0,125	1	94,9	5,1	0,0

(1) Otros *Bacteroides* del grupo *B. fragilis*: *Parabacteroides* (*Bacteroides*) *distasonis*, 7; *Bacteroides uniformis*, 7; *Bacteroides stercoris*, 7; *Bacteroides merdae*, 2; *Bacteroides* spp., 16.

Entre los antibióticos no b-lactámicos, el metronidazol y la tigeciclina fueron los más activos. Sólo se observaron aislamientos con sensibilidad disminuida (CIM= 4 µg/ml) para tigeciclina, especialmente en *B. caccae* (3,3%) y en "otros" *Bacteroides* spp. (5,1%). Todos los aislamientos, independientemente de la especie, fueron sensibles al metronidazol.

Se detectaron aislamientos resistentes a los carbapenemes y a la piperacilina/ tazobactama. Las tasas de resistencia (intermedio y resistente) de *B. fragilis* a imipenem, doripenem y ertapenem fueron de 1,5%, 2,5% y 4%, respectivamente. Para las otras especies del grupo el promedio de resistencia

fue de 0,6%, 2% y 4,8%, respectivamente, siendo *B. thetaiotaomicron/ovatus* la especie que presentó los porcentajes más elevados. La alta resistencia a piperacilina/tazobactama (CIM ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) fue asociada a los aislamientos de *B. fragilis* con alta resistencia a imipenem.

En la tabla 2, se muestran los resultados de la evaluación de la metalo-carbapenemasa y la detección del gen *cfiA* descrito para *B. fragilis*. En 23 aislamientos se observó una CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ para los carbapenemes, siendo el ertapenem el carbapenem menos activo. El gen *cfiA* que codifica la metalo- β -lactamasa se detectó en 8 aislamientos de *B. fragilis*, tres de ellos presentaron alta resistencia a los tres carbapenemes, la cual revirtió por el agregado de EDTA (disminución de la CIM de imipenem ≥ 3 títulos). En los 5 restantes con sensibilidad disminuida a ertapenem y doripenem, la inhibición con EDTA sólo se observó en 3 de ellos. No se detectó la presencia de *cfiA* en

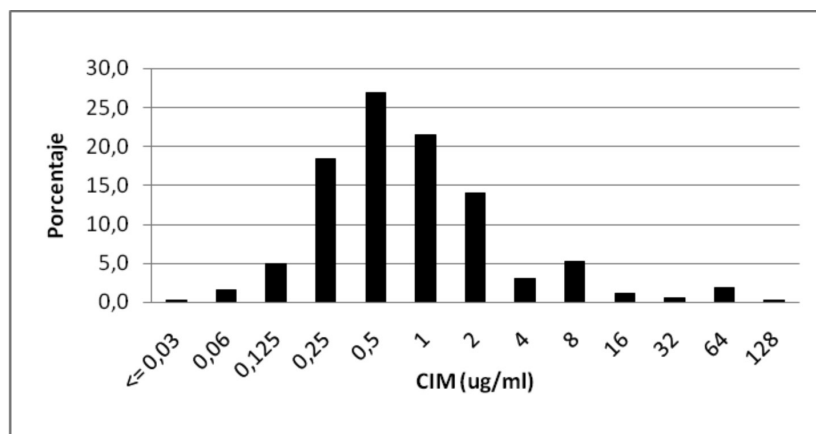
Tabla 2. Caracterización de la metalo-carbapenemasa en aislamientos con CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ a ertapenem

Centro	Especie	CIM ($\mu\text{g/ml}$)				Inhibición EDTA	Gen <i>cfiA</i>
		ERT	IMI	IMI+EDTA	DOR		
2.	<i>B. fragilis</i>	>64	>64	$\leq 0,015$	>64	+	PO
1	<i>B. fragilis</i>	>64	32	0,125	>645	+	PO
1	<i>B. fragilis</i>	32	32	0,06	32	+	PO
1	<i>B. fragilis</i>	8	4	$\leq 0,015$	4	+	NG
3	<i>B. fragilis</i>	8	0,5	0,125	4	—	PO
1	<i>B. fragilis</i>	4	2	$\leq 0,015$	2	+	NG
1	<i>B. fragilis</i>	4	1	0,125	4	+	PO
1	<i>B. fragilis</i>	4	1	0,125	4	+	PO
2	<i>B. fragilis</i>	4	0,5	0,125	4	—	PO
1	<i>B. fragilis</i>	4	0,5	0,125	1	—	NG
2	<i>B. fragilis</i>	4	0,5	0,125	1	—	NG
5	<i>B. fragilis</i>	4	0,25	0,03	8	+	PO
6	<i>B. fragilis</i>	4	0,06	$\leq 0,015$	4	—	NG
8	<i>B. fragilis</i>	4	0,25	0,03	2	+	NG
1	<i>B. caccae</i>	8	2	0,125	8	+	NG
4	<i>B. caccae</i>	4	0,5	0,125	1	—	NG
3	<i>B. caccae</i>	4	0,5	$\leq 0,015$	0,5	+	NG
3	<i>B. thetaiotaomicron/ovatus</i>	>64	16	8	64	—	NG
4	<i>B. thetaiotaomicron/ovatus</i>	32	4	0,5	16	+	NG
1	<i>B. thetaiotaomicron/ovatus</i>	8	2	0,5	4	—	NG
1	<i>B. thetaiotaomicron/ovatus</i>	8	1	$\leq 0,015$	4	+	NG
7	<i>B. thetaiotaomicron/ovatus</i>	4	0,5	$\leq 0,015$	1	+	NG
1	<i>B. stercoris</i>	16	4	$\leq 0,015$	4	+	NG

ERT: ertapenem, IMI: imipenem, DOR: doripenem, PO: positivo, NG: negativo.

otras especies del grupo *B. fragilis*, inclusive en el aislamiento de *B. thetaio-taomicron/ovatus* resistente a los tres carbapenemes en el cual tampoco se observó la inhibición con EDTA. Se probaron como controles 22 aislamientos sensibles a los carbapenemes (CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$), los cuales fueron negativos para la detección de *cfiA*.

Se evaluó la distribución de los aislamientos según el sitio de origen de la muestra. El 66% de los aislamientos correspondieron a foco abdominal, el 16% a piel y partes blandas, el 9% al tracto genitourinario y otros focos fueron el 9%. De 337/363 aislamientos de los cuáles se consignó el tipo de muestra, el 12% correspondieron a hemocultivos, de los cuáles en el 71% se aisló *B. fragilis* y en el 29% restante otras especies del grupo. Los aislamientos que presentaron resistencia absoluta a los carbapenemes correspondieron, dos a abdomen (un aislamiento de hemocultivo), uno a hueso y uno a líquido pericárdico. La menor actividad de moxifloxacina se observó en los aislamientos de piel y partes blandas, 79% para *B. fragilis* y 81% para las otras especies del grupo *B. fragilis*.



* Indica el punto de corte de sensibilidad

Fig. 1- Distribución de las CIM de moxifloxacina de los 363 aislamientos

DISCUSIÓN

El grupo *B. fragilis* ha mostrado variabilidad en los patrones de resistencia a lo largo de los años, tanto en relevamientos nacionales como en la literatura internacional. De ellos se deduce que hay variaciones entre las diferentes regiones geográficas, lo que demuestra la necesidad de realización de los estudios de vigilancia locales y periódicos (7, 8, 11, 14, 27).

En comparación con estudios anteriores llevados a cabo por esta Subcomisión de Bacterias Anaerobias (SBA), observamos que ampicilina/sulbactama, un antibiótico recomendado para el tratamiento de las infecciones por anaerobios, mostró una estabilización en los porcentajes de resistencia, con respecto al último relevamiento realizado en nuestro país, con un 97% de sensibilidad para *B. fragilis* y un promedio de 85% (dato no mostrado) de sensibilidad para otros *Bacteroides* del grupo *B. fragilis*, con respecto al 90,4% y al 82,4%, respectivamente, observado en el relevamiento realizado en el período 1999-2002 (7, 15).

Los datos sobresalientes del presente estudio fueron la detección -por primera vez- de aislamientos resistentes y con sensibilidad disminuida a los carbapenemes (imipenem, ertapenem y doripenem) y de resistencia a piperacilina-tazobactama. A pesar de ello, dichos antibióticos continúan siendo los b-lactámicos más activos frente a estos microorganismos. La emergencia de este tipo de resistencia ha sido informada en relevamientos de otras áreas geográficas en la última década. Se ha observado, afortunadamente, que la misma ha permanecido estable a través del tiempo con una prevalencia similar a la observada en este estudio (2, 26, 28).

La producción de una MBL del grupo 3 de Karen Bush (5) codificada por el gen *cfiA* ha sido descripta como la responsable de la resistencia a estos antibióticos en *B. fragilis* (1, 22, 24). No se encuentran datos sobre la detección de esta enzima en otras especies del grupo. En este trabajo investigamos la presencia de MBL mediante dos ensayos, la prueba de inhibición con EDTA utilizando como sustrato el imipenem y la detección del gen de *cfiA*.

El análisis de la detección fenotípica empleando EDTA mostró resultados no concluyentes y no se pudo correlacionar en todos los casos con la producción MBL. El ertapenem fue el mejor sustrato para esta enzima y probablemente su utilización para el ensayo fenotípico podría ser más sensible y específico que la utilización de imipenem, como ya fue documentado con meropenem antibiótico no probado en este estudio (4).

La detección del gen codificante de la MBL no siempre correlaciona altos valores de CIM para los carbapenemes. El gen puede ser silente o ser expresado y esto depende de promotores que regulan su transcripción. Se ha demostrado que la mutación responsable de los altos niveles de resistencia resulta de la inserción de elementos de inserción (IS) que proveen un promotor eficiente inmediatamente *upstream* del gen *cfiA* (13, 21, 23). En este trabajo se detectó el gen codificante pero no se estudió su regulación. Si bien no se analizó la totalidad de los aislamientos, en las 22 cepas con CIM $\leq 2\mu\text{g/ml}$ utilizadas como controles, el gen no se detectó, sugiriendo una frecuencia de portación similar a lo observado en la bibliografía (1,9 a 4%) (32).

En este estudio la sensibilidad global a moxifloxacina fue del 91%. Se detectó resistencia variable, según la especie, con un rango de 6,7% para *B. caccae* a 15% para *B. vulgatus* y para "otros" *Bacteroides* del grupo *B. fragilis*. Nuestros resultados no concuerdan con los altos niveles de resistencia informados por otros autores. Snyderman *et al.* y Betriu *et al.* informan porcentajes totales de resistencia absoluta de un 34,5% y 13,9%, respectivamente. Snyderman *et al.* refieren rangos de resistencia según la especie de 27,4% a 54,7% para *B. fragilis* y *B. vulgatus*, respectivamente y de 9% a 25% para *B. fragilis* y *B. uniformis* en el trabajo español, en el que observan además, un aumento de 8 veces en la CIM⁹⁰ en 10 años de vigilancia (2, 28). Moxifloxacina, es un antibiótico utilizado para el tratamiento de las infecciones abdominales, si bien en el presente estudio se observa buena actividad, consideramos que debe seguir siendo monitoreado, debido a que observamos un corrimiento de las CIM hacia los valores de resistencia como lo han informado otros autores (9, 19, 20).

La clindamicina y la cefoxitina presentaron valores de resistencia inaceptablemente altos como para ser utilizados en forma empírica frente a este grupo bacteriano, como ya fue observado en estudios previos en nuestro país y en la literatura internacional (2, 7, 31). La clindamicina, con respecto al relevamiento anterior, disminuyó la actividad frente a *B. fragilis* de 83,9% a 74,7% y en las otras especies del grupo *B. fragilis* se observó una baja actividad, similar al período anterior (55,9% vs. 52,1%). Con respecto a la cefoxitina, las tasas de sensibilidad fueron similares al estudio anterior y, como era esperable, fue menos activa frente a las otras especies del grupo *B. fragilis* (sensibilidad global 60%, dato no mostrado).

Dentro de los antibióticos no b-lactámicos, el metronidazol y la tigeciclina son los que mostraron mejor actividad. Estos datos son coincidentes con lo observado en la literatura; sin embargo, para tigeciclina en nuestro estudio el

rango de CIM⁹⁰ (0,125 a 1 mg/ml) es menor al observado por otros autores (4 a 8 mg/ml) (3, 10).

Es importante destacar que el metronidazol, un antibiótico tradicionalmente utilizado para el tratamiento de infecciones por anaerobios, continúa mostrando una excelente actividad frente a estas bacterias en nuestro medio. No se observó resistencia a diferencia de lo que ocurre en Europa y con menor frecuencia en Estados Unidos (14, 17, 25, 27).

En este relevamiento se observa que hay variaciones de la resistencia con respecto a estudios anteriores, algunos antibióticos como la clindamicina ha disminuido su actividad y otros, como la ampicilina/sulbactama y el metronidazol permanecen estables y activos. Nuevos antibióticos como la tigeciclina y la moxifloxacina, actualmente con buena actividad frente a este grupo requieren vigilancia de acuerdo a lo expuesto.

El notable hallazgo de este estudio fue la emergencia de resistencia a los carbapenemes y a la piperacilina/tazobactama. Quedan por evaluar los mecanismos de regulación de la expresión del gen *cfiA*, así como la probable presencia de mecanismos concomitantes y los mecanismos que median la resistencia en otras especies diferentes a *B. fragilis*.

Los cambios observados en los patrones de sensibilidad en el grupo *B. fragilis* en Argentina, determina la necesidad de continuar con el monitoreo periódico de la sensibilidad a los antibióticos en este grupo para guiar la selección de la terapia empírica apropiada.

Otros participantes de la vigilancia:

M Bottiglieri, Clínica Reina Fabiola, Córdoba; M Rocchi, Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba; IA Marqués, Hospital "Dr. J C Perrando", Resistencia, Chaco; M Machain (Junín, Bs As); MC Mauro, Clínica Regional Privada, San Genaro, Santa Fe; MR Nuñez, Hospital Provincial de Neuquén, Neuquén; D. Ballester Hospital "Dr. P. Piñero", CABA.

SUMMARY

In the past two decades the rates of antimicrobial resistance has increased in anaerobic bacteria. *Bacteroides fragilis* group is the one that shows the most important variations in resistance rates to the antibiotics, including those with high activity, like carbapenems and metronidazole. The aim of this study was to determine the susceptibility pattern of *B. fragilis* group to ten antimicrobial agents with known activity against anaerobes.

A total of 363 non-duplicate clinical isolates of the *B. fragilis* group collected from 2006 to 2009 at 17 centers of Argentina were included. *Bacteroides fragilis* (198), *Bacteroides thetaiotaomicron/ovatus* (69), *Bacteroides caccae* (30), *Bacteroides vulgatus* (27), and "other" *B. fragilis* group species (39). The following antibiotics were tested: ampicillin-sulbactam (AMS), piperacillin-tazobactam (PTZ), cefoxitin (FOX), ertapenem (ETP), imipenem (IMI), doripenem (DOR), clindamycin (CLI), metronidazole (MTZ), moxifloxacin (MXF), and tigecycline (TIG). Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined according to the reference agar dilution method described by the CLSI (M11 - A7, 2007). The presence of the *cfiA* metallo- β -lactamase gene was accomplished by PCR. The inhibition of MBLs with EDTA was evaluated comparing MICs for IMI respect IMI+EDTA (0.4 mM) in those strains that displayed MIC^{ERTA} $\geq$ 4 μ g/ml. A reduction of the carbapenem/EDTA MIC by $\geq$ 3 dilutions was considered a positive result.

The susceptibility rates were: PTZ 99%, AMS 92 %, FOX 72%, TIG 99%, MXF 91%, and CLI 52%. While no MTZ resistance was found, 1%, 2% and 4% of *B. fragilis* group strains were resistant to IMI, DOR and ETP, respectively (with *B. fragilis* 1.5%, 2.5% and 4%, and the other species of *B. fragilis* group 0.6%, 2%, 4.8% for IMI, DOR and ETP, respectively), constituting the first carbapenem resistant isolates detected in Argentina. In 8/23 isolates that displayed reduced susceptibility to ERT (MIC $\geq$ 4 μ g/ml) the *cfiA* gene was present; all of them belonging to *B. fragilis sensu stricto*. Three out of eight *cfiA* positive isolates were full resistant to carbapenems while 4/8 isolates showed low level resistance (MICs, 4-8 μ g/ml). The EDTA inhibition was a good predictor of the presence of MBL in the full resistant *B. fragilis* strains, but showed discrepant results with reduced susceptibility strains.

In general, *B. fragilis* was more susceptible to antimicrobials than were other *Bacteroides* species. On the other hand, *B. vulgatus* was more resistant to ampicillin-sulbactam and piperacillin-tazobactam, and *B. thetaiotaomicron/ovatus* were more resistant to carbapenems than were other *Bacteroides fragilis* group species. *B. vulgatus* and the "other" *Bacteroides* group species were more resistant to moxifloxacin, 14.8% and 15.4%, respectively.

In this report we alert about the emergence of *Bacteroides fragilis* group strains resistant to PTZ and to carbapenems. In our country, the changing susceptibility profile of *B. fragilis* group strains emphasizes the need to monitor the antibiotic susceptibility patterns of *B. fragilis* group organisms in order to guide the selection of appropriate antimicrobial therapy.

Anaerobic Group

M Bottiglieri, Clínica Reina Fabiola, Córdoba; M Rocchi, Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba; IA Marqués, Hospital "Dr. J C Perrando", Resistencia, Chaco; M Machain (Junín, Bs As); MC Mauro, Clínica Regional Privada, San Genaro, Santa Fe; MR Nuñez , Hospital Provincial de Neuquén, Neuquén; D. Ballester Hospital "Dr. P. Piñero", CABA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bandoh, K., Y. Muto, K. Watanabe, N. Katoh, and K. Ueno. 1991. Biochemical properties and purification of metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 35:371-2.
2. Betriu, C., E. Culebras, M. Gomez, F. Lopez, I. Rodriguez-Avial, and J. J. Picazo. 2008. Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period, 1997 to 2006, in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother 52:2686-90.
3. Betriu, C., E. Culebras, M. Gomez, I. Rodriguez-Avial, and J. J. Picazo. 2005. In vitro activity of tigecycline against *Bacteroides* species. J Antimicrob Chemother 56:349-52.
4. Bogaerts, P., A. Engelhardt, C. Berhin, L. Bylund, P. Ho, A. Yusof, and Y. Glupczynski. 2008. Evaluation of a new meropenem-EDTA double-ended Etest strip for the detection of the *cfiA* metallo-beta-lactamase gene in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. Clin Microbiol Infect 14:973-7.
5. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 39:1211-33.
6. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A7., 7th. ed.. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
7. Fernandez Canigia, L., L. Castello, A. Di Martino, G. Greco, M. C. Legaria, M. Litterio, S. C. Predari, R. Rollet, A. Rossetti, G. Carloni, M. I. Sarchi, and H. Bianchini. 2007. Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group isolates from Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol 39:156-60.
8. Gal, M., and J. S. Brazier. 2004. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. J Antimicrob Chemother 54:109-16.

9. Golan, Y., L. A. McDermott, N. V. Jacobus, E. J. Goldstein, S. Finegold, L. J. Harrell, D. W. Hecht, S. G. Jenkins, C. Pierson, R. Venezia, J. Rihs, P. Iannini, S. L. Gorbach, and D. R. Snyderman. 2003. Emergence of fluoroquinolone resistance among *Bacteroides* species. *J Antimicrob Chemother* 52:208-13.
10. Grisold, A. J., I. Wendelin, E. Presterl, R. B. Raggam, L. Masoud, A. Badura, and E. Marth. 2007. In vitro activity of ten antibiotics, including tigecycline, against *Bacteroides* species in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:525-7.
11. Hecht, D. W. 2006. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe* 12:115-21.
12. Jamal, W., M. Shahin, and V. O. Rotimi. 2010. Surveillance and trends of antimicrobial resistance among clinical isolates of anaerobes in Kuwait hospitals from 2002 to 2007. *Anaerobe* 16:1-5.
13. Kato, N., K. Yamazoe, C. G. Han, and E. Ohtsubo. 2003. New insertion sequence elements in the upstream region of *cfiA* in imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 47:979-85.
14. Katsandri, A., A. Avlami, A. Pantazatou, D. P. Houhoula, and J. Pappaskevas. 2006. Dissemination of *nim*-class genes, encoding nitroimidazole resistance, among different species of Gram-negative anaerobic bacteria isolated in Athens, Greece. *J Antimicrob Chemother* 58:705-6.
15. Litterio, M., H. Bianchini, G. Carloni, A. Di Martino, L. Fernandez Canigia, G. Greco, C. Legaria, R. Rollet, A. Rossetti, S. C. Predari, and L. Castello. 2004. "In vitro" activity of ten antimicrobial agents against anaerobic bacteria. A collaborative study, 1999-2002. *Rev Argent Microbiol* 36:130-5.
16. Liu, C. Y., Y. T. Huang, C. H. Liao, L. C. Yen, H. Y. Lin, and P. R. Hsueh. 2008. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3161-8.
17. Nagy, E., and E. Urban. 2010. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect*.
18. Nguyen, M. H., V. L. Yu, A. J. Morris, L. McDermott, M. W. Wagener, L. Harrell, and D. R. Snyderman. 2000. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis* 30:870-6.

19. Oteo-Iglesias, J., J. I. Alos, and J. L. Gomez-Garcés. 2002. Increase in resistance to new fluoroquinolones from 1998 to 2001 in the *Bacteroides fragilis* group. *J Antimicrob Chemother* 50:1055-7.
20. Papaparaskevas, J., A. Pantazatou, A. Katsandri, D. P. Houhoula, N. J. Legakis, A. Tsakris, and A. Avlami. 2008. Moxifloxacin resistance is prevalent among *Bacteroides* and *Prevotella* species in Greece. *J Antimicrob Chemother* 62:137-41.
21. Podglajen, I., J. Breuil, F. Bordon, L. Gutmann, and E. Collatz. 1992. A silent carbapenemase gene in strains of *Bacteroides fragilis* can be expressed after a one-step mutation. *FEMS Microbiol Lett* 70:21-9.
22. Podglajen, I., J. Breuil, I. Casin, and E. Collatz. 1995. Genotypic identification of two groups within the species *Bacteroides fragilis* by ribotyping and by analysis of PCR-generated fragment patterns and insertion sequence content. *J Bacteriol* 177:5270-5.
23. Podglajen, I., J. Breuil, and E. Collatz. 1994. Insertion of a novel DNA sequence, 1S1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Mol Microbiol* 12:105-14.
24. Rasmussen, B. A., Y. Gluzman, and F. P. Tally. 1990. Cloning and sequencing of the class B beta-lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1590-2.
25. Seifert, H., and A. Dalhoff. 2010. German multicentre survey of the antibiotic susceptibility of *Bacteroides fragilis* group and *Prevotella* species isolated from intra-abdominal infections: results from the PRISMA study. *J Antimicrob Chemother* 65:2405-10.
26. Snyderman, D. R., N. V. Jacobus, and L. A. McDermott. 2008. In vitro activities of doripenem, a new broad-spectrum carbapenem, against recently collected clinical anaerobic isolates, with emphasis on the *Bacteroides fragilis* group. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4492-6.
27. Snyderman, D. R., N. V. Jacobus, L. A. McDermott, Y. Golan, D. W. Hecht, E. J. Goldstein, L. Harrell, S. Jenkins, D. Newton, C. Pierson, J. D. Rihs, V. L. Yu, R. Venezia, S. M. Finegold, J. E. Rosenblatt, and S. L. Gorbach. 2010. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005-2007). *Clin Infect Dis* 50 Suppl 1:S26-33.
28. Snyderman, D. R., N. V. Jacobus, L. A. McDermott, R. Ruthazer, Y. Golan, E. J. Goldstein, S. M. Finegold, L. J. Harrell, D. W. Hecht, S. G. Jenkins, C. Pierson, R. Venezia, V. Yu, J. Rihs, and S. L. Gorbach. 2007. National

- survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1649-55.
29. Snyderman, D. R., N. V. Jacobus, L. A. McDermott, R. Ruthazer, E. J. Goldstein, S. M. Finegold, L. J. Harrell, D. W. Hecht, S. G. Jenkins, C. Pierson, R. Venezia, J. Rihs, and S. L. Gorbach. 2002. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends for 1997-2000. *Clin Infect Dis* 35:S126-34.
 30. Tygacil, (tigecycline for injection) [package insert]. 2007. , Philadelphia, PA: Wyeth pharmaceuticals
 31. Wybo, I., D. Pierard, I. Verschraegen, M. Reynders, K. Vandoorslaer, G. Claeys, M. Delmee, Y. Glupczynski, B. Gordts, M. Ieven, P. Melin, M. Struelens, J. Verhaegen, and S. Lauwers. 2007. Third Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 59:132-9.
 32. Yamazoe, K., N. Kato, H. Kato, K. Tanaka, Y. Katagiri, and K. Watanabe. 1999. Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2808-10.



EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ALTERACIONES EN LA SECRECIÓN SALIVAL EN RESPUESTA AL CONSUMO DE ALCOHOL Y AL TRATAMIENTO CON CANNABINOIDES

Dr. Javier Fernández Solari

SÍNTESIS DEL INFORME

La periodontitis es una enfermedad infecciosa progresiva que involucra la pérdida del hueso alrededor del diente y que generalmente se desarrolla a partir de una gingivitis preexistente. Se ha descrito que la secreción salival esta disminuida en pacientes con periodontitis. A su vez, tanto la hiposialia como la xerostomia predisponen a la aparición de un terreno favorable para el desarrollo de lesiones que afectan los tejidos duros y blandos de la cavidad oral y la progresiva pérdida de piezas dentarias. En condiciones de secreción salival deficiente se promueve la acumulación de biofilm de placa y se incrementan los riesgos de inflamación gingival y de periodontitis. Esto es lógico dado que la saliva constituye la primera barrera inmunológica para la protección de la cavidad oral y de las piezas dentarias.

La hipofunción de las glándulas salivales también se observa en respuesta al consumo de alcohol. En estudios preliminares, observamos que el etanol administrado en forma crónica provoca una disminución en el volumen de saliva secretado por la glándula submaxilar (GSM). Por lo tanto, el primer objetivo de este proyecto fue estudiar como se ve afectada la función secretora de la GSM y como evoluciona la enfermedad periodontal en ratas expuestas crónicamente a alcohol etílico.

Por otro lado, dado que los receptores de cannabinoides se encuentran expresados en distintos tipos celulares tanto a nivel gingival como de la GSM, y dadas sus conocidas acciones antiinflamatorias en otros tejidos, el segundo objetivo del proyecto fue estudiar la participación del sistema endocannabinoide en tejidos orales expuestos a condiciones inflamatorias.

Para el desarrollo de este proyecto de investigación se utilizaron ratas Wistar macho adultas (300-350 g). En la primera etapa del proyecto traba-

jamos con 4 grupos experimentales: Ratas control, ratas sometidas a periodontitis experimental (PE) traumática, ratas con administración repetitiva de etanol (ER) y ratas sometidas a PE traumática y ER.

Para la inducción de PE traumática a ratas anestesiadas se les realizó una ligadura con un hilo de algodón alrededor del cuello de los primeros molares inferiores que permaneció durante 7 días. Para estudiar el efecto de la alcoholización repetitiva sobre la secreción salival y sobre la evolución de la enfermedad periodontal, las ratas recibieron 2 mg/Kg de etanol vía intragástrica, 2 veces al día desde 5 días antes de colocar el hilo alrededor de los primeros molares inferiores, hasta el final de la experiencia (7 días después de la colocación del hilo). Luego de los tratamientos, en todos los grupos se estudió la secreción salival inducida por el agonista colinérgico metacolina inyectado vía femoral y se evaluó la pérdida ósea a nivel de los primeros molares inferiores mediante técnicas morfométricas. Como parámetros inflamatorios en la encía y en las GSM se midieron el contenido de prostaglandina E (PGE); la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) y la cuantificación del RNA mensajero de las distintas isoformas de NOS y de IL-1 β .

En una segunda etapa del proyecto, estudiamos la participación del sistema endocannabinoide en los procesos infecciosos e inflamatorios que se desarrollan en el tejido gingival. Con tal fin, desarrollamos un modelo de inflamación *in vitro* donde extractos de encía, obtenidas del primer molar inferior de las ratas son incubados en un buffer Krebs Ringer (a 37° centígrados en un baño termostático durante 90 min) con LPS (10 μ g/ml) e interferón gamma (INF, 100 ng/ml). Adicionalmente, pusimos a punto un modelo de periodontitis infecciosa crónica inducida por LPS sobre el cual comenzamos a estudiar la evolución de la enfermedad con el tratamiento diario con el agonista sintético de receptores de cannabinoides, la meta-anandamida.

Las ratas sometidas a la administración repetitiva de etanol (2 mg/Kg) por vía intragástrica mostraron claros índices de inflamación tal como lo demuestra el incremento en la mayoría de parámetros inflamatorios medidos por las distintas técnicas utilizadas. Adicionalmente, la administración repetitiva de etanol mostró efectos aditivos sobre algunos parámetros gingivales incrementados por periodontitis bilateral, como por ejemplo la expresión del RNA mensajero de NOSi (medida por RT-PCR semicuantitativa), e incluso potenció algunos otros, como por ejemplo la expresión del RNAm de IL-1 β (medida por Real time PCR). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el consumo repetido de alcohol incrementa parámetros inflamatorios en la encía que podrían agravar el daño periodontal y/o favorecer la aparición de

la enfermedad. Sin embargo, la administración repetitiva de etanol durante 12 días no evidenció cambios en la pérdida ósea basal ni en la inducida por periodontitis traumática bilateral, medidas por estudios morfométricos. Estos resultados analizados conjuntamente dan la pauta de que, probablemente, se requiera más tiempo para evidenciar deterioro óseo en respuesta al consumo de etanol, ya que la mayoría de los mediadores de periodontitis se encontraron incrementados en el tiempo estudiado.

Los resultados de los estudios *in vitro* con encías y GSM confirman la presencia y acción biológica de los receptores de cannabinoides en ambos tejidos. Su presencia a nivel de la GSM parece tener una acción dual, por un lado ejerciendo efectos antiinflamatorios, tal como lo revelan los efectos atenuadores de TNF α incrementados por LPS e interferon gamma, y por otro participando como mediadores de los efectos inhibitorios de la secreción salival ejercida por LPS y TNF α (estudiados *in vivo*). La presencia de los receptores de cannabinoides en el tejido gingival, demostrada por estudios inmunohistoquímicos realizados por otros autores, también fue confirmada mediante nuestros estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Por un lado, la activación de receptores de cannabinoides atenuó los incrementos de PGE y TNF α incrementados por LPS e interferon gamma, tal como lo demuestran los ensayos *in vitro*. Adicionalmente, la topicación diaria de meta-anandamida atenuó la pérdida ósea inducida por inyecciones crónicas de LPS.

En resumen, los resultados del presente trabajo permiten concluir; por un lado que el consumo repetitivo de alcohol genera un estado de inflamación crónica que genera un daño potencial de la salud periodontal; y por otro que los receptores de cannabinoides, dadas sus acciones antiinflamatorias en los tejidos orales, constituyen un blanco terapéutico interesante para combatir distintas patologías bucales, incluyendo la enfermedad periodontal.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad infecciosa progresiva que involucra la pérdida del hueso alrededor del diente y que generalmente se desarrolla a partir de una gingivitis preexistente (1). Se ha descrito que la secreción salival esta disminuida en pacientes con periodontitis. A su vez, tanto la hiposialia como la xerostomia predisponen a la aparición de un terreno favorable para el desarrollo de lesiones que afectan los tejidos duros y blandos de la cavidad oral y la progresiva pérdida de piezas dentarias. En condiciones de secre-

ción salival deficiente se promueve la acumulación de biofilm de placa y se incrementan los riesgos de inflamación gingival y de periodontitis. Esto es lógico dado que la saliva constituye la primera barrera inmunológica para la protección de la cavidad oral y de las piezas dentarias.

En experimentos preliminares en rata, demostramos que luego de inducir experimentalmente periodontitis traumática, a través de la ligadura de los primeros molares inferiores durante 7 días, la secreción salival submaxilar disminuye significativamente. Por otro lado, observamos que en ratas a las que se les extrajo el complejo glandular submaxilar-sublingual (submandibulectomia, Sx), la distancia entre el límite amelo-cementario (LAC) y la cresta alveolar (CA) de los molares inferiores, se incrementó, tanto del lado lingual (L) como vestibular (V). Estos resultados evidenciaron que en ausencia de estas glándulas salivales se genera pérdida ósea. A su vez, la distancia LAC-CA fue mayor aún cuando las ratas fueron sometidas conjuntamente a Sx y a periodontitis experimental traumática, tanto del lado L como del V (2).

La hipofunción de las glándulas salivales también se observa en respuesta al consumo de alcohol. En estudios preliminares, observamos que el etanol administrado en forma crónica (durante 12 días, vía intragástrica) provoca una disminución en el volumen de saliva secretado por la glándula submaxilar (GSM).

Todos estos resultados dan la pauta de que la enfermedad periodontal podría verse agravada debido al consumo de alcohol. Por lo tanto, el primer objetivo de este proyecto fue estudiar como se ve afectada la función secretoria de la GSM y como evoluciona la enfermedad periodontal en ratas expuestas repetitivamente a alcohol etílico.

Por otro lado, dado que los receptores de cannabinoides se encuentran expresados en distintos tipos celulares tanto a nivel gingival como de la GSM (3), y dadas sus conocidas acciones antiinflamatorias en otros tejidos (4), el segundo objetivo del proyecto fue estudiar la participación del sistema endocannabinoide en tejidos orales expuestos a condiciones inflamatorias. Estos estudios fueron desarrollados utilizando 2 modelos, uno *in vitro* y otro *in vivo*.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Para el desarrollo de este proyecto de investigación se utilizaron ratas Wistar macho adultas (300-350 g).

En la primera etapa del proyecto trabajamos con 4 grupos experimentales: Ratas control, ratas sometidas a periodontitis experimental (PE) traumá-

tica, ratas con administración repetitiva de etanol (ER) y ratas sometidas a PE traumática y ER.

Para la inducción de PE traumática a ratas anestesiadas se les realizó una ligadura con un hilo de algodón alrededor del cuello de los primeros molares inferiores que permaneció durante 7 días. Para estudiar el efecto de la alcoholización repetitiva sobre la secreción salival y sobre la evolución de la enfermedad periodontal, las ratas recibieron 2 mg/Kg de etanol vía intragástrica, 2 veces al día desde 5 días antes de colocar el hilo alrededor de los primeros molares inferiores, hasta el final de la experiencia (7 días después de la colocación del hilo).

Para la construcción de las curvas dosis respuesta (CDR), en los estudios de secreción salival, las ratas fueron anestesiadas y los conductos de las GSMs canulados para poder obtener la saliva, como describen Lomniczi y col. (5). La secreción salival se indujo con el agonista colinérgico metacolina (MC, 1, 3 y 10 μ g/kg) inyectada a través de la vena femoral. La saliva fue recolectada en papel de aluminio y pesada en balanza analítica. Los resultados fueron expresados en mg de saliva. A partir de la evaluación de la cantidad de saliva secretada luego de cada inyección, se construyeron CDR de cada animal. Cabe aclarar que los animales bajo anestesia no presentan secreción basal de saliva.

Luego de los tratamientos, en todos los grupos se evaluó la pérdida ósea a nivel de los primeros molares inferiores mediante técnicas morfométricas. Como parámetros inflamatorios en la encía y en las GSM se midieron el contenido de prostaglandina E (PGE) por radioinmunoanálisis (RIA); la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOSi); la cuantificación de distintas isoformas de NOS, e IL-1 β se midieron por RT-PCR, para estudiar el grado de inducción de su producción en las distintas condiciones experimentales.

En la primera etapa del proyecto centralizamos nuestro trabajo en el estudio de los efectos de la administración repetitiva de etanol (durante 12 días) sobre la secreción salival y la salud oral de ratas sanas o sometidas a PEB traumática (durante 7 días). En primer lugar, desarrollamos un test de coordinación motora en el Rotarod para corroborar que la dosis de 2 g/Kg de etanol era efectiva para alcoholizar a los animales. Como se observa en la Figura 1, la administración repetitiva de la dosis de etanol mencionada provocó un incremento significativo en el número de caídas, durante los 5 minutos que duró el test, con respecto a las ratas que recibieron un volumen equivalente de agua, ya sea con o sin PEB. Es decir, la dosis de 2 g/Kg de etanol alteró la coordinación motora.

Dado que se ha reportado que la ingesta crónica de etanol produce un incremento sostenido de las hormonas del estrés tales como adrenalina y corticosterona (cortisol en humanos) (6), nos propusimos medir los niveles plasmáticos de corticosterona en las ratas sometidas a las 4 condiciones experimentales en el día 12. Tal como se muestra en la Figura 2, los niveles plasmáticos de corticosterona se vieron incrementados significativamente en las ratas sometidas a ER con respecto a las que recibieron agua. La PE bilateral (PEB) no produjo cambios significativos en los niveles plasmáticos de la hormona en las ratas que recibieron agua ni en las que recibieron ER.

Como se observa en la Tabla 1, la administración repetitiva de etanol (ER) provocó un fuerte efecto inhibitorio de la secreción salival inducida por metacolina (MC) para las tres dosis de MC utilizadas. La PEB también produjo un efecto inhibitorio de la secreción salival, pero de menor magnitud, mientras con la combinación de ER y PEB, el efecto inhibitorio fue de menor magnitud que en los tratamientos por separado.

Para evaluar como se modifican algunos parámetros inflamatorios en la GSM y en la encía, medimos la actividad de la enzima NOSi y el contenido de PGE en ambos tejidos. Tanto ER como PEB incrementaron significativamente la actividad de la NOSi en la GSM, sin embargo combinando ER y PEB no se observó ningún efecto aditivo (Fig 3A). La PEB incrementó significativamente el contenido intraglandular de PGE, sin embargo, el ER no modificó ni el contenido basal de PGE ni el estimulado por PEB (Fig 3B).

Tanto ER así como PEB incrementaron significativamente la actividad de la NOSi en la encía, sin embargo combinando ER y PEB no se observó ningún efecto aditivo (Fig 4A). La PEB incrementó significativamente el contenido gingival de PGE, sin embargo, el ER no modificó significativamente ni el contenido basal de PGE ni el estimulado por PE (Figura 4B).

Adicionalmente, demostramos que el ER no modifica significativamente el contenido de PGE en el tejido gingival de ratas sometidas a PE unilateral (PEU, figura 5), ya que no se observaron cambios en los niveles del eicosanoide en respuesta a ER, ni en las encías contra-laterales a la ligadura, ni en la ispi-laterales con respecto a las ratas que recibieron agua. Estos resultados concuerdan con lo informado anteriormente para PEB (figura 3B), donde el ER no produjo cambios significativos en el contenido de PGE incrementado por PEB.

A continuación estudiamos la pérdida ósea, a partir de un análisis morfométrico, evaluada en base a la distancia entre el LAC y la CA de las 3 raíces linguales y vestibulares del primer molar inferior. Observamos que la PEB incrementó significativamente la pérdida ósea, tanto a nivel lingual como ves-

tibular, sin embargo, el ER no alteró la pérdida ósea basal, así como tampoco la incrementada por PEB (Figura 6A). En el análisis de la PEU, demostramos la presencia de una mayor pérdida ósea en el hueso que contiene al molar sometido a la ligadura (ipsilateral) con respecto al contra-lateral (Figura 6B). Sin embargo, las diferencias parecen ser menos significativas que las existentes entre los animales sometidos a PEB y los controles. El etanol, al igual que como fue observado en las ratas sometidas a PEB, no alteró significativamente la pérdida ósea incrementada por PEU. Adicionalmente, las hemimandíbulas contra-laterales a la ligadura, en las ratas con PEU, mostraron mayores niveles de pérdida ósea que las correspondientes a los animales sin ligadura. Estos resultados sugieren la presencia de un efecto cruzado a través del cual se podría incrementar la pérdida ósea aún en el hueso de los molares contra-laterales a la ligadura. Este efecto cruzado podría ser consecuencia del propio proceso inflamatorio.

Si bien el etanol administrado repetitivamente no parece modificar ni la pérdida ósea basal ni la incrementada luego de 7 días de PEU o PEB, su efecto estimulador sobre la actividad de la enzima NOSi tanto en el tejido gingival como en la glándula submaxilar, junto con sus efectos inhibitorios sobre la secreción salival, nos dan la pauta de que el ER estaría favoreciendo un estado inflamatorio. Para confirmar esta hipótesis, estudiamos la expresión del RNA mensajero de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β y de las distintas isoformas de NOS de ratas sometidas a las 4 condiciones experimentales (agua, ER, PEB y ER-PEB).

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos por RT-PCR semicuantitativa. En el panel inferior se observa, la corrida electroforética en gel de agarosa de uno de los 3 geles revelados con transiluminador. En el panel superior se representa en barras la densidad óptica (DO) de las bandas correspondientes al RNAm de IL-1 β , normalizadas en función de β -actina. Los resultados muestran que la expresión relativa del RNAm de IL-1 β se ve incrementada en las encías luego de 7 días de PE y que la ER ejerce un efecto aditivo sobre la expresión del mensajero.

En la figura 8 se muestran los resultados correspondientes a RT-PCR cuantitativa (Real Time). Coincidiendo con los resultados de la RT-PCR semicuantitativa, las encías provenientes de animales sometidos a PE durante 7 días mostraron un incremento en la concentración relativa del RNAm de IL-1 β , normalizado contra β -actina. La concentración relativa del mensajero de esta citoquina se vio potenciada en las encías provenientes de ratas sometidas conjuntamente a PE y a la administración repetitiva de etanol.

Las encías provenientes de ratas que recibieron ER evidenciaron expresión del RNA mensajero de la enzima NOS endotelial (NOS_e) medida por RT-PCR, mientras que en las encías de ratas que recibieron agua, la expresión no fue detectada (Figura 9). En las encías provenientes de ratas sometidas a PEB durante 7 días y a ER, se observó un incremento significativo en la expresión del RNA mensajero de NOS_e con respecto a las encías provenientes de ratas sometidas a ER exclusivamente. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las encías de ratas sometidas con PEB con respecto a las que adicionalmente fueron sometidas a ER. Con respecto a la NOS_i, los dos grupos de ratas sin PE, tanto las que recibieron agua como las sometidas a ER, mostraron expresión del RNA mensajero, sin diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 10). Sin embargo, las ratas sometidas a PEB que recibieron agua mostraron un incremento significativo en la expresión del mensajero de NOS_i con respecto a las ratas sin PEB. Mas aún, las encías provenientes de ratas con PEB y que recibieron ER mostraron incrementos significativos en la expresión del RNAm de NOS_i con respecto a las encías de ratas sometidas a PEB exclusivamente, mostrando un claro efecto aditivo entre los dos tratamientos sobre la variable en cuestión.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el consumo repetido de alcohol incrementa parámetros inflamatorios en la encía que podrían agravar el daño periodontal y/o favorecer la aparición de la enfermedad.

En una segunda etapa del proyecto, estudiamos la participación del sistema endocannabinoide en los procesos infecciosos e inflamatorios que se desarrollan en el tejido gingival. A la fecha existen varias publicaciones que avalan el papel modulador del sistema endocannabinoide en distintos procesos fisiopatológicos (4). Nosotros desarrollamos un modelo de inflamación *in vitro* donde extractos de encía, obtenidas del primer molar inferior de las ratas son incubados en un buffer Krebs Ringer (a 37° centígrados en un baño termostático durante 90 min) con LPS (10 µg/ml) e interferón gamma (INF, 100 ng/ml). Las prostaglandinas son eicosanoides derivados del ácido araquidónico, cuyos niveles se encuentran incrementados durante los procesos inflamatorios. En la figura 11 puede observarse que la liberación de prostaglandinas E (PGE) de encías incubadas durante 90 min (6 encías/grupo) fue incrementada en presencia de LPS-INF, pero que la misma tiende a retornar a los valores control cuando las encías son co-incubadas en presencia de LPS-INF y de concentraciones crecientes del endocannabinoide anandamida (AEA) en el orden de 10⁻⁸ a 10⁻¹⁰ M. Cabe destacar que dado que la AEA tiene una vida media corta, fue re-incorporada cada 30 min al medio de incu-

bación en la concentración correspondiente a cada tratamiento. En la figura 12 puede observarse que al repetir el experimento con AEA 10^{-9} M se observó una reversión significativa del incremento de la liberación PGE incrementado por LPS-INF. Adicionalmente, en este experimento observamos que el URB597 (10^{-9} M) un inhibidor de la degradación de la AEA también produjo un efecto inhibitorio sobre incremento de la liberación de PGE provocado por LPS-INF. Los niveles de PGE fueron medidos por radioinmunoanálisis (RIA).

A continuación, estudiamos el efecto de un agonista sintético de receptores de cannabinoides, la meta-anandamida (M-AEA, 10^{-9} M) que permite trabajar a tiempos mas largos sin riesgos de que se degrade y del inhibidor de la degradación de AEA, el URB597 (10^{-9} M) sobre la liberación de la citoquina pro-inflamatoria, el factor de necrosis tumoral, $TNF\alpha$, producido en encías incubadas durante 90 min en presencia del complejo LPS-INF. En la figura 13 puede observarse que la liberación del $TNF\alpha$ incrementada en respuesta a LPS-INF fue prevenida significativamente en presencia de M-AEA (10^{-9} M). De forma similar, en la figura 14 puede observarse que el inhibidor URB597 previno completamente el efecto estimulador de LPS-INF sobre la liberación de $TNF\alpha$.

Dado que en trabajos previos demostramos la presencia de los receptores para cannabinoides (CB1 y CB2) en la glándula submaxilar (GSM) de la rata (3), estudiamos los efectos provocados *in vitro* por agonistas y antagonistas de receptores de cannabinoides sobre el $TNF\alpha$ como parámetro inflamatorio incrementado por LPS-INF. El $TNF\alpha$ liberado por las GSM incubadas durante 90 min se incrementó en presencia de LPS-INF, mientras que la meta-anandamida (M-AEA, 10^{-9} M), un analogo estable del endocannabinoide AEA, inhibió el incremento inducido por LPS-INF (Figura 15). El antagonista selectivo de receptores CB1, AM251 (10^{-5} M), no modificó el efecto inhibitorio de la M-AEA sobre la liberación de $TNF\alpha$ incrementada por LPS-INF. Sin embargo, el antagonista selectivo de receptores CB2, el AM630 (10^{-5} M), bloqueó el efecto inhibitorio de la M-AEA sobre la liberación de $TNF\alpha$ incrementada por LPS-INF e incluso mostró una tendencia a incrementar el estímulo provocado por LPS-INF en ausencia de M-AEA (Figura 16). Cuando se utilizaron los dos antagonistas AM251 y AM630, simultáneamente, el bloqueo del efecto inhibitorio de la M-AEA sobre la liberación de $TNF\alpha$ incrementada por LPS-INF fue completo (Figura 17). Estos resultados sugieren que los endocannabinoides ejercen un efecto anti-inflamatorio en la GSM que sería mediado principalmente a través de los receptores CB2.

Dado que el $TNF\alpha$, media muchos de los efectos provocados por el LPS en distintos tejidos, nos propusimos estudiar si el efecto inhibitorio del LPS

inyectado vía intraperitoneal (ip) sobre la secreción salival es mediado por el TNF α . Los estudios de secreción salival mostraron que el efecto inhibitorio del LPS (5mg/Kg/3 hs, ip) sobre la secreción salival inducida por distintas dosis del agonista colinérgico metacolina, fue revertido casi completamente por la inyección intra-GSM de etanercept (800 μ g/50 μ l), un secuestrador de TNF α que lo inactiva evitando la interacción con sus receptores (Figura 18). Estos resultados demuestran que el TNF α media, al menos en parte, el efecto inhibitorio del LPS sobre la secreción salival.

A continuación, estudiamos la participación del sistema endocannabinoide sobre el efecto inhibitorio del LPS sobre la secreción salival inducida por metacolina. Los resultados demostraron que bloqueando los receptores CB1 y CB2, con la inyección intraglandular de AM251 (15 μ g/50 μ l, ig) y AM630 (15 μ g/50 μ l, ig), respectivamente, el efecto inhibitorio del LPS fue bloqueado casi completamente (Figura 19). Finalmente, dado que demostramos que el TNF α media al menos en parte, el efecto inhibitorio del LPS sobre la secreción salival, estudiamos el efecto de la inyección intraglandular del TNF α y de los antagonistas de receptores de cannabinoides sobre la secreción salival inducida por distintas dosis de metacolina. Los resultados mostraron que el TNF α (300 ng/50 μ l, ig) inhibió la secreción salival inducida por metacolina (Figura 20), y que la inyección previa de AM251 + AM630, bloqueó completamente dicho efecto. Dado que el LPS (5mg/Kg/3 hs, ip) incrementa los niveles de TNF α (Figura 21) así como la síntesis de AEA (Figura 22) en la GSM, podemos confirmar que el TNF α y el sistema endocannabinoide median el efecto inhibitorio de la secreción salival provocado por LPS y que además el sistema endocannabinoide podría ser activado en respuesta al LPS para ejercer efectos anti-inflamatorios en pos de recuperar la homeostasis.

En la última etapa del proyecto trabajamos en la puesta a punto de un modelo de "Periodontitis Experimental inducida por LPS", que es inyectado en las encías adheridas a los primeros molares superiores e inferiores de la rata, tanto del lado vestibular como oral. Las inyecciones de 20 μ l de LPS (1mg/ml) en las encías mencionadas fueron realizadas 3 veces por semana (los días lunes, miércoles y viernes) durante 1, 3 y 6 semanas. Finalizado el tratamiento, el estado de salud periodontal fue evaluado en base a 2 parámetros: 1) pérdida ósea estimada en base a la distancia entre el LAC y la CA de las raíces mesial, media y distal, tanto vestibulares como orales, de los primeros molares superiores e inferiores; 2) Contenido de prostaglandina E en las encías adheridas de los primeros molares superiores e inferiores. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Las ratas sometidas al tratamien-

to con LPS durante 1 semana no mostraron pérdida ósea alveolar significativa, evaluada en base a la distancia LAC-CA con respecto a las ratas control (Fig 23A), sin embargo mostraron un incremento en el contenido de PGE tanto en las encías del maxilar inferior como del superior, con respecto a las encías de los controles (Fig 24A). Las ratas sometidas a 3 semanas de LPS mostraron pérdida ósea alveolar significativa con respecto a los controles (Fig 23B) que se hizo más evidente aún en las ratas sometidas a 6 semanas de tratamiento (Fig 23C). Sin embargo el contenido de gingival de PGE no varió significativamente entre los grupos tratados con LPS y los controles, ni a las 3 ni a las 6 semanas de LPS (Fig 24B y C). Estos resultados sugieren que la PGE constituiría un mediador de la pérdida ósea en las etapas iniciales de la enfermedad periodontal, pero que en instancias más avanzadas de la enfermedad su producción se normaliza, por lo cual entrarían en juego otros mediadores que conducen a la pérdida ósea.

Culminada la puesta a punto del modelo de "Periodontitis Experimental inducida por LPS", determinamos la actividad de la enzima NOSi en tejido gingival extraído de ratas sometidas a 6 semanas de LPS o a su vehículo. La actividad de NOSi medida por radioconversión de de C¹⁴-arginina a C¹⁴-citrulina y cantidades equimolares de óxido nítrico, fue significativamente mayor en las ratas que recibieron las inyecciones de LPS durante 6 semanas con respecto a las que recibieron su vehículo (figura 25).

A continuación, estudiamos el efecto de la topicación diaria de las encías que rodean los primeros molares con un agonista sintético no hidrolizable de receptores de cannabinoides, la meta- Anandamida (M-AEA, 1 ng/20µl), sobre la pérdida ósea inducida por inyecciones de LPS durante 6 semanas.

Las ratas topicadas con M-AEA diariamente mostraron una reversión parcial de la pérdida ósea inducida por LPS en prácticamente todas las raíces de los molares superiores (figura 26A) e inferiores (figura 26B) estudiadas tanto del lado palatino/lingual como del lado vestibular.

Estos resultados sugieren que la topicación diaria con M-AEA (1 ng/20µl) sobre la encías expuestas a LPS estaría atenuando la pérdida ósea inducida por la endotoxina. En este momento nos encontramos trabajando en el estudio de los factores involucrados en este efecto atenuador de la periodontitis, intentando dilucidar que mediadores de enfermedad periodontal son atenuados durante el tratamiento con M-AEA.

SUMMARY

Periodontitis is an infectious disease involving bone loss around the teeth and normally developed from preexistent gingivitis.

The first aim of the project was to assess the effect of ethanol prolonged administration on the oral health of rats. Rats received ethanol or water during 12 days by gastric gavage. In the fifth day, half of the rats were subjected to experimental periodontitis during 7 days, and the others were sham. Periodontitis significantly increased inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression and activity in the gingival tissue, while ethanol administration increased iNOS activity and produced additive effect on periodontitis- increased iNOS mRNA expression. Ethanol administration also potentiates the stimulatory effect of periodontitis on interleukin (IL)-1 β mRNA expression. However, periodontitis but not ethanol administration increased prostaglandin E² content and alveolar bone loss. Also, rats exposed to ethanol or periodontitis showed diminution in methacholine induced salivary secretion.

On the other hand, cannabinoid receptors are present in SMG and gingival tissue. Since their anti-inflammatory properties are known, the second objective was to study the participation of the endocannabinoid system in oral tissues exposed to inflammatory conditions. *In vitro* studies showed that endocannabinoid agonists attenuate inflammatory parameters, such as TNF α and PGE, increased by LPS and interferon gamma in SMG and gingival tissue incubated in thermostatic bath during 90 min at 37° C. Additionally, a daily treatment with the synthetic cannabinoid meta-anandamide prevent partially the bone loss induced by chronic injections of LPS in a infectious model of periodontitis.

In summary, the present results suggest that ethanol consumption represent a risk factor for periodontal disease since increase the expression of inflammatory parameters in healthy individuals and enhance the inflammation taking place during the illness; and on the other hand that the endocannabinoid system represent an interesting therapeutic target against oral pathologies such as periodontitis.

BIBLIOGRAFÍA

Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T (2005). Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 76:2033-2041.

Vacas MI, Amer M, Chiarenza AP, Luchelli MA, Mandalunis PM, Elverdin JC. Influence of submandibulectomy on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol*. 2008 Jun;79(6):1075-80.

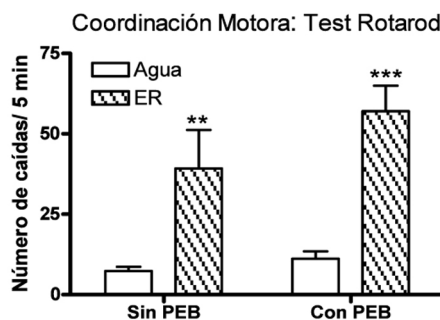
JP Prestifilippo, J Fernández-Solari, C de la Cal, M Iribarne, AM Suburo, V Rettori, SM McCann, JC Elverdin. Inhibition of salivary secretion by activation of endocannabinoid receptors. *Med. Exp Biol Med*, 231:1424-1429, 2006.

Klein TW. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol* 5: 400-411.

Lomniczi A, Mohn C, Faletti A, Franchi A, McCann SM, Rettori V, Elverdin JC (2001). Inhibition of salivary secretion by lipopolysaccharide: possible role of prostaglandins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 281:E405-11.

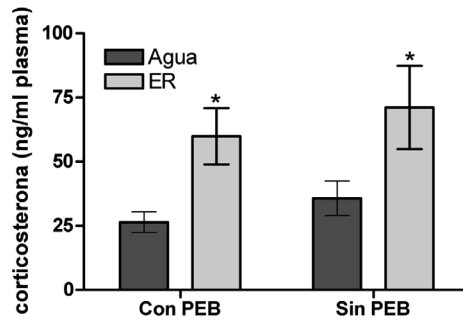
Dina OA, Khasar SG, Alessandri-Haber N, Green PG, Messing RO, Levine JD (2008). Alcohol-induced stress in painful alcoholic neuropathy. *Eur J Neurosci* 27:83-92.

APÉNDICE FIGURAS



** $P < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs Agua (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 1



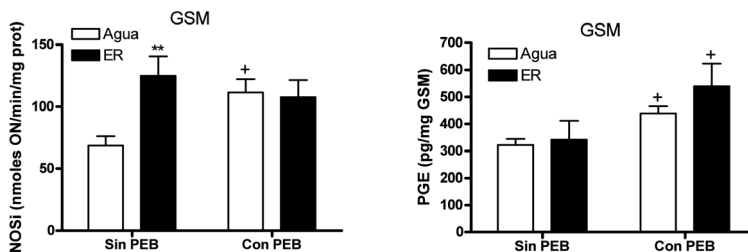
* $p < 0.05$ vs. Agua (Anova de 2 vías, post test de Tukey).

Figura 2

Grupo / Metacolina	1 $\mu\text{g/Kg}$	3 $\mu\text{g/Kg}$	10 $\mu\text{g/Kg}$
Agua	9,8 $\pm$ 1,8 ^A	23,0 $\pm$ 2,3	49,3 $\pm$ 2,3
ER	2,0 $\pm$ 0,5**	8,0 $\pm$ 1,7***	22,0 $\pm$ 2,7***
ER+PEB	6,7 $\pm$ 1,4	16,2 $\pm$ 1,9* [#]	34,2 $\pm$ 2,8***, [#]
PEB	3,5 $\pm$ 0,3**	14,2 $\pm$ 0,95** [#]	29,6 $\pm$ 2,4***

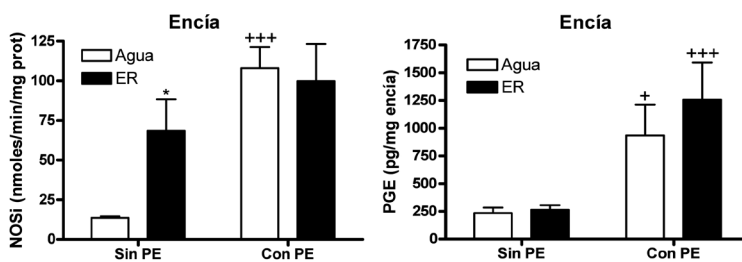
^AMedia $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. agua, # $p < 0.05$ vs. ER (Anova de 2 vías seguido del Test a Posteriori de Tukey).

Tabla 1



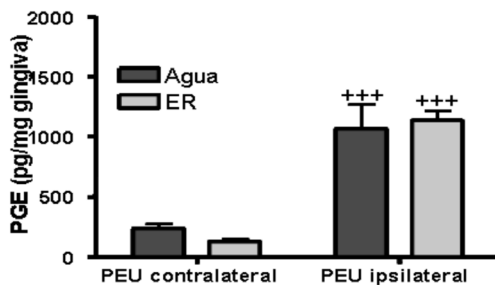
* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs. Agua y + $p < 0.05$ vs sin PE. (Anova de 2 vías, post test de Tukey).

Figura 3



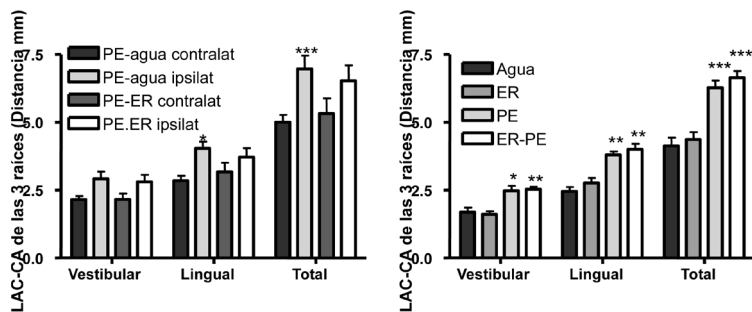
*p<0.05 vs. agua y +++p<0.01 vs. sin PE (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 4



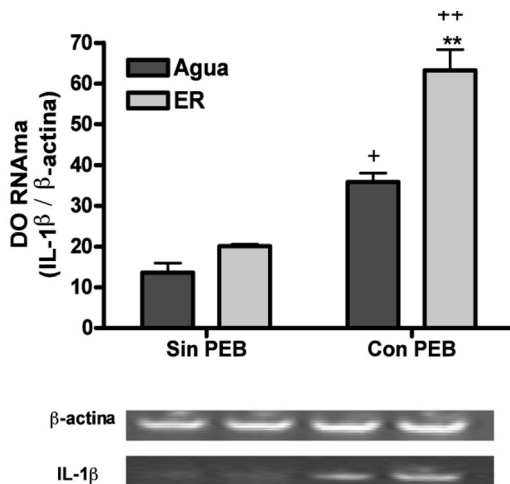
+++p<0.01 vs. sin PE (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 5



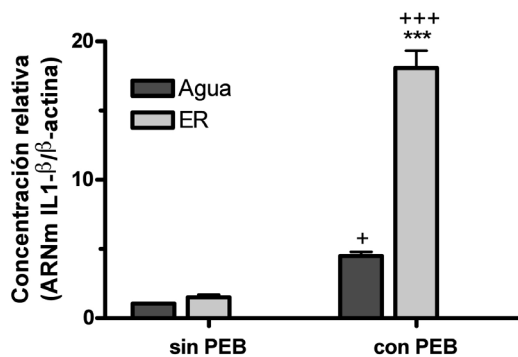
*p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs. Contralat o sin PE según corresponda (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 6



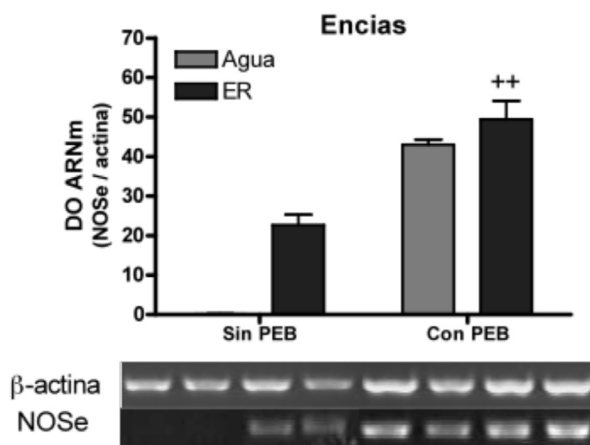
**p<0.01 vs. Agua, +p<0.05 y ++p<0.01 vs. Sin PE. (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 7



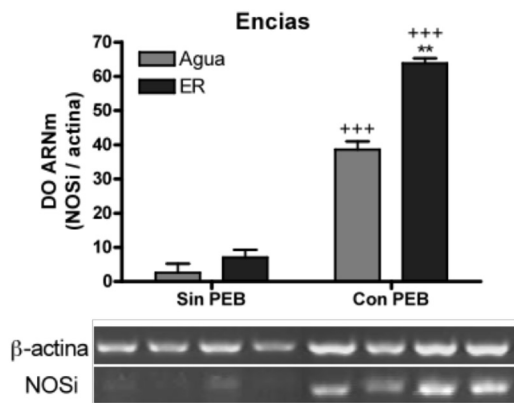
***p<0.01 vs. Agua, +++p<0.001 vs. Sin PE. (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 8



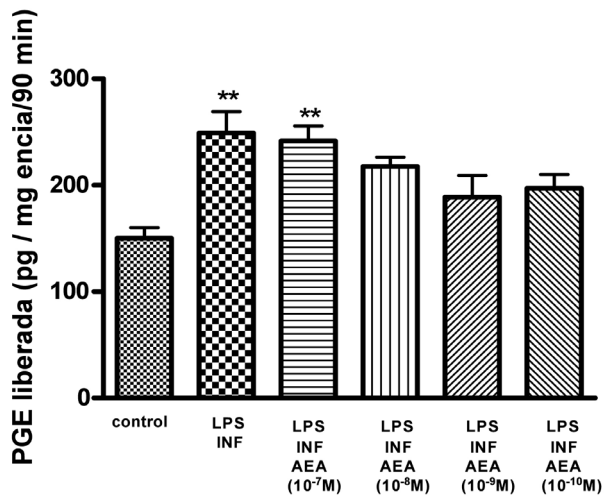
++p<0.01 vs sin PE (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 9



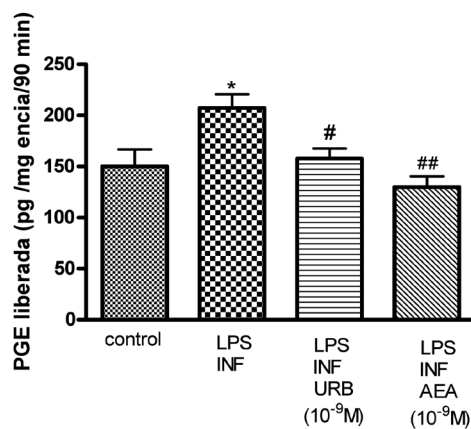
**p<0.01 vs sin Agua; +++p<0.001 vs. Sin PE (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 10



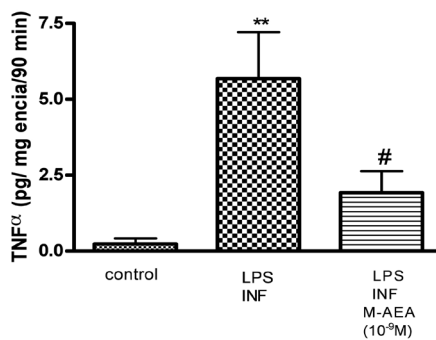
**p<0.01 vs control (Anova de 1 vía, post test de Dunnett)

Figura 11



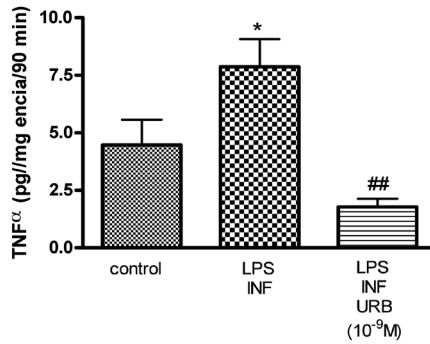
*p<0.05 vs control, #p<0.05 y ##p<0.01 vs. LPS-INF (Anova de 1 vía, post test de Newman Keuls)

Figura 12



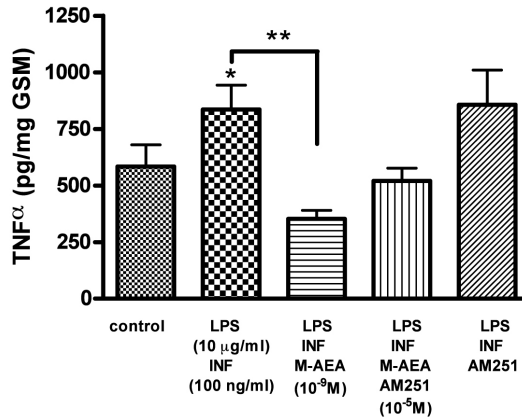
**p<0.01 vs control, #p<0.05 vs. LPS-INF (Anova de 1 vía, post test de Newman Keuls)

Figura 13



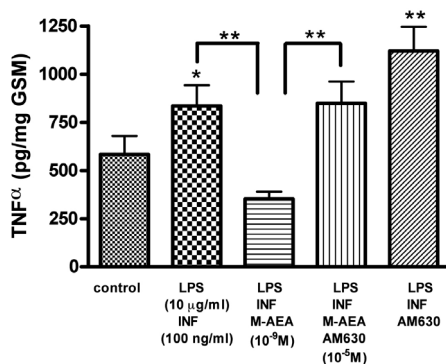
*p<0.05 vs control, ##p<0.01 vs. LPS-INF (Anova de 1 vía, post test de Newman Keuls)

Figura 14



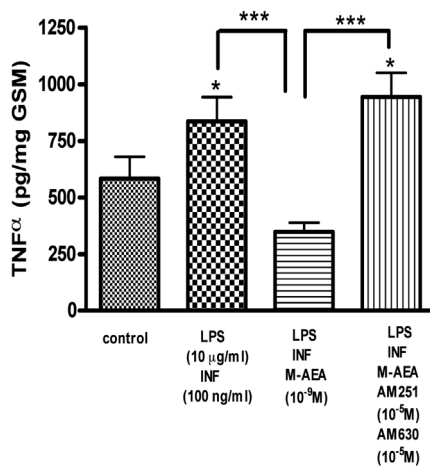
*p<0.05 vs control, **p<0.01 vs. LPS-INF (Anova de 1 vía, post test de Newman Keuls)

Figura 15



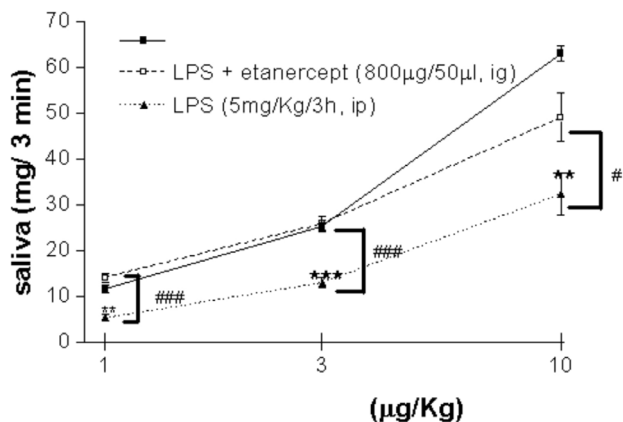
*p<0.05 vs control, **p<0.01 vs. Control o vs LPS-INF-MAEA, según corresponda (Anova de 1 vía, post test de Newman Keuls)

Figura 16



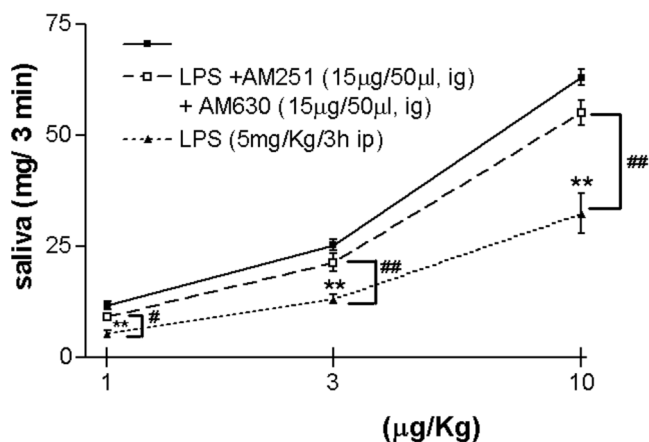
*p<0.05 vs control, ***p<0.01 vs. LPS-INF-MAEA (Anova de 1 vía, post test de Newman Keuls)

Figura 17



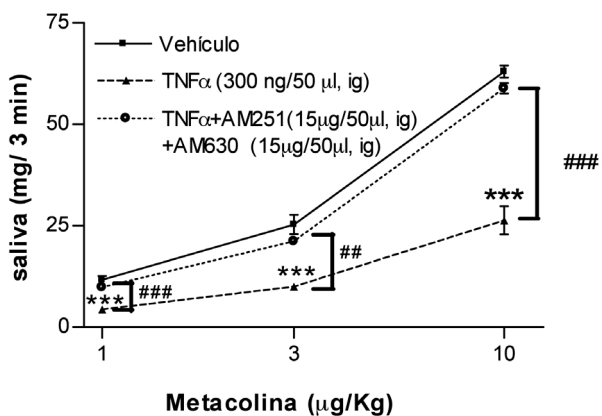
**p<0.01, p<0.001 vs. Vehículo y +p<0.05, +++p<0.001 vs. LPS + etanercept (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 18



**p<0.01 vs. Vehículo y +p<0.05, ++p<0.01 vs. LPS + AM251 (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 19



***p<0.001 vs. Vehículo y **p<0.01, ###p<0.001 vs. LPS + AM251+AM630 (Anova de 2 vías, post test de Tukey)

Figura 20

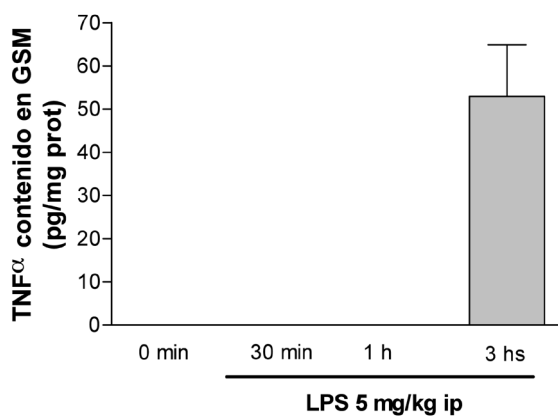
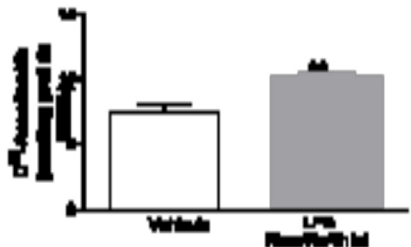
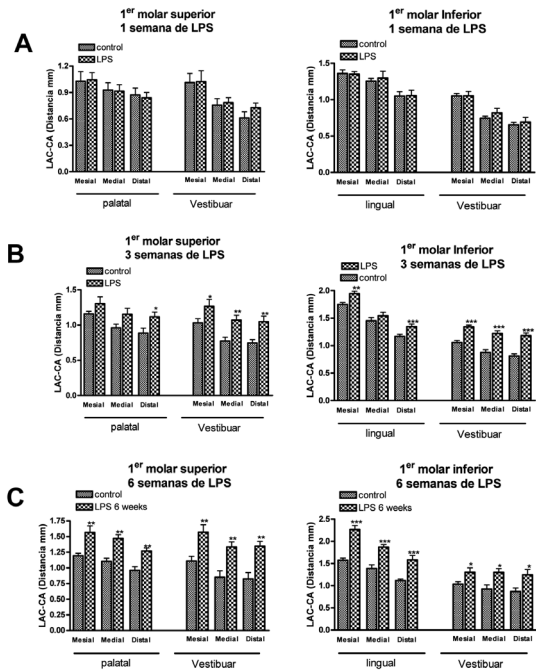


Figura 21



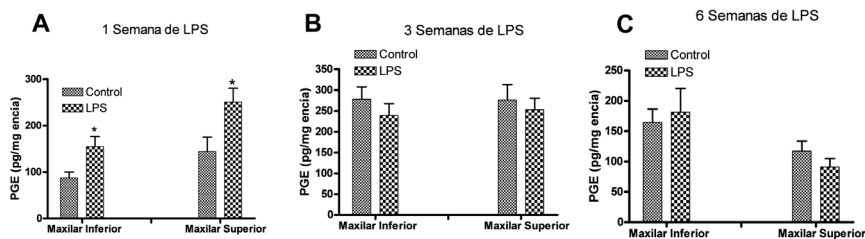
**p<0.01 vs. Vehículo (Test T de student)

Figura 22



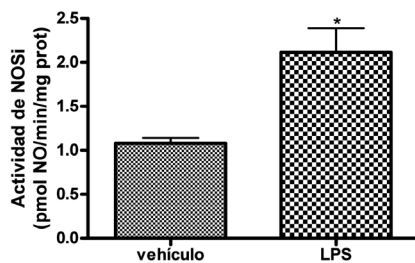
*p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs. respectivo control (Test T de student)

Figura 23



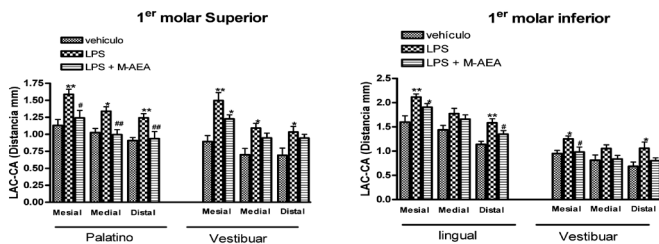
* $p < 0.05$ vs. respectivo control (Test T de student)

Figura 24



* $p < 0.05$ vs. vehiculo (Test T de student)

Figura 25



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. respectivo control y # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$ vs LPS (Anova de 1 vía y pst test de Newman Keuls)

Figura 26



COLONIZACIÓN Y SEPSIS POR LEVADURAS EN NEONATOS EN UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS

Giusiano Gustavo; Rojas, Florencia

Departamento Micología. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Av. Las Heras 727. (3500) Resistencia, Chaco. Argentina.

INTRODUCCION

Los importantes avances de la medicina moderna y los procedimientos invasivos han conducido a un aumento de la supervivencia de neonatos en unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN). Esta situación ha permitido un notable incremento en la frecuencia de infecciones fúngicas sistémicas y la gravedad de las mismas, causadas no solo por agentes conocidos, sino también por microorganismos hasta hace poco tiempo no considerados como patógenos (1,2).

Estudios sobre infecciones nosocomiales en los Estados Unidos muestran que durante los últimos años los hongos se posicionaron como el quinto patógeno intrahospitalario y en el cuarto lugar entre los microorganismos que causan infecciones del torrente sanguíneo (1,3,4,5).

Las infecciones más frecuentes en los recién nacidos pre-término son las micosis sistémicas. El diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras en estos pacientes comienza con la valoración del riesgo y entre los principales factores identificados se encuentran la prematuridad, el bajo peso, las internaciones prolongadas, la antibiótico y corticoterapia, la intubación endotraqueal, la nutrición parenteral, el uso de catéteres centrales, las malformaciones congénitas y las cirugías abdominales (2,6,7).

La vía endógena, a partir de la microbiota colonizante, es un importante mecanismo de transmisión de levaduras. La colonización por las especies de *Candida* está considerada como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de candidemias (2,6,8). La candidiasis invasora ocurre en el 6,9% de los neonatos colonizados y solo en el 0,76% de los no colonizados (3).

Las levaduras que se encuentran en el canal de parto constituyen la principal vía de transmisión exógena (transmisión vertical). Otra vía exógena son las manos del personal sanitario, las soluciones para nutrición parenteral, las formulas nutritivas y los artefactos biomédicos (transmisión horizontal) (6,8,9,10).

En los últimos años se han informado importantes cambios en la epidemiología de las candidiasis. En general, se revela una disminución de las candidemias por *Candida albicans* (*C. albicans*) y un incremento de las infecciones producidas por especies no *albicans* y otros géneros de levaduras, así como la emergencia de resistencia al fluconazol y, en menor medida, a otros antifúngicos (1-6,9-12).

En pacientes pediátricos, *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada y *C. parapsilosis* es el patógeno emergente que se encuentra en segundo lugar entre los responsables de candidemias (1,2,4,5,10,11). En menor proporción se aíslan otras especies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. kefyr* y *C. lusitaniae*. Por otro lado, se informa la emergencia de otros géneros de levaduras, entre los de mayor importancia, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Malassezia*, *Rhodotorula* y *Saccharomyces* (1,2,5,9-12).

El reconocimiento de las especies de *Candida* como patógenos predominantes en las UCIN, el uso indiscriminado de las drogas antifúngicas y la emergencia de géneros y especies poco conocidos, muestran la necesidad de conocer los microorganismos involucrados en estas infecciones y su sensibilidad frente a los antimicóticos de uso clínico, con el fin de poder establecer medidas preventivas y terapéuticas efectivas.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la epidemiología de las sepsis por hongos levaduriformes, de la colonización como factor predisponente y estudiar los perfiles de sensibilidad a drogas antifúngicas de uso convencional de esas levaduras, en neonatos en ICIN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el periodo de Octubre 2008 a Octubre 2010 se realizó un estudio multicéntrico, transversal, prospectivo en el que participaron salas de neonatología de la ciudad de Resistencia (Provincia del Chaco).

Muestras de sangre, orina y materia fecal de neonatos con signos y síntomas de sepsis, fueron recolectadas, antes de la terapia antifúngica y procesadas en sus respectivos laboratorios.

Las muestras de sangre fueron recolectadas por punción venosa periférica y estudiadas por lisis centrifugación (13). Las muestras de orina fueron obtenidas por punción suprapúbica y las de materia fecal por hisopado rectal.

Todos los hongos levaduriformes desarrollados fueron enviados al Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste para su identificación y realización de pruebas de sensibilidad antifúngica.

Las cepas fueron identificadas por sus características bioquímicas, fisiológicas y morfológicas según la metodología de Kreejer van-Rij (14) y el sistema comercial API ID 32-C.

Para las pruebas de sensibilidad antifúngica “in-vitro” se empleó el método de difusión en placa con sensidiscos Neosensitabs (Rosco®) y se ensayó la actividad de anfotericina B (AMB), ketoconazol (KTZ), itraconazol (ITZ), fluconazol (FCZ) y voriconazol (VCZ). Se interpretó como cepa Sensible (S), Resistente (R) o Intermedia (I) según la lectura de los halos y los puntos de corte establecidos por el fabricante.

RESULTADOS

Se recibieron 59 cultivos levaduriformes provenientes de 5 hemocultivos, 27 muestras de orina y 27 hisopados rectales.

De los 59 cultivos, se estudiaron 61 cepas, debido a que se encontraron 2 asociaciones, *C. albicans* y *C. glabrata* en un urocultivo y *C. guilliermondii* y *C. albicans* en un coprocultivo. En la **Tabla 1** se presenta la distribución de las especies aisladas de las diferentes muestras.

Tabla 1: Especies aisladas en las diferentes muestras estudiadas

Especies	Sangre	Orina	Hisopado rectal	Total
C. albicans	1 (20%)	16 (57.1%)	16(57.1%)	33 (54.1%)
C. parapsilosis	2 (40%)	6 (21.4%)	8 (28.6%)	16 (26.2%)
C. tropicalis	0	3 (10.7%)	1 (3.7%)	4 (6.6%)
C. glabrata	0	2 (7.1%)	2 (7.1%)	4 (6.6%)
C. guilliermondii	0	1 (3.7%)	1 (3.7%)	2 (3.3%)
C. famata	1 (20%)	0	0	1 (1.6%)
T. asahii	1 (20%)	0	0	1 (1.6%)
Total	5 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	61(100%)

C.: Candida, T.: Trichosporon

De acuerdo con los puntos de corte empleados, todas las cepas fueron sensibles a FCZ, VCZ y AMB. La **Tabla 2** muestra los valores obtenidos en las pruebas de sensibilidad de las 61 cepas estudiadas frente al KTZ y al ITZ.

La misma cepa de *C. guilliermondii* que resultó con sensibilidad intermedia al KTZ fue resistente al ITZ. La misma cepa de *C. parapsilosis* que presentó sensibilidad intermedia KTZ, también la presentó al ITZ.

Tabla 2. Valores obtenidos en la pruebas de sensibilidad al ketoconazol e itraconazol

	n	ketoconazol			itraconazol		
		S	I	R	S	I	R
<i>C. albicans</i>	33	33 (100%)	0	0	33 (100%)	0	0
<i>C. tropicalis</i>	4	4 (100 %)	0	0	4 (100 %)	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	16	15 (93.7%)	1 (6.3%)	0	15 (93.7%)	1 (6.3%)	0
<i>C. famata</i>	1	0	1 (100%)	0	0	0	1 (100%)
<i>C. guilliermondii</i>	2	1 (50%)	1 (50%)	0	1(50%)	0	1 (50%)
<i>C. glabrata</i>	4	0	3 (75%)	1(25%)	4 (100%)	0	0
<i>T. asahii</i>	1	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0
	61	54 (88.5%)	6 (9.8%)	1 (1.6%)	60 (98.4%)	0	1 (1.6%)

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A pesar de que el número de hemocultivos positivos procesados es escaso, es importante destacar que el 80% de las especies encontradas corresponde a levaduras diferentes de *C. albicans*. Esto coincide con otros estudios publicados donde es también mayor el porcentaje de levaduras aisladas de hemocultivos, distintas de *C. albicans* (1,3,5,11).

En dos de las cinco muestras de sangre, se aisló *C. parapsilosis*. Este patógeno oportunista ha sido reconocido como uno de los responsables más frecuentes de infección fúngica en neonatos. Su presencia es considerada una consecuencia de la transmisión horizontal por la interacción directa entre el personal de salud y el paciente hospitalizado (6,9,10,15-17).

Es relevante el aislamiento de *C. famata* y *Trichosporon asahii* (*T. asahii*) como agentes de sepsis. Estas especies incluidas dentro de las anteriormente consideradas inocuas o infrecuentemente relacionadas a infecciones, han sido informadas dentro de los preocupantes patógenos emergentes (1,11,18). Las infecciones causadas por *Trichosporon* spp. están asociadas con un amplio espectro de enfermedades que van, desde infecciones superficiales

en pacientes inmunocompetentes, hasta enfermedades sistémicas severas en inmunocomprometidos. *T. asahii* ha sido aislado en infecciones diseminadas en las UCIN ya que entre los factores de riesgo más importantes para desarrollar enfermedad invasora por este agente se encuentran, los recién nacidos pre-término de bajo peso, la antibióticoterapia de amplio espectro, la nutrición parenteral y la cateterización prolongada. La mortalidad asociada con la diseminación de *T. asahii* ha sido informada con valores del 60 al 80% (10,19,20). Por otro lado, la AMB ha demostrado tener poca actividad *in vitro* contra especies de *Trichosporon* y también se ha detectado resistencia a determinados agentes azólicos (9,19,20,21). Hay que considerar que tanto FCZ como AMB son las escasas drogas de elección para la terapia de neonatos en la actualidad (22). En nuestro caso *T. asahii* resultó sensible a estas drogas.

Todo recién nacido debe considerarse como un individuo inmunodeficiente funcional, ya que su sistema inmunológico es inmaduro en el momento del nacimiento (10). La colonización del tracto gastrointestinal de los neonatos hospitalizados es frecuente, lo que tiene relación directa con el desarrollo de infecciones diseminadas, con el consiguiente riesgo de mortalidad (6,9,10,15). En este trabajo *C. albicans* y *C. parapsilosis*, fueron las especies encontradas con mayor frecuencia como agentes colonizadores en muestras de orina y materia fecal. *C. albicans* es un componente habitual de la microbiota cutánea y del tracto gastrointestinal y genital. La mortalidad cruda de la candidemia asociada a esta especie es del 29% en niños (5). Su virulencia se debe a que puede desarrollar diversos factores como la adherencia a células epiteliales y endoteliales, enzimas hidrolíticas, formación de hifas y pseudomicelio, cambio fenotípico, entre otros (9,10). *C. parapsilosis* es considerada un importante patógeno nosocomial y el principal responsable de fungemias en neonatos de UCIN (10,11). En este estudio ocupó el segundo lugar en frecuencia como colonizador. El origen de las infecciones por *C. parapsilosis* es principalmente exógeno, adquirida a través de las manos del personal de salud y de guantes e instrumental contaminados (1,6,9,10,11,23). El alto porcentaje encontrado con colonizador y su aislamiento en hemocultivos demuestra una falta de control, como así también, la necesidad de la capacitación del personal interviniente en estas salas de cuidados intensivos. La aplicación de medidas de higiene y control permanente en las UCIN es de vital importancia para evitar estas infecciones nosocomiales.

C. tropicalis y *C. glabrata* se encontraron en tercer lugar con la misma proporción (6.6%). *C. tropicalis* es una especie con capacidad invasora y más

del 60% de los pacientes colonizados con esta especie desarrolla infección diseminada por traslocación intestinal. Por otro lado, *C. tropicalis* tiene mayor tendencia a desarrollar resistencia a las drogas azólicas que *C. albicans* (9,15,18). *C. glabrata* es uno de los patógenos nosocomiales más frecuentes en adultos y emergente entre los pediátricos, con alta índice de mortalidad (1,3,24). Los pacientes que han recibido profilaxis con FCZ pueden colonizarse con *C. glabrata* debido a su capacidad de desarrollar resistencia secundaria (1,11,24,25). En neonatos, dada su corta vida, se descarta la posibilidad de tratamientos previos, de allí la importancia de su aislamiento. Estos resultados acentúan la importancia del control sobre la colonización a fin de prevenir diseminaciones subsecuentes.

C. guilliermondii aislada como cuarto agente colonizador, ha sido informada en estudios previos realizados en pacientes pediátricos en esta región. En diversos estudios esta levadura presentó baja sensibilidad a los agentes azólicos de uso frecuente en neonatos y, por otro lado, se menciona su capacidad de desarrollar resistencia a la AMB durante el tratamiento (1,2,11,18,25,26,27). En nuestro estudio 1/2 cepas presentó baja sensibilidad a agentes azólicos.

En el total de las levaduras halladas no se encontraron problemas de sensibilidad frente al FCZ y la AMB, dos de las pocas opciones terapéuticas que tienen los neonatos. Tampoco frente al VCZ, que si bien no se presenta en formulación pediátrica al momento, se incluyó en el estudio para evaluar la respuesta de estas levaduras a esta droga (22). Por el contrario, KTZ fue la droga que mostró menor actividad general. Esto es importante considerar, dado que esta droga sigue siendo muy utilizada para el tratamiento de neonatos en nuestra zona.

Actualmente se considera que todas las especies de *Candida* pueden desarrollar resistencia secundaria a los azoles. La resistencia secundaria o cruzada se desarrolla gradualmente durante la terapia antifúngica y ha sido demostrada en aislamientos clínicos de *Candida* sp. (28,29). En nuestro trabajo, el 11.5% de las levaduras aisladas presentaron alguna alteración en su perfil de sensibilidad antifúngica.

C. glabrata, *C. famata* y *C. guilliermondii*, especies consideradas poco frecuentes en neonatos, presentaron sensibilidad disminuida frente a algunos de los agentes azólicos testeados. El 100% de las *C. glabrata* resultaron con sensibilidad disminuida al KTZ y la única especie con una cepa resistente. Estos valores son destacables ya que estos pacientes no han recibido terapia previa alguna que favorezca el desarrollo de resistencia secundaria.

Por otro lado, se ha observado que pacientes con terapia refractaria a KTZ, presentan resistencia a las demás drogas azólicas (28,29). Las levaduras pueden desarrollar resistencia cruzada a KTZ, ITZ, FCZ y, en ciertos casos, se puede observar valores altos de CIM para VCZ. En este estudio una cepa de *C. famata* y una de *C. guilliermondii* presentaron sensibilidad intermedia al KTZ y resistencia al ITZ. Es importante destacar que también una cepa de *C. parapsilosis* resultó con sensibilidad intermedia a ambos antifúngicos. Probablemente, como el KTZ sigue siendo utilizado en esta región, esta sea una evidencia del desarrollo de resistencia cruzada. Cabe aclarar que, de la misma manera que con VCZ, el ensayo de ITZ tampoco disponible en formulación pediátrica, fue realizado a fin de evaluar el comportamiento de estas levaduras frente a este antimicótico.

En las dos asociaciones encontradas se presentaron especies con sensibilidad disminuida a los azólicos. *C. glabrata* con resistencia a KTZ y *C. guilliermondii* con sensibilidad disminuida a KTZ y resistencia a ITZ. Esto demuestra la importancia de la detección de posibles asociaciones, y el estudio de sensibilidad, dada la diferente respuesta que las especies asociadas puedan presentar frente a los agentes antifúngicos de uso clínico.

Las infecciones por levaduras se han convertido en una de las causas mas comunes de infecciones fúngicas nosocomiales. El aumento de su incidencia y la asociación con elevados índices de mortalidad en neonatos, acen-túan la importancia del reconocimiento temprano de la colonización, para la prevención de estas infecciones. El presente trabajo permitió aportar datos a la escasa información existente en esta región del país, acerca de la distribución de especies levaduriformes colonizantes y causantes de candidemia en neonatos en UCIN. Dada la diversidad de agentes encontrada y la detección de cepas con perfiles de sensibilidad disminuida, resulta fundamental la vigilancia continua de estos pacientes a fin de detectar y prevenir la diseminación de estos microorganismos.

Los hongos levaduriformes aparecen como preocupantes patógenos nosocomiales en neonatos. Dadas las muy escasas opciones en la terapia antifúngica de estos pacientes, el reconocimiento de los factores de riesgo, la tipificación del agente etiológico o colonizante y el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de uso clínico disponibles, resultan de vital importancia para desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas eficaces.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the distribution and antifungal susceptibility profile of yeast species isolated from neonates in Neonatal Intensive Care Units (NICU) in northeast of Argentina. With these purpose 61 strains isolated from 5 bloodstream cultures, 27 suprapubic aspirations and 27 rectal swabs were studied. *C. parapsilosis* was the most frequent yeast in bloodstream isolates and *C. albicans* was the most frequent yeast associated with gastrointestinal tract colonization. With very low frequency, *C. famata* and *Trichosporon asahii* appears as bloodstream infection agents. *C. parapsilosis* was the second colonizer yeast. With low frequency, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. guilliermondii* were others yeast isolated as colonizers. A high rate of susceptibility to amphotericin B, fluconazole and voriconazole was observed. Ketoconazol show low activity in non *C. albicans* species. A *C. famata* and *C. guilliermondii* resistant strains to itraconazole, and *C. glabrata* resistant strain to ketoconazole, was detected. Its noteworthy the detection of resistant strains in neonates whom has not received previous antifungal therapies. The variations in the epidemiology of fungal infections observed and the antifungal resistance detected, emphasize the importance of performing a permanent surveillance to observe and to assess them.

BIBLIOGRAFIA

1. Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros Ce, Saporiti A, y participantes del Grupo EMIFN. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. Rev Argent. Microbiol. 2005; 37:189-195.
2. Pooli L, Nocetti FM, Pereda R, Rial MJ, Califano G. Candidemia en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales: identificación de factores de riesgo. Arch Argent Pediatr. 2006; 104:393-398.
3. Steinbach, WJ. Epidemiology of invasive fungal infections in neonates and children. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1321-1327.
4. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 2: 606-625.
5. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE, and NIAID Mycoses Study Group. A prospective obser-

- ational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 634–643.
6. Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19: 319–324.
 7. Dornbusch HJ, Groll A, Walsh TJ. Diagnosis of invasive fungal infections in immunocompromised children. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16:1328–34.
 - 8-Fridkin SK., Kaufman D, Jonathan RE, Shetty S, Horan T, and the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals Changing Incidence of *Candida* Bloodstream Infections Among NICU Patients in the United States: 1995–2004. *Pediatrics* 2006; 117:1680-1687.
 9. Giusiano, GE. Tesis de Doctorado: Caracterización de la epidemiología de las infecciones por hongos levaduriformes en pacientes pediátricos hospitalizados. 2007. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.
 10. Cantón E, Viudes Á, Pemán J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 51-55.
 11. Giusiano GE, Mangiaterra M., Rojas F, Gómez V. Yeasts species distribution in Neonatal Intensive Care Units in northeast Argentina. *Mycoses* 2004; 47: 300–303.
 12. Godoy P, Tiraboschi N, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, De Almeida LP, Da Matta DA, Lopes Colombo A. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98:401-405.
 13. Negroni R, Guelfand L. Manual de procedimientos para laboratorios de Micología médica. Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana. Federación Bioquímica de Prov. de Buenos Aires Ed: 1999; suplemento 1.
 14. Kreeger-Van Rij, NJW. The Yeasts: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1984.
 15. Muñoz P, Burillo A, Bouza E. Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:38–45.
 16. Pfaller AM. Epidemiology of Fungal Infections: The Promise of Molecular Typing. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1535-1539.

17. Pfaller MA, Diekema DJ. Role of Sentinel Surveillance of Candidemia: Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3551-3557.
18. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 462-478.
19. Téllez-Castillo CJ, Gil-Fortuño M, Centelles-Sales I, Sabater-Vidal S, Pardo Serrano F. Infección fatal por *Trichosporon asahii* en una recién nacida de pretérmino. *Rev Chil Infect* 2008; 25: 213-215.
20. Wolf DG, Falk R, Hacham M, Theelen B, Boekhout T, Scorzett G, Shapiro M, Block C, Salkin IF, Polacheck I. Multidrug-Resistant *Trichosporon asahii* Infection of Nongranulocytopenic Patients in Three Intensive Care Units. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4420-4425.
21. Chowdhary A, Ahmad S, Khan ZU, Doval DC, Randhawa HS. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: a case report and an update. *Indian J Med Microbiol* 2004; 22:16-22.
22. Groll AH, Tragiannidis A. Update on antifungal agents for paediatric patients. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16:1343-1353.
23. Orozco PA, Cortes JA, Parra CM. Colonización por levaduras en recién nacidos y personal de salud en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales de un Hospital Universitario en Bogotá. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26:108-111.
24. Fidel PL. Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 80-96.
25. Giusiano G, Mangiaterra M, Rojas F, Gómez V. Azole resistance in neonatal intensive care units in Argentina. *J Chemother* 2005; 17:347-50.
26. Cheng MF, Yu KW, Tang RB, Fan YH, Yang YL, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48:33-37.
27. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, Gibbs DL, Newell VA, and the Global Antifungal Surveillance Group. *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3551-3556.
28. Müllera FMC, Weigc M, Petera J, Walsh TJ. Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical

Candida albicans isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis J Antimicrob Chemother 2000; 46: 338-341.

29. Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. J Antimicrob Chemother 1993; 31: 463-471.



RESPUESTA INNATA Y ESPECÍFICA A AGENTES CAUSANTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS BACTERIANAS EN PACIENTES CON ASMA Y EN PACIENTES CON DEFICIENCIA ESPECÍFICA FRENTE A ANTÍGENOS POLISACÁRIDOS

Susana Fink, Rubén D. Paz

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

INTRODUCCIÓN

Nos propusimos intentar comprender algunos de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune innata y la adquirida en los pacientes pediátricos con asma y en aquellos con deficiencia de respuesta específica frente a antígenos polisacáridos; niños susceptibles de padecer infecciones respiratorias bacterianas por *S. pneumoniae*, tanto en el tracto respiratorio alto y bajo, como cuadros diseminados.

La fisiopatología del asma se caracteriza por edema e hiperemia de la mucosa e infiltración de la misma con linfocitos, mastocitos y eosinófilos. Así se producen infecciones bacterianas secundarias a la infección viral, siendo la más frecuente por neumococos. El asma produce una alta susceptibilidad a contraer infecciones respiratorias virales y bacterianas sin mayor prevalencia de tuberculosis.

El asma es una patología inflamatoria que se caracteriza por edema e hiperemia de la mucosa con infiltración por linfocitos, mastocitos y eosinófilos. En su fisiopatogenia interviene la respuesta inmune celular con predominio de citoquinas tipo Th2. En los pacientes asmáticos la hipersecreción mucosa disminuye la capacidad del *clearance* ciliar, lo que favorece infecciones virales que desencadenan el cuadro asmático, facilitando infecciones bacterianas secundarias, siendo la más frecuente por *Streptococcus* (*S. pneumoniae*) o neumococo.

Los pacientes con Defecto de Anticuerpos Específicos (respuesta deficiente de anticuerpos para antígenos polisacáridos), definidos como aquellos con niveles normales de inmunoglobulinas séricas y con una alteración

funcional específica frente al desafío con antígenos polisacáridos polivalentes, se presentan clínicamente con infecciones bacterianas recurrentes, de las cuales la más frecuente es por neumococos. Estos pacientes no registran mayor incidencia de infecciones por gérmenes intracelulares como el *M.tuberculosis* que otros niños.

El neumococo es una bacteria capsulada Gram + que es el agente causal de neumonía adquirida de la comunidad más prevalente, provoca además otitis, septicemias y meningitis bacterianas. Es responsable de la mayoría de las infecciones respiratorias tanto en los pacientes con asma como en aquellos con deficiencias en la respuesta específica de anticuerpos contra polisacáridos. Por otra parte, el *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular. La respuesta inmune de los individuos expuestos al *M.tuberculosis* que desarrollan la enfermedad es tipo Th2, ineficaz para controlar la infección, mientras que aquellos individuos infectados sin enfermedad activa presentan una respuesta Th1.

Como ya se mencionó, se planteó como objetivo general estudiar la respuesta inmune al neumococo en estos dos grupos de pacientes, para explicar la susceptibilidad de estos individuos a infectarse con *Streptococcus pneumoniae*.

Tradicionalmente se considera que la protección contra este patógeno es por anticuerpos y no se considera relevante la respuesta celular. Como la mayoría de los anticuerpos están dirigidos contra los polisacáridos de su cápsula, se considera que se trata de respuestas B independientes de los linfocitos T. Sin embargo, diversos autores, y en particular el grupo de C.M.Snapper, han destacado el papel de los linfocitos T en esta respuesta, atribuyendo un papel a los linfocitos CD4 en la respuesta anti-polisacáridos generada (J.Colino y cols, J Immunol. 2009,183(3):1551-9).

Por otro lado se ha estudiado poco el papel de células de la inmunidad innata en los pacientes que presentan falla en la respuesta a los antígenos polisacáridos, que se diagnostican a partir de la deficiente respuesta a la vacuna contra el *S.pneumoniae*. Hay escasa bibliografía acerca de esta inmunodeficiencia y se describe sólo un defecto en la maduración de los linfocitos B. El sistema inmune innato es un componente filogenética y evolutivamente antiguo de la defensa del huésped contra infecciones, que provee mecanismos sofisticados para proteger a macroorganismos complejos del ataque por microorganismos. Durante el desarrollo de este trabajo se publicó un trabajo referido a células dendríticas, células de la inmunidad innata, en este tipo de pacientes (Jyonouchi H et al Eur J Pediatr. 2010;169(10):1233-9)

que describe una falta de maduración de las células dendríticas plasmacitoides en estos pacientes, y una menor expresión del marcador CD86.

Nosotros planteamos estudiar una subpoblación de monocitos, también células de la inmunidad innata, aquellos que expresan el marcador CD16 además del característico CD14 en su superficie. Estos monocitos se asocian a numerosas patologías inflamatorias (Ziegler-Heitbrock L, J Leukoc Biol. 2007; 81(3):584-92). Se consideran proinflamatorios por su expresión elevada de citoquinas que favorecen la inflamación y por su mayor capacidad de presentación antigénica.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Pacientes: Se estudiaron pacientes con asma atópico de 7 o más años de edad. La selección se hizo por dosaje de IgE, elevado para la edad, historia de hiperactividad bronquial, más de dos crisis de broncoespasmos por año, pacientes positivos para tests cutáneos para diferentes alérgenos. Todos los individuos estudiados habían recibido vacuna BCG. Se evaluó un total de pacientes, en período de crisis (n=12) y/o de intercrisis (n=26), pero no en todos se realizó la totalidad de las determinaciones.

Se estudiaron además 8 pacientes no asmáticos, no atópicos con respuesta deficiente de anticuerpos anti-polisacáridos (FRPS).

Controles: Para los estudios en monocitos se evaluó un número equivalente de controles sanos de 7 o más años de edad. Para los estudios en linfocitos se estudiaron individuos sanos (no asmáticos y no atópicos que realizan laboratorio prequirúrgico para cirugías programadas de igual rango de edad (7 a 16 años) (Total n=19). No en todos los controles se realizaron todas las determinaciones.

Se requirió de los pacientes un consentimiento informado tanto para la extracción de las muestras como para su participación en los estudios.

Antígenos: Se utilizó *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 cultivado, lavado e inactivado por calor, provisto por el Laboratorio de Bacteriología Central del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr Malbrán, así como *Mycobacterium tuberculosis* H37-RV, cultivado e inactivado por calor, provisto por el Servicio de Micobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr Malbrán. Se emplearon 10 ul de una

suspensión de $DO=1$ por cada 1×10^6 células, en 1 ml como estímulo en cultivos de 48 o más horas, para una evaluación comparativa de la respuesta de subpoblaciones celulares cultivadas con *S. pneumoniae* y con *M. tuberculosis*.

Evaluación de poblaciones celulares y antígenos de activación :

Se determinaron las poblaciones que expresan CD3, CD4, CD14 y CD16 en células mononucleares periféricas (CMNP) obtenidas por gradiente de Ficoll-Hypaque, con los respectivos anticuerpos conjugados con fluorocromos por citometría de flujo en el día de la extracción (D0) y a las 48 h de cultivo (D2). Se determinaron por citometría de flujo las poblaciones que expresan CD25 y CD69 en CMNP con los respectivos anticuerpos conjugados con fluorocromos.

Producción de citoquinas: Para la evaluación del IFN γ , la IL-5 y la IL-10, se estudiaron 11 pacientes asmáticos atópicos tanto en crisis como en estabilidad, así como 10 controles sanos no asmáticos, no atópicos de 7 o más años de edad. Para la determinación de la capacidad de producción de las citoquinas se estimularon células de sangre total con PMA/ionomicina en presencia de Brefeldina A; y se marcaron con anti CD3 y el anticuerpo anti-citoquina correspondiente con permeabilización (Fix and Perm). Se determinó el porcentaje de células positivas por citometría de flujo.

RESULTADOS:

Estudios en monocitos

Se evaluaron los monocitos en los pacientes con FRPS y en controles normales. Los pacientes presentan un porcentaje significativamente más elevado de monocitos con fenotipo CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$, como puede verse en la siguiente Figura.

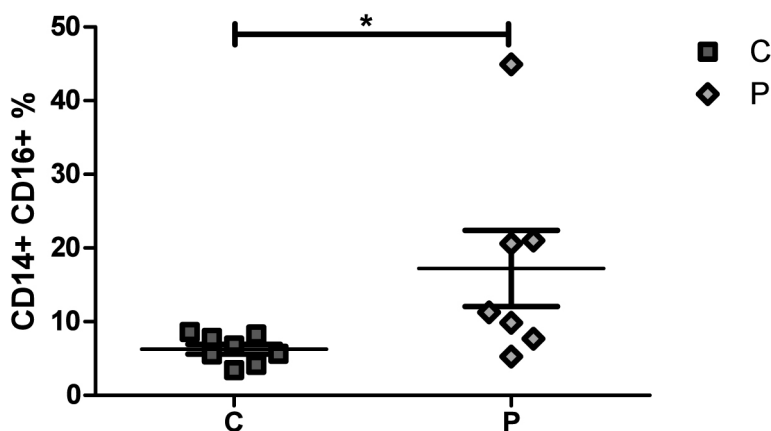


Figura 1:

Estudios en linfocitos

Expresión de CD69:

Se evaluó la expresión del antígeno de activación temprana CD69 en la región de linfocitos en el día de toma de la muestra (D0) y a las 48 hs de cultivo en presencia o ausencia de los antígenos bacterianos. Los resultados pueden verse en la Figura 2. La expresión en D0 no difiere en los grupos evaluados, es decir pacientes FRPS, pacientes asmáticos en crisis, pacientes asmáticos en intercrisis y controles sanos. Se observa un aumento de expresión de CD69 en respuesta a ambos antígenos en todos los grupos siendo mayor frente al *M.tuberculosis*, en especial en las células de los pacientes FRPS y de los asmáticos en intercrisis. Los linfocitos de asmáticos en crisis son los que responden más al *S.pneumoniae*.

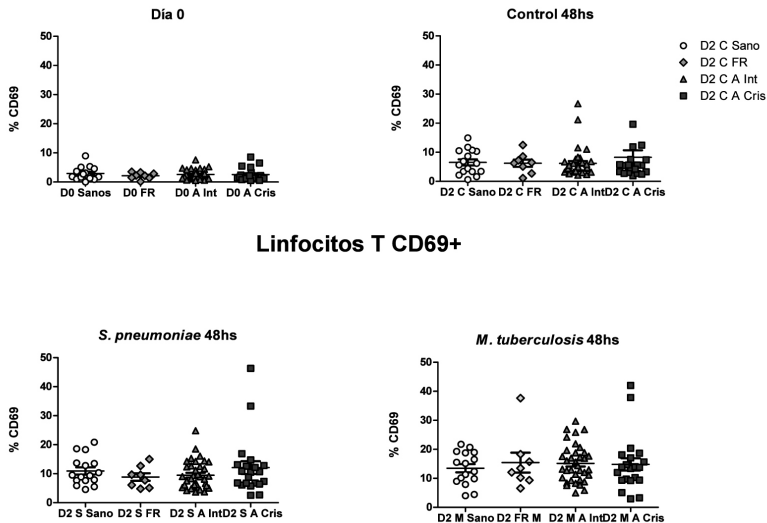


Figura 2

Expresión de CD25:

En forma análoga se evaluó la expresión de CD25, que forma parte del receptor para interleuquina 2 y es considerado un antígeno de activación tardía, tanto en D0 como luego del cultivo en presencia o ausencia de los antígenos bacterianos. Las células de los pacientes con FRPS en D0 presentan un porcentaje mucho menor de células que expresan CD25 que los demás grupos, como puede verse en la Figura 3.

Como puede ser observado en la Figura 4, al estimular con los antígenos bacterianos, la expresión de CD25 no aumenta en las células de los pacientes con FRPS con *S. pneumoniae* pero sí con *M. tuberculosis*.

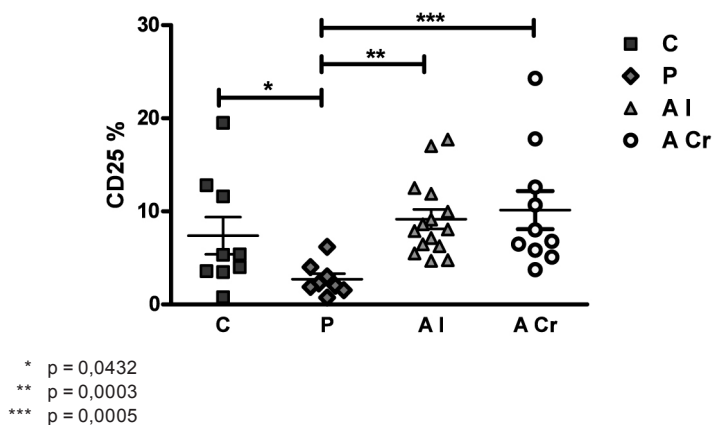


Figura 3

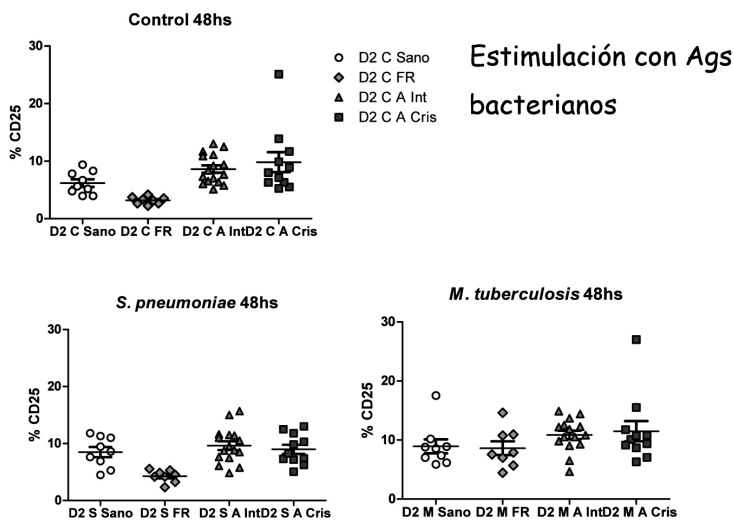


Figura 4

Capacidad de producción de citoquinas:

Se evaluó la capacidad de producir citoquinas de células de sangre periférica de los pacientes y controles.

Se tomó IFN γ como representativo de las citoquinas Th1, IL-5 como representativo de las Th2 e IL-10 como citoquina de rol regulatorio. No se observaron diferencias en la capacidad de producción de IFN γ en los linfocitos T de los distintos grupos de pacientes y los controles, como puede verse en la Figura 5.

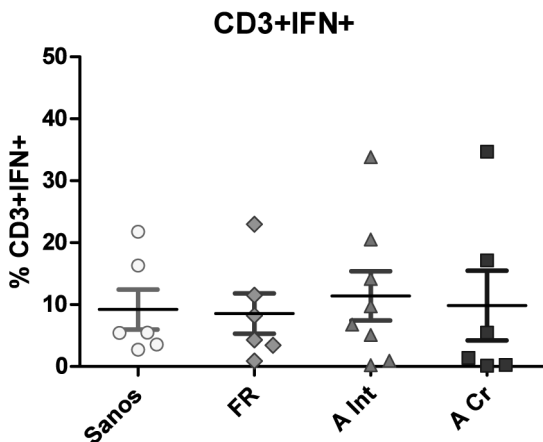


Figura 5

Tampoco se observan diferencias en la producción de IL-5 entre los linfocitos T de los controles y de los pacientes con FRPS, pero es algo más elevada en los pacientes asmáticos en intercrisis y notoriamente más elevada en aquellos en crisis, como puede verse en la Figura 6, aunque este grupo presenta datos más dispersos.

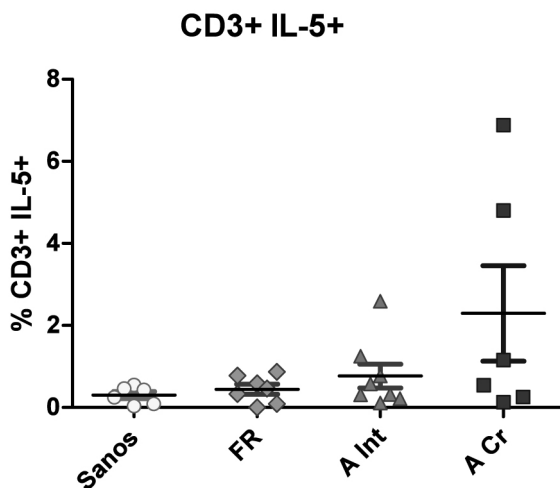


Figura 6

La capacidad de producción de IL-10 es, en promedio, mayor en los linfocitos de todos los pacientes comparados con los controles sanos, como se observa en la Figura 7. Sin embargo, hay dispersión de datos que podrían llegar a definir en cada caso pacientes con valores muy bajos, comparables a los de los controles, y otros elevados. Esto es particularmente notorio en los pacientes con FRPS y deberemos analizar si se correlaciona con datos clínicos que puedan diferenciar a estos pacientes.

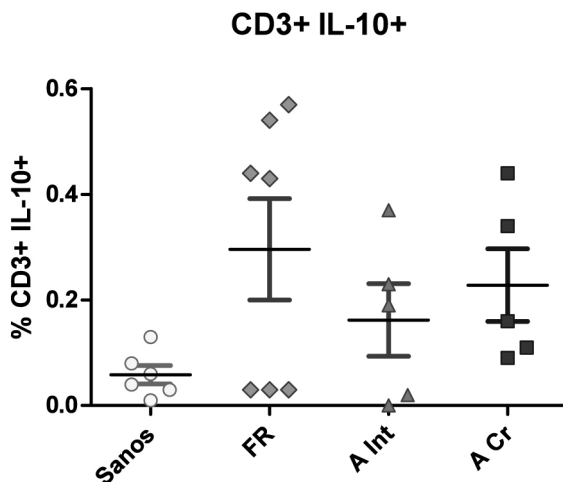


Figura 7

Por lo tanto, hemos descrito hallazgos novedosos en las células de los pacientes con FRPS, los que presentan un número elevado de monocitos CD14+CD16+ y un número reducido de linfocitos CD25+.

Hemos observado también algunas diferencias en la respuesta a los antígenos bacterianos estudiados, con poca respuesta por expresión de CD25 al neumococo, tanto en las células de los pacientes con FRPS como en las de aquellos con asma en sus distintas etapas. Sin embargo estas células conservan su capacidad de responder a otra bacteria como el *M.tuberculosis*.

Encontramos diferencias en la capacidad de producción de la citoquina Th2 IL-5, mucho mayor en las células de los pacientes con asma que en las de aquellos con FRPS y de los controles normales.

Asimismo observamos diferencias en la producción de la IL-10, si bien debemos analizar si corresponde separar a los pacientes en grupos con alta y baja capacidad de producir IL-10 según sus características clínicas.

ABSTRACT

Asthma is a clinical syndrome of multifactorial etiology characterized by recurrent episodes of airway obstruction that resolve either spontaneously or in response to treatment.

In asthma patients the air filtration capacity of cilia is diminished, facilitating viral infections that trigger the asthma crisis. Under those conditions bacterial infections secondary to the viral infection are produced. The most frequent bacterial agent is the Gram + capsulated bacterium *Streptococcus (S.) pneumoniae* or pneumococcus.

Specific antipolysaccharide antibody deficiency (SPAD) patients are defined as patients with normal levels of serum immunoglobulins and a specific functional alteration when challenged with polyvalent polysaccharide antigens. Their clinical presentation involves recurrent bacterial infections of which the most frequent is caused by pneumococci. Innate immune cells have been scarcely studied in these patients.

Our objective was to study the immune response to *S. pneumoniae* in these two groups of patients and some characteristics of their cells, in order to understand the basis of their susceptibility to infection with pneumococcus.

In the present report we describe new findings in the cells of SPAD patients, which present high CD14+CD16+ monocyte counts and a reduced number of CD25+ lymphocytes. We have also observed some differences in the response to the bacterial antigens studied, *S. pneumoniae* and *M.tuberculosis*, with low response to *S. pneumoniae* evaluated by CD25 expression, both in cells from SPAD patients and from asthma patients in different stages. Nevertheless their cells maintain their response capacity to another bacterium such as *M.tuberculosis*.

No differences in IFN γ production capacity could be observed when cells from SPAD patients, asthma patients and healthy controls were evaluated.

On the other hand, we have observed differences in the interleukin (IL)-5 production capacity of cells from the different groups, much higher in the cells from asthma patients compared to those of SPAD patients and healthy controls.

We have also observed differences in IL-10 production capacity, higher in average in the T cells of all patients when compared to healthy controls. Nevertheless many data are scattered and two groups might be defined, some having low values, comparable to those of controls, and some high values. This is remarkable in the cells of SPAD patients and an analysis to evaluate if there is correlation with clinical data that may establish differences in the two groups of patients remains to be performed.



DETECCIÓN DE *MYCOPLASMA HOMINIS*, *UREAPLASMA UREALYTICUM* Y *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN MUESTRAS DE SEMEN MEDIANTE PCR MULTIPLE.

Gómez María V., Deluca Gerardo D., Merino Luis Antonio
Facultad de Medicina- Universidad Nacional del Nordeste (UNNE)

RESUMEN

La infección genital es una de las principales causas de infertilidad en el mundo. Actualmente, se reconoce que las infecciones urogenitales producidas por *Chlamydia trachomatis* (Ct) son las más prevalentes entre las infecciones de transmisión sexual (ITS) superando incluso a la sífilis y a la gonorrea. Por otra parte, *Mycoplasma hominis* (Mh) y *Ureaplasma urealyticum* (Uu), a pesar de su discutido rol como patógeno, son considerados responsables indiscutidos de un importante número de patologías urogenitales. El objetivo de este trabajo fue poner a punto una técnica de PCR múltiple para determinar la frecuencia de Mh, Uu y Ct en hombres con diagnóstico presuntivo de infertilidad. Se estudiaron 80 muestras de semen, que fueron recolectadas previa abstinencia sexual de 72 hs. Para determinar la frecuencia de los microorganismos mencionados se utilizó una PCR multiple basada en cebadores específicos para cada uno de ellos. En el total de muestras analizadas se observaron 16 positivas para Ct (20%), 11 para Uu (13,75%) y 3 para Mh (3.75%). Además, se detectaron 1 coinfecciones por Ct y Mh (1,25%); 6 por Ct y Uu (7,5%) y 1 por Ct, Mh y Uu (1,25%).

Discusión: La prevalencia de estos microorganismos varía ampliamente dependiendo de población estudiada, edad, factores de riesgos asociados, área geográfica analizada, nivel socioeconómico, técnica diagnóstica utilizada, etc. Sin embargo los valores de frecuencia observados para Ct y Uu en este trabajo son elevados por lo que no descartamos que los mismos pudieran estar involucrados directamente como responsables de la infertilidad en la población estudiada.

Palabras clave: Chlamydia trachomatis, infertilidad, PCR multiple

INTRODUCCIÓN:

La infección genital es una de las principales causas de infertilidad en el mundo, pudiendo afectar cada una de las partes de la anatomía genital femenina y masculina.¹⁸

Actualmente, se reconoce que las infecciones urogenitales producidas por *Chlamydia trachomatis* (Ct) son las más prevalentes entre las infecciones de transmisión sexual (ITS) superando incluso a la sífilis y a la gonorrea. Por otra parte, *Mycoplasma hominis* (Mh) y *Ureaplasma urealyticum* (Uu), a pesar de su discutido rol como patógeno; hoy en día son considerados responsables indiscutidos de un número importante de patologías urogenitales en hombres y mujeres. A estos tres agentes se los ha encontrado asociados a cistitis, uretritis, endometritis, salpingitis, cervicitis crónica, enfermedad inflamatoria pélvica, fiebre post-parto infertilidad y aborto en las mujeres; mientras que en el varón se han asociado a uretritis, epididimitis, orquitis, infertilidad y en menor frecuencia prostatitis.^{2; 6; 7; 10; 12; 13; 18; 19; 20; 21.}

Una de las principales características que presentan estos microorganismos es la necesidad de condiciones especiales para su desarrollo, razón por lo cual su aislamiento e identificación no están al alcance de cualquier laboratorio de microbiología y por la cual durante mucho tiempo su diagnóstico ha quedado postergado en los laboratorios asistenciales. Habitualmente se sospecha de la infección por alguno de estos microorganismos una vez agotada la investigación de otras bacterias que pudieran dar una clínica similar. En los casos de infertilidad, la situación es aún más compleja dado que en el 80% de los casos las infecciones por estos agentes se presentan en forma asintomática.^{2;6;10;17} En los últimos años, las técnicas moleculares para detección de ácidos nucleicos (AN) han evolucionado marcadamente, y en la actualidad, la aplicación de estas metodologías, en sus diversos formatos, para la detección de Ct, Mh y Uu han demostrado ser de gran utilidad, siendo altamente sensibles específicas y no requiriendo mayores exigencias para el transporte y conservación de las muestras.^{2; 5; 7; 19.}

El objetivo de nuestro trabajo fue poner a punto una técnica de PCR múltiple para determinar, en un solo paso y en una misma reacción, la presencia de Ct, Mh y Uu, así como determinar la frecuencia de estos microorganismos en muestras de semen de hombres con diagnóstico presuntivo de infertilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se estudiaron 80 muestras de semen de pacientes con diagnóstico presuntivo de infertilidad provenientes de distintas clínicas privadas de la ciudad de Corrientes. El material de muestra se obtuvo mediante masturbación, previa abstinencia sexual de 72 hs.

La extracción del material genómico se realizó mediante un Kit de extracción comercial con columnas de intercambio iónico (NucleoSpin®). Posteriormente el templado fue sometido a una PCR múltiple para amplificar secuencias genómicas características de cada uno de los microorganismos estudiados haciendo uso de cebadores específicos para cada uno de ellos (Tabla1).

Las condiciones de máxima sensibilidad y especificidad de la PCR ensayada fueron determinadas experimentalmente. Finalmente, las condiciones óptimas para un volumen final de reacción de 20 µl fueron: 10 mM de Tris-HCl (pH8,3), 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs c/u, primers (0.1 µM de Ct, 0.5 µM de Mh y Uu) El ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 7 min. El material amplificado se corrió en un gel de agarosa al 2.5 %, que posteriormente se tiñó con una solución de bromuro de etidio para poder visualizar las bandas de amplificación por exposición a luz UV a 320nm (Figura 1).

RESULTADOS

En 31 muestras (38.7%) de las 80 examinadas se observó la presencia de ADN de al menos uno de los gérmenes evaluados. La tabla 2 muestra las frecuencias halladas para cada uno de ellos como así también las infecciones concomitantes.

Discusión de Resultados y Conclusiones:

Según datos obtenidos en numerosos estudios, la prevalencia de Ct oscila en un rango del 2–30% dependiendo de población estudiada, edad, factores de riesgos asociados, área geográfica analizada, nivel socioeconómico, técnica diagnóstica utilizada, etc. 10, 14, 15, 16, 21. Teniendo en cuenta la prevalencia en distintas partes del mundo y de acuerdo a las frecuencias encontradas en nuestro trabajo podemos concluir que a pesar de no contar

con datos epidemiológicos previos de prevalencia de Ct en muestra masculina en la región norte de Argentina, nuestro trabajo muestra una alta frecuencia para esta bacteria (20%). Con respecto a los micoplasmas urogenitales, la frecuencia hallada en este trabajo (Uu: 13.75% y Mh 3.75%), es similar a la encontrada por Nassar et al 2008., sin embargo, debe tenerse en cuenta que la misma puede variar ampliamente en diferentes poblaciones, fenómeno similar a lo observado para Ct.

Sin embargo los valores de frecuencia observados para Ct y Uu en este trabajo son elevados por lo que no descartamos que los mismos pudieran estar involucrados directamente como responsables de la infertilidad en la población estudiada.

Los resultados obtenidos en esta investigación justificarían la implementación en forma rutinaria de metodologías de detección simultánea de estos agentes. A su vez, esto, resultaría de gran importancia para la administración de un tratamiento rápido y efectivo con el fin de disminuir la diseminación de estas infecciones y evitar las secuelas que las mismas ocasionan cuando no son tratadas en tiempo y forma.

Agradecimientos:

Los autores expresan su más profundo agradecimiento a la **Fundación “Alberto J. Roemmers”** por el subsidio otorgado que permitió llevar adelante el presente trabajo de investigación.

ABSTRACT

Genital infection is a major cause of infertility in the world. Now recognized that urogenital infections caused by *Chlamydia trachomatis* (Ct) are the most prevalent sexually transmitted infections (STIs), surpassing even the syphilis and gonorrhea. In addition, *Mycoplasma hominis* (Mh) and *Ureaplasma urealyticum* (Uu), despite his controversial role as a pathogen, are considered responsible undisputed a significant number of urogenital diseases. The aim of this study was to develop a multiplex PCR to determine the frequency of Mh, Uu and Ct in men with a presumptive diagnosis of infertility. We studied 80 samples of semen, which were collected after 72 h abstinence. To determine the frequency of the mentioned microorganisms used a PCR-based multiple specific primers for each of them. In total 16 samples were found positive for Ct (20%), 11 for Uu (13.75%) and 3 for Mh (3.75%). In addition, co-infections were detect-

ed Ct 1 and MH (1.25%), 6 per Ct and Uu (7.5%) and 1 Ct, Mh and Uu (1.25%). Discussion: The prevalence of these organisms varies widely depending on population studied, age, associated risk factors, geographic area analyzed, socioeconomic status, diagnostic technique used, etc. However, the observed frequency values for Ct and Uu in this work are high so do not rule out that they might be involved directly as responsible for infertility in the population studied.

Keywords: Chlamydia trachomatis, infertility, multiple PCR

BIBLIOGRAFÍA

1. Cristina Santos, Fabiane Teixeira, Ana Vicente; and Spartaco Astolfi-Filho. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. Brazilian Journal of Infectious Diseases 2003; 7(2):91-95.
2. Golshani M, Eslami G, Mohhammadzadeh Ghabadloo Sh, Fallah F, Goudarzi H, Soleimani Rahbar AA, Fayaz F. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by Multiplex PCR in Semen Sample of Infertile Men. Iranian J Publ Health, 2007; 36(2): 50-57.
3. Kathleen A. Stellrecht, Amy M. Woron, Nada G. Mishrik, and Richard A. Venezia. Comparison of Multiplex PCR Assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasmas. Journal of Clinical Microbiology, 2004; 42(4):1528-1533.
4. Kui Teng, I Muyiao Li, Wanfang Yu, Houjun Li, Dawei Shen, and Dexiang Liu. Comparison of PCR with Culture for Detection of *Ureaplasma urealyticum* in Clinical Samples from Patients with Urogenital Infections. Journal of Clinical Microbiology, 1994; 32(9): 2232-2234.
5. Méndez Alvarez Sebastián, Pérez-Roth Eduardo. La PCR múltiple en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(3):183-92
6. Gdoura, Wiem Kchaou, Chiraz Chaari, Abir Znazen, Leila Keskes, Tarek Rebai and Adnane Hammami. *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. BMC Infectious Diseases 2007; 7(129):1-9
7. Arráiz Naltet, Marcucci Rafael, Urdaneta Baldimiro, Colina Sonia, Romero Zoila. Diagnóstico molecular en la evaluación de infecciones urogenitales por *Chlamydia trachomatis*. Rev Obstet Ginecol Venez 2008; 68(3):195-201.

8. Deluca Gerardo D, Marín Héctor M., Schelover Eduardo, Chamorro Estela M., Vicente Lilian., Ibhom Mónica, Alonso José M. Infección por *Chlamydia Trachomatis* y *Papilomavirus* en mujeres con alteraciones citohistológicas de cuello uterino. Medicina (Buenos Aires) 2006; 66: 303-306
9. Figueroa Jesús Reyna, Gabriel Graciela Villeda, Ortiz Ibarra Federico Javier, Morales Méndez Iyari, Flores Medina Saúl. Detección de micoplasmas genitales y su sensibilidad antimicrobiana mediante una prueba rápida en muestras clínicas de parejas mexicanas con infertilidad. ENF INF MICROBIOL 2009; 29 (2): 54-58.
10. Molina Rosa I., Tissera Andrea D., Olmedo José J., Allende Pinto Benjamín, Kiguen Ximena, Cuffini Cecilia. Infecciones seminales en pacientes infértiles asintomáticos Rev. Fac. Cien. Méd. 2009; 66(Supl.1):60-66.
11. Santoiani, J.; Mormandi, e.Smayevsky J.; Nagelberg A.; Farinati A.; Terradas C.; Predari Sc. 1º Consenso Argentino sobre diagnóstico de las infecciones de las vías espermáticas y glándulas anexas en infertilidad. Bioquim. Patolo. Clín. 2002; 66:9-27.
12. Paavonen J. and Eggert Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impacto on human reproduction. Human Reproduction Update. 1999; 5(5):433-447.
13. Entrocassi A. Carolina, Lerea M. Alejandra; Domínguez Verónica L.; Sauka Diego H.; Scigliano Pablo M.; Livellara, Beatriz; Famiglietti Angela R.; Casco Ricardo; Rodríguez Fermepin, Marcelo. Perfil de riesgo para infecciones genitales en estudiantes universitarios. Rev. Enf. Infec. Emergentes. 2005;1(3):13-17.
14. Jordi Reina A, Olivia Gutiérrez A, González-Cádenasa María y Berlanga Rafael. Prevalencia de infección genital por *Chlamydia trachomatis* en la población general y en un grupo de prostitutas de Palma de Mallorca. Enferm Infec Microbiol Clin 2004; 22(7):439-42.
15. Laspina F, Samudio M, Meyer MT, Guillen E, Fariña N, Meyer M, Sanabria R. Agentes etiológicos de uretritis infecciosa masculina en pacientes que concurren a laboratorios de Asunción. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, 2010;8(1):41-46
16. Guerra-Infante; Fernando M., Tapia-Yáñez; J. Ramón, López-Hurtado; Marcela, Flores-Medina; Saúl, Díaz-García; Francisco J. Infección por *Chlamydia trachomatis* en varones y su asociación con las alteraciones ginecológicas de su compañera sexual. Rev Investig. Clin, 2005; 3(57):406-414.
17. Gallegos Ávila Guadalupe. Infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma* sp. Su relación con la infertilidad masculina. Boletín del Colegio Mexicano de Urología 2003; 18(3):106-112

18. Rodríguez Rubí, Hernández Rafael, Fuster Fátima, Torres Álvaro, Prieto Pedro y Alberto José. Infección genital y esterilidad. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2001; 19: 261-266
19. Mahony James b., Luinstra Kathy E., Tyndall Mark, Sellors John W., Repel Jack, and Chernesky Max. Multiplex PCR for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genitourinary Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; 33(11):3049–3053.
20. Nassar Fadel A. Abu-Elamreen, Farid H Shubair Mohammad E., Sharif Fadel A. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis*, genitalium and *Ureaplasma urealyticum* by Polymerase Chain Reaction in patients with sterile pyuria. *Advances in Medical Sciences*. 2008; 53(1):80-86.
21. Gallo Vaulet, Lucía, Entrocassi Carolina, Corominas Ana I, Rodríguez Fermepin Marcelo. Distribution study of *Chlamydia trachomatis* genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires, Argentina: association between genotype E and neonatal conjunctivitis. *BMC Research Notes* 2010; 3(34):2-6.

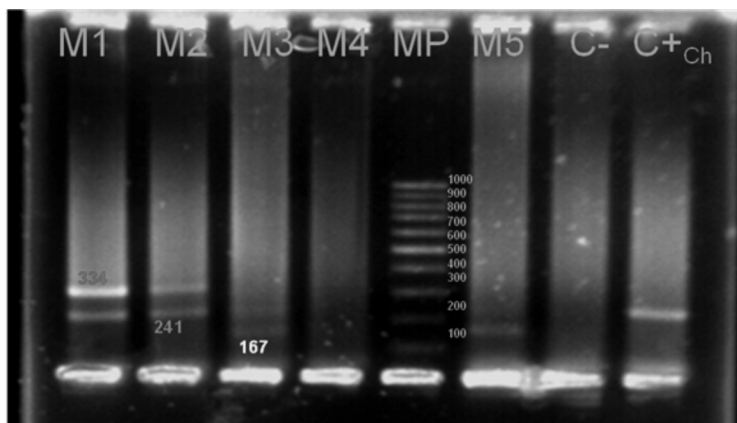
ANEXO

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos.

Primers específicos	Secuencia genómica	Pares de base
<i>Mycoplasma Hominis</i> (RNAH ¹ /RNAH ²)	5' CAA TGG CTA ATG CTG GAT ACG C 3' 5' GGT ACC GTC AGT CTG CAA T 3'	334
<i>Ureaplasma Urealitycum</i> U ⁸ /U ⁹	5' GAG ATA ATG ATT ATA TGT CAG GAT CA 3' 5' GAT CCA ACT TGG ATA GGA CGG 3'	167
<i>Chlamydia trachomatis</i> KI ¹ /KI ²	5' TCC GGA GCG AGT TAC GAA GA 3' 5' AAT CAT TGC CGG GGA TTG GT 3'	241

Tabla 2. Frecuencias observadas para Ct, Mh y Uu en muestras de semen de hombres con sospecha de infertilidad de la ciudad de Corrientes, Argentina. N=80

Microorganismos estudiados	PCR + (%)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	20
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	13.75
<i>Mycoplasma hominis</i>	3.75
<i>Chlamydia trachomatis</i> – <i>Ureaplasma urealyticum</i>	7.7
<i>Chlamydia trachomatis</i> - <i>Mycoplasma hominis</i>	1.25
<i>Chlamydia trachomatis</i> – <i>Ureaplasma urealyticum</i> - <i>Mycoplasma hominis</i>	1.25



M1, M2: muestras positivas para *Ct* - *Mh* , M3 muestra positiva para *Ct* – *Uu* , M4 muestra negativa y M5: muestra positiva para *Uu*; MP: marcador de peso molecular, C-: control negativo, C+ ^{Ch}: control positivo *Ct*

Figura 1. Corrida electroforética en gel de agarosa de los segmentos amplificados durante la reacción de PCR múltiple.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS. DETERMINACIÓN DE SU POSIBLE ROL EN LA RELACIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO Y SU POTENCIAL COMO BLANCO PROFILÁCTICO DE LA HIDATIDOSIS

La hidatidosis humana representa un problema en la salud pública de la República Argentina, siendo endémica en varias regiones del país. Su agente etiológico es el parásito cestode *Echinococcus granulosus* que presenta un grupo de variantes genéticas o cepas. Mediante técnicas moleculares se han definido hasta el momento 10 cepas de *E. granulosus* (G1-G10), (Thompson y McManus 2002; Jenkins y col 2005), que difieren en características de importancia biológica y epidemiológica como la infectividad en humanos, período prepatente, entre otras. Los resultados de nuestro laboratorio, confirman la presencia de cinco variantes genéticas presentes en la Argentina: cepa oveja (genotipo G1), cepa oveja de Tasmania (genotipo G2), cepa vaca (genotipo G5), cepa camello (genotipo G6) y cepa cerdo (genotipo G7) (Rosenzvit y col 1999., Kamenetzky y col 2002., Haag y col 2004.). Además, se confirmó que las cepas infectivas para el hombre son cepa oveja (genotipo G1), cepa vaca (genotipo G5), primer aislamiento sudamericano y por primera vez descripta como infectante para el hombre las cepas oveja de Tasmania (genotipo G2) y camello (genotipo G6) (Rosenzvit y col 1999., Kamenetzky y col 2002., Guarnera y col 2004., Dopchiz y col 2009).

El ciclo de vida de *E. granulosus*, involucra a dos tipos de hospedadores, uno definitivo (perro) y otro intermediario (el hombre y mamíferos ungulados). La ingestión accidental de huevos viables (liberados en la materia fecal del perro) por el hombre, desarrolla el estadio larval (quiste o metacestode), principalmente en hígado y pulmón (hidatidosis primaria).

El quiste está formado por: una capa germinal de naturaleza celular, la que produce por reproducción asexual vesículas prolíferas que generan protoescolices (quiste fértil), una segunda capa denominada laminar que es acelular, de naturaleza mucoproteica y por líquido hidatídico que es una mezcla de proteínas, enzimas, lípidos, electrólitos y protoescolices.

Cuando estos quistes se rompen accidentalmente en individuos infectados, los protoescolices contenidos en ellos se diseminan y pueden formar nuevos quistes, dando origen a una hidatidosis secundaria. Los mecanismos por los cuales estos protoescolices tienen la capacidad de establecerse en otras ubicaciones y dar origen a nuevos quistes no se conocen aún.

Existe poca información de los primeros cambios ultraestructurales de los protoescolices hasta desarrollar un metacestode secundario, sin embargo Holcman y Heath (1997) estudiaron las primeras etapas de la infección primaria (por ingestión de oncosferas). Los autores describen que en la región del núcleo en la oncosfera activada está ocupada por gránulos de las glándulas de penetración. Diferentes funciones son atribuibles a las secreciones de las glándulas de penetración, una de las principales funciones que se han descrito es la de lisar el tejido del hospedador en la vecindad de la oncosfera y/o ayudar a la adherencia de la oncosfera al tejido del hospedador (Thompson 1995).

Se ha demostrado en varios parásitos helmintos, de importancia en la salud pública, que las cistein proteasas (están involucradas en una importante variedad de funciones durante las etapas de invasión y diseminación del parásito (Robinson y col 2008). Varias cistein proteasas han sido aisladas y caracterizadas a partir de parásitos como: *Fasciola hepatica* (Dowd y col 1997, Grams y col 2001, Yamasaki y col 2002), *Paragonimus westermani* (Kim y col 2000; Park y col 2002; Yang y col 2004), *Schistosoma mansoni* (Dvorák y col 2009), *Diplostomum pseudospathaceum* (Moczoń 1994), e *Hymenolepis diminuta* (Tua y col 2006). Las cistein proteasas constituyen una gran proporción en el transcriptoma de estos parásitos ej: cerca del 15% en el transcriptoma del adulto de *F. hepatica* (Robinson y col 2009), entre 18% y 27% para el adulto diploide y triploide de *P. westermani* respectivamente y dentro de ellas las Cathepsin L, S, B, F y L son comúnmente encontradas en el perfil de moléculas secretadas (secretoma) en los parásitos helmintos (Kim y col 2000, Park y col 2002). Esto permite inferir la importancia de sus funciones en la interacción hospedador-parásito como penetración a través de los tejidos durante la invasión y migración del parásito y degradación de la matriz extracelular del hospedador.

Recientemente se han descrito dos cistein proteasas de *Echinococcus multilocularis* (EmCLP1 y EmCLP2) (Sako y col 2007), capaces de degradar moléculas humores (IgG y albúmina) y moléculas de la matriz extracelular (colágeno y fibronectina). Estas características pueden estar estrechamente relacionadas con la patogénesis del parásito y dichas moléculas podrían actuar en la interfase hospedador-parásito en los primeros eventos de desarrollo del nuevo quiste hidatídico.

La relación filogenética, homología, entre las proteínas de *E. multilocularis* y de *E. granulosus* permitirá hacer inferencias acerca de la estructura, función o de la semejanza del sitio activo, entre otras. Por lo que, los cambios que ocurrieron durante la evolución (sustituciones, inserciones o eliminaciones) permitieron que la función de la proteína permaneciera.

El modelado por homología se basa en la suposición de que las proteínas homólogas tienen un plegamiento similar y en el hecho experimental de que la estructura terciaria se conserva más que la secuencia de aminoácidos. Además, el modelado molecular es útil para el diseño de mutantes para probar una hipótesis determinada, para analizar sitios activos y de unión a ligandos o modelar la especificidad de sustrato, también se ha utilizado para predecir epítopes antigénicos y realizar el Docking. Este último es una herramienta que permite predecir las interacciones entre proteínas blanco con moléculas pequeñas de drogas candidatos, con el fin de predecir a su vez, la afinidad y la actividad del ligando. Por lo tanto, el docking juega un importante papel en el diseño racional de fármacos.

El propósito de este trabajo es la identificación y caracterización de cistein proteasas en *E. granulosus* que permitirá la búsqueda de nuevos enfoques para prevenir la hidatidosis secundaria en pacientes intervenidos quirúrgicamente o con riesgo de sufrir rotura de quiste por traumatismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Parasitario

El líquido hidatídico se aspiró en forma aséptica a partir de quistes hidatídicos porcinos, los protoescólices se separaron por centrifugación a 4°C durante 15 min a 12000 rpm y se lavaron con PBS. Se determinó el porcentaje de vitalidad mediante la tinción vital con eosina al 1%. Se seleccionaron aquellos pellet con un 95% de vitalidad, una alícuota se congeló en N² líquido hasta su uso. El resto se lo resuspendió con PBS pH 7,4, se sonicó en hielo durante 2 ciclos de 3 minutos cada uno. El producto sonicado obtenido, se lo centrifugó a 4°C durante 5 min a 10000 rpm, se descartó el sedimento y el sobrenadante se reservó hasta su uso a -20°C.

El líquido hidatídico separado, se dializó contra agua durante 24 horas a 4°C y liofilizó. La concentración proteica del sobrenadante del sonicado y del líquido hidatídico liofilizado fue determinada por la técnica de Bradford.

Obtención de ADN

Los protoescólices de *E. granulosus* congelados se lavaron con buffer de extracción (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM y EDTA 10 mM) y se extrajo el ADN con el reactivo DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue resuspendido en Tris-HCl 10 mM, pH 8.

La determinación de integridad del ADN, pureza y cuantificación del ADN obtenido se realizó por técnicas convencionales.

Obtención de ARN

El ARN fue extraído a partir de protoescólices congelados en nitrógeno líquido utilizando el reactivo de TRIzol (Gibco, BRL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada muestra fue incubada 30 minutos a 37°C con 1 unidad de ADNasa RQ1 libre de ARNasa (Promega) para eliminar las posibles trazas de ADN.

Geles de actividad

El sonicado de protoescólices y el líquido hidatídico liofilizado obtenido de distintos animales y de distintos hospedadores (vacas y cerdos) fueron analizados en geles al 12.5% y 15% de SDS-PAGE copolimerizado con concentraciones crecientes de gelatina entre 0.5%, 1% y 1.5%, para determinar la presencia de actividad proteolítica.

En cada calle se sembró 60 µg del sonicado y de líquido hidatídico liofilizado. Los geles se corrieron durante 1 hora a un voltaje constante de 100 volts y se lavaron 2 veces con Triton X100 al 1% en agua destilada durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante para remover el SDS y permitir que las proteasas recuperen su conformación nativa. Posteriormente se lavó con agua destilada durante 20 minutos y se lo incubó a diferentes tiempos (toda la noche, 12 horas, 6 horas, 3 horas y 1 hora) en los siguientes buffers AcNa 0.1M pH 5.5 más 1 mM de ditioneitol (DTT) y buffer Na₂HPO₄ 0.1 M pH 7 más 1 mM de DTT con agitación constante. Para cada una de las variables (concentración de gelatina, tiempo de incubación, buffers y pH) utilizadas fueron evaluadas en forma combinada para encontrar las mejores condiciones que permitan detectar la actividad proteasa en las respectivas muestras.

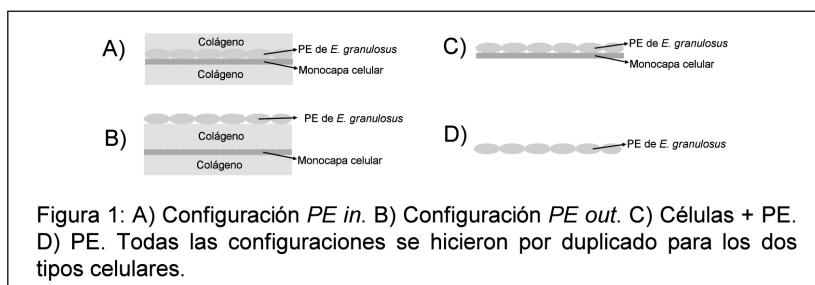
Los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie Blue R 250 0.1% en agua:metanol:acético durante 45 minutos con agitación constante y decolorado con una solución agua:metanol:acético con agitación constante.

Cultivo *In vitro*

Se ensayaron diferentes condiciones y configuraciones de co-cultivo de células y de capas de colágeno de cola de rata tipo I (BD) (sistema de sándwich de colágeno). El colágeno se mezcló en proporción 4:1 con medio DMEM 4X, se dejó solidificar en estufa de cultivo a 37°C durante 2 horas. La cantidad de colágeno utilizado fue la necesaria para lograr una capa inferior de 1,25 mm de alto. Luego de esto se colocaron células de hepatoma de rata (RH-) y fibroblastos de riñón de mono (COS7) en distintos pocillos de la placa. Las células se cultivaron a confluencia formando monocapa. En algunas de las celdas se colocaron protoesclólices de origen porcino con viabilidad cercana o superior al 90% y se dejaron otras sin parásitos como control. En la primera placa se usaron 20 protoesclólices por celda (10 PE/cm²), pero en las siguientes se utilizaron 200 protoesclólices por celda (100 PE/cm²). Se cubrieron los pocillos con colágeno de 2 mm de espesor y se incubó en atmósfera 5% CO₂ a 37°C, registrándose los cambios morfológicos a lo largo del tiempo. Los cultivos se mantuvieron con medio DMEM, 10% SFB y antibióticos, realizándose cambios de medio cada 4 días.

Los cultivos se observaron durante 20 días. Una celda de cada configuración se coloreó con una tinción tricrómica específica para colágeno al finalizar el cultivo.

En la Figura 1 pueden observarse las distintas configuraciones ensayadas.



Reacciones de PCR

Amplificación del gen de actina:

La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo ADNc de cada muestra (10-100 ng), 100 mM de cada dNTP (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden), 2.5 mM MgCl₂, 50 pmol de cada primer ACF y ACR previa-

mente descritos por da Silva CM y col (1993) y 1.5 unidades de la enzima Taq DNA polimerasa en buffer de reacción 1X (Invitrogen). Las condiciones fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización (95°C durante 180 s), seguido de 35 ciclos con los siguientes pasos: 95° C durante 60 s (desnaturalización), 55° C durante 60 s (unión de los primers al ADN molde), 72° C durante 90 s (extensión) y un paso final de extensión (72° C durante 10 minutos).

Amplificación con primers genéricos para las cistein proteasas

La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo ADNc de cada muestra (10-100 ng), 100 mM de cada dNTP (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden), 50 pmol de cada primer degenerado (ECP-F y ECP-R) previamente descriptos (Sakanari JA y col 1989) y 1.5 unidades de la enzima Hot-Start polimerasa en buffer de reacción 1X (QUIAGEN). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización (95°C durante 15 min) seguido de 30 ciclos con los siguientes pasos: 95°C durante 30 s (desnaturalización), 50°C durante 30 s (unión de los primers al ADN molde), 72°C durante 30 s (extensión), y un paso final de extensión (72°C por 10 min).

Amplificación con primers específicos para la cistein proteasas madura

Para la reacción de PCR se utilizó los primers forward EgCLP1m-F (5' AGC CCT ACC CGA **ATG** CTA GTT CC 3') y el reverse EgCLP1m-R (5' GGC CAT TGT AGC GAT GCC GC 3') diseñados a partir de la secuencia aminoacídica deducida, homóloga depositada en el GenBank (AB248269) de la Cathepsin L1 madura de *E. multilocularis* (EmCLP1m) que incluyen el codon de iniciación y respetando el marco de lectura para no generar codones de terminación prematuros y excluyen el péptido señal y el pro-péptido. La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo ADN de cada muestra (50-100 ng), 100 mM de cada dNTP (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden), 50 pmol de cada primer EgCLP1m-F y EgCLP1m-R y 1 unidad de enzima Hot Start DNA polimerasa en buffer de reacción (QUIAGEN).

Las condiciones de estandarización de la reacción de PCR fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 15 seg, seguido de 30 ciclos con los siguientes pasos: 95°C durante 30 s (desnaturalización), tres temperaturas diferentes de unión de los primers (60°C, 62°C y 64°C) durante 30 s (desnaturalización), 72°C durante 30 s (extensión) y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient 5331 versión 1.2.

La especificidad y tamaño de los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa 1-1.2% (p/v) utilizando TAE como buffer, tinción con bromuro de etidio y observación a luz U.V.

Obtención de los extremos 5' y 3' del gen de la cistein proteasa EgCLP1 mediante la técnica de (RACE)

El ARN^{total} obtenido fue tratado con fosfatasa intestinal de carnero (CIP) para eliminar los ARNm truncados y asegurar únicamente la amplificación de los transcritos de longitud completa. El ARN desfosforilado fue tratado con la enzima pirofosfatasa ácida de tabaco (TAP) para remover la estructura cap del extremo 5' de los ARN de longitud completa y su posterior ligación con la T4 ARN ligasa del GeneRacer RNA Oligo (INVITROGEN).

Posteriormente el ARNm ligado fue retrotranscrito, usando SuperScript II RT y el primer GeneRacer Oligo dT para sintetizar la primera cadena de ADNc. La reacción fue inactivada por calentamiento y el ARNm fue degradado por tratamiento con ARNasa. El ADNc fue diluido y almacenado a -20°C hasta su uso.

Se realizaron dos reacciones de PCR para identificar los extremos 5' y 3' del gen EgCLP1, una utilizando el primer específico forward degenerado y el GeneRacer Oligo dT⁽¹⁸⁾ y la segunda con el primer específico reverse degenerado y el GeneRacer RNA Oligo.

Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas

Para determinar la identidad de los productos amplificados de las reacciones de PCR a partir de ADNc y ADN, los productos de PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante los reactivos comerciales QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN) y secuenciados.

Además, los fragmentos obtenidos de 500 pb (a partir de ADNc), y de aproximadamente 1400 pb (a partir de ADN genómico de diferentes cepas) fueron clonados en el vector TOPO (INVITROGEN) y secuenciados.

Las reacciones de secuenciación se realizaron mediante PCR en un volumen final de 7 µl, se agregaron 2 µl de mezcla de reacción (Big Dye 3.1 mix, Applied Biosystems), 30 pmoles de uno de los primers en cada tubo y el ADN correspondiente. La secuenciación de productos de PCR se realizó utilizando 30-100 ng y 400 ng de ADN para los plásmidos. El programa uti-

lizado fue 80 ciclos de: 95°C durante 10 s, 50°C durante 5 s y 60°C durante 4 minutos. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM, Modelo 377, ABI150, versión 3.0 (Perkin Elmer).

Con las secuencias obtenidas se buscaron similitudes en la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/sequin>).

GenBank número de acceso

La secuencia de 655 pb descrita en este trabajo a partir de ADNc, fue depositada en el GenBank con el número de acceso HQ176369.

Análisis bioinformático

Se analizaron las secuencias nucleotídicas obtenidas *in silico*, se buscaron: presencia de dominios conservados utilizando el programa BLAST conserved domain search tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); se compararon secuencias homólogas de Catepsinas L de helmintos y humanas, con la secuencia obtenida de la amplificación de ADNc, denominada Eg-CLP1, se seleccionaron aquellas con alto grado de similitud y se construyeron árboles filogenéticos. Además, la base de datos PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) se utilizó para determinar la familia de proteína a la cual pertenecen las secuencias obtenidas.

Con el propósito de diseñar primers para aislar el fragmento que corresponde a la secuencia de la proteína madura, se analizó el perfil de hidrofobicidad de los 338 residuos de la proteína Em-CLP1 y se predijo la localización de regiones hidrofóbicas que pudieran dificultar la expresión de la proteína recombinante. El perfil de hidrofobicidad se realizó accediendo al programa ExPASy Proteomics Server (ProtScale) (<http://au.expasy.org>). También, mediante el programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) se predijo la presencia y localización del sitio de clivaje del péptido señal a partir de la secuencia aminoacídica deducida del gen de la proteína publicada en el GenBank (AB248269) de *E. multilocularis*. De esta manera se diseñaron primers (EgCLP1m-F y EgCLP1m-R), capaces de amplificar potencialmente la secuencia madura de Eg-CLP1 sin que incluya regiones hidrofóbicas ni el péptido señal que imposibilitaría la expresión en un sistema procariótico.

Expresión de la proteína recombinante

El fragmento amplificado por PCR usando el juego de primers degenerados para las cistein proteasas eucariotas y el fragmento amplificado con pri-

mers para la proteína madura se clonó en el vector pBAD TOPO/Thio fusion (INVITROGEN). Este vector codifica una proteína de fusión con la tiorredoxina y el fragmento clonado, además de adicionar una cola de His en el extremo Carboxi-terminal para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad en una columna de Níquel. Bacterias competentes TOP10 (INVITROGEN) se transformaron con la construcción obtenida. Una vez obtenidos los clones, se purificaron los plásmidos de las colonias obtenidas y se secuenciaron.

Las colonias recombinantes positivas se crecieron en medio LB con ampicilina durante toda la noche a 37°C con agitación constante, de este cultivo se transfirieron 100 µl a 10 ml de LB/Ampicilina y se incubaron con agitación constante a 37°C durante 2 hs, hasta la fase exponencial (DO_{600} 0,5). Se separó 1 ml (control sin inducir), se centrifugó y guardó el pellet a -20°C hasta su uso. Al resto del cultivo se le agregó arabinosa al 0.2% y se incubó durante 4hs. Se separó 1 ml se centrifugó y guardó el pellet a -20°C hasta su uso. Se resuspendieron todos los pellets en 100µl de buffer SDS-PAGE 1X y se calentó durante 5 min a 70°C. Se tomaron 10µl de cada muestra para sembrar en un gel de acrilamida. La expresión de la proteína recombinante se evaluó por inmunoblot. Se prepararon geles en idénticas condiciones para luego transferirlos a membranas PVDF Hybond (Amersham) previamente activadas durante 10" con metanol, lavadas y equilibradas. Posteriormente las membranas se bloquearon con PBS Tween 20 0.5%, leche 5% en agitación durante 1 hora. Luego de dos lavados con PBS-Tween 0.5% (solución de lavado) se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con un suero de conejo anti-tiorredoxina (1/400). Luego de dos lavados con solución de lavado y un lavado con PBS se incubó durante una hora con anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Se repitieron los lavados y se reveló con DAB.

Modelado por homología

El modelado por homología aprovecha las similitudes de secuencias de amino ácidos y las similitudes estructurales entre proteínas, construyendo una estructura tridimensional para la secuencia incógnita, usando estructuras tridimensionales conocidas de otras proteínas, cuyas secuencias de aminoácidos guardan similitud con la secuencia incógnita. Para la predicción del plegamiento por modelado por homología de la proteína de la secuencia EgCLP1 obtenida en este trabajo, se utilizó el servidor automático de Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), para la visualización y análisis de la estructura se utilizó el programa VMD, Visual Molecular Dynamics, (

www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/).

La calidad de la alineación entre la secuencia que se utilizan como molde y la secuencia de EgCLP1 es el paso clave para obtener una buena predicción de la estructura. Con la secuencia EgCLP1 (HQ176369) se realizó un Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) contra la base de datos de proteínas de estructuras tridimensional conocida determinadas experimentalmente (estructuras cristalizadas), PDB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>). Para ello se selecciono las secuencias más similares, es decir aquellas con un porcentaje mayor de 40% identidad y menor número y longitud de gaps. Además, de estos criterios se considero aquellas proteínas que pertenezcan a la misma familia (Cathepsin L C1A), que los posibles ligandos sean lo más parecidos a los posibles a utilizar en estudios de Docking y que el modelo experimental tenga una alta resolución.

RESULTADOS

Amplificación del gen constitutivo de la actina

Se realizó una reacción de PCR utilizando los primers del gen constitutivo de la actina para determinar la calidad y descartar la presencia de inhibidores en el ADNc extraído. Una banda de aproximadamente 300 pb amplificó en los tubos que fueron retrotranscriptos y no hubo amplificación en aquellos tubos que no fueron retrotranscriptos (dato no mostrado).

Amplificación con primers genéricos para las cistein proteasas

Con el objetivo de aislar proteasas de *E. granulosus*, se realizaron reacciones de PCR a partir del ADNc extraído de PE, utilizando primers degenerados diseñados en zonas conservadas que codifican residuos que flanquean el sitio activo de la secuencia de las cistein proteasas de eucariotas. El fragmento obtenido de 500 pb fue clonado en el vector TOPO (INVITROGEN) (dato no mostrado). Cincuenta y cuatro clones se analizaron por PCR para identificar las colonias recombinantes, ocho de éstas se secuenciaron en ambas direcciones utilizando primers M13 mediante un secuenciador automático. Una de las colonias tenía el fragmento de interés.

El análisis *in silico* de las secuencias nucleotídicas (**EgCLP1**) obtenidas, mostraron una identidad nucleotídica de un 94% con una Cathepsina-L de *E. multilocularis*, (número de acceso AB248269), 79% con Cathepsina-L de *Fasciola hepatica* (EU191984) y 73% con *Taenia asiatica* (AB441817). La

[illegible]

EgCLP1: secuencia aminoacídica identificada de protoescolices de *E. granulosus*.

EmCLP2: Cathepsin L-like CLP1 de *E. multilocularis*.

Tsc1x3: Cathepsin L-like de *T. solium*.

CecI sx4: Cathepsin I-like de *C. elegans*

CECL5X4. Cathepsin L-like of *C. elegans*.

Análisis bioinformático

A partir de la secuencia obtenida del fragmento amplificado con los primers genéricos (**EgCLP1**) se buscó la presencia de dominios conservados utilizando el programa BLAST conserved domain search tool. En la Figura 3 se observa que todo el fragmento hallado forma parte de un dominio conservado característico de la familia C1A de peptidasas, a la que pertenece la Catepsina-L.

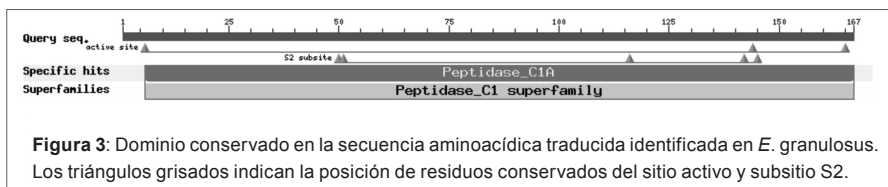


Figura 3: Dominio conservado en la secuencia aminoacídica traducida identificada en *E. granulosus*. Los triángulos grisados indican la posición de residuos conservados del sitio activo y subsito S2.

Usando la base de datos PFAM se confirmó que la arquitectura y organización del dominio pertenece a la familia C1, Papain family cysteine protease, (PF00112) con E-value: $2,9 \times 10^{-84}$ y un score de 282.1 y los sitios activos predichos son el residuo 31, 168 y 190.

Además, se compararon secuencias homólogas de Catepsinas L de helmintos y humanas, con la secuencia obtenida de Eg-CLP1, se seleccionaron aquellas con alto grado de similitud y se construyeron árboles filogenéticos usando el programa Mega 3.1 (método UPGMA). La Figura 4 muestra que la Cathepsin L de *E. granulosus* (Eg-CLP1) queda agrupada dentro del mismo nodo que la Catepsina L 1 de *E. multilocularis* (Em-CLP1). Por otra parte, en el árbol se puede observar que la secuencia de Cathepsin L del hombre queda separada de Eg-CLP1 y Em-CLP1.

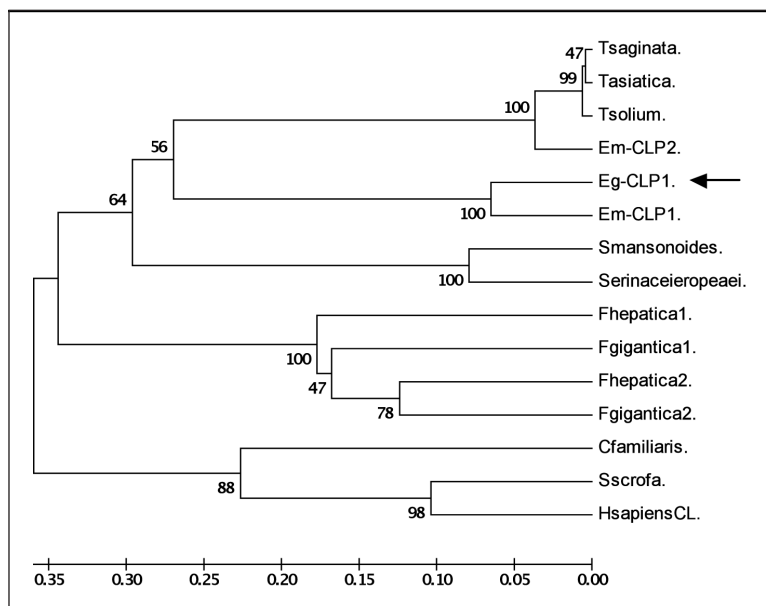


Figura 4: Análisis filogenético de secuencias homólogas de cathepsinas L de helmintos. La flecha indica la posición de Eg-

Obtención de la secuencia completa del gen

La técnica de RACE fue realizada en cuatro oportunidades diferentes, por los controles realizados se evidencio que el kit utilizado no funcionaba.

Con el propósito de aislar la secuencia que corresponde a la proteína madura (Eg-CLP1m), se diseñaron primers a partir de la secuencia previamente depositada en el Gen Bank para *E. multilocularis*, excluyendo las regiones hidrofóbicas y el péptido señal. La temperatura de unión de los primers fue óptima a 64°C. Las reacciones se realizaron utilizando ADN genómico de las cinco variantes genéticas circulantes en el país, (siendo cuatro de ellas infectivas para el hombre) y ADNc obtenido a partir de ARN extraído de quistes porcinos. La Figura 5 muestra los productos amplificados para ADNc y ADN para la cepa cerdo (genotipo G7). Los productos amplificados fueron de aproximadamente de 1600 pb para todas las cepas ensayadas excepto para la cepa oveja de Tasmania (genotipo G2) que no amplificó (dato no mostrado). Los productos amplificados fueron clonados y secuenciados. Solamente se

pudo obtener la secuencia del genotipo G1. Las secuencias pertenecientes al vector se eliminaron y las secuencias forward (F) y reverse (R) fueron superpuestas para deducir la secuencia genómica mediante el programa dnabaser (<http://www.dnabaser.com>). La secuencia obtenida es de 1616 pb. Se realizó una comparación manual de la secuencia obtenida a partir de ADNc con la obtenida a partir del ADN, identificándose de manera preliminar 4 exones y 3 intrones. Por otra parte, se utilizó el programa GenScan 1.0 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::genscan>) para hacer una predicción teórica preliminar de sitios de splicing en la secuencia obtenida en referencia al genoma de *C. elegans*. Los resultados se muestran en la Tabla 1 en comparación con los obtenidos por comparación ADN/ARN.

La Figura 6, muestra la organización genómica de EgCLP1 madura.

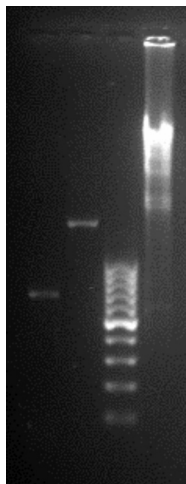


Figura 5. Productos de amplificación a partir de 1) ADNc obtenido a partir de ARN extraído de quistes porcinos; 2) ADN genómico de cepa cerdo (genotipo G7); 3) 100 pb 4) $\lambda^{\text{HIND III}}$.

Tabla 1: Comparación entre la predicción de exones/intrones por bioinformática y por alineamiento entre secuencias ADN/ARN obtenidas por amplificación con primers para cistein proteasa madura

	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4
Comparación ADN/ARN	4-79 (76 nt)	138-359 (222 nt)	1125-1285 (161 nt)	1359-1554 (196 nt)
GenScan 1.0	4-83 (80 nt)	135-359 (225nt)	1123-1285 (163 nt)	1352-1554 (203nt)

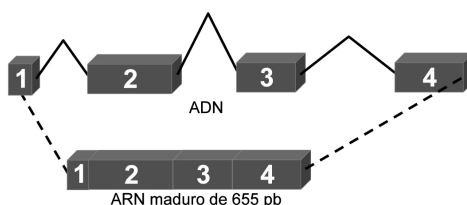


Figura 6: Esquema de la organización de la porción correspondiente a la proteína madura del gen de Eg-CLP1.

El alineamiento de la secuencia genómica y de EgCLP1 por bl2seq (BLAST) coincidió con los sitios predichos del análisis *in silico* de dnabaser. Dichas secuencias tienen una identidad de 100%, el porcentaje de cobertura es de 41% y el e-value es de 4×10^{-120} . La identidad y los e-value para los exones 1-4 es de 99% con un e-value 7×10^{-38} , 100% con un e-value 4×10^{-120} , 100% con un e-value 1×10^{-85} y 99% con un e-value 7×10^{-103} respectivamente. Solamente en el exon 4 hay un Gap.

Geles de actividad

Se ensayaron diferentes condiciones para detectar la presencia de actividad proteolítica en el sonificado de protoescolices y en los productos de excreción y secreción de los co-cultivos y cultivos, para su posterior identificación y caracterización por SDS-PAGE.

La cuantificación proteica obtenida para el líquido hidatídico de origen porcino del animal 1 (LP1) fue de $69.2 \mu\text{g/ml}$, para el líquido hidatídico de origen porcino del animal 2 (LP2) $79.2 \mu\text{g/ml}$, para el sonificado de protoescolices de origen porcino del animal 2 (SP2) $2.24 \mu\text{g/ml}$ y para el líquido hidatídico de origen bovino del animal 1 (LC1) $51 \mu\text{g/ml}$.

Se comparó el patrón electroforético del sobrenadante de PE con el patrón del líquido hidatídico, mediante un gel de poliacrilamida al 12.5% (SDS-PAGE) en condiciones nativas. La comparación de bandas por SDS-PAGE, muestra la presencia una mezcla compleja de bandas en un rango desde 11 KDa a 170 KDa en todas las muestras analizadas. Para el líquido hidatídico las bandas más predominantes fueron un complejo entre 57-60 KDa, que se corresponden con la movilidad electroforética del Antígeno 5 (Ag5) y con menor intensidad la bandas de 8-16 y 32 KDa correspondientes al Antígeno B (AgB), además se observa bandas de alto peso molecular que se corresponden con las inmunoglobulinas del hospedador. El patrón obtenido para LP2 y SP2 es idéntico, excepto que difieren en la concentración de cada fracción. La comparación de bandas proteicas de la misma fuente proteica (líquido hidatídico) obtenido de diferentes animales de una misma especie y diferentes especies de hospedador muestra un patrón diferencial (datos no mostrados).

Hasta el momento no se ha podido observar actividad proteolítica (ausencia de coloración debido a la incapacidad de degradar a la gelatina) en las muestras y condiciones analizadas por geles de actividad.

Resultados de expresión de proteínas recombinantes

La figura 7 muestra los western-blot de las colonias recombinantes con el fragmento amplificado con primers genéricos. Solamente la colonia 2 expresó la proteína fusionada con tiorredoxina con una masa molecular teórica de 67 KDa. El análisis de las secuencias de los plásmidos recombinantes evidencio que hubo una inserción en la secuencia nucleotídica provocando un corrimiento del marco de lectura, de manera que se produce un codón stop previo a la expresión de las histidinas que se utilizan para purificar la proteína recombinante. Impidiendo de esta forma la purificación en columnas de afinidad de Ni quelado.

Con respecto al fragmento amplificado que codifica la proteína madura, se logro obtener colonias recombinantes pero éstas no fueron viables en las condiciones de cultivo a 37°C aún en varios ensayos realizados. En este caso si bien se obtuvieron colonias que por PCR poseían el inserto, dichas colonias no originaron cultivos viables. Se ensayo el crecimiento bacteriano a 30°C (condiciones de baja actividad proteolítica), pensando que tal vez algún producto generado pudiera ser tóxico para las mismas, sin éxito. Además se realizó la clonación varias veces, incluyendo controles para descartar causas relacionadas con las bacterias competentes en si.

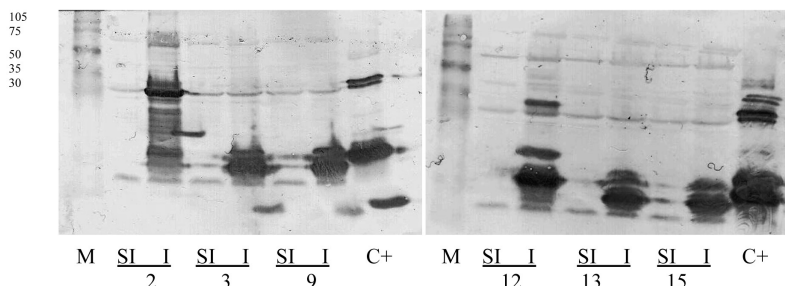


Figura 7: Western-blot utilizando como anticuerpo primario anti-tiorredoxina. SI: sin inducir, I: inducido. M: marker. C+: Control positivo. Los números identifican las colonias. La flecha azul indica la proteína de fusión recombinante..

Modelado por homología

La alineación entre la secuencia de la proteína que se usa como molde para el modelado y la secuencia que se desea modelar es clave para obtener un buen modelo a estudiar. Evidencias experimentales demuestran que a partir de una identidad mayor al 40%, la predicción de la estructura es confiable.

La identificación de la secuencia de EgCLP1m con templates de estructuras muy similares mostró una identidad de 56% con e-value 2 e-85 y solamente 2 Gaps con la secuencia (3HWN_A) de Cathepsin L cadena A madura de *Homo sapiens*, (cristalizada con Az13010160 como ligando) de 258 aa de longitud. La estructura fue analizada por difracción de Rx con una resolución de (resolución 2,5 Å) usando Blast contra la base de datos curadas de estructuras tridimensionales proteicas.

Por otra parte el programa Swiss-Model adjudico para la secuencia aminoacídica traducida de EgCLP1 como mejor molde, la estructura de 1CS8A, también correspondiente a la pro-Cathepsin L de *H. sapiens*.

La figura 8 muestra el alineamiento múltiple entre la secuencia proteica de referencia de la Cathepsina L de *H. sapiens* (PO7711) y la HWN-A. Además, el alineamiento múltiple permitió determinar la conservación de la triada catalítica (C, H y N), residuos funcionales de las Cathepsin L.

La figura 9 muestra el modelado de EgCLP1 por Swiss-Model.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

3HWN.      EPLFYEAPRSVDWREKGYVTPVKNQGGCGSCWAFSATGALE-
            GQMRKTGRLISLSEQNLV 60
P07711.    EPLFYEAPRSVDWREKGYVTPVKNQGGCGSCWAFSATGALE-
            GQMRKTGRLISLSEQNLV 60
EgCLP1.    RPTRMLVPDSIDWRKKGLVTPIKDQGDGCGSCWAFSATGALE-
            GQLKRKKGKLISLSEQQLV 60
            * * * * *
            . . . . .

3HWN.      DCSGPQGNEGCNGGLMDYAFQYVQDNGGLDSEESYPYEATEESC-
            KYNPKYSVANDAGFVD 120
P07711.    DCSGPQGNEGCNGGLMDYAFQYVQDNGGLDSEESYPYEATEESC-
            KYNPKYSVANDTGFVD 120
EgCLP1.    DCSTDMGNEGCNGGYMNDAFRYWMQNG-AEESDYPYTAMDGKC-
            KFNSSKVVTKVSFVK 119
            *** * * * *
            . . . . .

3HWN.      IPKQ-EKALMKAVATVGPIVAIDAGHESFLFYKEGIYFEPDCSSD-
            MDHGVLVVGYGFE 179
P07711.    IPKQ-EKALMKAVATVGPIVAIDAGHESFLFYKEGIYFEPDCSSD-
            MDHGVLVVGYGFE 179
EgCLP1.    VPKKREDQLKLSVAQVGPVSVDAIDAASSGFMLYKKGIYQDNTCS-
            QQYLDHAVLVVGY--- 176
            .** * * *
            . . . . .

3HWN.      STESDNNKYWLKNSWGEEWGMGGYVKMAKDRRNHCGIASAA
            221
P07711.    STESDNNKYWLKNSWGEEWGMGGYVKMAKDRRNHCGIASAA
            221
EgCLP1.    DADMAGQKYWIVKNSWGEDWGQRGYIWMARDKGNMCGIATMA
            218
            .. .***.***.***.***.***.***.***
            ... ..

```

Figura 8. Alineamiento múltiple entre: **3HWN** secuencia proteica de la estructura cristalina de la cathepsina L de *H. sapiens* con Az13010160, **P07711** secuencia proteica de la Cathepsina L1 de *H. sapiens* y **EgCLP1** secuencia aminoacidica traducida de cathepsina L de *E. granulosus*. Las flechas muestran la triada catalítica (C, H y N).

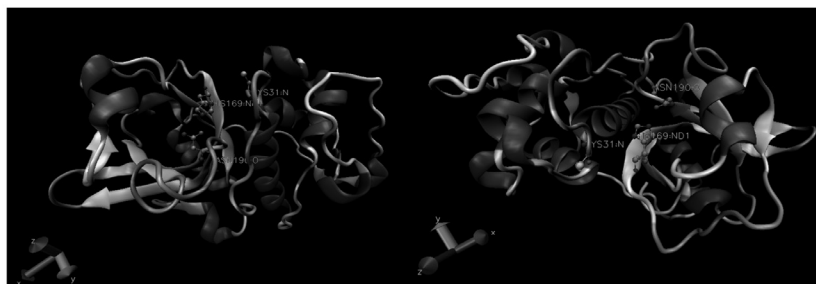


Figura 9. Modelo tridimensional de Eg-CLP1m obtenida por Swiss-Model. Se presentan dos vistas con los aminoácidos de la tríada catalítica identificados (Cys, Asn, Hys) y su estructura molecular.

Cultivos de colágeno

Con el objetivo de estandarizar un sistema de cultivo *in vitro* para ensayar la interfase hospedador parásito y tratar luego de identificar en esta interfase la acción de cistein proteasas parasitarias, se ensayaron distintas condiciones y configuraciones de cultivos mixtos de células con protoescolices y colágeno.

Las observaciones más relevantes fueron: en todas las configuraciones los PE alcanzaron a vesicularizarse, aunque en la celda de PE sin células fueron muy pocos los vesicularizados y los parásitos murieron al día 12. En general se observó que los PE de las configuraciones con células RH- presentaban un desarrollo más tardío que con las células COS-7. En las configuraciones *PEout* una menor proporción de parásitos se vesicularizó y sus tamaños resultaron menores que los parásitos de las configuraciones *PEin*, donde los PE estaban en contacto directo con las células. Cronológicamente, al primer día se vio movilidad de los PE y vesicularización en todas las configuraciones. Al día 6 las configuraciones *PEin* con células COS-7 presentaron zonas de aparente hidrólisis de colágeno (Figura 10A). Al día 7 esas mismas celdas presentaron “túneles” en la capa superior de colágeno (Figura 10B); para la misma configuración con células RH- los túneles aparecieron en el día 12. Se observaron PE en el interior de algunos de estos “túneles”. Se vio que éstos no poseían ya ganchos, aunque conservaban las ventosas y el roseto.

Una vez completados estos experimentos se llevaron a cabo estudios similares sin células, observándose también que los protoescolices atrave-

saban las capas de colágeno. Para estas placas de cultivo se usaron los mismos espesores de colágeno, pero una vez que se formó la capa inferior y se dejó gelificar se colocaron los PE en buffer PBS. Se absorbió la mayor cantidad posible del buffer usando papel de filtro autoclavado durante 40 minutos. Eliminada la mayor cantidad de líquido posible, se colocó la segunda capa de colágeno, cubriendo los PE en los casos en que correspondía. A los PE en configuración *PEin* se los colocó sobre la capa inferior de colágeno de 1,25 mm de espesor. Estos cultivos se contaminaron al día 5, pero de todas formas se vio la presencia de túneles y el movimiento de los PE a través del colágeno. En todos los casos se recolectó sobrenadante para evaluar en el mismo la actividad proteasa.

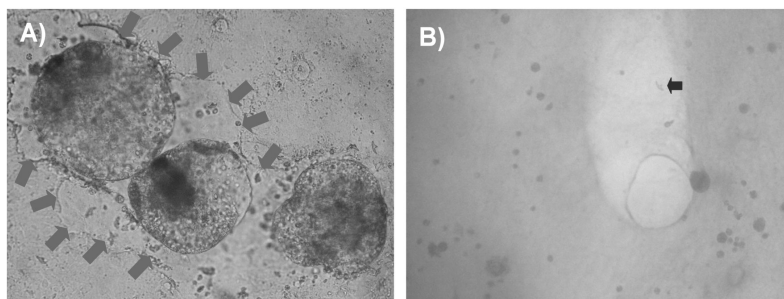


Figura 10: A) Micrografía de configuración *PEin* con células C)S-7ç Las flechas indican los límites de las zonas de probable hidrólisis. B) Micrografía de la "boca" de uno de los "túneles". La flecha muestra un gancho.

CONCLUSIONES

Este es el primer reporte de identificación y caracterización de una cisteína proteasa a partir de protoescolices de *E. granulosus* (EgCLP1). El análisis de los fragmentos amplificados demuestra que la secuencia corresponde a la familia de la Cathepsina C1 (PF00112), la triada catalítica está conservada y tiene similitud de secuencia con organismos relacionados, proviniendo de un ancestro común.

La genómica comparativa propone que a partir de los sitios conservados de familias de proteínas se identifiquen en otros organismos, proteínas homólogas. Utilizando este enfoque se partió del diseño de primers genéricos que amplifican cisteína proteasas de eucariotas. Posteriormente se emplearon primers diseñados a partir de una proteasa madura en *E. multilocularis*. En ambos casos a partir de ADNc se obtuvieron fragmentos, que pudieron ser secuenciados. Con el segundo juego de primers se identificó además la estructura del gen, coincidiendo los resultados de secuenciación con los estudios de predicción bioinformáticos. El conocimiento de la estructura génica, como así también la ampliación de la misma a regiones no estudiadas en este trabajo, permitiría conocer aspectos de regulación de la expresión (ver más abajo expresión estadio-específica).

El fragmento que codifica a la probable proteína Eg-CLP1 según el análisis de filogenia divergió de un ancestro común, junto con la proteína ortóloga de Em-CLP1. Ambas se encuentran en un nodo separado de las proteínas homólogas del hombre y de hospedadores del parásito.

La expresión de la proteína recombinante no pudo realizarse con éxito debido a que probablemente el producto generado, aun sin inducción, resultaría tóxico para las bacterias. No contamos con cepas bacterianas alternativas, ni otros sistemas de clonación para poder expresar el fragmento que codifica la proteasa madura. Estas son acciones que se tomarán en el futuro con el fin de conseguir la expresión recombinante. Por otra parte, para realizar los estudios bioquímicos y funcionales es necesario obtener la proteína completa y expresarla en un sistema eucariota como levaduras, ya que este tipo de proteínas poseen modificaciones postraduccionales que están directamente implicadas en la función biológica. Estamos actualmente desarrollando las herramientas para lograr esta expresión.

Si bien no se pudo identificar efectivamente a la proteasa en la interfase hospedador-parásito, se diseñó y probó por primera vez un sistema de cultivo que emula un componente principal de la matriz extracelular, donde se evidenció la migración de protoesclótics. Esta migración podría darse por medios mecánicos, pero en algunas imágenes al microscopio parece haber zonas de hidrólisis de colágeno alrededor del parásito. Si bien es necesario contar con anticuerpos u otras herramientas para identificar la expresión de la proteasa, el sistema diseñado permitiría evaluar *in vitro* la localización en esta interfase hospedador-parásito.

La imposibilidad de expresar la cistein proteasa no permitió tampoco el análisis de su actividad. Por otra parte, tampoco se evidenció por geles de

actividad, acción de enzimas proteolíticas en líquido hidatídico. Este resultado coincide con los trabajos de proteómica de Monteiro y col. (2010) y Aziz y col. (2011) donde no se identificó Catepsina L en el líquido hidatídico en distintas especies de hospedadores. La identificación de Catepsina B, enzima que interviene en mecanismos apoptóticos, se evidencio exclusivamente en líquidos hidatídicos infértiles (ausencia de PE), lo que apoya la hipótesis del incremento del stress celular y apoptosis como causa de su infertilidad (Aziz y col. 2011). Este resultado junto con el hallazgo de ARN de Eg-CLP1 en protoescolices podría indicar una expresión estadio-específica, siendo probablemente expresada en las etapas previas o iniciales de formación del quiste y no detectable en etapas siguientes. La existencia de una regulación estadio-específica fue probada para enzimas similares en otros parásitos (Robinson y col., 2008)

El ensayo de inhibidores requiere contar con la proteína nativa o recombinante para realizar las pruebas *in vitro*. En este caso no fue posible por las razones detalladas anteriormente. De todas formas, hoy están disponibles herramientas bioinformáticas que permiten modelar la proteína y su interacción con diferentes ligandos, ya que la acción de estos está directamente vinculada a la estructura.

Resulta claro que aunque los resultados obtenidos en este trabajo son preliminares y plantean la profundización de varios aspectos del conocimiento de la proteína identificada, representan un avance importante en el campo de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, diagnósticas e inmunoprolácticas en el tratamiento y prevención de la hidatidosis humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aziz A, Zhang W, Li J, Loukas A, McManus DP, Mulvenna J. (2011) Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics*. 24;74(9):1560-72.
2. da Silva CM, Henrique, Ferreira B, Picón M, Gorfinkel N, Ehrlich R, Zaha A. (1993) Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol*. 60(2):209-19.
3. Dopchiz MC, Elissondo MC, Andresiuk MV, Maiorini E, Gutiérrez AM, Muzulin PM, Rosenzvit MC, Lavallén CM, Denegri G. (2009) Pediatric hydatidosis in the south-east of the Buenos Aires province, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 41(2):105-11

4. Dowd AJ, Tort J, Roche L, Ryan T, Dalton JP. (1997) Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol.* 88:163-174.
5. Dvorák J, Mashiyama ST, Sajid M, Braschi S, Delcroix M, Schneider EL, McKerrow WH, Bahgat M, Hansell E, Babbitt PC, Craik CS, McKerrow JH, Caffrey CR. (2009) SmCL3 a gastrodermal cysteine protease of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop.* 2;3 (6):e449
6. Grams R, Vichasri-Grams S, Sobhorn P, Upatham E.S. and Viyanant V. (2001) Molecular cloning and characterisation of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Parasitol. Int.* 50, 105-114.
7. Guarnera EA, Parra A, Kamenetzky L, García G, Gutiérrez A. (2004) Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestode and clinical expression in various *Echinococcus granulosus* strains. *Acta Trop.* 92(2):153-9.
8. Haag KL, Ayala FJ, Kamenetzky L, Gutierrez AM, Rosenzvit M. (2004) Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *J Parasitol.* 90(2):234-9.
9. Holcman B, Heath DD. The early stages of *Echinococcus granulosus* development. (1997) *Acta Trop.* 1;64(1-2):5-17.
10. Jenkins DJ, Romig T, Thompson RC., (2005). Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp. a global update. *Int J Parasitol.* 35(11-12):1205-19
11. Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, García GE, Rosenzvit MC. (2002) Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2(2):129-36.
12. Kim TS, de Guzman JV, Kong HH, Chung DI. (2006) Comparison of gene representation between diploid and triploid *Paragonimus westermani* by expressed sequence tag analyses. *J Parasitol.* 92(4):803
13. Kim TS, Na BK, Park PH, Song KJ, Hontzeas N, Song CY. (2000) Cloning and expression of a cysteine proteinase gene from *Paragonimus westermani* adult worms. *J Parasitol.* 86(2):333
14. Lee EG, Na BK, Bae YA, Kim SH, Je EY, Ju JW, Cho SH, Kim TS, Kang SY, Cho SY, Kong Y. (2006) Identification of immunodominant excretory-secretory cysteine proteases of adult *Paragonimus westermani* by proteome analysis. *Proteomics.* 6(4):1290-300.
15. Moczoń T. (1994) A cysteine proteinase in the cercariae of *Diplostomum pseudospathaceum* (Trematoda, Diplostomatidae). *Parasitol Res.* 80(8):680-3.

16. Monteiro KM, de Carvalho MO, Zaha A, Ferreira HB. (2010) Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics*. 10(10):1985-99.
17. Park H, Kim SI, Hong KM, Kim MJ, Shin CH, Ryu JS, Min DY, Lee JB, Hwang UW. (2002) Characterization and classification of five cysteine proteinases expressed by *Paragonimus westermani* adult worm. *Exp Parasitol*. 102(3-4):143-9.
18. Rawlings ND, Morton FR, Kok, CY, Kong, J. & Barrett, AJ (2008) Merops: La base de datos peptidasa. *Nucleic Acids Res*. 36, D320-D325.
19. Rene Coulombe, Pawel Grochulski, J.Sivaraman, Robert Menardl, John S.Mort and Mirosław Cygler (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *Journal*. 15:20.5492
20. Robinson MW, Dalton JP, Donnelly S. (2008) Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends Biochem Sci*. 33(12):601-8.
21. Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S. (2009) An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics*. 8(8):1891-907.
22. Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP (1999) Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*. 118 5:523-30.
23. Sakanari JA, Staunton CE, Eakin AE, Craik CS, McKerrow JH. (1989) Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc Natl Acad Sci* 86(13):4863-7.
24. Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, Ito A. (2007) Cloning and characterization of cathepsin L-like peptidases of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Mol Biochem Parasitol*. 154(2):181-9.
25. Thompson RC, McManus DP. (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*. 18(10):452-7.
26. Thompson RCA. Biology and Systematics of *Echinococcus*. In *Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson, R.C.A and Lymbery, A.J., eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 1995; Páginas: 1-37.
27. Tua WC, Lai SC. (2006) Induction of cysteine proteinase in the encapsulation of *Hymenolepis diminuta* eggs in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J Invertebr Pathol*. Jun; 92(2):73-8.

28. Yamasaki, R. Mineki, F. Murayama, A. Ito and T. Aoki. (2002) Characterisation and expression of the *Fasciola gigantica* cathepsin L gene. *Int. J. Parasitol.* 32, 1031–1042.
29. Yang SH, Park JO, Lee JH, Jeon BH, Kim WS, Kim SI, Yun KJ, Jeong ET, Lee KW, Kim YM, Lee MH, Park H. (2004) Cloning and characterization of a new cysteine proteinase secreted by *Paragonimus westermani* adult worms. *Am J Trop Med Hyg.* 71(1):87



DETECCIÓN DE CEPAS DIARREOGÉNICAS DE *ESCHERICHIA COLI* EN FUENTES DE AGUA DE LA PROVINCIA DEL CHACO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Liliana Silvina Lösch, Luis Antonio Merino

Área de Bacteriología. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Av. Las Heras 727. Resistencia. Chaco

RESUMEN

La contaminación por *Escherichia coli* de fuentes de agua o de cursos superficiales destinados a recreación representa un riesgo para la salud humana ante la posibilidad de la existencia de cepas patógenas de este microorganismo. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de *E. coli* diarreogénicas mediante el reconocimiento de sus factores de virulencia a través de la técnica de PCR y determinar su distribución en los diferentes compartimentos acuáticos de la provincia del Chaco. Se estudiaron 305 muestras de agua a partir de las cuales se recuperaron 120 cepas de *E. coli*, cada una de ellas procedentes de una fuente diferente. *E. coli* enteroagregativa fue el patotipo más recuperado en todas las fuentes estudiadas.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua y los alimentos es un problema común y persistente que amenaza la salud pública y es la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo entero. Las enfermedades diarreicas son responsables de 1,8 millones de muertes al año, principalmente en los países en vías de desarrollo. Los grandes asentamientos, la falta de tratamiento de los efluentes urbanos e industriales degradan la calidad de los recursos hídricos, superficiales y subterráneos, del mundo entero (Egli 2002; Ishii 2008).

Los patógenos bacterianos son considerados como una de las mayores amenazas para las fuentes de agua, ante la creciente demanda en cantidad y calidad de la misma. Es competencia de los laboratorios relacionados a la salud pública la evaluación y seguimiento de los cambios observados en los ambientes acuáticos. Existe limitado conocimiento sobre los principios que gobiernan su desarrollo y prevalencia; la correcta detección, identificación y

cuantificación requiere la combinación de los métodos clásicos y moleculares (Cotruvo 2004; Kong 2009).

Los recientes avances en las técnicas moleculares aplicadas a la detección de microorganismos, en la etapa de control del tratamiento de aguas, permite asegurar la calidad y seguridad del agua de bebida. (Brettar 2008; Clasen 2007)

La calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano es evaluada mediante la detección y enumeración de organismos indicadores de contaminación. El Código Alimentario Argentino establece como indicadores de calidad del agua destinada a consumo humano a los coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación establece como indicadores de la calidad del agua destinada a contacto primario a *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp (CAA 1994).

La contaminación de fuentes de agua o de cursos superficiales destinados a recreación por *Escherichia coli* representa un riesgo para la salud humana ante la posibilidad que este germen se propague con otros microorganismos patógenos o a la existencia de cepas patógenas de este microorganismo que se describen a continuación (Baba 2006; Orsi 2007).

Es ampliamente reconocido que *E. coli* es causante de diferentes enfermedades humanas, sin embargo su rol como patógeno entérico se exacerbó con la aparición de *E. coli* O157H7 y su asociación con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Nataro 1998).

Las cepas de *E. coli* causantes de enteritis se han clasificado en cinco grupos principales, a los cuales se les agrega *E. coli* de adherencia difusa (ECAD); cada uno de ellos engloba diferentes serotipos, genes y mecanismo de acción. Así, según los genes de virulencia presentes en cada cepa, se pueden clasificar en (Hunter 2003; Kaper 2004; Kuhnert 2000):

Escherichia coli enteropatógena (ECEP) principal causa de diarrea en niños menores de dos años.

Escherichia coli enteroinvasiva (ECEI) penetra en la célula intestinal y causa seguidamente necrosis de la misma.

Escherichia coli enterotoxigénica (ECET) produce dos clases de enterotoxinas: LT y ST y es causante de la diarrea del viajero y también afecta a niños mayores de dos años en países tropicales.

Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH) posiblemente resulta en uno de los patógenos emergentes más importantes de la última década, produce diarrea sanguinolenta y en niños puede causar SUH.

Escherichia coli enteroagregativa (ECEAG) al igual que el patotipo anterior es considerada un patógeno emergente, agente causal de brotes severos de diarrea persistente en el mundo entero, tanto en la población adulta como en niños y en países desarrollados como en vías de desarrollo. Actualmente se la reconoce también como agente etiológico de brotes agudos y como causales de diarrea en pacientes infectados con el VIH. Los brotes de diarrea asociados a este microorganismo están relacionados a la ingesta de alimentos y agua contaminada (Harrington 2006; Huang 2006; Villaseca 2005). *Escherichia coli* enteroagregativa engloba un grupo heterogéneo de genes de virulencia, ya que se demostró que no existe una secuencia única presentes en todos los aislamientos de este microorganismo (Elias 2002; Weintraub 2007). En 1987 el grupo de investigación encabezado por Nataro realizan la primera descripción de estas cepas separando de esta manera ECEAg de ECAD.

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de *E. coli* diarreogénicas mediante el reconocimiento de sus factores de virulencia a través de la técnica de PCR y detectar su distribución en los diferentes compartimentos acuáticos de la provincia del Chaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se tomaron en botellas estériles de 150-250 cm³ de capacidad dejando un espacio aéreo para facilitar la homogeneización antes del estudio. Las muestras a estudiar procedieron de la red, cisternas ó tanques de almacenamiento, fuentes profundas como pozos o perforaciones y fuentes superficiales como ríos ó lagunas. Se mantuvieron refrigeradas hasta su llegada al laboratorio donde se realizó su análisis. El mismo se llevó a cabo siguiendo la técnica de presencia/ausencia, modificación de la técnica de tubos múltiples, para lo cual se prepararon caldo tripticasa de soya modificado con novobiocina y medio EC modificado, ambos a doble concentración, se los fraccionó en alícuotas de 50 ml en botellas que posteriormente se esterilizaron en autoclave. Esta técnica brinda información cualitativa sobre la presencia o ausencia de microorganismos. Posteriormente, y de acuerdo a la turbidez de la muestra, se procedió según una de estas dos metodologías:

a) En aquellas muestras de turbidez apreciable se agregó igual volumen de la muestra, previamente agitada, al medio de cultivo.

b) Las muestras que no presentaron turbidez apreciable fueron filtradas a través de una membrana de 0,45 µm de poro la que posteriormente se colocó en el recipiente que contenía el medio de cultivo estéril.

Una vez inoculadas las botellas con las muestras, se incubaron a temperaturas de 35±0,5°C y se inspeccionarán a las 24 y 48 horas.

A partir de aquellas botellas donde se produjo desarrollo bacteriano, se realizaron resiembras en placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y en Agar Mac Conkey Sorbitol las que se incubaron a 35±0,5°C durante 24 horas para la recuperación de *E. coli*.

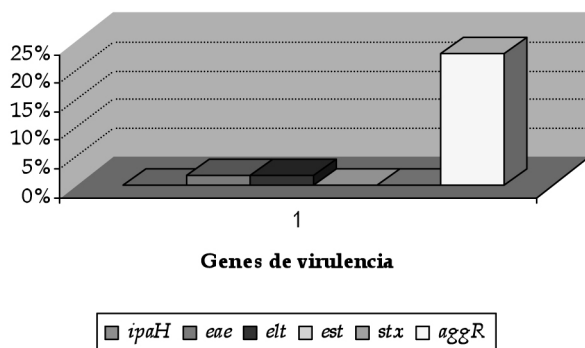
Todos los aislamientos sospechosos fueron identificados mediante las siguientes pruebas bioquímicas: producción de SH² y gas, utilización de glucosa, lactosa, sacarosa y citrato, producción de ureasa e indol, decarboxilación de aminoácidos, producción de oxidasa y reacción de ortonitrofenilgalactopiranosido (ONPG), reacción de Rojo de Metilo y Voges-Proskawer, motilidad, producción de fenilalaninadesaminasa y prueba de sorbitol en tubo.

Las cepas bioquímicamente identificadas como *E. coli* se sometieron a amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el método de PCR múltiple. Se utilizaron 6 pares de iniciadores que detectan 6 genes codificantes de factores de virulencia, lo cuales corresponden a cinco tipos patogénicos: *E. coli* Enterotoxigénica –ECET (*elt* y *est*), *E. coli* Enteropatógena –ECEP (*eae*), *E. coli* Enterohemorrágica –ECEH (*eae* y *stx*), *E. coli* Enteroinvasiva –ECEI (*ipaH*), *E. coli* Enteroagregativa –ECEAg (*aggR*). Se incluyeron cepas control con y sin factores de patogenidad suministradas por el personal del Servicio de Fisiopatogenia del INEI –ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó un protocolo descrito previamente (Toma 2003). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2,5%, posteriormente los geles se colorearon con bromuro de etidio y se tomó registro fotográfico bajo luz UV. El análisis de las bandas se realizó con el programa UVI Pro. (APHA 1992; OMS 1995; Toma 2003).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se estudiaron 305 muestras de agua de la provincia del Chaco a partir de las cuales se recuperaron 120 cepas de *Escherichia coli*, cada una de ellas procedentes de una fuente diferente. En el gráfico 1 se presenta el porcentaje de los genes de virulencia recuperados.

Porcentaje de genes de virulencia de *Escherichia coli* en ambientes acuáticos



A partir de las fuentes superficiales estudiadas se recuperaron 73 cepas de este microorganismo; siendo 55 de ellas (75%) negativas para todos los genes de virulencia estudiados, en tanto que en 18 aislamientos (25%) se detectaron los siguientes genes: una cepa (1,4%) presentó el gen *eae* correspondiéndose al patotipo de ECEP, 2 cepas (2,7%) fueron identificadas como ECET ya que se detectó el gen *elt*. Finalmente en 15 de los aislamientos (20,5%) se detectó en la presencia del gen *aggR* de ECEAg, constituyéndose en el patotipo más frecuente en esta clase de fuente de agua.

En las fuentes subterráneas estudiadas se recuperaron 19 cepas de *E. coli*; de ellas 12 (63,1%) fueron negativas para los genes estudiados. Al igual que en el caso anterior, en las fuentes subterráneas, el patotipo más frecuente fue ECEAg recuperándose 6 cepas (31,6%) portadoras del gen *aggR*. En esta fuente de agua también se recuperó una cepa (5,3%) portadora del gen *eae* correspondiéndose al patotipo de ECEP.

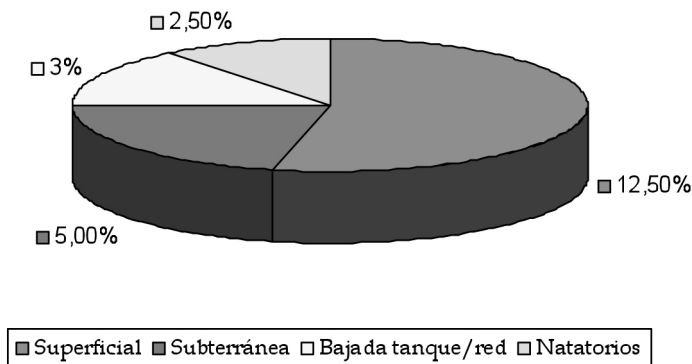
En los estudios que se realizaron de las muestras de bajadas de tanque y de red se recuperaron 19 cepas; de ellas 15 (79%) no presentaron ninguno de los genes de virulencia estudiados, en tanto que 4 (21%) fueron positivas para el gen *aggR*, que se corresponde con el patotipo de ECEAg. A diferencia del trabajo de Ram y col., en esta clase de muestras no se detectaron cepas portadoras del gen *stx* (Ram 2008).

Finalmente se recuperaron 9 cepas de natatorios, de ellas 6 (66,7%) fueron negativas y 3 (33,3%) fueron positivas e identificadas como ECEAg.

E. coli *Enteragregativa* fue el patotipo que se recuperó con mayor frecuencia en todas las fuentes de agua estudiadas. Se caracteriza por su gran variabilidad genética, lo que lleva a que no exista un gen común presente en todas las cepas de este germen dificultando su diagnóstico, por ello, el porcentaje presente en el ambiente podría ser aún mayor desde el momento que en este estudio sólo se analizó uno de los genes de virulencia. En virtud de los resultados se considera a este patógeno como emergente, coincidentemente con otros autores, al tiempo que se requiere ampliar los estudios evaluando a los otros genes de virulencia (Bouzari 2005; Cerna 2003; Huang 2007).

En el gráfico 2 se presentan los porcentajes encontrados de ECEAg según fuente de agua estudiada.

Distribución de ECEAg por fuente de agua



En el presente trabajo se detectó un 1,4 % de cepas, recuperadas de fuentes superficiales, portadoras del gen *eae* y compatible con ECEP y no se detectaron cepas portadoras del gen *stx*. El resultado obtenido es concordante a los trabajos de Ishii y cols (Ishii 2007) y Lauber y cols (Lauber 2003) quienes también determinaron que es más frecuente el aislamiento de cepas de EPEC en el ambiente, situación posiblemente determinada por el mayor

número de reservorios animales.

En ninguna de las fuentes estudiadas se detectó el gen indicador de *E. coli* Enteroinvasiva (*ipaH*), si bien en la bibliografía está descripta esta ruta y la de los alimentos como las principales vías de exposición de estas cepas, su aparición está relacionada a brotes y casos esporádicos (Kuhnert 2000).

En el presente estudio se detectó una cepa de *E. coli* portadora el gen *eae*, clasificada en el presente estudio como ECEP, y 6 con el gen *aggR* (ECEAg) en las muestras de fuentes subterráneas. La presencia de las mismas es un factor que podría contribuir al incremento de los casos de gastroenteritis, particularmente en la población pediátrica, que consume la misma sin previo tratamiento (Rogan 2009; Strauss 2001).

En 2 de las 73 muestras de agua superficial (2,7%) se detectó la presencia del gen *elt* correspondiente a ECET, si bien este porcentaje es inferior al 30% determinado por el grupo de Begum y cols (Begun 2007) está acorde a la bibliografía que indica al agua como una de las principales vías de exposición de este patotipo (Kaper 2004). Durante mucho tiempo se consideró que este microorganismo tenía una corta sobrevida fuera del huésped, pero recientes estudios demuestran que la presencia de nutrientes y las cálidas temperaturas reinantes en climas subtropicales, como el de la Provincia del Chaco, le permitirían en una mayor sobrevida en el ambiente, con el riesgo sanitario que ello implica (Ishii 2007; Winfield 2003).

CONCLUSIONES

La detección de *Escherichia coli* en fuentes de agua requiere particular atención. Si bien la presencia de cepas no patogénicas son un claro indicador de mala higiene, las cepas portadoras de genes de virulencia representan una amenaza a la salud pública; principalmente, a la luz de los presentes resultados, en muestras de natatorios, bajada de tanque y red constituyen un riesgo para la salud de la población expuesta debiéndose incrementar los controles de la integridad del sistema de distribución del agua como así también la calidad del agua del natatorio.

Las técnicas moleculares se presentan como una nueva herramienta, a implementar en el control de microorganismos patógenos, para asegurar la calidad y seguridad del agua destinada al consumo humano y poder determinar la presencia de patógenos emergentes no detectables por los indicadores vigentes actualmente en nuestro país.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que las diferentes fuentes de agua de la Provincia del Chaco podrían actuar como reservorios de ECEAg, patógeno emergente en el mundo entero.

SUMMARY

The contamination of water sources or surface watercourses for recreational uses by *Escherichia coli* represents a risk to human health due to the possible existence of pathogenic strains of this organism. The aim of this study was to detect the presence of diarrheagenic *E. coli* through recognition of their virulence factors by PCR and determine its distribution in the different aquatic compartments of the province of Chaco. We studied 305 samples of water from which 120 strains of *E. coli* were recovered from different sources. Enterotoxigenic *E. coli* was the most frequently recovered pathotype in all sources studied.

BIBLIOGRAFÍA

1. APHA. American Public Health Association. American Water Works Association. Water Pollution Control Federation. Métodos Normalizados. Para el análisis de aguas potables y residuales. Ediciones Díaz De Santos S.A. 1992.
2. Baba A; Ebuchi S; Urdu K; *et al.* An outbreak of waterborne gastroenteritis caused by diarrheagenic *Escherichia coli* possessing *eae* gene. Jpn J Infect Dis 2006; 59: 59-60.
3. Begun YA; Talukder KA; Nair GB; *et al.* Comparison of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water and diarrhoeal stool samples in Bangladesh. Can J Microbiol 2007; 53(1):19-26.
4. Bouzari S; Jafari A; Zarepour M. distribution of virulence related genes among enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. Infect Genet Evol 2005; 5: 79-83.
5. Brettar I; Höfle M. Molecular assessment of bacterial pathogens – a contribution to drinking water safety. Curr Op Biotech 2008; 19: 274-280.
6. Cerna J; Nataro J; Estrada García T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of *Enterotoxigenic Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 2003; 41(5): 2138-2140.

7. Clasen T; Haller L; Walker D; Bartram J; Cairncross S. Cost-effectiveness of water quality interventions for preventing diarrhoeal disease in developing countries. *J Water Health* 2007; 5(4): 599-608.
8. CAA. Código Alimentario Argentino. Capítulo XII: Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. Artículo 982. Res. S.yA.S. N° 494 del 7.07.94. 1994.
9. Cotruvo J; Dufour A; Rees G; *et al.* Waterborne zoonoses. Identification causes and control. Organización Mundial de la Salud. IWA Publishing 2004.
10. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Desarrollo de niveles guías nacionales de agua ambiente correspondientes a *E. coli*/*Enterococcus*. República Argentina. 2001. Disponible en: <http://www.mec.gov.ar>.
11. Egli T; Köster W; Meili L. Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26: 111-112.
12. Elias W; Barros S; Moreira C; *et al.* Enteraggregative *Escherichia coli* strains among classical enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3540-3541.
13. Harrington S; Dudley E; Nataro J. Pathogenesis of Enteraggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254: 12-18.
14. Huang D; Mohanty A; DuPont H; *et al.* A review of an emerging enteric pathogen: Enteraggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 2006; 55:1303-1311.
15. Huang DB; Mohamed JA; Nataro JP. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of Enteraggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. *J Med Microbiol* 2007; 56:1386-1392.
16. Hunter P. Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. *J Water Health* 2003; 01(2): 65-72.
17. Ishii S; Hansen DL; Hicks RE; *et al.* Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environ Sci Technol* 2007; 41: 2203-2209.
18. Ishii S; Sadowsky M. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes Environ* 2008; 23(2):101-108.
19. Kaper J; Nataro J; Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev Microbiol* 2004; 2: 123-140.
20. Kong R; Mak M; Wu R. DNA technologies for monitoring waterborne pathogens: A revolution in water pollution monitoring. *Ocean Coastal Manag* 2009; 52: 355-358.
21. Kuhnert P; Boerlin P; Frey J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24:107-117.

22. Lauber CL; Glatzer L; Sinsabaugh RL. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in recreational waters. J Great Lakes Res 2003; 29: 301-306.
23. Nataro J; Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11 (1):142-201
24. OMS. Organización Mundial de la Salud. Guías para la Calidad del Agua Potable. Volumen I: Recomendaciones. Ginebra. 1995.
25. Orsi RH; Stoppe NC; Sato MI; Gomes TA; Prado PI; *et al.* Genetic variability and pathogenicity potential of *Escherichia coli* isolated from recreational water reservoirs. Res Microbiol 2007; 158(5): 420-427.
26. Ram S; Vajpayee P; Shanker R. contamination of potable water distribution system by multiantimicrobial – resistance Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Environ Health Perspect 2008; 116: 448-452.
27. Rogan W; Brady M; and the Committee on Environmental Health and the Committee on Infectious Diseases. Drinking Water on private wells and risks to children. Pediatrics 2009; 123 (6): 1123-1137.
28. Satrauss B; King W; Ley A; *et al.* A prospective study of rural drinking water quality and acute gastrointestinal illness. BMC Public Health 2001; 1:8.
29. Toma C; Lu Y; Higa N; *et al.* Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41 (6): 2669-2671.
30. Villaseca JM; Hernández U; Sainz Espuñes TR; *et al.* Enteraggregative *Echerichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. Rev Latinoam Microbiol 2005; 47(3-4): 140-159.
31. Weintraub A. Enteraggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. Review. J Med Microbiol 2007; 56: 4-8.
32. Winfield MD; Groisman EA Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 3687-3694.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento a la Fundación “Alberto J. Roemmers” por el subsidio otorgado que permitió llevar adelante el presente trabajo de investigación.

DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS TIPOS PATOGENICOS CAGA, VACA Y BABA² DE *HELICOBACTER PYLORI* EN MUESTRAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS EN POBLACIÓN ADULTA.

Marcelo Gabriel Medina, Myriam Lucrecia Medina, Liliana Silvina Lösch,
Luis Antonio Merino.

Área Bacteriología. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del
Nordeste. Campus de Resistencia, Chaco, Argentina.

RESUMEN

Introducción: La infección con *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) está asociada con el desarrollo de diferentes enfermedades gastroduodenales. Varios genes de virulencia de *H. pylori* se han relacionado con mayor riesgo de enfermedad gástrica. Los 3 principales factores de virulencia son la toxina vacuolizante (*VacA*), el gen de la citotoxina asociada al producto (*CagA*) y la proteína de adhesión (*babA2*). Debido a la diversidad geográfica de prevalencia de *H. pylori* y sus factores de virulencia, el objetivo de este trabajo fue detectar estos genotipos de *H. pylori* en muestras de biopsia gástrica en una población adulta, a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Métodos: *H. pylori* fue identificado en biopsias gástricas por PCR. Los genes *vacA*, *cagA* y *babA2* fueron detectados por PCR multiplex. **Resultados:** La biopsia *H. pylori* positivos fueron 17 (34%). Las cepas de *H. pylori* que fueron genotipos *vacA*+70,60%; *cagA*+52% y no se hallaron genes *babA2*+. **Conclusión:** Estos resultados muestran la eficacia de la PCR en el diagnóstico y genotipificación de cepas de *H. pylori* en pacientes de nuestra región que padecen gastropatías. Demostrando por primera vez en infección por *H. pylori* de genotipos de alta virulencia *cagA* y *vacA* en nuestra población.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo gramnegativo microaerófilo que coloniza la mucosa gástrica de humanos^{1,2}. La infección con esta bacteria ocurre en todo el mundo y la prevalencia varía según la región geográfica, lo que se ha asociado con el nivel socio-económico de la población³. En los países en vías de desarrollo, la prevalencia de la infección alcanza ~80% y la mayoría de las

personas adquiere la infección a temprana edad^{4,5}.

La evolución clínica de la infección es muy variable y depende de factores ambientales y del hospedero, así como de factores de virulencia de la bacteria, los cuales pueden llegar a ser importantes en el desarrollo diferencial de las patologías gastroduodenales^{3,6,7}. Inicialmente la infección aguda puede inducir gastritis crónica no atrófica que eventualmente progresa hacia gastritis crónica atrófica, úlcera péptica, metaplasia intestinal, displasia y carcinoma gástrico o hacia linfoma tipo MALT^{3,4}.

Varios genes de *H. pylori* se han asociado con virulencia y mayor riesgo de enfermedad gástrica grave, en particular se han estudiado genes relacionados con la producción de citotoxina bacteriana, la inducción de citocinas proinflamatorias y la adhesión de la bacteria al epitelio⁸. El gen *vacA* codifica la citotoxina vacuolizante *vacA*; está presente en todas las cepas de *H. pylori*; las cepas que portan el tipo *vacA* s1 son más virulentas, tienen mayor actividad citotóxica y se asocian con mayor actividad citotóxica y se asocian con mayor riesgo de úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer⁹. El gen asociado a la citotoxina (*cagA*) es un marcador de la presencia de un islote de patogenicidad (*cag* PAI) de 40 kb; las cepas *cagA* positivas se asocian con mayor riesgo de úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer¹⁰. El gen *babA2* que codifica una adhesina *BabA2* que se une a antígenos Lewis b de alta expresión en epitelio gástrico, se asocia con mayor riesgo de úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico distal y gastritis con alto grado de actividad se han reportado también variaciones en la prevalencia de cepas *babA2* positivas entre los países occidentales y asiáticos¹¹.

El propósito del este estudio fue detectar la presencia de *Helicobacter pylori* en muestras de biopsias gástricas en una población adulta a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y detectar los genotipos específicos (*cagA*, *vacA*, *babA2* que presentan mayor potencial carcinogénico, en pacientes que concurren al servicio de gastroenterología del hospital Dr. Julio C. Perrando de Resistencia, Chaco.

Materiales y métodos

Se incluyeron en el estudio 50 pacientes que asistieron al servicio de gastroenterología del hospital Dr. Julio Perrando de la ciudad de Resistencia, Provincia del Chaco, Argentina, entre los meses de marzo de 2009 y mayo de 2010. Todos los individuos que participaron, presentaban un cuadro de dispepsia, se les había indicado la realización de una endoscopia alta y firma-

ron el consentimiento informado. Se excluyeron pacientes con enfermedades cardiovasculares y respiratorias, y aquellos que hubieran recibido antiácido 12 horas antes del procedimiento, bloqueadores de la bomba de protones y H₂ quince días antes de la endoscopia y antimicrobianos durante los tres meses previos a la toma de la muestra. El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la institución participante.

Durante el procedimiento endoscópico, el médico gastroenterólogo tomó una biopsia del antro gástrico, destinado a la realización de las pruebas moleculares y 4 a 6 biopsias para la realización del estudio por biología molecular.

Extracción de ADN a partir de la biopsia de antro gástrico, usando el kit Aqua Pure Genomic DNA de (Bio-Rad®) ¹²de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Tipificación de factores de virulencia

La determinación de los genotipos de *H. pylori* se basó en la amplificación de los genes *vacA*, *cagA*, *babA2* mediante PCR, de acuerdo con los protocolos descritos previamente^{12,13}. Los iniciadores para la amplificación de estos genes se presentan en el cuadro 1. Cada reacción de PCR contenía solución tampón PCR (Tris HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50mM, MgCl₂ 2,5 mM, 0,2mM de cada desoxinucleótido (dNTPs) y 0,625 U de Taq DNA polimerasa (Gibco BLR) en un volumen final de 25 µl y de 1 a 2 µl de ADN genómico. Para la amplificación del gen *babA2* se realizó una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C, con un paso final de extensión de 4 minutos de 72°C. Las condiciones de PCR para los alelos s1/s2, m1 y m2 del gen *vacA* y para el gen *cagA*, se basó en protocolos descritos previamente¹⁴. Se amplificó un fragmento de 820 pb del gen *UreC* para confirmar la calidad del ADN extraído para amplificar los fragmentos largos¹⁵. En los aislamientos en los que no se observó una señal clara de amplificación de este gen no se tipificaron el gen *babA2* puesto que para este gen el producto esperado es de 800 pb.

Visualización y análisis de los productos de amplificación. Los productos de amplificación -fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa. La detección y visualización se realizó con bromuro de etidio bajo luz UV, en un sistema de documentación de geles ChemiDoc system XRS de BioRad®. Para el procesamiento y análisis de las imágenes se utilizó el programa Quantity One de BioRad®.

Análisis estadísticos. Para el análisis estadístico se empleó el programa Excel de Window XP. Se consideró estadísticamente significativa una probabilidad (p) < 0,05.

RESULTADOS

Se analizaron biopsias gástricas provenientes de 50 pacientes, 25 hombres y 25 mujeres, con edad promedio de 41 años. La presencia de *H. pylori* se detectó en 17 de las 50 muestras de biopsias endoscópicas gástricas analizadas (34%) por medio de la amplificación de un fragmento del gen *16S ADNr* especie-específico. Acoplada a esta reacción de PCR, se realizó la detección del factor de virulencia *BabA2*, mediante la amplificación de un fragmento del gen *babA2*; el producto esperado de esta reacción no fue observado en muestras *H. pylori* positivas; los genotipos hallados fueron *vacA* + 70,60 %; *cagA* + 52 %.

Teniendo en cuenta que se ha reportado la existencia de factores inhibidores de la PCR en biopsias gástricas, se realizó la amplificación del gen de la IL-1 β humana con el fin de descartar falsos negativos. El producto esperado de esta reacción se encontró presente en todas las muestras analizadas, lo que indica la ausencia de factores inhibidores.

Los valores de p siempre fueron mayores a 0,05.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* es de gran importancia, dado que su presencia ha sido asociada con el desarrollo de algunas enfermedades gastroduodenales^{15,16,17}. Existen diferentes pruebas para diagnosticar la infección por *H. pylori*, cada una de ellas con ventajas y desventajas¹⁸. Los métodos de detección se han dividido tradicionalmente en métodos invasores y no invasores, según si requieren o no de una endoscopia con toma de biopsia^{16,17}. La reacción de PCR permite confirmar el diagnóstico de la infección, mediante la detección y amplificación de un fragmento de ADN específico de *H. pylori*^{16,17}. Dada la especificidad de los iniciadores y la capacidad de la técnica de amplificar exponencialmente el ADN blanco presente en una muestra, se ha reportado que presenta una alta especificidad y sensibilidad, ofreciendo un diagnóstico rápido y confiable de la infección, que es de gran

utilidad en la detección de microorganismos de difícil cultivo como es el caso del *H. pylori*. Adicionalmente, la aplicación de esta técnica se extiende a la detección de factores genéticos responsables de la virulencia y en la evaluación de mutaciones específicas asociadas a la resistencia a antimicrobianos^{19,20}.

En este estudio se observó una prevalencia del 34% de infección por *H. pylori* mediante la aplicación de la técnica de PCR para la amplificación de un fragmento del gen 16S ADNr de *H. pylori*; su prevalencia a nivel mundial es de 30 a 50%, y existe una relación inversa entre el grado de infección con esta bacteria y el nivel socioeconómico de la región, este hallazgo coincide con lo reportado por otros autores^{21,22}. El 70,60% de las cepas de *H. pylori* fueron positivas para el gen *vacA*, en nuestro estudio; estas cepas bacterianas *vacA* + expresan la citotoxina *vacA*, capaz de causar injuria celular gástrica in vitro e in vivo y el 52% de las cepas de *H. pylori* resultaron positivas para el gen *cagA*, el cual está asociado a un mayor grado de severidad de gastritis, daño epitelial superficial, úlcera duodenal, metaplasia intestinal y atrofia de la mucosa gástrica²³. La prevalencia reportada en otros estudios de América del Sur es similar a la hallada en este estudio²⁴ y en los países asiáticos²⁵. El gen *babA2*, participa en la adhesión de *H. pylori* a los antígenos Leb en humanos las células epiteliales gástricas, este gen no fue hallado en nuestro estudio, la frecuencia de este gen varía en los países de América latina²⁶, además es importante señalar que la detección por PCR de *babA2* de *H. pylori* no siempre se correlaciona con sus propiedades adhesivas y, por el contrario, el fracaso para detectar *babA2* por PCR no significa que la cepa es no adherentes, ya que hay una considerable variación alélica en *babA2* gen²⁷⁻²⁹.

La asociación de genes *cagA* y *vacA* observado en nuestro estudio fue del 52,94%, este hallazgo es importante pues los genotipos *cagA*(+) y *vacA*(s1/m1) se asocian con incremento del riesgo para desarrollar úlcera péptica, lesiones precursoras e inclusive cáncer gástrico³⁰. Por lo tanto, la identificación de los genes *vacA* y *cagA* permite identificar las cepas con mayor virulencia y por tanto asociadas con cuadros clínicos más severos. En este sentido, estudios de genotipificación del microorganismo, así como la caracterización de factores genéticos del hospedero, en pacientes con patologías gástricas leves e infección activa por *H. pylori* son de gran importancia dado que un porcentaje significativo podrían desarrollar alguna patología gastroduodenal de mayor gravedad.

CONCLUSIÓN

Estos resultados muestran la eficacia de la PCR en el diagnóstico y genotipificación de cepas de *H. pylori* en pacientes de nuestra región que padecen gastropatías. Demostrando por primera vez en infección por *H. pylori* de genotipos de alta virulencia *cagA* y *vacA* en nuestra población.

ABSTRACT

Background: *Helicobacter pylori* has been strongly associated with chronic gastritis, peptic and duodenal ulcers, and it is a risk factor for gastric cancer. Three major virulence factors of *H. pylori* have been described: the vacuolating toxin (VacA), the cytotoxin-associated gene product (CagA) and the adhesion protein BabA2. Since considerable geographic diversity in the prevalence of *H. pylori* virulence factors has been reported, the aim of this work was to establish the *H. pylori* and *vacA*, *cagA* and *babA2* gene in adult patients, the aim of this work was to detect these genotypes of *H. pylori* in samples of gastric biopsy in an adult population, across chain reaction of the polymerase (PCR).

Methods: *H. pylori* was identified in gastric biopsies by nested PCR. *vacA*, *cagA* and *babA2* genes were detected by multiplex PCR.

Results: The biopsy *H. pylori* positive were 17 (34%). The strains of *H. pylori vacA* genotypes were 70.60% +, *cagA* + 52% and found no genes *babA2* +. Conclusion: These results show the effectiveness of PCR in the diagnosis and genotyping of strains of *H. pylori* in patients in our region that have gastropathy. Demonstrating for the first time in infection by *H. pylori* High virulence genotypes *vacA* and *cagA* in our population.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-5.
2. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 321-33.
3. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-86.
4. Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed* 2000; 11: 187-205.

5. Logan RP, Walker MM. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Br Med J 2001; 323: 920-2.
6. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 12778-83.
7. Quiroga A, Cittelly D, Bravo M. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. Biomédica 2005; 25: 325-34.
8. Atherton JC. *Helicobacter pylori* virulence factors. Br Med Bull 1998; 54:105-20.
9. Phadnis SH, Llover D, Janzon L, Normark S, Weastblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1994; 62: 1557-65.
10. Sharma SA, Tummuru MK, Blazer MJ, Kerr LD. Activation of IL-8 gene expresión by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor -Kappa B in gastric epithelial cells. J Immunol 1998; 160:2401-7.
11. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:12778-83.
12. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blazer MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995; 270:17771-7.
13. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asboeck M, Sousa JC et al. Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. J Clin Microbiol 1998; 36:1.
14. Cittelly DM, Huertas MG, Martinez JD, Oliveros R, Posso H, Bravo MM et al. *Helicobacter pylori* genotypes in non atrophic gastritis are different of the found in peptic ulcer, premalignant lesions and gastric cancer in Colombia. Rev Med Chil 2002; 131:1370-5.
15. Fujimoto S, Marshall B, Blaser MJ. PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1994; 32:331-4.
16. Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Rev Biomed 2000; 11: 187-205.
17. Hardin F J, Wright R A. *Helicobacter pylori*: Review and update. Hosp Physician 2002; 38: 23-31.
18. Logan RP, Walker MM. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Br Med J 2001; 323: 920-2.

19. Premoli G, González A, Millán-Mendoza, Percoco T, Vielmas A. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Rev Cubana Med Trop 2004; 56: 85-90
20. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 280-322.
21. Castillo G, Mazari M, López Y. *Helicobacter pylori*: Focus on *cagA* and *vacA* major virulence factors. Salud Publica Mex 2004; 46: 538-48.
22. Araya JC, Anabalón L, Roa I, Bravo M, Villaseca MA, Guzmán P, et al. Relación de la genotipificación de *Helicobacter pylori* con la forma e intensidad de la gastritis en población adulta portadora de patología gástrica benigna. Rev Méd Chile 2004; 132: 1345-54.
23. Leung WK, Chan MC, To KF, Man EP, Ng EK, Chu ES, et al. H pylori Genotypes and Cytokine Gene Polymorphisms Influence the Development of Gastric Intestinal Metaplasia in Chinese Population. Am J Gastroenterol 2006; 101: 714-720.
24. Ramírez Ramos A, Sánchez Sánchez R. Contribución de Latinoamérica al estudio del *Helicobacter pylori*. Acta Gastroenterol Latinoam 2009;39:197-218.
25. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, Shiratori Y, Omata M: Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. Gut 1998, 42:338-343.
26. Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S: Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science 1993, 262:1892-1895.
27. Hennig EE, Mernaugh R, Edl J, Cao P, Cover TL: Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA. Infect Immun 2004, 72:3429-3435.
28. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, Volland P, Borén T, Karttunen R, Engstrand L, Rad R, Prinz C, Gerhard M: Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. FEMS Immunol Med Microbiol 2005, 44:151-156.
29. Colbeck JC, Hansen LM, Fong JM, Solnick JV: Genotyping profile of the outer membrane proteins *babA* and *babB* in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Infect Immun 2006, 74:4375-4378.
30. Gold BD, van Doorn LJ, Guarner J, Owens M, Pierce-Smith D, Song Q, et al. Genotypic, clinical, and demographic characteristics of children infected with *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1348-52.

SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: RELEVAMIENTO SEROEPIDEMIOLÓGICO DE ANTICUERPOS ANTI- *ESCHERICHIA COLI* O157 PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA, EN DIFERENTES GRUPOS POBLACIONALES.

Elizabeth Miliwebsky, Isabel Chinen, Marta Rivas
Servicio Fisiopatogenia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr.
Carlos G. Malbrán

INTRODUCCION

Las principales estrategias de virulencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) son la habilidad de colonizar el intestino y la producción de toxina Shiga (Stx). Sin embargo, la respuesta inmune inducida por STEC está poco estudiada. Los anticuerpos con características protectoras inducidos por STEC, deben inhibir la colonización intestinal y/o neutralizar a la Stx antes que esta alcance las células blanco y se desarrolle una enfermedad severa como el síndrome urémico hemolítico (SUH). Desde el punto de vista epidemiológico, el hecho de que la edad de mayor incidencia de infección por STEC y sus complicaciones severas como el SUH ocurra en niños menores de 10 años, sugiere un probable aumento de la inmunidad a lo largo de los años. Desde el punto de vista clínico, la baja frecuencia de re-infecciones con STEC, así como la rara ocurrencia de un segundo episodio de SUH puede ser una evidencia de una eficiente respuesta inmunológica y con capacidad protectora contra Stx. En nuestro país, a pesar de la alta incidencia de SUH, hay muy pocos estudios sobre el porcentaje de individuos sanos que presentan anticuerpos anti-LPS de STEC y/o anti-Stx y/o anti-proteínas de adherencia. Existen distintos métodos para determinar anticuerpos con diferentes especificidad, sensibilidad y complejidad (1; 2). Entre ellos, se pueden citar los ensayos en cultivos celulares para medir anticuerpos neutralizantes anti-Stx, enzimoimmunoensayos para la detección de anticuerpos anti-LPS y proteínas secretadas, el Western Blot para la detección de anticuerpos anti-LPS, anti-Stx, anti-enterohemolisina, anti-flagelo y anti- proteínas de membrana externa. El desarrollo de técnicas serológicas permitiría contar con herramientas diagnósticas para establecer la infección por STEC en pacientes con enfermedad severa principalmente cuando el patógeno no puede ser detec-

tado, y para evaluar grupos susceptibles a la infección por STEC. Brindaría además importantes aportes en la identificación de grupos de riesgo para establecer estrategias de prevención y control, así como también información para la selección de proteínas inmunogénicas para ser utilizadas en fórmulas vacunales.

OBJETIVOS

1. Desarrollar las metodologías de ELISA y Western Blot para la detección de anticuerpos anti-*E. coli* O157 (anti-Lipolisacárido O157, anti-Stx y anti-proteínas que intervienen en la adherencia al epitelio intestinal), en sueros de origen humano.
2. Seleccionar la técnica serológica cuyas características de sensibilidad y especificidad permitan utilizarla como parte de la metodología diagnóstica en ausencia del aislamiento del patógeno.
3. Detectar proteínas generadoras de inmunidad protectora capaces de ser utilizadas como probables inmunógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ELISA para la detección de anticuerpos anti- Lipopolisacárido O157 (LPSO157)

El desarrollo del ELISA se fundamentó en los protocolos descriptos por Chart (3), Guth (4) y Thirumalapura (5). Se definieron las siguientes etapas: Sensibilización del soporte con LPSO157; incorporación de la muestra (suero del paciente); incorporación de anticuerpo anti-IgG humano conjugado con peroxidasa; incorporación del sustrato; y lectura de absorbancia a 450 nm. Para cada etapa se evaluaron las concentraciones de los reactivos y los parámetros de temperatura y tiempos de incubación. Se trabajó en la preparación de un pool de sueros positivos y de un pool de sueros negativos, para ser utilizados como suero control positivo y negativo, respectivamente. Se utilizaron placas de poliestireno (Nunc polysorp) de 96 hoyos, LPSO157 comercial (List Biological Laboratories INC, USA), y anticuerpos anti-human conjugados con peroxidasa (Chemicon International, USA). Se realizó la calibración de micropipetas y se estandarizó la forma de lavado manual. Con el objetivo de ajustar la absorbancia correspondiente al punto de corte de lectura se

procesaron un total de 59 sueros de individuos con infección por *E. coli* O157 y 83 sueros negativos.

Western Blot (WB) para la detección de anticuerpos anti-LPSO157

El desarrollo del WB se fundamentó en el protocolo descrito por Towbin (6) con modificaciones. Muestras de LPSO157 de diferentes concentraciones (1, 0,5 y 0,1 mg/ml) fueron hervidas a 70°C y 100°C por 30 min. Se realizó la siembra y la electroforesis en gel de poliácridamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). El LPS se transfirió a membrana de nitrocelulosa. Se realizó el bloqueo y lavado de la membrana transferida. El suero diluido 1/100 en PBS-BSA 0,1% Tween 0,05% fue incubado con la membrana por 2 h a temperatura ambiente (Ta). Se agregó el conjugado IgG de cabra anti-IgG humano 1/1000, por 1 h a Ta. La membrana se reveló con Diamino bencidina tetrahidroclorato (DAB) (Sigma Chemical CO.) y H₂O₂. Se tomó como resultado positivo la aparición de patrones de banda de color. Se ensayó el protocolo con un suero proveniente de un individuo con infección por *E. coli* O157.

Preparación y purificación de Stx

El procedimiento de purificación se fundamentó en los protocolos previamente descritos por Head (7) y por Ishikawa (8), con modificaciones. Para la obtención de toxina se trabajó con la cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido conteniendo el inserto para Stx2, gentilmente cedida por la Dra. Ibarra (Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA). Un subcultivo (1/50) de una colonia *E. coli* DH5 α /Stx2 se sembró en caldo Luria más ampicilina (100 ug /ml). Luego de la incubación a 37°C por 18 h y centrifugación, se precipitaron las proteínas del sobrenadante con SO₄NH₄ (60%). El pellet resuspendido se dializó por membrana de 3,500 MWCO. Se utilizó polietilenglicol para concentrar el líquido dializado. El ensayo de neutralización citotóxica en células Vero con anticuerpos monoclonales anti-Stx2 (MAbC5BB12) se realizó para confirmar la extracción de Stx2, mientras que el título de toxina se determinó realizando diluciones al medio del extracto y siembra en microplaca con células Vero. Luego de la incubación a 37°C por 72 h en estufa con 5% de CO₂ se determinó el título de Stx2 como la inversa de la dilución más alta que presentó destrucción en el 50% de la monocapa (CD50) (9).

Western Blot para la detección de anticuerpos anti-Stx

El desarrollo del WB se fundamentó en el protocolo descrito por Ludwig y col. (2) con modificaciones. Se realizó SDS-PAGE del extracto de

toxina. La transferencia a la membrana de difluoruro de polivinilidina (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Calif. USA) se realizó a 20 V por 18 h. Luego del bloqueo y los lavados, cada uno de los cortes realizados a la membrana o "strips" fue incubado con una muestra de suero diluido 1:100 en buffer Tris 50mmol/L; pH 7.4 con 5% de suero de cabra (SC) y 5% de leche descremada (LD) a 4°C durante 18 h. Después de los lavados, los strips fueron incubados con el anticuerpo anti-humano IgG conjugado con peroxidada diluido 1:10000 en buffer 50mmol/L; pH 7.4 con 3% de SC y 3% de LD a 37°C durante 1 h. Luego de los lavados se reveló la unión del anticuerpo humano anti-Stx con el anticuerpo anti-humano conjugado con peroxidasa por quimioluminiscencia en placa radiográfica (AGFA X-Ray Film). Se procesaron 2 sueros de pacientes con infección por STEC Stx2 y un suero de un individuo no infectado por STEC.

Western Blot para la detección de anticuerpos anti-proteínas involucradas en la adherencia de STEC al epitelio intestinal: Int280 γ y EspA (proteínas estructurales de membrana externa) y TccP, Tir y Map (proteínas efectoras)

Este ensayo fue desarrollado según lo descrito por Towbin y col. (6) con modificaciones. Las membranas de nitrocelulosa transferidas con las proteínas recombinantes TCCP, Tir, EspA, Map, e Int280 γ fueron cedidas por el Dr. Frankel (División de Biología celular y molecular Colegio Imperial de Londres, Inglaterra). Luego del bloqueo y los lavados, cada uno de los strips fueron incubados con un suero diluido 1:300 en buffer PBS 0,1% pH 7.3 con 5% de LDy 0,1% Tween 20 a Ta, con agitación durante 2 h. Después de los lavados, los strips fueron incubados con el anticuerpo anti-humano IgG conjugado con peroxidada diluido 1:7.500 en buffer PBS-0.1% Tween 20 y con 0,1% de DA a Ta durante 2 h. La membrana se reveló con DAB y H₂O₂. Un suero fue considerado reactivo si se detectaba una de las bandas correspondiente a una de las proteínas estudiadas. Cada suero positivo fue considerado con 1+, 2+ y 3+ de acuerdo a la intensidad de la banda. Se procesaron 24 sueros de pacientes con infección por *E. coli* O157 y 12 sueros de individuos no infectados por STEC.

RESULTADOS

ELISA para la detección de anticuerpos anti-LPSO157

Para evaluar la concentración del antígeno LPSO157 a fijar en las placas se definió como parámetro fijo el anticuerpo de cabra anti-humano conjugado

con peroxidasa. Mediante este ensayo, se evaluó en los pocillos utilizados como blanco de antígeno, el efecto “background” debido al pegado inespecífico de anticuerpos (sueros control +y/o -) y del conjugado a las proteínas que quedan adheridas en los pocillos en la etapa de bloqueo y cuyo valor de OD_{450nm} promedio obtenido fue < 0.08, tanto al evaluar el suero control (+) como el suero control (-). Asimismo, en los pocillos sin suero control (+) y/o (-), se evaluó el efecto “background” que se genera por pegado inespecífico del conjugado, obteniéndose valores de OD_{450nm} < 0.064. La concentración seleccionada a ser utilizada en el protocolo estandarizado fue de 2µg LPSO157/ pocillo. Con el suero control positivo se evaluaron las curvas generadas al trabajar con diluciones seriadas a fin de seleccionar la curva sigmoidal de mayor pendiente lo que permitió establecer el punto de corte para una lectura óptima. El parámetro fijo para esta determinación fue el conjugado, y los parámetros variables fueron el suero control positivo y el antígeno. Se observó que el punto de corte óptimo se obtuvo utilizando 2µg LPS O157/ pocillo y una dilución de suero control 1:400.

Protocolo definitivo

Sensibilizar las placas con 200 µl/hoyo del LPS (10µg/ml) diluido en buffer carbonato, pH 9.6, a 4°C durante 18 h.

Retirar la solución del LPS y bloquear la placa con BSA al 2% en buffer PBS 1X Ta durante 1 h.

Realizar 3 lavados con Tween 20 al 0.05% en buffer PBS 1X

Agregar 100 µl/hoyo de diluciones seriadas al ½ partiendo de una dilución inicial de 1/20 del suero del paciente (de la línea A a la H) en buffer PBS 1X con Tween 20 al 0.05% y 0.5% de BSA. Incubar a Ta durante 1 h.

Realizar 3 lavados con Tween 20 al 0.05% en buffer PBS 1X

Agregar 100 µl/hoyo del antisuero anti-human conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 en PBS 1X con 0.05% de Tween 20 y 0.1% de BSA. Incubar a Ta durante 1 h.

Realizar 3 lavados con Tween 20 al 0.05% en buffer PBS 1X.

Agregar 100 µl/hoyo del sustrato (10 ml buffer citrato pH 4.5, 10 mg de OPD, 10 µl H₂O₂ 30 vol). Incubar a Ta en ausencia de luz por 10 min.

Leer en espectrofotómetro a 450 nm.

Luego de realizar los ensayos con 83 sueros negativos se obtuvieron lecturas comprendidas entre 0,1 y 0,5 de DO en la dilución de punto de corte de 1/400. Mientras que con el procesamiento de 59 sueros positivos se obtuvo una DO promedio de 0,741.

Western Blot para la detección de anticuerpos anti-LPSO157

En tres calles de la membrana de nitrocelulosa se observaron, patrones de bandas de diferentes intensidades, correspondientes a la precipitación del complejo formado por el antígeno LPSO157 (1, 0,5 y 0,1 g/ml previamente calentado a 100°C) con los anticuerpos anti-LPSO157 presentes en el suero ensayado. No se observó bandas de precipitación en aquellas calles donde se había sembrado el LPSO157 calentado a 70°C.

Preparación y purificación de Stx

Por el ensayo de neutralización de la citotoxicidad en células Vero utilizando anticuerpos monoclonales anti-Stx2 (MAbC5BB12) se confirmó la extracción de Stx2. El extracto presentó un título de CD50 =46080.

Western Blot para la detección de anticuerpos anti-Stx

De acuerdo con el protocolo descrito se pudieron completar todas las etapas del WB excepto la correspondiente al revelado de la quimioluminiscencia con placas radiográficas. La eficiencia de las etapas de SDS-PAGE y de transferencia fue controlada con la tinción con el colorante Coomassie R-250. En la etapa del revelado se pudo observar la fluorescencia originada de la reacción con la enzima peroxidasa del anticuerpo conjugado indicando la unión del anticuerpo anti-Stx de los dos sueros positivos ensayados con la proteína Stx unida a la membrana. Mientras que con el suero negativo no se observó fluorescencia. Sin embargo no pudo lograrse la captación de la quimioluminiscencia por la placa radiográfica.

Western Blot anti-proteínas involucradas en la adherencia de STEC al epitelio intestinal: Int280γ y EspA (proteínas estructurales de membrana externa) y TccP, Tir y Map (proteínas efectoras)

Se ha observado que el 50% de los sueros de los casos con infección por STEC y 25 % de los sueros de los casos asintomáticos presentó respuesta inmune para Int280γ, EspA, TccP, Tir y Map. Sin embargo no se observó diferencias significativas entre ambos grupos. Las proteínas Tir y EspA mostraron mayor intensidad de respuesta que el resto de las proteínas. El 95,8% de los sueros de los casos (+) por STEC (23/24), y todos los sueros de los casos (-), mostraron respuesta inmune de gran intensidad anti estas dos proteínas. Mientras que fue variable la respuesta anti TccP, Map y Int280γ. Para Tccp, 13 de 18 (72%) casos mostraron una intensidad entre 2+ y 3+ mientras que para los sueros (6/6, 100%) de los niños asintomáticos fue de 1+. Para

Map, 10 de 19 (52,6%) sueros de los casos mostraron una respuesta entre 2+ y 3+ mientras que para los sueros de los niños asintomáticos (5/5, 100%) fue de 1+. Para Int280y 9 de 16 (56,2%) sueros de los casos mostraron una respuesta de 2+ mientras que para los sueros de los niños asintomáticos (9/10, 90%) fue de 1+.

DISCUSIÓN

En este trabajo se han desarrollado las técnicas serológicas de ELISA y WB para la detección de anticuerpos anti-*E. coli* O157 (anti-LPSO157, anti-Stx y anti-proteínas que intervienen en la adherencia al epitelio intestinal), en sueros de origen humano. Cada uno de estos ensayos presentó particularidades a destacar. El ELISA para la detección de anticuerpos anti-LPSO157 fue el ensayo más sencillo para su aplicación. Este se realiza sobre un soporte sólido y se completa en un solo día. Se debe destacar además que resultó ser el ensayo más versátil para ser aplicado al diagnóstico. La detección de IgM permitiría detectar los casos agudos y diferenciarlos de infecciones anteriores. Sin embargo requirió de una compleja estandarización quedando aún pendiente el ajuste de la lectura correspondiente al punto de corte. EL WB para la detección de anticuerpos anti-LPSO157 en contraste con el ELISA fue más complejo. Consta de diferentes etapas como SDS-PAGE, transferencia y detección de los anticuerpos que se completan en dos días de ensayo. Se observó además la necesidad que el LPS debe ser precalentado a 100°C para extraerlo de las micelas que forma en su estado original y forzar de esta manera a que se expongan cargas eléctricas necesarias para realizar la electroforesis. El WB para la detección de anticuerpos anti-Stx, fue la técnica más extensa teniendo en cuenta además, que al no disponerse de toxina comercial hay que sintetizarla. Para este fin se debe contar con un laboratorio con equipos que permitan procesar grandes volúmenes de cultivo del microorganismo. En nuestro laboratorio se trabajó con la capacidad máxima disponible pero además se utilizaron estrategias para la concentración del extracto de Stx. La detección de anticuerpos anti-Stx mediante WB esta descrita como una técnica sensible, sin embargo en este proyecto se observaron dificultades en el revelado mediante quimioluminiscencia. De todas maneras durante este estudio se pudo identificar y definir nuevos reactivos para el revelado que se experimentarán para complementar este estudio en posteriores ensayos que permitan superar esta limitante. Por lo desarrollado hasta el momento, se

considera que el ELISA por sus características de sensibilidad, especificidad y aplicabilidad sería la técnica serológica de elección para ser utilizada como parte de la metodología diagnóstica en ausencia del aislamiento del patógeno y para brindar información sobre la respuesta inmune humoral anti-*E. coli* O157 en población sana y en niños con infección por STEC O157. Por otro lado los resultados del WB para la detección de anticuerpos anti-proteínas involucradas en la adherencia de STEC al epitelio intestinal mostraron que 1) Las proteínas Tir y EspA presentaron mayor intensidad de respuesta que el resto de las proteínas. Esto podría indicar que estas proteínas poseen mayor antigenicidad y capacidad de inducir respuesta inmune. 2) La respuesta anti TccP, Map y Int280y es de menor intensidad en niños asintomáticos que en sueros de los casos con infección por STEC. De acuerdo a estos resultados, se pudo observar que la respuesta inmune anti-estas proteínas podrían tener una función protectora en la población general y podría ser utilizada como estrategia para reducir la colonización de STEC en terneros y en niños resultando una medida de prevención importante de la enfermedad severa causada por STEC en áreas endémicas de Argentina.

ABSTRACT

The aim of this project was develop the LPSO157 enzyme-linked immunosorbent (ELISA) and western blot (WB) assays to detect anti-LPSO157, anti-Shiga toxin and anti- intestinal adherence proteins, antibodies. Our preliminary results suggest that the LPSO157 ELISA for its characteristics of sensitivity, specificity, applicability and versatility would be one of the best serological techniques to be used as part of the diagnostic methodology in the absence of pathogen isolation. In addition, this assay also would provide important information about the humoral immune response anti-*E. coli* O157 in healthy and in children with severe O157 infection. On the other hand, by intestinal adherence proteins (Int280y, EspA, TCCP, Tir and Map) WB, was observed that immune response against these proteins may have a protective function in the general population and could be used as a strategy to reduce the colonization of STEC reinforcing the prevention of severe diseases in endemic areas of Argentina. Further studies should be performed to confirm theses hypothesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reymond D, Karmali MA, Clarke I, Winkler M, Petric M. Comparison of the Western blot assay with the neutralizing-antibody and enzymelinked immunosorbent assays to measure antibody to verocytotoxin 1. *J Clin Microbiol* 1997; 35:609-13.
2. Ludwig K, Karmali MA, Sarkim V, et al. Antibody response to Shiga toxins Stx2 and Stx1 in children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2272-9.
3. Chart H, Scotland SM, Smith HR, Rowe B. Antibodies to *Escherichia coli* O157 in patients with haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome. *J Clin Pathol.* 1989; 42(9):973-6
4. Nishimura LS, Souza RL, Guth BEC. Serum antibodies to *Escherichia coli* Lipopolysaccharide O26, O111, O157 in children with hemolytic uremic syndrome in Sao Paulo, Brazil. Poster P05.1.07 6° International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *E. coli* Infection VTEC 2006, Melbourne.
5. Thirumalapura NR, Morton RJ, Ramachandran A, Malayer JR. Lipopolysaccharide microarrays for the detection of antibodies. *J Immunol Methods.* 2005; 298:73-81.
6. Towbin M, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4
7. Head SC., Petric M, Richardson SE, Roscoe ME, Karmali MA. Purification and characterization of verocytotoxin 2. *FEMS Microbiol Lett.* 1988; 51:211-6.
8. Ishikawa S, Kawahara K, Kagami Y, Isshiki Y, Kaneko A, Matsui H, Okada N, Danbara H. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. *Infect Immun.* 2003; 71(6): 3235-9
9. Mena MF, Tous M, Miliwebsky E, Chillemi G, Rivas M. Differential Kinetic patterns for Shiga toxin production by *Escherichia coli*. *Rev Arg Microbiol.* 1997; 29: 167-75.



ESTADO NUTRICIONAL Y PARASITOSIS EN ESCOLARES DEL MUNICIPIO DE BERISSO, PROVINCIA DE BUENOS AIRES.

Minvielle Marta Cecilia, Pezzani Betina Cecilia, Ciarmela María Laura,
Molina Nora Beatriz

PROCOPIN (Programa de control de las parasitosis intestinales y nutrición).
Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de La Plata.

El desarrollo de este estudio implicó seis fases:

FASE I: PARASITOSIS INTESTINALES

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios epidemiológicos han registrado la presencia de parasitosis intestinales en poblaciones infantiles de Latinoamérica (1-6). Existe además una amplia variedad de especies parasitarias dentro de las regiones y dentro de cada país (7).

Si tenemos en cuenta los datos reportados por diversas publicaciones en Argentina, podemos hablar de un problema “no resuelto” en el ámbito de la Salud Pública (8-11). Estudios realizados en la última década revelan prevalencias cercanas al 50% en poblaciones vulnerables de la provincia de Buenos Aires y de Neuquén, indicando que los diferentes factores ambientales (clima y suelo especialmente) de las diversas regiones de Argentina, no se relacionan con las frecuencias de esta patología (12-14). Sin embargo, estas condiciones ambientales se asocian a la diversidad de especies parasitarias presentes en cada región. En la región Sur son más frecuentes los protozoos (13,15), en el Norte los helmintos (19,10) y en el Centro se presenta una combinación de ambos grupos parasitarios (16). Pero en todas las publicaciones siempre se registra la presencia de *Giardia intestinalis*, protozoo reconocido en muchas reuniones científicas de nuestro país como “el parásito nacional” (17)

G. intestinalis (*G. lamblia*, *G. duodenalis*) es el protozoo productor de diarrea no bacteriana diagnosticado con más frecuencia en todo el mundo (18).

Actualmente, es una especie compleja con características morfológicas similares pero con heterogeneidad fenotípica y genotípica (19). En años recientes, la clasificación genotípica ha sido aplicada para la identificación de este parásito y su posible relación con la clínica y la epidemiología de giardiasis (20-22). Numerosos investigadores han reportado que los genotipos A y B de *Giardia* se aíslan en muestras humanas y presentan diferencias biológicas y patogénicas (23,24). Aún no existe consenso sobre la relación entre el genotipo de *G. intestinalis* y las características clínico-epidemiológicas de esta protozoosis (25,26). En un estudio previo del grupo llevado a cabo en las localidades de La Plata (urbana) y General Mansilla (rural) de Argentina se detectó una prevalencia de 93% de genotipo B y 7% de All, este último sólo presente en área urbana y asociado a formas asintomáticas de giardiasis (27).

El presente trabajo se realizó en un municipio lindante con las localidades mencionadas, dentro del marco del PROCOPIN (Programa de Control de las Parasitosis Intestinales y Nutrición) (28). Específicamente se seleccionó un barrio que presenta permanente inmigración proveniente del norte de nuestro país (aborígenes) y de países limítrofes (Bolivia, Paraguay), circunstancias que permiten estudiar las posibles diferencias en la circulación de especies parasitarias y de genotipos de *Giardia* (Figura 1).

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de los parásitos intestinales y de los genotipos de *Giardia intestinalis* y analizar las características clínico-epidemiológicas en escolares de Berisso, provincia de Buenos Aires, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante 2009 se realizó un estudio descriptivo-transversal en escolares de Berisso, provincia de Buenos Aires. Se convocó a la población a través del establecimiento escolar de la zona, siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud que recomienda el desarrollo de estudios poblacionales ingresando a la comunidad por intermedio de las escuelas (29). Las autoridades educativas difundieron la convocatoria a los padres/tutores de los 352 niños matriculados en tres establecimientos educativos del municipio. Mediante entrevista personal se relevaron variables demográficas (edad, sexo) y variables socioculturales y ambientales: tipo de vivienda (chapa/madera o cemento), tipo de piso (tierra o cemento), recolección de residuos domiciliarios (sí/no), tipo de agua de consumo (red o bomba), eliminación de excretas (red

cloacal o letrina), hacinamiento (sí -cuando duermen más de 3 personas por habitación-/no) y anegamiento de la vivienda (sí/no). Se registró la presencia/ausencia en la última semana previa a la encuesta de los siguientes signos/síntomas (sí o no): diarrea, vómitos, prurito anal, pérdida de apetito, decaimiento y dolor abdominal. También se registró la práctica de conductas de riesgo como no lavado de manos antes de comer y después de ir al baño, onicofagia y andar frecuentemente descalzo. Cada padre/tutor firmó un consentimiento informado para el desarrollo de este trabajo. Los procedimientos desarrollados en este proyecto fueron aprobados por los Comités respectivos de las cuatro entidades que financiaron el proyecto. Además se contó con la autorización escrita de las autoridades escolares y del municipio de Berisso.

Simultáneamente se entregaron los recipientes para la realización de un seriado coproparasitológico y escobillado anal seriado a cada uno de los niños que participaron en el estudio (30,31). Las indicaciones de la toma de muestra fueron dadas verbalmente y por escrito a los padres/tutores. Brevemente, para el seriado coproparasitológico, se coloca diariamente una porción de materia fecal en un mismo frasco con conservante, durante cinco días consecutivos. Para el escobillado anal seriado, se pasa por los márgenes del orificio anal una gasa doblada y humedecida previamente en agua al despertarse en la mañana durante cinco días consecutivos y las gasas se colocan en un mismo frasco. El procesamiento y la observación de los extendidos se realizaron según metodología publicada previamente (16).

Posteriormente se seleccionaron las muestras fecales con quistes de *Giardia* para la genotipificación. Los quistes se concentraron en gradiente de sacarosa y se conservaron a 4°C. La ruptura de los quistes, la purificación del DNA y la genotipificación se desarrolló mediante el procedimiento publicado por Molina et al. (32).

Para el análisis estadístico se estimaron las prevalencias de parasitosis total y específicas y las frecuencias de todas las variables registradas. Las posibles asociaciones se analizaron mediante test de Chi cuadrado y de Fisher. En las asociaciones que resultaron significativas ($p \leq 0,05$) se calculó la razón de probabilidad (OR, Odds Ratio) y el intervalo de confianza del 95% (IC 95%). El análisis multifactorial para relacionar las características demográficas, socioculturales, ambientales y clínicas con las parasitosis detectadas se realizó mediante modelo de regresión logística utilizando el software SPSS® 11.5 (*Statistical Package for the Social Sciences*, versión 11.5).

Para relacionar los signos/síntomas con genotipos de *Giardia* se seleccionaron solamente los niños monoparasitados con este protozoo para evitar

el sesgo que podría resultar por la presencia concomitante de otros parásitos intestinales.

RESULTADOS

A las entrevistas concurren los padres/ tutores de 296 niños. Completaron todos los estudios presentados en este trabajo 244 escolares entre 3 y 11 años, 126 varones (51.6%) y 118 niñas (48.4%). El 49.2% (120/244) habitaban viviendas de chapa/madera, 28.3% (69/244) tenían piso de tierra en el interior de sus hogares; 6.1% (15/244) no poseían recolección domiciliar de residuos; 72.9% (178/244) poseían agua corriente, 56.5% (138/244) tenían letrina, 63.5% (155/244) presentaron hacinamiento, y en el 57.8% (141/244) las viviendas se anegaban con frecuencia.

Se registraron 37/244 (15.2%) niños con diarrea, 15/244 (6.1%) con vómitos, 92/244 (37.7%) con prurito anal, 53/244 (21.7%) con pérdida de apetito, 31/244 (12.7%) con decaimiento y 87/244 (35.6%) con dolor abdominal.

Respecto a las conductas de riesgo, 40.6 % (99/244) no se lavaba las manos antes de comer, 52.0% (127/244) no se lavaba las manos luego de ir al baño, 90.6% (221/244) practicaba onicofagia y 73.4% (179/244) andaba descalzo con frecuencia.

Se detectaron 179/244 (73.4%) niños parasitados; 30.3% monoparasitados, 28.3% biparasitados, 12.7% triparasitados y 2.0 % tetraparasitados. En la Tabla I se presentan las prevalencias parasitarias específicas detectadas en la población. No hubo diferencias estadísticas según sexo y edad. La presencia de parásitos intestinales solamente se asoció con el anegamiento de la vivienda ($p=0.050$, $OR=2.25$, $IC=0.983-5.157$).

Únicamente la detección de *G. intestinalis* se asoció con personas que carecían de recolección domiciliar de residuos ($p=0.005$, $OR=4.894$, $IC=1.492-16.055$), eliminación de excretas por letrina ($p=0.001$, $OR=2.724$, $IC=1.468-5.055$) y anegamiento de la vivienda ($p=0.027$, $OR=2.089$, $IC=1.082-4.033$).

Se registró la presencia de signos/ síntomas en 62,0% (111/179) de los niños parasitados y en 57,9% (37/65) de aquellos no parasitados, diferencia que no fue significativa. En las Tablas II y III se presentan las frecuencias de los signos/síntomas en los niños de manera general y de manera particular con cada parásito. Tampoco se encontró asociación entre las conductas de riesgo y la detección de parásitos intestinales. En la Tabla IV y V se presentan

las frecuencias de las prácticas de riesgo detectadas en los niños parasitados y no parasitados, y con cada parásito en particular.

El coeficiente de regresión logística seleccionó la presencia de *G. intestinalis* con las variables letrina (coef 0.828, $P=0.019$; OR= 2.29) y anegamiento (coef 0.630, $p=0.075$, OR= 1.88); y la presencia de *E. vermicularis* con edad entre 6 y 11 años (coef 1.340, $p=0.010$, OR= 3.82)

Se realizó PCR a las 83 muestras que presentaron quistes de *G. intestinalis* por microscopía óptica. Se logró la amplificación genómica en 70/83 de las muestras, correspondiendo 65.7% (46/70) a *G. intestinalis* genotipo B, 31.4% (22/70) a genotipo All y dos muestras (2.8%) con infección mixta (All + B). Las muestras procedentes de niños entre 3 y 5 años fueron 36/70 y las de niños entre 6 y 11 años 34/70 (Tabla VI). Los genotipos All y B se detectaron en ambos grupos etareos sin diferencias significativas. Hubo 41 muestras pertenecientes a varones y 29 a niñas (Tabla VII). No se demostró diferencias estadísticamente significativas entre genotipos y sexo.

Tanto *Giardia* genotipo All y B se asociaron aleatoriamente con otros protozoos. Si bien no se obtuvo asociación significativa, la infección con otros helmintos como *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides* y/o *Enterobius vermicularis* se observó en mayor medida en los escolares infectados con el genotipo B. No se demostró asociación entre genotipos y variables ambientales y socioculturales investigadas.

De las 70 muestras genotificadas, 24 correspondieron a niños infectados únicamente con *Giardia*. Doce/24 niños fueron asintomáticos, siendo 58.3% (7/12) genotipo All. Siete niños manifestaron dolor abdominal, siendo el 57.1% (4/7) genotipo B. En dos escolares se registró diarrea; en uno vómitos y en otro decaimiento. Lo cuatro tenían genotipo B. El dolor abdominal combinado con diarrea se detectó en un niño con infección mixta de genotipos (All + B). Ningún padre/tutor reportó pérdida de apetito en los escolares infectados exclusivamente por *Giardia*.

DISCUSIÓN

En Latinoamérica, el movimiento de poblaciones rurales hacia las áreas urbanas es altamente frecuente (6). Consecuentemente ha habido un incremento del número de personas pobres que viven en asentamientos precarios donde las condiciones básicas de infraestructura edilicia y saneamiento son

inexistentes. Tales circunstancias favorecen la transmisión de enfermedades infecciosas, tales como las parasitosis (33).

Los barrios relevados son comunidades con permanente inmigración que proviene de la región norte de nuestro país y de países limítrofes. En estas comunidades, además de las deficientes condiciones sanitarias se suma el hacinamiento y, de este modo, la transmisión de las parasitosis se ve incrementada. Como muchos habitantes son indocumentados, no llevan a sus niños a las Unidades Sanitarias para el Control periódico de Salud. No obstante, estas personas siempre envían a sus niños a la escuela porque en ella se les ofrece un almuerzo gratuito en el comedor escolar. Esta es la razón por la cual el grupo de trabajo ingresó a la comunidad a través de la escuela del barrio y, al ofrecer gratuitamente el análisis parasitológico, la mayoría de los padres prestaron su consentimiento. Así se logró relevar a la mayoría (69,3%) de los niños asistentes a los establecimientos escolares.

Analizando las condiciones socioculturales y ambientales de estas comunidades, se registró que el anegamiento estuvo estadísticamente asociado a la condición de "estar parasitado". Pero las variables vivienda de chapa/madera, hacinamiento y presencia de letrina tienen elevada frecuencia, constituyendo factores que agravan las condiciones sanitarias, favoreciendo la diseminación parasitaria. Si bien la mayoría de la población registra suministro de agua corriente, debemos aclarar que los habitantes de estos asentamientos precarios se conectan de manera clandestina a las cañerías de distribución de agua potable de la red municipal. Estas conexiones son precarias y realizadas por personal no idóneo, razón por la cual no se puede asegurar la potabilidad del agua de consumo.

Estas variables socio ambientales constituyen factores que impactan sobre las condiciones de salud de estos niños, exponiéndolos no solamente a las parasitosis sino también a otros patógenos entéricos. La carencia de normas de higiene individual detectada en estos niños tales como no practicar el lavado de manos, comerse las uñas y andar descalzos favorecen aún más la transmisión de los agentes infecciosos. Además, las conexiones clandestinas no aseguran la calidad del agua que utilizan aquellos niños que registraron adecuados hábitos de higiene individual.

El registro de signos y síntomas presentes en la semana previa a la encuesta reveló que entre un 6 y un 37% de los niños presentaron manifestaciones clínicas que deberían ser motivo de consulta en la Unidad Sanitaria local. Los niños no son llevados por sus padres/tutores a la consulta médica a pesar del evidente cuadro clínico. Esta situación revela un grave problema

de vinculación entre esta comunidad y el Servicio de Atención Primaria de la Salud, el cual debe buscar la manera de incentivar a los pobladores a concurrir a este Centro. Por otra parte, estos niños enfermos siguen concurriendo a los establecimientos escolares porque, en muchos casos es allí donde reciben la única ración alimentaria que consumen en el día.

Más del 70% de los niños estaba parasitado y concurrían a las escuelas constituyendo una fuente constante de infección para el resto no parasitado. Los tres parásitos con prevalencias cercanas al 50% fueron *Blastocystis hominis*, *Giardia intestinalis* y *Enterobius vermicularis*, los cuales se hayan asociados fundamentalmente a la transmisión hídrica y directa persona-persona; asociados a su vez a la carencia de agua potable y al hacinamiento detectados en estos niños. La detección de quistes de *Entamoeba coli* y *Endolimax nana* en esta población refuerzan el riesgo que constituye el agua no potable que abastece a esta localidad.

Los geohelmintos *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura* presentaron frecuencias inferiores al 4% y el cestodo *Hymenolepis nana* inferior al 1%. Si consideramos que el 40% de las familias de los barrios son inmigrantes del norte de nuestro país y de países limítrofes como Bolivia y Paraguay donde los geohelmintos son muy frecuentes (34), podríamos pensar que las condiciones ecológicas de este barrio no son favorables para la transmisión de estos parásitos (35).

En un estudio de prevalencia hospitalaria de infecciones intestinales por parásitos llevados a cabo en Argentina por la Red Nacional de Enteroparásitos, Salomón et al. (17) reportan las siguientes frecuencias: *G. lamblia* 12,5%, *Entamoeba coli* 7,5%, *E. vermicularis* 13.5%, geohelmintos 2,5% y cestodos 1,68%. La comparación de estos datos con nuestros resultados revela que las frecuencias parasitarias encontradas en el estudio poblacional son mayores que a nivel hospitalario, denotando un subregistro de niños parasitados a nivel de las entidades públicas de salud.

En este estudio no se registró diferencias significativas de los signos y síntomas registrados entre niños parasitados y no parasitados. Es evidente que esta comunidad infantil no solo se ve expuesta a la infección parasitaria sino también a otros patógenos bacterianos y virales que se asocian a patologías digestivas y que presentan cuadros clínicos similares. Se observa que solo concurren a la consulta hospitalaria los casos emergentes con cuadros infecciosos graves que representan "el iceberg" de la comunidad

Giardiasis, una infección intestinal frecuente ha concentrado mayor atención tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (36). La

genotipificación de este parásito ha permitido recabar datos epidemiológicos relacionados con los genotipos en numerosos países del mundo (26,37-40).

En las muestras fecales amplificadas de los aislamientos obtenidos se detectaron los genotipos zoonóticos AII y B, con predominio de este último. Estos resultados concuerdan con el predominio global de genotipo B en el mundo (19,24,41,42). Se ha reportado que niños con infecciones por genotipo B liberan más quistes que aquellos infectados con genotipo A (26). Esta situación podría ocurrir en los niños de este barrio, que se ven más expuestos al genotipo B. La ocurrencia de infección mixta ha sido publicada en diversos países como Australia, Inglaterra, India, Italia y Etiopía con porcentajes que varían entre 2 y 21%, siendo mayor en países con menor desarrollo económico (24,43-45). Si bien las condiciones de vida de las comunidades evaluadas eran precarias, sólo se encontraron dos niños de 3 años de edad con ambos genotipos.

La diversidad de parásitos en materia fecal asociada a los genotipos de *G. intestinalis* no tuvo diferencias estadísticamente significativas, pero en las personas infectadas con genotipo B hubo una mayor tendencia de asociaciones parasitarias, especialmente con helmintos.

Varios reportes han postulado la relación entre genotipo de *Giardia* y la sintomatología. En Turquía, (46) detectaron que el 85% de los pacientes con diarrea tenían genotipo A y el 94% de los pacientes asintomáticos presentó infección con genotipo B. Resultados similares obtuvieron Sahún et al (47) en México y Perez Córdón et al (48) en Perú. Sin embargo, los grupos de investigadores no evaluaron la presencia de otros patógenos intestinales. En nuestro trabajo seleccionamos solamente los niños monoparasitados con *Giardia*. La mitad de estos niños no refirieron síntomas, distribuyéndose similarmente ambos genotipos en este grupo. Este hecho remarca la importancia epidemiológica que tienen los portadores asintomáticos de *Giardia*. Para los niños que reportaron síntomas, el más frecuente fue el dolor abdominal que se distribuyó de igual manera para ambos genotipos. La diarrea, los vómitos y el decaimiento se registraron en niños con genotipo B. Se necesitan más número de casos para saber si estas asociaciones son significativas.

En un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo sobre genotipos de *Giardia*, detectamos una prevalencia de 7% de genotipo AII y 93% de genotipo B. El estudio fue llevado en las localidades de La Plata (urbana) y General Mansilla (rural), situadas en la región central-este de nuestro país, aproximadamente a 50 km de Berisso (27). Respecto a ese estudio, el presente trabajo detectó mayor presencia de genotipo AII en la

población y se reportaron infecciones mixtas. Esta situación implica variaciones geográficas en la prevalencia de genotipos en nuestro país que hacen necesario conocer los factores que determinan esta variabilidad

Los resultados del presente estudio revelan un alto porcentaje de niños escolares parasitados que habitan en una región suburbana del centro de Argentina de pobres condiciones sanitarias, que no concurren a la consulta médica a pesar de presentar signos y síntomas asociados a patología digestiva. Esta situación avala la necesidad de continuar con programas comunitarios que permitan mejorar la calidad de vida y controlar las parasitosis en estas poblaciones vulnerables de nuestra región.

Tabla 1. Prevalencias específicas en la población relevada.

Tipo de parásito	Número de niños N= 179	%
<i>Blastocystis hominis</i>	105	58.6
<i>Giardia intestinalis</i>	83	46.4
<i>Entamoeba coli</i>	25	14.0
<i>Endolimax nana</i>	8	4.5
<i>Enterobius vermicularis</i>	95	53.0
<i>Ascaris lumbricoides</i>	7	3.9
<i>Hymenolepis nana</i>	1	0.5
<i>Trichuris trichiura</i>	1	0.5

Tabla 2. Registro de signos y síntomas en la semana previa al estudio coproparasitológico.

	Parásito (+) N= 179	Parásito (-) N= 65	p
Diarrea	27	10	0.95
Vómitos	10	5	0.54
Prurito anal	71	21	0.30
Pérdida de apetito	39	14	0.97
Astenia	20	11	0.23
Dolor abdominal	63	24	0.79

Tabla 3. Registro de signos y síntomas en la semana previa al estudio coproparasitológico en relación a cada especie parasitaria.

	<i>B. hominis</i> (+) N=105	<i>G. intestinalis</i> (+) N= 83	<i>E.vermicularis</i> (+) N=95	<i>A.lumbricoides</i> (+) N= 7
Diarrea	15	16	15	1
Vómitos	6	7	3	1
Prurito anal	47	29	42	3
Pérdida de apetito	25	18	26	2
Astenia	10	10	11	1
Dolor abdominal	36	20	33	4

Tabla 4. Registro de conductas de riesgo.

Conducta de riesgo	Parasite (+) N= 179	Parasite (-) N= 65	p
No lava las manos antes de comer	80	19	0.13
No lava las manos luego de ir al baño	94	33	0.95
Onicofagia	160	61	0.98
Anda descalzo con frecuencia	127	52	0.14

Tabla 5. Registro de conductas de riesgo en relación con cada especie parasitaria.

Conducta de riesgo	<i>B. hominis</i> (+) N=105	<i>G. intestinalis</i> (+) N= 83	<i>E.vermicularis</i> (+) N=95	<i>A.lumbricoides</i> (+) N= 7
No lava las manos antes de comer	44	39	45	3
No lava las manos después de ir al baño	49	38	46	1
Onicofagia	96	65	90	3
Anda descalzo con frecuencia	63	58	65	5



Figura 1. Ubicación de Berisso, provincia de Buenos Aires.

BIBLIOGRAFÍA

1. Santos R, Coimbra Junior C, Flowers N, Silva J (1995) Intestinal parasitism in the Xavante Indians, central Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 145-148.
2. Ludwig K, Frei F, Alvares Fiho F, Ribeiro-Paes J (1999) Correlation between sanitation and intestinal parasitosis in the population of Assis, State of Sao Paulo. *Rev Bras Med Trop* 32: 547-555.
3. Chacin-Bonilla L, Sanchez-Chavez Y (2000) Intestinal parasitic infections, with a special emphasis on cryptosporidiosis in Amerindians from western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 62: 347-352.
4. Guevara Y, De Haro I, Cabrera M, García de la Torre G, Salazar-Schettino P (2003) Enteroparasitosis in indigenous and mestizo individuals from the Nayarit Mountain Range, Mexico. *Parasitol Latinoam* 58: 30-34.
5. Devera R, Blanco Y, Cabello E (2005) High prevalence of *Cyclospora cayetanensis* among indigenous people in Bolivar State, Venezuela. *Cad Saude Publica* 21: 1778-1784.
6. Gamboa M, Navone G, Orden A, Torres M, Castro L, Oyhenart E (2009) Socio-environmental conditions, intestinal parasitic infections and nutritional status in children from a suburban neighborhood of La Plata, Argentina. *Acta Tropica* Jul 3. [Epub ahead of print]
7. Morales-Espinoza E, Sanchez-Perez H, Garcia-Gil M, Vargas-Morales G, Mendez-Sanchez J, Perez-Ramirez M (2003) Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico. *Salud Publica Mex* 45:379-388.
8. Taranto N, Cajal S, De Marzi M, Fernandez M, Frank F, Bru A, Minvielle M, Basualdo J, Malchiodi E (2003) Clinical status and parasitic infection in a Wichi Aboriginal community in Salta, Argentina. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 554-558.
9. Navone G, Gamboa M, Oyhenart E, Orden A (2006) Intestinal parasitosis in Mbyá-Guaraní populations from Misiones, Argentina: epidemiological and nutritional aspects. *Cad Saude Publica* 22: 1089-1100.
10. Menghi C, Iuvaro F, Dellacasa M, Gatta C (2007) Survey of intestinal parasites among an aboriginal community in Salta. *Medicina (Buenos Aires)* 67:705-708.
11. Barboni G, Candi M, Villace M, Leonardelli A, Balbaryski J, Gaddi E (2008) Intestinal cryptosporidiosis in HIV infected children. *Medicina (Buenos Aires)* 68: 213-218.

12. Gamboa M, Basualdo J, Cordoba M, Pezzani B, Minvielle M, Lahitte H (2003) Distribution of intestinal parasitoses in relation to environmental and sociocultural parameters in La Plata, Argentina. *J. Helminthol* 77: 15-20.
13. Soriano S, Manacorda A, Pierangeli N, Navarro M, Gyayetto A, Barbieri L, Lazzarini L, Minvielle M, Grenovero M, Basualdo J (2005) Intestinal parasitosis in relation to socioeconomic factors and habitat conditions in children of Neuquen, Patagonia, Argentina. *Parasitol Latinoam* 60: 154-161.
14. Basualdo J, Cordoba A, De Luca M, Ciarmela M, Pezzani B, Minvielle M (2007) Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49: 251-255.
15. Pierangeli N, Giayetto A, Manacorda A, Barbieri L, Veronesi A, Pezzani B, Minvielle M, Basualdo J (2003) Seasonality of intestinal parasites in suburban soils of the city of Neuquen, Patagonia, Argentina. *Trop Med Int Health* 8: 259-263.
16. Pezzani BC, Minvielle MC, Ciarmela ML, Apezteguía MC, Basualdo JA (2009) Community participation in the control of intestinal parasitoses at a rural site in Argentina. *Rev Panam Salud Publica* 26:471-477.
17. Salomón C and Red Nacional de enteroparasitosis (2009) Parásitos intestinales en Argentina: años 2005-2006. *Acta Bioqim Clin Latinoam*, Suppl 1: 65-66.
18. Adam RD (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14: 447-475.
19. Thompson R and Monis P (2004) Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 58: 69-137.
20. Homan W and Mank T (2001) Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol* 31: 822-826.
21. Ratanapo S, Mungthin M, Soontrapa S, Faithed C, Siripattanapipong S, Rangsin R, Naaglor T, Piyaraj P, Taamasri P, Leelayoova S (2008). Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 78: 611-615.
22. Mohammed Mahdy A, Surin J, Wan K, Mohd-Adnan A, Al-Mekhlafi M, Lim Y (2009) *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta Trop* 112: 67-70.
23. Amar C, Dear P, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J (2002) Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol* 40: 446-452.

24. Cacciò S and Ryan U (2008) Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160: 75-80.
25. Cedillo-Rivera R, Darby, J, Enciso-Moreno J, Ortega-Pierres G, Ey P (2003) Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitol Res* 90: 119-123.
26. Kohli A, Oluma Y, Bushen R, Pinkerton E, Hout R, Newman C, Sears A, Lima A, Guerrant R (2008) *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 718-725.
27. Minvielle M, Molina N, Polverino D, Basualdo J (2008) First genotyping of *Giardia* spp. from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 98-103.
28. PROCOPIN (Programme for the Control of Intestinal Parasites and Nutrition) Argentina (2009). Available: <http://es-la.facebook.com/people/Procopin-Unlp/100000891185541>. Accessed 1 October 2010. http://hosting.udlap.mx/sitios/unionlat.extension/memorias2009/trabajos/universidad_sociedad/procopin. Accessed 1 October 2010
29. World Health Organization (1987) Prevention and control of intestinal parasitic infection. WHO Technical Report Series 749, Geneva.
30. Minvielle M, Pezzani B, Cordoba M, De Luca M, Apezteguía M, Basualdo J (2004) Epidemiological survey of *Giardia lamblia* and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *Korean J Parasitol* 42 61-66.
31. Pezzani B, Minvielle M, de Luca M, Cordoba A, Apezteguía M, Basualdo J (2004) Enterobius vermicularis infection among population of General Mansilla, Argentina. *World J Gastroenterol* 10: 2535-2539.
32. Molina N, Polverino D, Minvielle M, Basualdo J (2007) PCR amplification of triosephosphate isomerase of *Giardia lamblia* in formalin fixed feces. *Rev Latinoam Microbiol* 49: 5-10.
33. Thompson R C A (2001) The future impact of societal and cultural factors on parasitic diseases-some emerging issues. *Int J Parasitol* 31: 949-959.
34. Tanner S, Leonard W, McDade T, Reves-Garcia V, Godoy R, Huanca T (2009) Influence of helminth infections on childhood nutritional status in lowland Bolivia. *Am J Hum Biol* 21: 651-656.
35. KnoppS, Mohammed K, Simba Khamis I, Mgeni A, Stothard J, Rollison D, Marti H, Utzinger J (2008). Spatial distribution of soil-transmitted helminths, including *Strongyloides stercoralis*, among children in Zanzibar. *Geospat Health* 3: 47-56.

36. Savioli L, Smith H, Thompson A (2006) *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. Trends Parasitol 22: 203-208.
37. Thompson R, Hopkins R, Homan W (2000) Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitol Today 16: 210-213.
38. Newman R, Moore S, Lima A, Nataro J, Guerrant R, Sears C (2001) Longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in northeast brazilian children. Trop Med Int Health 6: 624-634.
39. Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo M, Bermúdez-Cruz R, Salazar-Schettino P, Ortega-Pierres G, Ey P (2002). Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. Int J Parasitol 32: 1201-1202.
40. El-Shazly A, Mowafy N, Soliman M, El-Bendary M, Morsy A, Ramadan N, Arafa W (2004). Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. J Egypt Soc Parasitol 34: 265-280.
41. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J (2005) Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. J Microbiol 43: 5940-5944.
42. Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson J, Svard S (2008) Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. Acta Trop 106: 44-53.
43. Traub R, Monis P, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson R (2004) Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitology 128: 253-262.
44. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM (2005) Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int J Parasitol 35: 207-213.
45. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM (2007) Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. Acta Trop 102: 92-99.
46. Aydin A, Besirbellioglu B, Avci I, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A (2004) Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. Diagn Microbiol Infect Dis 50: 147-151.
47. Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente M, Castillo F, Capilla S, Arias A, Gomez-Lus R (2008) Correlation between the presence of

- symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 27: 81–83.
48. Pérez-Cordón G, Cordova-Paz-Soldan O, Vargas-Vásquez F, Velasco-Soto J, Sempere-Bordes L, Sánchez-Moreno M, Rosales M (2008) Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in peruvian children. Parasitol Res 103: 459-465.

FASE II: EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICA DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LOS NIÑOS

INTRODUCCIÓN

La nutrición es la base de la salud y el desarrollo. La interacción de la infección y la malnutrición está bien documentada. Una mejor nutrición significa sistemas inmunológicos más fuertes, menos enfermedades y mejor salud. Los niños saludables aprenden mejor. Las personas sanas son más fuertes, más productivas y más capaces de crear oportunidades para romper gradualmente los ciclos de la pobreza y el hambre y lograr una mejor calidad de vida. Paralelamente, el mundo también asiste a un fuerte aumento de otras formas de malnutrición caracterizadas por la obesidad y sus consecuencias a corto y largo plazo sobre la salud.

Todas las formas de la malnutrición se asocian con morbilidad y mortalidad y conllevan costos económicos. En particular en los países en desarrollo, donde la carga de obesidad y desnutrición coexisten. Las consecuencias son severas. Los principales “productos” de la malnutrición durante la infancia son el deterioro del desarrollo psicológico e intelectual, la morbilidad y mortalidad. También hay importantes consecuencias en la vida adulta, que se traducen en menor tamaño corporal, menor capacidad laboral y reproductiva y mayor riesgo de enfermedades crónicas. Los jóvenes que crecen adecuadamente durante su infancia también tendrán mejor desempeño escolar que aquellos que crecieron pobremente. Esto no es una relación causal, pero refleja el hecho de que alterando el “ambiente” para promover la salud redundará en el conocimiento y desarrollo de capacidades para que los niños y jóvenes sean miembros productivos de la sociedad.

Frecuentemente la malnutrición se concibe como parte de un ciclo vicioso que incluye también la pobreza y la enfermedad; los tres componentes

están relacionados entre sí y cada uno de ellos contribuye a la presencia y persistencia de los otros. Las modificaciones socioeconómicas y políticas que mejoran las condiciones sanitarias y nutricionales pueden romper el ciclo del mismo modo que las intervenciones específicas en la nutrición, la salud y sectores afines. En este informe se efectúa una descripción general de uno de estos aspectos, dado que la interpretación adecuada de la antropometría no puede ser realizada sin una comprensión más general de tales problemas.

Mediciones, índices, indicadores

Una de las formas de medir el estado nutricional del individuo es mediante la evaluación antropométrica. Esta incluye un conjunto de técnicas de medición del cuerpo humano que, durante la niñez y la adolescencia, son la expresión del crecimiento físico. Las más frecuentes son el peso y la talla. La medición y análisis del peso y la talla han sido reconocidos como indicadores generales de la salud durante muchos años. Sin embargo, es relativamente más reciente que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableciera criterios para evaluar el bajo peso y el sobrepeso tanto en niños como en adultos (WHO 1995).

Los índices son, como su nombre lo indica, una medida que asocia dos mediciones. Los más frecuentes son el peso y la talla en relación a la edad (P/E, T/E), el peso para la talla (P/T) y el índice de masa corporal (peso/talla²). Es frecuente expresar estos índices en puntaje z (o puntuación de desvío estándar). Un valor z indica en qué medida un individuo se desvía de la mediana de la población de referencia o percentil 50), dividido el desvío estándar de la población de referencia. Por lo tanto un valor de z expresa la desviación (de signo positivo o negativo) en forma estandarizada.

El término indicador refiere al empleo o aplicación de un índice. La antropometría proporciona algunos de los indicadores más importantes usados en la vigilancia nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un relevamiento antropométrico en una muestra de 280 niños (131 varones y 149 mujeres) comprendidos entre los 3,0 y 11,9 años de edad (Media: $6,8 \pm 2,5$ años). Los menores de 5 años correspondieron al Jardín 904 y los niños mayores a la Escuela Virgen de Loreto, ambos de la localidad de Berisso. Para la realización de las mediciones se obtuvo el consentimiento

escrito de los padres o tutores. Las mediciones se llevaron a cabo siguiendo protocolos estandarizados (Cameron, 2004).

El peso fue registrado en kilogramos con balanza digital de precisión con el niño descalzo y vistiendo ropa ligera. La talla se registró en centímetros empleando un estadiómetro portátil, con el niño descalzo, de pie y con la cabeza orientada según el plano de Frankfort. Con estos valores se obtuvo el Índice de Masa Corporal ($IMC = \text{peso(kg)} / \text{talla(m)}^2$) (se acompaña registro fotográfico). La fecha de nacimiento se obtuvo de los registros escolares. Con este dato y la fecha de relevamiento se obtuvo la edad exacta o decimal.

Para la determinación del estado nutricional se consideraron tres índices antropométricos: (1) talla para la edad, (2) peso para la edad e (3) índice de masa corporal (IMC). Aunque los tres índices están relacionados entre sí, cada uno tiene un significado específico en términos de la evolución o los resultados del deterioro del crecimiento. Además, los márgenes de la deficiencia del estado físico basada en cada índice varían mucho en las distintas poblaciones. Por ejemplo, en situaciones que no son de emergencia, los grados de prevalencia del peso bajo para la edad tienden a ser considerablemente superiores a los del peso bajo para la talla (WHO, 1995).

Índices empleados como indicadores de estado nutricional de la comunidad:

- (1) Talla para la edad (T/E): refleja el crecimiento lineal alcanzado y sus deficiencias indican un déficit acumulativo de la salud o la nutrición a largo plazo. La “baja estatura” es la definición descriptiva de la talla baja para la edad, aunque no indica nada acerca de su origen (normal o patológico) en tanto que “detención del crecimiento” implica una falla en el alcance del potencial del crecimiento lineal como resultado de condiciones sanitarias y nutricionales no óptimas. Por lo tanto el uso de uno u otro término, dependerá de las condiciones de la población bajo estudio.
- (2) Peso para la edad (P/E): refleja la masa corporal en relación con la edad cronológica. Es influido por la talla del niño y por su peso, y por su carácter compuesto es compleja su interpretación. En ausencia de elevada consunción en una comunidad, el peso y la talla para la edad proporcionan información similar pues ambos reflejan la experiencia nutricional y de salud a largo plazo del individuo o la población. Como el peso bajo para la edad refleja la talla baja para la edad o el peso bajo para la talla a menudo se describe a éste como un indicador de “malnutrición global”.

- (3) Índice de masa corporal (IMC): es el parámetro que con más frecuencia se utiliza para la detección del exceso de grasa corporal por su rápida determinación y su correlación con la grasa corporal. Los valores del IMC varían durante la infancia y la adolescencia dependiendo de la edad y del sexo.

Puntos de corte

La antropometría normal se define estadísticamente como un valor antropométrico por debajo de -2 desviaciones estándar (DS) o puntuaciones z , o por encima de +2 DS o puntuaciones z con respecto a la mediana de la población de referencia. Estos valores límites definen el 95% central de la distribución de referencia como intervalo de valores de la “normalidad”. Así, 2.3% es la línea de base o prevalencia esperada. Los puntos de corte empleados para definir sobrepeso y obesidad en el adulto son >25 y >30 kg/m², respectivamente. En niños y adolescentes, la Internacional Obesity Task Force (IOTF), en base a curvas percentiladas de IMC, propuso puntos de corte del IMC por edad, extrapolando los valores del adulto. En relación a estos valores centilares se halló que los valores de IMC correspondientes a +1DS a los 5 años diferían de 0.0 kg/m² a 0.1 kg/m². A los 19 años, los valores de IMC que se corresponden a +1 DS son 25.4 kg/m² en varones y 25.0 kg/m² en mujeres. Por lo tanto estos valores son equivalentes a los puntos de corte adulto de sobrepeso y obesidad (25 y 30.0 kg/m², respectivamente).

Procesamiento de los datos: Los datos fueron estandarizados a puntaje Z de la mediana de la referencia OMS 2007 (WHO AnthroPlus 1.02). Esta base es una reconstrucción de la referencia National Center for Health Statistics (NCHS)/WHO de 1977, suplementada con los nuevos estándares de crecimiento infantil de la OMS (MGSR) para niños menores de 5 años (de Onis et al., 2008). La serie resultante contiene datos de talla para la edad (5-19 años), peso para la edad (5-10 años) e índice de masa corporal para la edad (5-19 años).

RESULTADOS

Las prevalencias de déficit en peso para la edad (P/E), talla para la edad (T/E) e IMC para la edad (IMC/E) se calcularon en base a un valor de $z < -2$ DS de la mediana de la población de referencia. Las prevalencias de P/E para los 10-11 años no se presentan puesto que no están disponibles en la referencia.

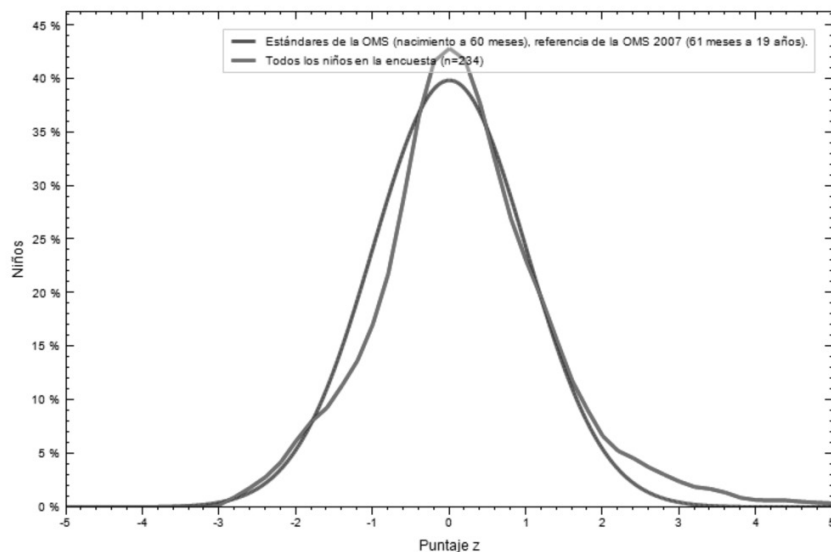
Esto es porque muchos niños experimentan el empuje puberal en este periodo y pueden ser clasificados con exceso de peso previo al estirón puberal. El sobrepeso y la obesidad se determinaron en base a +1 y +2DS respectivamente. Peso para la edad: Las prevalencias de bajo peso por edad fueron inconstantes. La prevalencia total fue 2.7% en varones y 2.4% en mujeres, indicando correspondencia con las esperadas bajo la curva normal. La distribución de este indicador mostró superposición con la curva de referencia.

Talla para la edad: Las prevalencias de baja talla por edad fueron inconstantes. La prevalencia total fue 3.1% en varones y 6.0% en mujeres, indicando en las niñas valores superiores a los esperados bajo la curva normal. La distribución de este indicador mostró que tanto varones como mujeres se desvían hacia la izquierda de la curva de referencia indicando menor talla en los niños de Berisso.

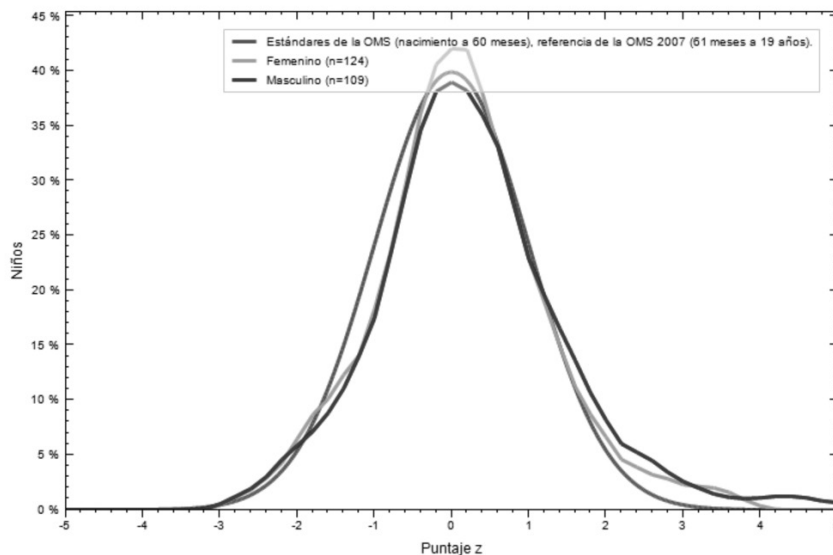
Índice de masa corporal para la edad: El 25% de los niños fueron clasificados con sobrepeso. La obesidad definida con un IMC por encima de +2 DS de la mediana de referencia fue de 10.7 y 8.1 en varones y mujeres, respectivamente. La curva de distribución del IMC estuvo sesgada a la derecha de la curva de la referencia *indicando* que la masa corporal de estos niños es mayor a la de los niños de la población de referencia.

Los resultados obtenidos mediante muestran que ninguno de los indicadores de déficit (P/E y T/E) superan el 6.0% de los niños. Pero este porcentaje puede no expresar claramente la situación nutricional de esta población, donde la distribución z indica que la baja talla es un fenómeno evidente en la población. Por otra parte, las prevalencias de sobrepeso y obesidad son superiores a las esperadas. Este resultado se evidenció también en la distribución del IMC en la población estudiada. Se concluye que existiría una tendencia no armónica en el crecimiento resultante del incremento del peso en relación a la talla, que eventualmente incrementan el riesgo de sobrepeso y obesidad en estos niños.

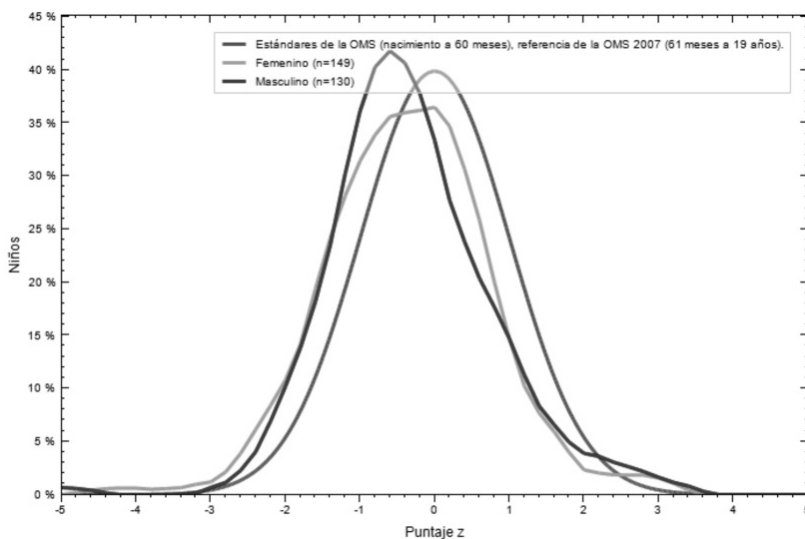
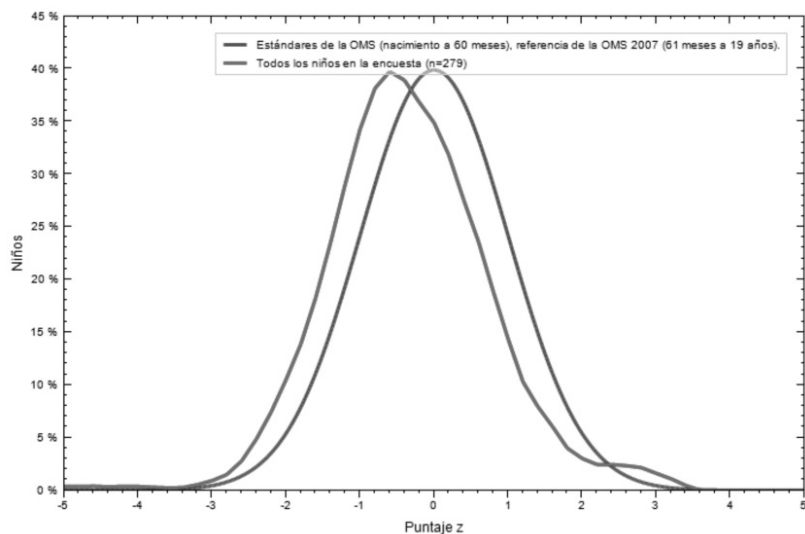
Se presenta en la Figura 1 la curva de desvío Z correspondientes a Peso/Edad. De todos los niños encuestados



En la Figura 2 se presenta la diferencia hallada entre niños y niñas encuestadas



En las Figura 3 y 4 se presenta la curva de desvíos Z correspondientes a la relación talla/ edad de los niños encuestados



Se puede concluir lo siguiente:

Peso para la edad: Las prevalencias de bajo peso por edad fueron inconstantes. La prevalencia total fue 2.7% en varones y 2.4% en mujeres, indicando correspondencia con las esperadas bajo la curva normal. La distribución de este indicador mostró superposición con la curva de referencia (Figuras 1 y 2).

Talla para la edad: Las prevalencias de baja talla por edad fueron inconstantes. La prevalencia total fue 3.1% en varones y 6.0% en mujeres, indicando en las niñas valores superiores a los esperados bajo la curva normal. La distribución de este indicador mostró que tanto varones como mujeres se desvían hacia la izquierda de la curva de referencia indicando menor talla en los niños de Berisso (Figuras 3 y 4).

FASE III: ANEMIA, EOSINOFILIA Y ANTICUERPOS ANTITOXOCARA

Con el consentimiento informado de los padres/tutores se realizaron extracciones de sangre a los escolares. Las mismas se llevaron a cabo por punción venosa del pliegue del codo y se recolectaron dos tubos, uno con EDTAK3 y otro sin anticoagulante. Los extendidos de sangre fueron secados al aire y coloreados con Giemsa. Las muestras de sangre entera se conservaron a 4°C y fueron analizadas en el día. El suero fue separado antes de la dos horas de recolectada la muestra y conservado a -20° C hasta su procesamiento. La concentración de hemoglobina (HB), el volumen corpuscular medio (VCM) y la distribución de eritrocitos (RDW) se midieron en contador hematológico automático (Sysmex-K21N). El porcentaje de eosinófilos fue calculado a partir del recuento de eosinófilos en microscopio óptico (400X). La determinación serológica de anticuerpos antitoxocara se realizó mediante la aplicación del kit Toxocara Microwell FERUM ELISA (IVD Research Inc. Carlsbad, USA):

Población estudiada: Se extrajo sangre a 97 niños concurrentes al Jardín de infantes y 76 concurrentes a la Escuela Primaria.

—Se registró anemia en el 9,3% (9/97) de los niños del Jardín y en el 9,2 % (7/76) de la Escuela.

—Registraron eosinofilia el 11,3% (11/97) de los niños del Jardín y el 28,9% (22/76) de la Escuela.

—Resultaron seropositivos 15,5% (15/97) niños del Jardín y 14,5% (11/76) de la Escuela.

FASE IV: TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS E INDIVIDUALES

Los niños parasitados y/o con anemia concurren a la Unidad Sanitaria donde se les otorgó tratamiento gratuito. Este tratamiento fue erogado por la Secretaría de Salud Pública de la Municipalidad como se había acordado previamente al desarrollo de este estudio (convenio firmado entre la Secretaría de Salud Pública y la Cátedra).

FASE V: INTERVENCIÓN EDUCATIVA

Se capacitaron 65 estudiantes voluntarios de la carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. Los estudiantes fueron capacitados sobre morfología y biología de los parásitos, morbi-mortalidad de las enfermedades parasitarias más frecuentes, mecanismos de transmisión, ciclos evolutivos, métodos de diagnóstico y medidas de prevención. Las parasitosis que se abordaron fueron las prevalentes de la comunidad. Con la colaboración de los estudiantes capacitados se evaluaron los hábitos riesgosos (no saludables) y saludables ejercidos en la comunidad, se identificaron las fuentes y vías de transmisión de las parasitosis, los reservorios parasitarios y las barreras que pudieran contrarrestar la diseminación parasitaria. Se establecieron cuáles eran las modificaciones necesarias para generar un cambio de situación que constituirán los mensajes fundamentales en cada encuentro educativo con la comunidad.

- Con el asesoramiento del Colegio de Nutricionistas de la provincia de Buenos Aires los estudiantes se capacitaron sobre conductas que pueden modificarse en niños con trastornos de la alimentación teniendo en cuenta la realidad socioeconómica de la comunidad.

- Los estudiantes formaron seis grupos para interactuar con los diferentes grupos etáreos de la comunidad.

- Al final de cada actividad educativa se entregaron un tríptico y un mini-poster para que cada niño llevara a su casa y comentara en su hogar lo que había comprendido de cada actividad. También se entregó a cada niño un jabón para que llevara a su casa y/o lo utilizara en la escuela.

FASE VI: CONTROL POST-INTERVENCIÓN

Durante el año 2010 se realizó el control post-intervención.

Se realizaron 120 entrevistas con entrega de material para la toma de muestras para control coproparasitológico y registro de conductas modificadas en la comunidad intervenida durante 2009. La frecuencia parasitaria bajó al 25 % cuando en el 2009 había sido del 73,4%. Los profesionales de la US local revelaron que también disminuyeron las diarreas de otras etiologías como consecuencia del cambio de hábitos de higiene.

BIBLIOGRAFÍA

1. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. 2007. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization* 85:660–667.
2. Cameron N. 2004. Measuring growth. In: Hauspie RC, Cameron N and Molinari L, editors. *Methods in Human Growth Research*. Cambridge: Cambridge University Press. p. 68-107.
3. WHO. 1995. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization.



MICROAMBIENTE CELULAR Y DEL ESTROMA EN PIEL LESIONAL DE PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTÉMICA PROGRESIVA.

Gabriela Fernanda Mora, Eduardo Santini Araujo. Stella Mans Vidal.
Rómulo Cabrini. Graciela Schlegel.
Hospital Militar Central

INTRODUCCIÓN

La esclerosis sistémica progresiva ó esclerodermia (ESP) es una enfermedad rara, con una prevalencia anual de alrededor de 3 nuevos casos por 100.000 pacientes, y predomina en el sexo femenino (1, 2). La fibrosis generalizada que caracteriza a la enfermedad guarda similitudes con un proceso descontrolado de curación de heridas, autoperpetuado en el tiempo, y en cuyo desarrollo intervienen elementos celulares del sistema inmunológico, del tejido conectivo, factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, proteínas de la matriz extracelular, etc. El mediador celular clave en la fibrosis es el miofibroblasto, que cuando es activado sirve como célula primordial productora de colágeno. Los miofibroblastos se generan de una variedad de fuentes que incluyen a las células mesenquimáticas residentes, células epiteliales y endoteliales en procesos denominados transición epitelio/mesenquimática endotelio/mesenquimática, como también de células circulantes llamadas fibrocitos, derivadas de células madre de médula ósea (3, 4). Aunque los tratamientos actuales para enfermedades fibróticas como fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, esclerodermia, enfermedad renal progresiva y fibrosis cardiovascular típicamente hacen blanco en la respuesta inflamatoria, existe evidencia creciente de que los mecanismos que llevan a la fibrosis son distintos de aquellos que regulan la inflamación. El rol de la matriz extracelular y los fibroblastos que la producen en el desarrollo de un microambiente favorable al desarrollo y progresión de la fibrosis es crítico. El rol de las células precursoras mesenquimáticas en el desarrollo de fibrosis y su compromiso hacia el linaje fibroblástico, determinaría qué población de fibroblastos (residentes, precursores mesenquimáticos) predomina en el escenario fibrótico de la esclerodermia.

OBJETIVOS

Estudiar las características histológicas/inmunohistoquímicas de la piel esclerodérmica en comparación con las de la piel normal en epidermis y en dermis realizando las inmunomarcaciones correspondientes para caracterizar a las distintas poblaciones celulares: fibroblásticas, endoteliales, inmunológicas, precursores mesenquimáticos en matriz extracelular.

PACIENTES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal sobre población ambulatoria de consultorio y hospitalaria de biopsias de piel de pacientes con diagnóstico de esclerosis sistémica progresiva según criterios del American *College of Rheumatology* –

ACR comparadas con biopsias de piel de donantes sanos de región de antebrazo sometidos a cirugía ortopédica de miembro superior. Se calcula una proporción de 3 casos por cada control.

Se estudiaron pacientes con diagnóstico de Esclerosis Sistémica Progresiva según criterios del ACR (1), que integran la población de pacientes ambulatorios y del sector internación del Departamento de Medicina del Hospital Militar Central Cirujano Mayor Doctor Cosme Argerich, y del Servicio de Reumatología del Hospital Bernardino Rivadavia, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Muestreo

Debido a que se trata de una enfermedad rara, y no se conocen las tasas de prevalencia de la misma en la población hospitalaria, no se realizará muestreo aleatorio sino consecutivo de los pacientes. Se realizará un pareo por edad y sexo entre pacientes y controles.

a) Casos

Criterios de Inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- diagnóstico de ESP de acuerdo con criterios de clasificación del ACR (1980)
- Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Pacientes mayores de 75 años.
- Pacientes con coagulopatías
- Pacientes cursando infecciones cutáneas y/o sistémicas de cualquier etiología.
- Pacientes con riesgo quirúrgico elevado (enfermedad coronaria, hipertensión arterial no controlada, insuficiencia respiratoria, etc).
- Embarazo y lactancia.

Criterios de eliminación

- Voluntad del paciente de retirar su colaboración con el estudio.
- Ausencia de lesiones esclerodérmicas en el estudio histopatológico.

b) Controles

Criterios de Inclusión

- Pacientes mayores de 18 años sometidos a cirugía ortopédica de miembro superior.
- Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Pacientes mayores de 75 años.
- Pacientes con patología cutánea de cualquier etiología.
- Pacientes con coagulopatías
- Pacientes cursando infecciones cutáneas y/o sistémicas de cualquier etiología.
- Pacientes con riesgo quirúrgico elevado (enfermedad coronaria, hipertensión arterial no controlada, insuficiencia respiratoria, etc).
- Embarazo y lactancia.
- Pacientes con antecedentes de enfermedades pulmonares crónicas: asma, EBOC, fibrosis pulmonar, CA de pulmón, otras causantes de alteraciones de la función pulmonar.

Criterios de eliminación

- Voluntad del paciente de retirar su colaboración con el estudio
- Diagnóstico histopatológico de enfermedad cutánea de cualquier etiología.

Se realizaron tomas de biopsia escisional por losange de 1.5 a 2 cm de piel lesiona de piel de antebrazo de pacientes con diagnóstico de esclerosis sistémica progresiva y de pacientes sin diagnóstico de enfermedades autoinmunes sometidos a cirugía ortopédica de miembro superior.

Se realizó una revisión de las características clínico–humorales de la enfermedad:

1. Tipo de esclerodermia (de acuerdo con criterios del ACR). Esclerodermia difusa (ED), esclerodermia limitada (EL), síndrome de superposición (SS), enfermedad injerto contra huésped (EICH).
2. Tiempo desde el diagnóstico (en meses).
3. Anticuerpos antinucleares (FAN) y anticentrómero (ACA) por inmunofluorescencia indirecta con sustrato Hep2 (valor de corte positivo para títulos superiores a 1/40); anticuerpos antitopoisomerasa I (ATA) por inmunodifusión radial (cualitativo).
4. Capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono (DLCO) (clasificada como 0=normal; 1=leve disminución; 2=moderada disminución; 3=severa disminución).
5. Tomografía computada de tórax de alta resolución (HRCT) (clasificada según los hallazgos: 0=normal; 1=refuerzo intersticial periférico; 2=alveolitis; 3=fibrosis).
6. Tratamientos inmunosupresores: D–penicilamina (D–Pen), metotrexate (MTX), glucocorticoides (GC), ciclofosfamida (CFM), etc.

Todos los pacientes incluidos firmaron un consentimiento informado para la realización y utilización de las biopsias de piel de antebrazo y el acceso a sus datos clínico–demográficos.

La realización del trabajo contó con la aprobación del Departamento de Docencia e Investigación ambas instituciones.

Análisis histológicohistométrico

1) Se realizó el recuento celular en los cortes analizados teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Se consideró “campo” a un área de 0.45 mm² observada con un objetivo de 40 X en un microscopio Zeiss S.A.P.
- Se realizó una observación de cada muestra con el objetivo 10X.

- Se realizó el recuento de células positivas en la inmunohistoquímica en 10 campos 40X por cada muestra.
- A los fines histométricos, se dividieron los cortes observados en 3 áreas: epidermis, dermis superficial –yuxtaepidérmica– y dermis profunda –incluyendo anexos.
- Se clasificó la intensidad de la tinción utilizando la siguiente escala cualitativa: 0= sin tinción; 1=tinción leve; 2=tinción moderada; 3=tinción intensa. Los elementos considerados para la aplicación de la escala fueron: epidermis, miofibroblastos y otros elementos celulares aislados, músculo piloerector, epitelio glandular y periacinar, endotelio.

Inmunohistoquímica

Se incubaron los cortes histológicos con los anticuerpos monoclonales correspondientes: anticuerpos monoclonales murinos anti :alfa actina de músculo liso, anti CD45+RO, anti CD34+, anti CD105+ –Leica–.

Como controles positivos se utilizaron: para AML: cortes de adenocarcinoma de colon; para CD45+RO, cortes de amígdala normal, para CD34+, cortes de angiosarcoma.

Como controles negativos se utilizaron los slides correspondientes, incubados con PBS.

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 19 pacientes con diagnóstico de esclerodermia –10 con la forma difusa de la enfermedad, 7 con esclerodermia limitada, 1 síndrome de superposición –todas de sexo femenino– y 1 enfermedad injerto contra huésped crónica esclerodérmica –varón–. La edad promedio de los pacientes fue de 49 años (rango 18-74). El promedio de tiempo desde el diagnóstico al momento del estudio fue de 79 meses (4–360). Las características clínicodemográficas de los pacientes se muestran en la tabla 1.

El recuento total de fibroblastos en los casos (n=19) fue en promedio de 65,8 por campo de 400X. El recuento total de fibroblastos en los controles (n=7), fue de 23 por campo.

El recuento de fibroblastos positivos para los distintos anticuerpos monoclonales no adoptó una distribución estadística normal. El promedio de fibroblastos positivos para alfa actina de músculo liso (AML+) en los casos fue de

54,9, ES = 12,4. Para los controles, los fibroblastos AML positivos por campo fueron en promedio 12,4, ES = 4,6. (T de Student = 2,4; $p < 0,05$). (Figura 1).

El promedio de fibroblastos positivos para CD45+RO en los casos fue de 48, ES = 8,3. No hubo expresión de CD45+RO en fibroblastos de piel del grupo control. (Figura 2.)

El promedio de fibroblastos positivos para CD34+ en los casos fue de 13,2; ES = 8,3. En los controles, no hubo expresión de CD34+ en fibroblastos (Figura 3.).

Ninguna de las muestras observadas fue positiva para CD 105+.

No se halló correlación significativa entre la expresión de AML, CD34, CD105 y ninguna de las variables clínicas de los pacientes. Se mostró una tendencia a la correlación entre la expresión de AML y CD45RO+ en fibroblastos de piel esclerodérmica ($r = 0,6$) (Gráfico 2.). La presencia de anticuerpos antinucleares mostró una tendencia a asociarse con la expresión de AML en fibroblastos esclerodérmicos ($p = -0,06$).

DISCUSIÓN

La deposición excesiva de matriz extracelular en la piel y órganos internos es una de las características de la esclerodermia. Las fuentes tisulares de los fibroblastos en el proceso fibrótico no son completamente conocidas pero se ha sugerido que el pool de fibroblastos residentes contiene diferentes clones que pueden influir en la patología de la esclerodermia (5). Adicionalmente, el reclutamiento de células circulantes progenitoras de fibroblastos como los fibrocitos, y la participación de la transición epitelio-mesenquimática han sido propuestos como fuentes complementarias al pool de fibroblastos residentes tisulares en las enfermedades fibróticas (6–9). El término fibrocito fue utilizado por primera vez en 1994 para definir a una subpoblación de leucocitos que se acumulan en sitios de injuria tisular y muestran propiedades de los fibroblastos (10). En el reporte inicial, los fibrocitos mostraron expresión de CD34 y CD105, marcadores de células madre hematopoyéticas, y CD45R0+, el marcador leucocitario común –panhematopoyético– así como varios marcadores de linaje monocítico junto con vimentina y colágeno (10, 11). La combinación de la producción de colágeno y la expresión de CD45 y uno de los antígenos hematopoyéticos, como CD34 es considerado criterio suficiente para discriminar fibrocitos de leucocitos, células dendríticas, endoteliales y fibroblastos tisulares residentes, in vitro e in vivo (11–17).

Una vez que los fibrocitos completan su maduración desde célula mononuclear CD14+, continúa diferenciándose en células ultraestructural y fenotípicamente similares a fibroblastos maduros, promovido por estimulación vía TGF β (10, 12,15) y endotelina-1 (15). La población celular resultante produce más colágeno y fibronectina que los fibrocitos (12, 15), expresa el marcador de miofibroblastos alfa actina de músculo liso (11, 15, 18), down-regulando la expresión de CD34 y CD45 (15, 18). En este estudio se pudo observar una importante proporción de fibroblastos esclerodérmicos que expresaban actina de músculo liso, CD45RO y CD34, aunque solo la expresión de AML fue estadísticamente significativa respecto de los controles ($p < 0,05$). Esto está en concordancia con los datos hallados por otros autores respecto del rol de los fibrocitos en el desarrollo de fibrosis en la esclerodermia (7, 11). Es probable que debido al pequeño número tanto de casos como de controles, no se haya encontrado asociación entre la expresión de estos antígenos y características propias de la actividad de la esclerodermia, como el compromiso pulmonar (TCAR y DLCO) a excepción de la presencia de anticuerpos antinucleares, que mostraron una tendencia a asociarse con la expresión de AML (coeficiente de correlación de Pearson=0.6; $p=0.06$). Se pudo observar una tendencia a correlacionarse la expresión de CD45RO y AML en los fibroblastos de piel de pacientes con esclerodermia (coeficiente de correlación de Pearson=0.6; $p=0.06$). (Este dato será estudiado mediante inmunofluorescencia con microscopía confocal). Es destacable que a pesar de no comprobarse una asociación estadística, sí pudo observarse que en las biopsias correspondientes a pieles esclerodérmicas en fases activas de la enfermedad, había un mayor número de fibroblastos CD45RO positivos (paciente 9, figura 2.), junto con un gran infiltrado inflamatorio.

CONCLUSIONES

- Las biopsias de piel lesiona; de pacientes con esclerodermia mostraron una mayor expresión de actina de músculo liso en fibroblastos respecto de los controles ($p < 0,05$).
- Hubo una tendencia a correlacionar la expresión de actina de músculo liso y CD45RO+ en fibroblastos esclerodérmicos, lo que inferiría que podría tratarse de una subpoblación de fibroblastos con características fenotípicas de precursores mesenquimáticos, como los fibrocitos ($p=0.06$).

- No hubo correlación entre las características clínicas de los pacientes esclerodérmicos con la expresión de AML, CD45RO+ ni CD34. Sí existió una tendencia a la asociación entre la expresión de AML y la presencia de anticuerpos antinucleares ($p=0.06$).
- Ninguna de las muestras observadas expresó el antígeno CD105+.

BIBLIOGRAFÍA

1. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:403–13.
2. Tan F. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). In: White B, editor. *Rheum Dis Clin N Am*. Scleroderma. Philadelphia: WB Saunders; 2003. 211–37.
3. Denton CP, Black CM. Scleroderma—clinical and pathological advances. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2004; 18:271–90.
4. Herrick AL, Worthington J. Genetic epidemiology Systemic Sclerosis. *Arthritis Res*, 2002; 4:165168.
5. Westergren–Thorsson G, Sime P, Jordana M, et al. Lung fibroblast clones from normal and fibrotic subjects differ in hyaluronan and decorin production and rate of proliferation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:1573–1584.
6. Kasai H, Allen JT, Mason RM, et al. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 2005; 6:56.
7. Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S: Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:733–738.
8. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, et al. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* 2003; 171:380–389.
9. Willis BC, Liebler JM, Luby–Phelps K, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2005; 166:1321–1332.
10. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, et al. *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair*. *Mol Med* 1994; 1:71–81.

11. Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest* 2007; 87: 858-870.
12. Abe R, Donnelly SC, Peng T, et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001;166:7556-7562.
13. Pilling D, Buckley CD, Salmon M, et al. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol* 2003;171:55375546.
14. Pilling D, Tucker NM, Gomer RH. Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes. *J Leukoc Biol* 2006; 79:1242-1251.
15. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, et al. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* 2003; 171:380-389.
16. Yang L, Scott PG, Dodd C, et al. Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* 2005;13:22152224.
17. Varcoe RL, Mikhail M, Guiffre AK, et al. The role of the fibrocyte in intimal hyperplasia. *J Thromb Haemost* 2006; 4:1125-1133.
18. Mattoli S. Tissue repair in asthma: the origin of airway subepithelial fibroblasts and myofibroblasts. In: Chaponnier C, Desmoulière A, Gabbiani G (eds). *Tissue Repair, Contraction and the Myofibroblast*, Chapter 4. *Landes Bioscience and Springer Science*, Business Media: Georgetown, TX, 2006, pp 40-46.

Paciente	Edad	Sexo	Tipo Esclerodermia	Tiempo Dx (meses)	TAC	DLCO	SEGD	FAN	DNA	Ro	La	Sm	RNP	ACA	ATA	TTO
1.	28	Masc	EICH	12	0	0	0	Neg	0	0	0	0	0	0	0	GC
2.	74	Fem	ED	46	3	3	1	1/80	0	0	0	0	0	0	0	GC+CFM
3.	53	Fem	SS	24	1	1	NR	1/80	0	0	0	0	0	0	0	GC+MTX
4.	58	Fem	EL	13	2	NR	NR	Neg	0	0	0	0	0	0	0	-
5.	59	Fem	EL	108	0	2	1	1/80	0	0	0	0	0	1/1600	0	GC+2 drogas
6.	18	Fem	ED	9	0	1	1	1/20	0	0	0	0	0	0	0	-
7.	56	Fem	EL	4	2	0	1	1/20	0	0	0	0	0	0	0	GC+D-Pen
8.	18	Fem	ED	9	0	1	1	1/20	0	0	0	0	0	0	0	GC
9.	18	Fem	ED	9	0	1	1	1/20	0	0	0	0	0	0	0	GC
10.	68	Fem	EL	19	1	3	1	1/80	0	0	0	0	0	1/1600	0	GC+D-Pen
11.	34	Fem	EL	12	0	0	NR	1/80	0	0	0	0	0	1/180	0	GC
12.	66	Fem	EL	156	NR	NR	1	1/80	0	0	0	0	0	0	0	-
13.	71	Fem	ED	24	3	2	3	1/1280	0	0	0	0	0	0	0	-
14.	48	Fem	ED	80	3	NR	2	1/320	0	0	0	0	0	0	0	CFM
15.	46	Fem	ED	252	NR	NR	2	1/640	0	0	0	0	0	0	0	GC+MTX
16.	54	Fem	ED	240	NR	NR	1	1/2540	0	0	0	0	0	1/160	0	-
17.	71	Fem	ED	48	1	NR	2	Neg	0	0	0	0	0	0	1	MTX
18.	45	Fem	ED	360	2	NR	NR	1/2560	0	0	0	0	0	1/1600	1	GC
19.	50	Fem	EL	96	0	1	1	Neg	0	0	0	0	0	1/1600	0	-

Tabla 1.

Características clínico-humorales de los casos con esclerodermia; EICH: enfermedad injerto contra huésped; ED: esclerodermia difusa; EL: esclerodermia limitada; SS: síndrome de superposición; Tiempo Dx: tiempo de diagnóstico; TCAR: tomografía computada de alta resolución; DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono; SEGD: seriada esófagostomoduodenal; ANA: anticuerpos antinucleares; DNA: anticuerpos anti ADN; ACA: anticuerpos anticentrómero; ATA: anticuerpos anti-topoisomerasa I; TTO: tratamiento; GC: glucocorticoides; CFM: ciclofosfamida; MTX: metotrexate; D-Pen: D-penicilamina. NR: no realizado.

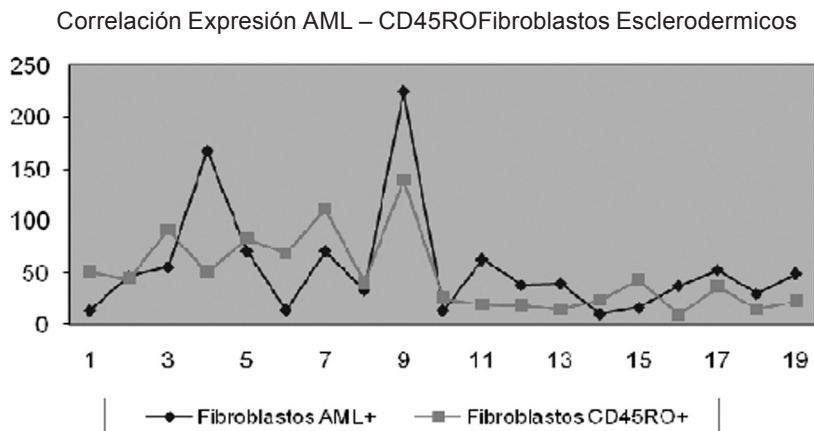


Gráfico 1. Correlación entre la expresión de actina de músculo liso y CD45RO+ en fibroblastos esclerodérmicos.

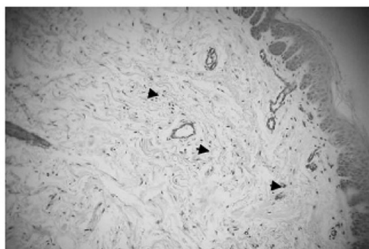
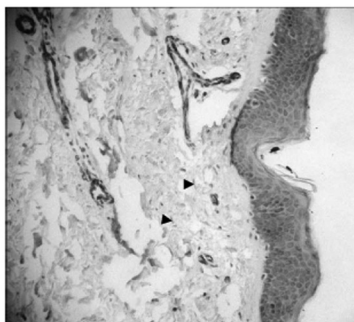


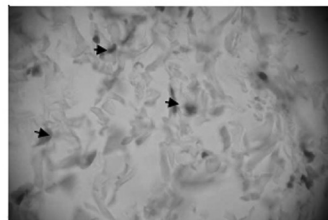
Figura 1. Expresión de actina de músculo liso en fibroblastos.

A. piel esclerodérmica con abundantes fibroblastos positivos –400X(flechas).

B. Piel normal, con escasos fibroblastos positivos –400X(flecha).



C. Detalle de miofibroblastos esclerodérmicos –1000X–.



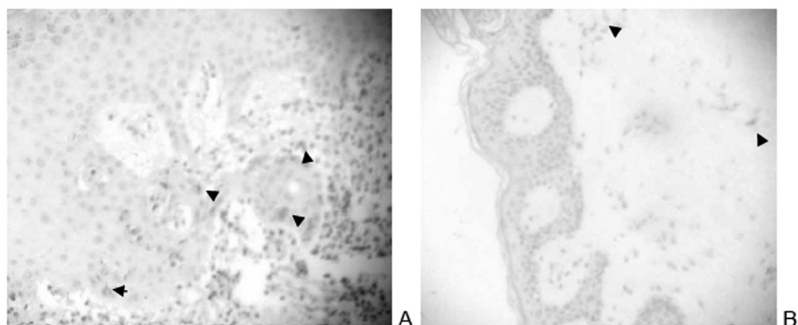


Figura 2 Expresión de CD45RO en fibroblastos de piel.

A. Piel esclerodérmica –paciente 9–. Abundantes fibroblastos positivos rodeados de infiltrado inflamatorio –400X–.

B. Piel normal. Escasos fibroblastos positivos –400X–.

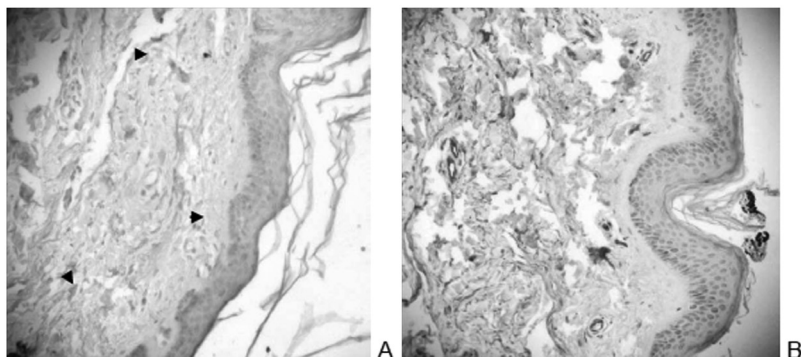


Figura 3. Expresión de CD34 en fibroblastos de piel.

A. Piel esclerodérmica. Se observan fibroblastos dérmicos positivos –400X–.

B. Piel normal. No se observan fibroblastos positivos –400X–.

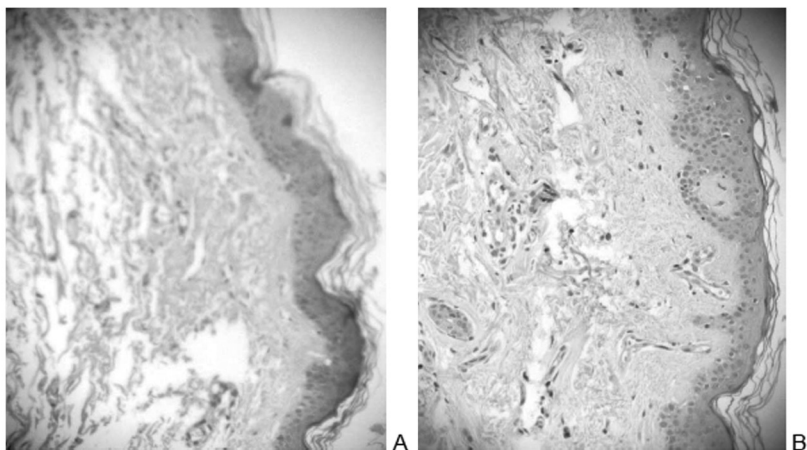


Figura 4. Expresión de CD1 05 en fibroblastos de piel.

A. Piel esclerodérmica. No se observan fibroblastos positivos –400X.

B. Piel normal. No se observan fibroblastos positivos –400X–.



AISLAMIENTO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DE MADRES CHAGÁSICAS CRÓNICAS QUE NO TRANSMITIERON LA INFECCIÓN CONGÉNITA A NINGUNO DE SUS HIJOS: PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA MEJORADA DE HEMOCULTIVO PARA SER USADA EN PACIENTES CRÓNICOS

María Celia Mora, Olga Sánchez Negrette*, Federico Ramos, Cintia Fernández, Miguel Ángel Basombrío.

Instituto de Patología Experimental (IPE). Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad Nacional de Salta. Salta Capital.

En nuestro Instituto fueron estudiados más de veinte aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de cordón umbilical o punción venosa de recién nacidos, hijos de madre chagásica. Mora et al. (2005). A partir de los mismos se realizó la caracterización isoenzimática para conocer la filogenia a la que pertenecían los mismos. Corrales et al. (2009). A través de este proyecto nos propusimos aislar parásitos de madres chagásicas seropositivas que no transmitieron la infección congénita a ninguno de sus hijos. Con estos aislados y los anteriores se podrá estudiar la Enfermedad de Chagas Congénita desde el parásito, y así poder conocer las características y capacidades de los mismos, que hacen que unos atraviesen la barrera transplacentaria y otros no. La gestación es un factor de riesgo para el aumento de la parasitemia, evidenciada por la mayor positividad de hemocultivos de las mujeres gestantes en relación a las no gestantes, y por el elevado número de parásitos circulantes entre las primeras. Avelar et al. (2007), Hermann et al. (2004).

La técnica que se aplicó para aislamiento de tripomastigotes sanguíneos es el hemocultivo (HC). Se utilizó el protocolo de Chiari et al. (1989), modificado por Luz et al. (1994). El mismo es más laborioso que el del HC de uso corriente, y se aplica a estudios de pacientes chagásicos crónicos específicamente. Luz publicó también resultados muy alentadores utilizando esta técnica (1998 y 1999).

Los HC son importantes técnicas para el aislamiento de parásitos Chiari et al. (1989). La detección de *T. cruzi* es difícil debido al escaso número de formas tripomastigotes circulando en esa fase las cuales son recuperadas solo de un limitado número de pacientes por métodos parasitológicos tanto el xenodiagnóstico como el HC. Ambos son métodos indirectos, diferidos y multiplicadores de parásitos. Estos métodos son altamente específicos pero presentan baja sensibilidad (50-74%) además que son más complicados, len-

tos y dilatados en el tiempo, y no son de uso rutinario en el hacer clínico. Castro et al. (2002).

Para nuestro laboratorio dedicado prioritariamente al estudio de la Enfermedad de Chagas tanto en forma básica como aplicada, poner a punto esta técnica de HC resulta una herramienta muy valiosa para iniciar otros estudios a partir del parásito.

El mejor conocimiento del rol del *T. cruzi* y su persistencia en pequeño número en sangre periférica a través del tiempo de vida del huésped humano infectado puede desenmarañar la evolución de la enfermedad.

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en pacientes en fase crónica, es realizado principalmente a través de tests serológicos convencionales debido a los menores niveles de parasitemia característicos de esta fase de la enfermedad. Rassi y Luquetti (2003), Manual para la atención del infectado chagásico (2005). La parasitemia entonces no sólo es escasa, sino que además, algunos de los individuos infectados pueden no tener parásitos circulantes por cortos períodos de tiempo. Castro et al. (2006).

Aún cuando se aplique el tratamiento específico, la serología puede permanecer positiva por largos períodos de tiempo a pesar de que los parásitos hubieren sido eliminados. Sánchez Negrette et al. (2008). Por eso la introducción de metodologías capaces de evidenciar al *T. cruzi* en este tipo de pacientes con el objeto de discriminar por ejemplo, curados y no curados, es fundamental. Luz et al. (1994). Asimismo esta técnica permite el aislamiento de tripomastigotes de pacientes crónicamente infectados para realizar estudios de resistencia al tratamiento. Es en este momento cuando necesitamos aplicar criterios de curación y la búsqueda debe ser exhaustiva. Nos permite estudiar también la asociación de parásitos con el tropismo a ciertos órganos y su relación con determinadas características y particularidades de esta patología, incluso respecto a ciertas áreas geográficas.

También se busca lograr el aislamiento de parásitos para poder llevar adelante estudios bioquímicos, y de caracterización de *T. cruzi* en humanos, animales domésticos y silvestres.

La necesidad de evidenciar al *T. cruzi* en pacientes ha hecho de esta técnica una sensible herramienta para muchas investigaciones.

Durante años los HC no fueron corrientemente realizados para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas crónica, porque se obtenían bajos niveles de positividad como por ejemplo, 6.3%. Pifano et al. (1954).

Desde que Chiari y Brener (1966) obtuvieron casi un 26% de cultivos positivos en LIT (Liver Infusion Tryptosa Medium), cambió la opinión acer-

ca del método y aparecieron nuevas posibilidades de investigación. Ayudó mucho el medio líquido, principalmente con siembra directa o después de la centrifugación del material.

Diferentes intentos han sido hechos para perfeccionar el diagnóstico parasitológico de la Enfermedad de Chagas humana por hemocultivo. Mourao y Mello (1975) estuvieron comprometidos en el desarrollo de su idea de remover el plasma para lavar las células con el propósito de sacar los anticuerpos y otros factores inhibitorios del crecimiento del *T. cruzi*.

A fin de ese año Chiari y Dias (1975) reprodujeron la técnica anterior y comenzaron un proyecto piloto cambiando el volumen de 10 a 30 ml para obtener mejor positividad temprana. Minter-Goedbloed, E. et al. (1978) aumentaron las lecturas por un término de 6 meses.

Ya en 1989 Chiari et al. emplearon para el aislamiento un volumen de 30 ml de sangre extraída con heparina de pacientes positivos por serología, centrifugando a 2000 r.p.m. 30' y separando el plasma. Lavaban con LIT o PBS (Phosphate Buffered Saline) y hacían otra centrifugación a 2000 r.p.m. 15'. Este grupo comenzó a trabajar conservando las muestras en frío. El material era distribuido en 6 tubos con 6 ml de LIT cada uno. Con agitaciones de las muestras cada 2 días y exámenes los días 15, 30, 45, y 60. Se procesaban sin tener en cuenta el tiempo, removían el plasma y leían muestras de 100 microlitros, obteniendo 55% de hemocultivos positivos.

En 1994 Luz et al. realizaron estudios parasitológicos en pacientes chagásicos crónicos no tratados, positivos por tres reacciones serológicas. En estos estudios se disminuyó el tiempo de procesamiento de la sangre y el manipuleo de la muestra con homogeneización suave. Hicieron tres HC seriados por persona. El volumen de extracción de sangre fue de 30 ml, la centrifugación inmediata a 4000 g 10' y 20' respectivamente, y siempre trabajaron a 4°C. Retiraban el plasma y usaban medio LIT. Además guardaban el sedimento de centrifugación del plasma centrifugado en iguales condiciones, al que se le agregaba medio y se lo incubaba también. Resuspendían todo el paquete celular en 10 ml de LIT y distribuían este material en tubos con 2 ml de LIT cada uno. El tiempo de realización era de 30 minutos y se cultivaban a 28° C. Se homogeneizaban los tubos 1 vez por semana y la lectura era de 10 microlitros de suspensión, examinada mensualmente durante 120 días. La proporción de HC positivos en una sola toma de muestra fue de 79%.

En 1998 y 1999 también Luz trabajó con muestras de sangre inmediatamente después de extraída, en un procedimiento que no debía pasar los 30'

y con baja temperatura. Extraía 30 ml de sangre heparinizada, centrifugaba a 1000 g 10' a 4° C y luego hacía un único lavado. El paquete de células sanguíneas era alicuotado desde lo alto hacia el botón, en el 1° tubo va el buffy-coat. Este es un término inglés que puede traducirse por capa leuco-plaquetaria que se observa después de la centrifugación o de la sedimentación de la sangre total entre el plasma y los glóbulos rojos. También se la conoce como la capa leucocitaria, componente sanguíneo formado por centrifugación de una unidad de sangre total, que contiene la mayor parte de sus leucocitos y, según el sistema de centrifugación sus plaquetas. Junto a ese estrato de formas sanguíneas quedan los tripomastigotes, si los hubiera, por su peso específico. La siembra del mismo trae más resultados positivos que los otros tubos. La concentración de parásitos en el buffy-coat permite simplificar la técnica y hace al test más tentador para el diagnóstico. Lavaba con LIT y seguía con la lectura por 120 días. Repitió los tests de HC y sin embargo, ya en el primero consiguió un 76 % de resultados positivos.

Castro et al. (2002) repitió la técnica descrita anteriormente, excepto la lectura que hacía hasta los 150 días. Agitaba los cultivos 2 veces por semana, realizaba la lectura entre porta y cubreobjetos tomando 10 microlitros de la suspensión de los tubos, que habían sido cultivados en estufa a 26°C. Hizo repetición de la técnica con tres extracciones por paciente pero la detección de hemocultivos positivos en la primera de ellas fue de un 40%.

La propuesta de este trabajo fue encontrar un método ideal que fuera simple y práctico dando un rápido crecimiento de los flagelados. Podemos decir que la mayor positividad del HC depende de la naturaleza del medio de cultivo, de la técnica empleada y de las modificaciones que se van realizando a la metodología.

Nosotros modificamos la técnica en algunos puntos: trabajamos con la mitad del volumen de sangre que la escuela brasilera, se homogeneizaron las muestras dos veces por semana, se leyeron hasta los seis meses y la observación se realizó a partir de 10 microlitros levantados del fondo del tubo y leídos entre porta y cubreobjetos. Le prestamos especial atención a la observación de dos tubos de la serie de siete: el primero, donde se cultiva el buffy-coat y el séptimo, donde se cultiva el sedimento de centrifugación del plasma. Este último tiene la misma composición celular del primer tubo puesto que al levantar el plasma la primera vez indefectiblemente se levantan muchas células de esa capa leuco-plaquetaria. Todo el remanente celular de hematíes se reparte en 5 tubos con 4 ml de medio LITHSP (Tryptosa Liver Infusion, Hemina, Penicilina-Estreptomicina, Suero Bovino Fetal). Por

lo demás se siguieron las pautas principales de la técnica: trabajar con muestras sanguíneas de no más de cuatro horas de obtenidas, procesar en no más de 30' y lavar con LITHSP siempre. En todo momento se conservó la muestra a temperatura no superior a 4° C para evitar que los parásitos sean lisados por el complemento.

Con esta metodología usada en las 22 muestras que finalmente se utilizaron en la investigación de esta técnica, 4 resultaron positivas. Esto representa un 18.18% de muestras positivas, a pesar de estar trabajando en muchas oportunidades con la mitad del volumen de sangre que con el que trabajaron los expertos brasileiros.

Nuestros resultados muestran que con la técnica de HC empleada y con las modificaciones en la metodología introducidas y reajustadas durante la realización de este trabajo se puede lograr un porcentaje muy interesante de muestras positivas y el aislamiento de buen número de parásitos. Estamos frente a una excelente herramienta para futuros trabajos y esto es muy promisorio para nosotros.

Objetivo: Poner a punto y optimizar una técnica parasitológica sensible para la detección de *Trypanosoma cruzi* de madres chagásicas crónicas: el hemocultivo según un protocolo especial para pacientes crónicos con pocos parásitos en sangre.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Reclutar madres chagásicas crónicas registradas a partir de un estudio previo, con dos tests serológicos positivos y cuyos hijos nacieron sin infección en la totalidad.

Obtener sangre de esas mujeres y aplicar una técnica de aislamiento de parásitos.

Poner a punto la misma: aislar *Trypanosoma cruzi* y amplificar dicho cultivo.

Producir stocks de estos parásitos y congelarlos en nitrógeno líquido para posteriores estudios de caracterización isoenzimática, bioquímica y genética, etc.

MATERIALES Y METODOS:

Se realizó un método parasitológico, el hemocultivo, con un procedimiento especial para ser usado en pacientes crónicos con pocos parásitos circulantes.

Pacientes: Fueron estudiadas 24 madres chagásicas crónicas que no transmitieron la infección congénitamente a ninguno de sus hijos, y que eran positivas por dos técnicas serológicas: HAI (Hemaglutinación Indirecta) y ELISA (Ensayo Inmunoenzimático). Las muestras pertenecían a pacientes residentes en la Ciudad de Salta y no sometidos a reinfecciones.

Se realizaron los estudios en cámara de flujo laminar vertical. Se utilizó centrifuga refrigerada, y baño de hielo. Estufa de cultivo a 28°C y microscopio óptico.

El medio de cultivo utilizado es LITHSP (Tryptosa Liver Infusion- Hemin-Penicilina- Estreptomicina y Suero Bovino Fetal).

Se confeccionó un consentimiento informado que fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Procedimiento para realizar el hemocultivo:

La técnica utilizada fue basada en la descripta por Chiari et al. 1989, y modificada según Luz et al. 1994, 1998, 1999.

Extraer 20 ml. de sangre venosa por muestra con jeringa heparinizada. Procesar antes de las 4 hs. de la extracción, y en ese período será mantenido en baño de hielo. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 min. a 4°C en centrifuga refrigerada y retirar el plasma. En tubo aparte centrifugar el plasma retirado de igual forma. Separar el plasma para serología y al sedimento celular que queda, agregarle 3 ml de LITHSP, que es el medio utilizado. Ese tubo será el n° 7, de los 7 tubos de cada paciente.

Agregar al sedimento de la primera centrifugación igual volumen de LITHSP que el del plasma eliminado, para lavar el paquete de células hemáticas. Vortexear.

Centrifugar a 2500 rpm durante 10 min. a 4°C en centrífuga refrigerada.

El sobrenadante será descartado y el pellet celular se fraccionará en alícuotas de 1 ml aproximadamente, con pipeta Pasteur de plástico. Se distribuirán en 6 tubos plásticos de 15 ml, tubos Falcon, conteniendo 4 ml de medio LITHSP.

Por cada muestra se harán 7 tubos. El 1° contendrá el buffy-coat y el 7° el pequeño pellet del centrifugado del plasma, que son células levantadas del buffy-coat y que quedan al retirar el plasma. Del 2° al 6° son glóbulos rojos que deben ser cuidadosamente alicuotados.

El procedimiento no debe alargarse por más de 30 min.

Se harán dos homogeneizaciones por semana de los tubos, pero nunca el día de la lectura. Estos tubos serán mantenidos en estufa de cultivo a 28°C.

Se realizará una muestra por persona. Y por cada muestra se sembrarán 7 tubos.

Lectura:

Se llevará a cabo los días 30, 60, 90, 120, 150, y 180 post-siembra o hasta que sea positivo.

Tomar 10 microlitros del fondo cónico del tubo Falcon.

Colocar 10 microlitros del pellet entre porta y cubreobjetos, y observar con microscopio óptico a 400 x. Esto se hace con cada uno de los 7 tubos Falcon correspondientes a cada muestra.

En caso de resultar positivo tomar el resto del pellet y repicar a tubos con LITHSP.

A partir de los hemocultivos realizar cultivos masivos en medio LITHSP y posteriormente criopreservar en N₂ líquido a - 196 °C.

RESULTADOS:

Dos de esas muestras se perdieron por contaminación. Por lo tanto, las muestras se redujeron a 22. Cuatro de ellas resultaron positivas lo que representa un 18.18% (4/22).

El volumen de sangre extraído fue en promedio 12.5 ml (desde 10 a 20 ml)

El tiempo transcurrido entre la fecha de siembra de la muestra y el diagnóstico del resultado positivo de las cuatro muestras fue el siguiente: una a los 30 días, dos a los 60 días y una a los 90 días.

En dos muestras positivas el número de tubos con parásitos fue de 3, y en las otras dos hubo 2 tubos positivos.

En las dos muestras con 3 tubos positivos, el orden de los mismos fue en el 1°, 2° y 3°. Y en las dos muestras con 2 tubos positivos el orden fue en una el 2° y el 7° y en el otro el 1° y el 7° respectivamente.

El lapso de tiempo entre la entrega y el procesamiento fue siempre menor de 4 horas.

Se usó centrifuga refrigerada en 16 muestras y en 8 centrifuga común.

DATOS DE LAS MADRES Y VARIABLES					
CODIGO	N° HIJOS	RESULTADO FINAL	T' LECT 1° t+	T' ENTREGA Y SIEMBRA	
1	8	Positivo	30 días	Correcto	
2	3	Negativo		Correcto	
3	4	Negativo		Correcto	
4	3	Negativo		Correcto	
5	2	Negativo		Correcto	
6	2	Positivo	60 días	Correcto	
7	3	Negativo		Correcto	
8	2	Negativo		Correcto	
9	7	Negativo		Correcto	
10	3	Negativo		Correcto	
11	3	Negativo		Correcto	
12	6	Negativo		Correcto	
13	4	Positivo	90 días	Correcto	
14	3	Negativo		Correcto	
15	7	Positivo	60 días	Correcto	
16	2	Negativo		Correcto	
17	3	Negativo		Correcto	
18	3	Negativo		Correcto	
19	2	Negativo		Correcto	
20	2	Negativo		Correcto	
21	7	Negativo		Correcto	
22	3	Negativo		Correcto	
23	7	Negativo		Correcto	
24	5	Negativo		Correcto	

* Primer Nivel de Atención. Salud Pública. Ciudad de Salta

MEDIDAS EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

	TIPO CENTR.	CONTAMIN.	ml. MUESTRA	Nº TUBO POSIT.	ORDEN TUB. POS.
	Refrig.	NO	13	3	1° 2° 3°
	Refrig.	NO	12	0	
	Refrig.	NO	12	0	
	Refrig.	NO	12	0	
	Refrig.	NO	20	0	
	Refrig.	NO	12	3	1° 2° 3°
	Refrig.	NO	10	0	
	Refrig.	NO	12	0	
	Refrig.	NO	12	0	
	Refrig.	SI	10	0	
	Refrig.	NO	12	0	
	Común	SI	10	0	
	Común	NO	13	2	2° 7°
	Común	NO	14	0	
	Refrig.	NO	12	2	1° 7°
	Refrig.	NO	10	0	
	Común	NO	10	0	
	Común	NO	12	0	
	Común	NO	10	0	
	Común	NO	10	0	
	Común	NO	11	0	
	Refrig.	NO	12	0	
	Refrig.	NO	20	0	
	Refrig.	NO	10	0	

DISCUSIÓN:

Si bien en principio se planificó extraer de cada madre 20 ml de sangre, aproximándonos así al volumen de las muestras de la bibliografía tomada como modelo, se obtuvieron solo dos muestras con el volumen deseado, y el volumen promedio fue de 12 ml. Pese a tener un consentimiento informado aceptado por un Comité de Ética no se pudieron obtener muestras de mayor volumen. Los motivos son la reticencia de las mismas madres a dar mucha sangre, que es un problema cultural y a que en nuestra provincia no es habitual hacer extracciones de esos volúmenes a los pacientes. En Brasil obtienen volúmenes mayores, 30 ml de sangre por extracción, en investigaciones como ésta. Casi toda la bibliografía en la que hemos apoyado nuestra estudio es brasilera, se ve allí que grandes grupos de diferentes partes de ese país desde hace 40 años manejan esos volúmenes. El hecho de haber trabajado con poco volumen de sangre fue una enorme desventaja en nuestro trabajo.

Se obtuvo sólo una muestra por cada madre, no hubo repeticiones. La población estudiada es un grupo muy acotado de personas: madres con infección chagásica crónica que no transmitieron la infección congénitamente a ninguno de sus hijos. Esto requiere tener un muy buen registro y manejo de técnicas serológicas puestas a punto para la selección de madres y control de todos sus hijos. Por otra parte las muestras tomadas según la buena voluntad de las pacientes fue muy restringida.

El medio utilizado para cultivos y lavados fue LITHSP en todas las muestras. Ocho se procesaron en centrifuga común.

Se retiró el plasma que posee factores inhibidores del crecimiento del parásito y se prolongó el tiempo de cultivo a seis meses como sugiere Minter-Goedbloed et al. (1978) y Fernandes et al. (1995) quienes sostienen que aumenta el número de muestras positivas encontradas cuanto más tiempo son incubadas.

Se usó el buffy-coat y el sedimento del plasma extraído. Se homogeneizaron dos veces por semana todas las muestras.

El tiempo de procesamiento fue variable. Se intentó procesarla en 30 min.

Con el uso de esta técnica se disminuyó la manipulación de la muestra, como sugirieron Barbosa et al. (1983), Luz et al. (1994) y Fernández et al. (1995). Ellos observaron que a menor manoseo de la muestra se conseguía mayor viabilidad de los parásitos y que los mismos estuvieran en condiciones favorables para su multiplicación. Castro et al. (2006).

Levantamos el plasma, factor con inhibidores del crecimiento del parásito. Mourao y Mello (1975), Chiari et al. (1989) y Luz et al. (1994).

Se conservó la línea de frío a 4°C Chiari et al. (1989), Luz et al. 1994 y 1999.

Se homogeneizaron todas las muestras 2 veces por semana. Castro et al. (2002).

La centrifugación duplica o triplica los hallazgos. Barbosa et al. (1983) y la centrifugación del plasma también suma mucho al aislamiento de parásitos. Luz et al. (1994).

Otro camino bien conocido para aumentar la positividad es aumentar el número de exámenes por pacientes Luz et al. (1994), Castro et al. (2002). Estos deben ser repetidos en diferentes momentos. Diferentes autores mostraron que repitiendo hemocultivos en un mismo paciente podía aumentarse la sensibilidad de la técnica: Albuquerque et al. (1972), Mourao and Chiari (1975), Luz et al. (1994), Luz (1998), Luz (1999); Castro et al. (2002). En nuestro país Jörg y Baez (1993) lograron una positividad de un 86.8% repitiendo tomas de muestras en un mismo paciente, hasta 8 muestras de una misma persona. No se hicieron repeticiones en nuestro proyecto.

De las cuatro muestras positivas, dos de ellas tuvieron dos de los siete tubos positivos, compatible con parasitemia baja y las otras dos muestras tuvieron 3 tubos positivos compatible con parasitemia alta. A esta clasificación de los pacientes según la carga parasitaria la hace Luz et al. (1994) y habla de baja parasitemia cuando hay solo 1 o 2 tubos positivos y alta parasitemia cuando 3 o más tubos son positivos de los siete sembrados.

Nosotros le dimos una importancia especial al orden del tubo positivo. En dos casos fueron positivos el 1º, 2º, y 3º. El primero es el tubo donde indefectiblemente se inoculó el buffy-coat y los subsiguientes son aquellos en donde se sembró el material próximo a él ya que por el peso específico del parásito al centrifugar la muestra, se ubicará entre la capa de glóbulos blancos y hematíes de la muestra. En las otras 2 muestras positivas el orden de los tubos positivos es, en una el 2º y 7º y en otro en 1º y 7º. Ya explicamos la razón de los primeros tubos positivos. Respecto del 7º tubo recordemos que en el mismo se alojaba el pellet de centrifugación del plasma con células del buffy-coat al cual se le agregó medio.

Hemos comprobado que el uso del buffy-coat da significativamente más resultados positivos que otros tubos. Esto fue sostenido por Luz en 1998 en su tesis doctoral. La concentración de parásitos en el mismo permitiría simplificar la técnica ya que podría ser usado un número más pequeño de tubos

por paciente, haciendo al test más eficiente y la lectura más estimulante para el diagnóstico o el aislamiento parasitológico.

Otro aporte importante es la búsqueda de los parásitos en el fondo del tubo. Los tripomastigotes fisiológicamente respiran y lo hacen mejor en la superficie. Nadan en la parte superior. Al reproducirse, las formas epimastigotes quedan en grumos en el fondo del tubo si hay pocos, y levantarlos del fondo cónico del tubo es más fácil en el momento de la lectura.

Comentarios de Luquetti A. y Castro A. M..

En general se detectan más positivos al día 30, y en orden decreciente el día 60 y el 90 Luz et al. (1994). Nosotros detectamos una muestra positiva al día 30, dos al día 60 y una al día 90.

Se pudo aislar el parásito de cuatro madres de las 22 estudiadas que representan 18.18 % (4/22). Las muestras no fueron voluminosas, no obstante se obtuvo muy buen porcentaje de positividad si comparamos nuestro trabajo con el trabajo de Sirano et al. (2007) que consigue 18.4 % de hemocultivos positivos de madres infectadas no gestantes basados en las mismas técnicas que nosotros usamos pero con más del doble del volumen.

Seguramente si se aplicara este protocolo en trabajos semejantes a los realizados por nosotros con sangre de cordones umbilicales de niños hijos de madres chagásicas se elevaría el número de aislados obtenidos. Mora et al. (2005).

Conseguimos con varias dificultades y modificaciones sobre la marcha una positividad de 18.18%, esto significa que ajustando las variables y con esta experiencia se puede mejorar mucho la detección de *T. cruzi*. Más aún si se repiten las extracciones por paciente.

Conclusiones: se puede aumentar el número de hemocultivos positivos, aumentando el volumen de la muestra, disminuyendo el lapso colecta-siembra, centrifugando y separando el plasma, empleando un tiempo de procesamiento de no más de 30 min, disminuyendo el manejo de la muestra y conservando la línea de frío en 4° C, usando el medio LIT completo para el lavado, sembrando el buffy-coat y las células sedimentadas en el fondo del tubo de centrifugación del plasma, y prologando la lectura hasta los 180 días. Las lecturas se harán tomando el material del fondo del tubo y colocando entre porta y cubreobjetos para las lecturas mensuales.

Hemos puesto a punto una técnica que nos abrirá muchas posibilidades. Con la experiencia adquirida y las modificaciones implementadas conseguiremos aislar en un próximo trabajo más *Trypanosoma cruzi* a partir de esta metodología.

AGRADECIMIENTOS:

A la Fundación Roemmers por apoyar con el subsidio otorgado la realización de este proyecto.

Al Instituto de Patología Experimental (IPE) por haber posibilitado el desarrollo de este proyecto en sus laboratorios.

Al Dr. Carlos Diego Lacunza por su aporte a la bibliografía de este trabajo.

A la Téc de Lab. Alejandra Ontiveros que colaboró con el aporte de muestras desde el Centro de Salud N° 15 de la Ciudad de Salta.

SUMMARY

A parasitological technique, Hemoculture (HC), was implemented due to the need of isolating *Trypanosoma cruzi* from chronic chagasic women, whose children were born without congenital infection. This technique was adapted to patients in the chronic phase.

HC is commonly used because of its low levels of circulating parasites in the chronic phase of the disease. This indirect method is highly specific, but in general, its sensitivity is rather low.

The technique of Chiari et al. (1989) modified by Luz Z. et al. (1994-1999) and by us, aiming to increase its sensitivity, was used as follows: aprox 12 ml. of venous blood was collected into syringe containing sodium heparin and centrifuged for 10' at 1.000 g and 4 °C to separate red blood cells from plasma. Supernatant plasma was centrifuged and 3 ml of Liver infusion Tryptose Medium, Hemine, Peniciline – Streptomycine, Foetal Serum Bovine LITHSP) added to pellet. Packed red blood cells were washed by centrifugation in LITHSP at 4°C and 1.000 g for 10 min, and distributed into six plastic tubes (Falcon) each containing 3 ml LITHSP. All tubes were kept at 28°C, mixed gently twice a week, and examined monthly during 180 days. A total of 10 microlitres of each preparation, taken from the tube's bottom, was examined microscopically. There were no further repetitions.

The parasites were isolated – 4 out of 22 mothers (18.18%), showing that HC is a sensitive method for the parasitological diagnosis of Chagas disease as well as ideal for monitoring cure in treated patients.

In conclusion, a higher positivity of HC can be attained: using LITHSP medium, using buffy-coat, increasing the period of culture up to 180 days, reducing time-period between collection and inoculation of samples, processing blood more rapidly, reducing manipulation of blood samples.

The present protocol has been improved during the development of the project. The isolated parasites should outnumber in future studies and be used in further investigations.

BIBLIOGRAFIA:

1. Albuquerque, R.E.; Fernandes L.A.; Funayama G.H.; Fernolli Filho F.; Siqueira A.F. Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes con reação de Guerreiro- Machado positiva. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 14: 1-5, 1972.
2. Avelar, J.B.; Siriano, L.R.; Leal, N.G.; Marquez, D.S.; Lages-Silva, E.; Luquetti, A.O.; Castro, A.M. Avaliacao da parasitemia e caracterizacao genética das populacoes do *Trypanosoma cruzi* isoladas de gestantes atendidas no ambulatorio de doença de Chagas HC-UFG. Rev. Pat. Tropical. Vol.36 (Supl. 3): 01-65 out.-dez. Pág.24, 2007.
3. Barbosa, W.; Czerewuta, A.C.; Oliveira, R.L. Tentativa de isolamento primário de *Trypanosoma cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura-agentes bloqueadores. Rev. Pat. Tropical. 12: 155-163, 1983.
4. Castro, A.M.; Luquetti, A.O.; Rassi, A.; Rassi, G.G.; Chiari, E.; Galvao, L.M.C. Blood Culture and Polymerase Chain Reaction For The Diagnosis of The Chronic Phase of Human Infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 88: 894-900, 2002.
5. Castro, A.M.; Luquetti, A.O.; Rassi, A.; Chiari, E.; Galvao, L.M.C. Detection of parasitemia profiles by blood cultura after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitol. Res. 99: 379-383, 2006.
6. Chiari, E.; Brener, Z. Contribucao ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 8: 134-138, 1966.
7. Chiari, E.; Díaz, J.C.P. Nota sobre una nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. Rev. da Soc. Bras. Med. Trop. IX: 133-136, 1975.
8. Chiari, E.; Pinto Días, J.C.; Lana, Andrade Chiari C. Hemocultures For The Parasitological Diagnosis of Human Chronic Chagas Disease. Rev. da Soc. Bras. de Med.Trop. 22(1): 19-23, jan-mar, 1989.
9. Corrales R.M., Mora M.C., Negrette O.S., Diosque P., Lacunza D., Vir-

- reira M., Brenière S.F., Basombrío M.A. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *INFECT. GENET. EVOL.* Mar; 9(2): 278-82, 2009.
10. Fernandes, A.J.; Diotaiuti, L.; Azeredo, B.V.M.; Busek, S.U.; Chiari, E.; Viabilidade da utilização da hemocultura no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em amostras coletadas em condições de campo. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 28: 123, 1995.
 11. Hermann, E.; Truyens, C.; Alonso -Vega, C.; Rodríguez, P.; Berthe, A.; Torrico, F.; Carlier, Y. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* is Associated with Maternal Enhanced Parasitemia and Decreased Production of Interferon in Response to Parasite Antigens. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189:1274-81.
 12. Jorg M.E.; Báez V.J. Parasitemia en infectados crónicos por *Trypanosoma cruzi*, indeterminados y sintomáticos, evidenciada por hemocultivo. *EM Publicación Médica* 6: 71-79, 1993.
 13. Luz, Z. M.P.; Coutinho, M.G.; Romeu Cancado, J.; Krettli A.U. Hemocultura: Técnica Sensível Na Detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos Na Fase Crônica Da Doença de Chagas *Rev. da Soc. Bras. de Med.Trop.* 27 (3):143-148, jul-set, 1994.
 14. Luz Z.M.P. Hemoculturas em Indivíduos no Fase Crônica pelo *Trypanosoma cruzi*: Modificações na Metodologia Visando a Simplificação e Aumento da Sensibilidade da Técnica, MSc.Thesis. Instituto Oswaldo Cruz, 87 pp, 1998.
 15. Luz, Z. M.P. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 296-298, 1999.
 16. Minter-Goedbloed, E.; Minter, D.M.; Marshall, T.F.C. Quantitative comparison between xenodiagnosis and haemoculture in the detection of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 72: 217-225, 1978.
 17. Mora, M.C.; Sánchez Negrette, O.; Marco, J.D.; Barrio, A.; Ciaccio, M.; Segura, M.A.; Basombrío, M.A. Early Diagnosis of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection Using PCR, Hemoculture and Capillary Concentration as Compared with Delayed Serology. *JOURNAL OF PARASITOLOGY.* 91(6): 1468-73, 2005.
 18. Mourao, O.G.; Mello, O.C. Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. da Soc. Bras. Med. Trop.* IX: 183-188, 1975.

19. Manual para la atención del paciente infectado con ***T. cruzi***. MS y AN Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina. 2005.
20. Pifano, C.F. El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. Arch. Venezol. Patol.y Parasit. Med. 2: 120-155, 1954.
21. Rassi, A.; Luquetti, A.O. Specific treatment for ***Trypanosoma cruzi*** infection (Chagas disease). In: Tyler K.M., Miles M.A. (eds) American trypanosomiasis. Kluwer, Boston, pp. 117- 125. 2003
22. Sánchez Negrette, O.; Sánchez Valdez, F.J.; Lacunza, C.D.; García Bustos, M.F.; Mora, M. C.; Uncos, A.D.; Basombrío, M.A. Serological Evaluation of Specific- Antibody Levels in Patients Treated for Chronic Chagas'Disease. Clinical and vaccine immunology. Vol. 15. N° 2. p. 297-302. Feb.2008.
23. Siriano, L.R.; Avelar, J.B.; Oliveira, R.A.; Marra, N.G.L.; Luquetti, A.O.; Castro, A.M. Parasitemia por hemocultura em pacientes na fase crónica da doença de Chagas: Influencia da gestacao. Rev. Pat. Tropical. Vol.36 (Supl. 3): 01-65 out.-dez. Pág.29, 2007.

AVANCES EN LA COMPRENSIÓN DE LA LEISHMANIASIS A NIVEL REGIONAL: ANÁLISIS DE FACTORES INMUNOLÓGICOS Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA.

Cecilia María Parodi Ramoneda
Instituto de Patología Experimental (IPE) - CONICET

GRUPOS DE PACIENTES ESTUDIADOS

Para realizar el análisis fenotípico de las poblaciones linfoides, se tomaron y procesaron muestras de sangre periférica de 76 pacientes, de los cuales, luego de realizar el diagnóstico, se descartó la Leishmania como agente causal en 19 de los mismos. El resto se clasificó dentro de dos formas clínicas de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA), 29 pacientes presentaron clínica compatible con *L. Mucocutánea* (LMC) y 28 con *L. Cutánea* (LC).

Debido a que la enfermedad de Chagas es endémica en las mismas zonas geográficas que la Leishmaniasis, resultó de gran importancia determinar por enzoinmunoensayo el porcentaje de pacientes que concomitantemente con la LTA presentaban infección por el protozooario *T. cruzi*. El 39.29 % de los pacientes con LMC presentó infección por *T. cruzi*, mientras que un menor porcentaje de infección mixta se observó en los pacientes con LC (20.69 %) (Tabla 1).

Tabla 1. Relación entre formas clínicas de LTA y la infección por *T. cruzi*

Forma de presentación	Infección por <i>T. cruzi</i>		Total
	SI	NO	
LC	6 (20.69 %)	23 (79.31 %)	29 (100 %)
LMC	11 (39.29 %)	17 (60.71 %)	28 (100 %)
Total	17 (29.82 %)	40 (70.18 %)	57 (100 %)

Análisis del perfil fenotípico de las células linfoides periféricas de los pacientes con *L. Cutánea* (LC) y con *L. Mucocutánea* (LMC)

Se determinó por citometría de flujo el porcentaje de expresión de diferentes receptores relativos a diferenciación y memoria sobre los linfocitos

T CD8+ y T CD4+ de pacientes que sufren LC (n= 16) y LMC (n= 25) con lesiones activas y de un grupo control (GC, n= 12) compuesto por sujetos sanos sin historia de Leishmaniasis. Al progresar en los estadios de diferenciación T se produce la pérdida de moléculas como CD27, CD28, CD127 y CD45RA, entre otras, y la ganancia de otros receptores en membrana, como ser el marcador de senescencia CD57 y moléculas citolíticas como perforina y granzima en el citoplasma de los linfocitos (Appay et al 2002; Appay & Rowland Jones, 2004). El análisis de estos marcadores resulta de interés, ya que según diversos estudios acerca de infecciones virales crónicas o de la enfermedad de Chagas, relacionan el estadio de diferenciación en el que se encuentran los linfocitos, con la mejoría clínica o con progresión y severidad de las patologías.

En la figura 1 se muestran los principales hallazgos encontrados. Ambos grupos de pacientes (LC, LMC), mostraron un porcentaje disminuido de células “early” o tempranas, caracterizadas por la co-expresión CD27+, CD28+ sobre los linfocitos T CD8+ y T CD4+, respecto al grupo control (Fig. 1A). Lo mismo se observó con la expresión de otro marcador temprano, CD127 (Fig. 1B) en ambas subpoblaciones linfoides. Por otra parte, al analizar al marcador CD27 conjuntamente con el de memoria CD45RO, se pudo demostrar que en el grupo control prevalecen las células T CD27+, CD45RO-, es decir las células vírgenes (Fig. 1C), mientras que en los pacientes que sufren LC y LMC, estas células se encuentran en menores porcentajes mientras que se observa un porcentaje estadísticamente mayor de células de memoria CD45RO+ con ausencia de CD27 en membrana (Fig. 1D).

La pérdida de CD27 también se observa al analizar la co-expresión CD27-, CD28-, característica de células “late” o tardías, ya que los pacientes presentan un porcentaje significativamente mayor de dichas células respecto al grupo control (Fig. 1E). La caracterización de células en estadios terminales de diferenciación en los pacientes se completa con la determinación de un mayor porcentaje de expresión del receptor CD57 (Fig. 1F) y de moléculas citolíticas como perforina en el interior de los linfocitos T CD8+ (Fig. 1G).

Respecto a la funcionalidad de las células T CD8+, se determinó el porcentaje de IFN- γ luego de la estimulación con mitógenos (PMA + ionomicina) en los grupos en estudio. En este caso, los pacientes con LC presentaron porcentajes intracitoplasmáticos de esta citoquina similares al grupo control. No obstante se observaron diferencias altamente significativas entre estos grupos y el de pacientes con LMC activa (Fig. 1H), quienes demostraron los mayores porcentajes de IFN- γ .

Las diferencias fenotípicas se encuentran más pronunciadas en los linfocitos T CD8+, que en los linfocitos T CD4+. Es importante destacar también, que independientemente de las distintas formas clínicas de LTA, ambos grupos de pacientes mostraron un fenotipo de diferenciación T tardío. Como se trata de pacientes que presentan lesiones activas, ya sea a nivel cutáneo o a nivel nasofaríngeo, el fenotipo encontrado puede estar asociado a un estado de estimulación inmune debido principalmente a la presencia del parásito en el organismo. El fenotipo de diferenciación T terminal se asocia, según diversos estudios a cronicidad y progresión de la patología. A su vez, células altamente diferenciadas presentan signos de senescencia durante infecciones crónicas presumiblemente debido a agotamiento luego de re-estimulación persistente (Hinrichs et al, 2006; Barber et al, 2006). Es por este motivo que otro objetivo del proyecto es determinar que sucede cuando se produce la curación o mejoría clínica, lo que lleva a la disminución de la carga parasitaria en el organismo, luego de la administración de la terapia específica.

Influencia de la coinfección con *T. cruzi* en los hallazgos fenotípicos de pacientes con LMC

Debido a que durante la enfermedad de Chagas también se producen cambios en el fenotipo de los linfocitos T de los pacientes, quisimos determinar si la infección por *T. cruzi* tenía influencia en los resultados expuestos para los pacientes con LMC. Para esto, realizamos la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante ensayo de inmunoenzimático comercial (con Antígenos recombinantes) en el plasma de los pacientes. De 25 pacientes analizados, 16 mostraron serología negativa, mientras que en 9 se determinó la positividad para anticuerpos contra *T. cruzi*. Luego de dividir los grupos en LMC y LMC-Chagas+ analizamos los principales receptores de diferenciación sobre linfocitos T CD8+ y pudimos determinar que no se observan diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 2), lo cual indica que los hallazgos encontrados no están influenciados por la infección con *T. cruzi* concomitante.

Tabla 2. Diferencia entre receptores de diferenciación T en pacientes con LMC y en pacientes con LMC que concomitantemente presentan infección por *T. cruzi*

Formas de presentación	Receptores de membrana sobre linfocitos T CD8+ (% , X $\pm$ ES)					
	CD27+,CD28+	CD127	CD57	CD27-, CD28-	Perforina	IFN- γ
LMC (n= 16)	39,13 $\pm$ 3,17	58,47 $\pm$ 4,18	36,22 $\pm$ 2,85	37,63 $\pm$ 2,61	38,97 $\pm$ 5,93	53.85 $\pm$ 5.51
LMC-Chagas+ (n= 9)	35,48 $\pm$ 5,31	47,98 $\pm$ 3,97	43,22 $\pm$ 3,46	45,77 $\pm$ 4,59	53,99 $\pm$ 1,80	57.10 $\pm$ 4.42

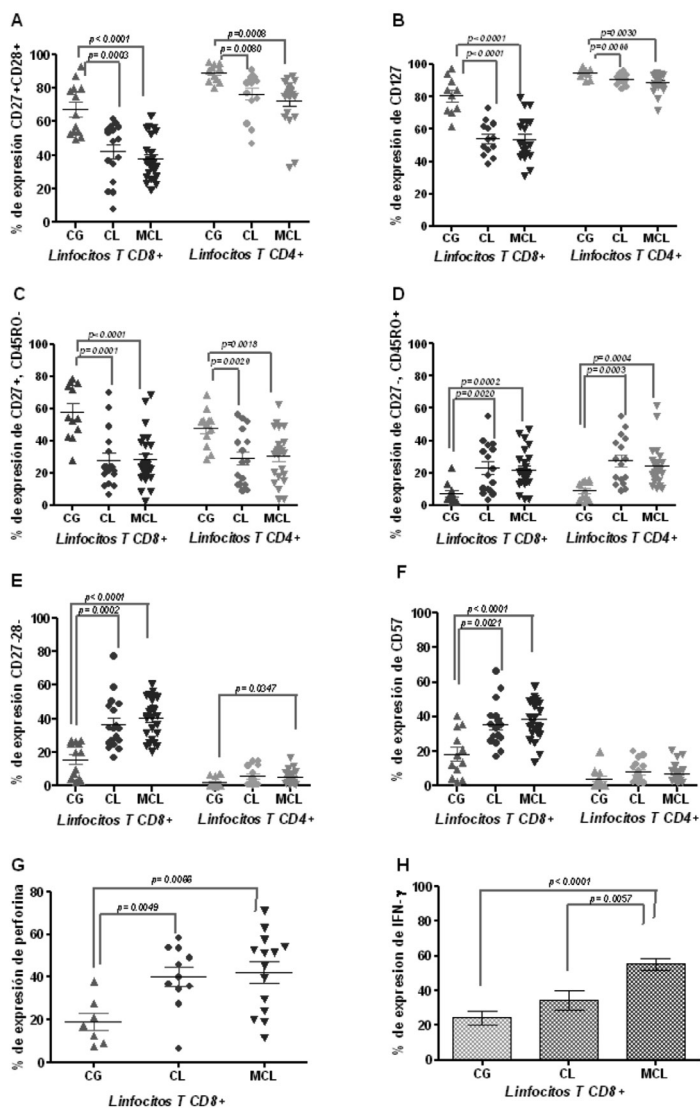


Fig. 1. Receptores de memoria y diferenciación sobre linfocitos T CD8+ y CD4+ provenientes de los distintos grupos en estudio: grupo control (CG), pacientes con L. Cutánea (CL) y pacientes con L. Mucocutánea (MCL). Estadística: t de Student.

Progresión de la LTA en los pacientes estudiados y su relación con el fenotipo de diferenciación T

La Leishmaniasis es una patología difícil de diagnosticar, a su vez los pacientes generalmente provienen del interior de la provincia y luego de lograr el diagnóstico y recibir el tratamiento, muchas veces no es posible localizarlos nuevamente para realizar su control clínico. En el caso de los pacientes estudiados ($n = 57$), pudimos determinar su evolución en 28 de los mismos. En el caso de los pacientes con LC, 34.48 % presentaron buena respuesta al tratamiento, 6.90 % (2 casos) no cicatrizaron las heridas y no pudimos realizar el seguimiento del resto (58.62 %). El 39.29 % de los casos de pacientes con LMC presentó mejoría clínica mientras que el 17.86 % mostró recidivas, luego de más de dos regímenes terapéuticos y el 42.86 % no pudo ser evaluado.

Fenotipo de diferenciación T en pacientes con LC y distinta progresión de la patología

Luego de demostrar que los pacientes con LC activa ($n = 16$) presentan un fenotipo de diferenciación T tardío, quisimos determinar que sucede luego de años de recibido el tratamiento, que lleva a la disminución o eliminación de la carga parasitaria, en pacientes que se encuentran en seguimiento con heridas cicatrizadas y sin ninguna sintomatología clínica de enfermedad, con buena respuesta sostenida ($n = 9$). Debido a que la subpoblación T CD8+ es la que presenta las diferencias más pronunciadas, analizamos los principales receptores de diferenciación sobre estas células T. Las células tempranas doble positivas CD27+, CD28+ y el marcador de diferenciación temprana CD127 se encuentran aumentados significativamente en el grupo de pacientes en seguimiento respecto a los pacientes con enfermedad activa (Fig. 2 A, 2B). Además, el porcentaje de células CD27-, CD28- y la molécula perforina, ambas características de estadios avanzados, se encuentran disminuidas en el grupo de pacientes que presentaron buena respuesta sostenida en el tiempo (Fig 2C, 2D). Estos resultados sugerirían la reversión de un fenotipo tardío hacia un fenotipo temprano luego del descenso de la carga parasitaria, producido por la administración del tratamiento. Estos hallazgos son relevantes, ya que el fenotipo temprano se asocia con mejoría clínica, mayor inmunidad protectora y síntomas más leves de las patologías (Albareda et al, 2006).

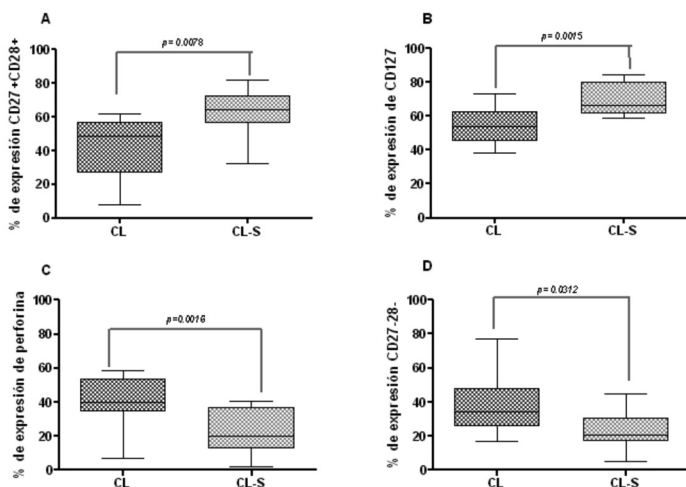


Figura 2. Receptores de diferenciación sobre los linfocitos T CD8+ de pacientes con L. Cutánea activa (CL, n= 16) y de pacientes que se encuentran en seguimiento luego de la administración de la terapia y de años de mejoría clínica y cicatrización de lesiones (CL-S, n= 9).

Nuestros estudios sugieren que el análisis de la modulación de los receptores de diferenciación a distintos tiempos de infección, podría ser de utilidad como una herramienta que ayude a definir clínicamente a pacientes que se presentan un mayor riesgo de progresión de la patología y a pacientes con pronóstico más favorable.

Dificultades encontradas en la Investigación:

La mayor dificultad ha sido no contar con una estufa de cultivo que funcionara adecuadamente en nuestro Instituto, durante la mayor parte del período comprendido para la realización del proyecto. Ahora que la tenemos estamos poniendo a punto las técnicas (ya mencionadas en el informe anterior) que requieren de la implementación de cultivos celulares.

EXPRESIÓN CLÍNICA DE HEMOFILIA EN MUJERES PORTADORAS. DIAGNÓSTICO DE LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.

Claudia Pamela Radic, Liliana Carmen Rossetti, Miguel Candela.

Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano R Castex*.

Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

RESUMEN

La hemofilia es una enfermedad hemorrágica hereditaria, ligada al sexo, que afecta a 1 de cada 10.000 varones en todas las poblaciones humanas. La hemofilia A (HA) se caracteriza por el déficit del factor VIII de coagulación (FVIII). La HA no se distingue clínicamente de la hemofilia B (HB), asociada a defectos en el factor IX de coagulación; es aproximadamente 5 veces más frecuente.

En hemofilia, como toda enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, los varones resultan afectados y las mujeres son generalmente no sintomáticas. La evidencia fenotípica de hemofilia en mujeres es un fenómeno inusual. Sin embargo en la literatura la mayoría de los reportes presentan mujeres sintomáticas heterocigotas que son portadoras para mutaciones en el gen del FVIII asociadas a sesgo completo en la inactivación del cromosoma X.

Este trabajo presenta el estudio molecular de 72 mujeres relacionadas a pacientes con hemofilia A severa, mediante un algoritmo de análisis molecular de todo el gen del FVIII, para determinar el estado de portadora y la cigosidad en cada una de ellas. En la serie estudiada fueron detectadas 44 portadoras de HA severa 24 no portadoras y 4 resultaron indeterminadas. Para estudiar la causa de expresión de HA severa en mujeres portadoras heterocigotas se ajustó y validó el sistema del gen HUMARA para estimar el patrón de inactivación del cromosoma X (XIP). Se estudiaron seis mujeres con HA severa: una mostró la delección c.3633delA en hemi-homocigosis, cuatro, mostraron la mutación en heterocigosis y sesgo extremo en el XIP, un caso heterocigota para c.4388_4391delCTTT, mostró XIP no sesgado en leucocitos de sangre periférica.

INTRODUCCIÓN

La hemofilia es una coagulopatía hereditaria ligada al sexo, que afecta 1 cada 10.000 varones en todas las poblaciones humanas. Se pueden distinguir dos tipos, la hemofilia A (HA) asociada a defectos en el gen del factor VIII (*F8*) de coagulación humano y la hemofilia B (HB) debida a defectos en el gen del factor IX (*F9*). La HA se presenta con una frecuencia 5 veces mayor que la HB, y puede clasificarse en hemofilia severa (se) (actividad del factor menor al 1%), moderada (mo) (entre 1 y 5%) o leve (le) (entre 5 y 20%). La caracterización de la mutación causal de hemofilia constituye la ruta ideal para proveer información segura para asesorar genéticamente a las familias afectadas (diagnóstico de portadoras y prenatal). La hemofilia es transmitida por mujeres quienes debido a su condición de heterocigotas generalmente no son afectadas y son denominadas portadoras. Estas portadoras pueden tener niveles de actividad normales o intermedios de factor dependiendo del balance en el mosaismo presente en sus células somáticas, donde alternativamente o el cromosoma X en fase con el *F8* normal o el *F8* mutado esta activo. El normal proceso de la inactivación al azar de uno de los cromosomas X en mamíferos, permite compensar las dosis de los genes ligados al X con los machos. Esta inactivación ocurre temprano en la embriogénesis, afecta casi todas las regiones del cromosoma X con escasas excepciones (Brown & Willard, 1990) y genera individuos femeninos que son mosaicos de células conteniendo o bien el cromosoma X materno (X_m) inactivo, o bien el X paterno (X_p) inactivo. Una vez ocurrida, en cada célula somática, esta inactivación es hereda clonalmente y permanece inalterada durante toda la vida adulta. Usualmente las mujeres son portadoras asintomáticas debido a que la inactivación del cromosoma X se produce al azar con aproximadamente igual proporción de células con el cromosoma X_p activo y el X_m activo (Favier et al, 2000). La evidencia fenotípica de la enfermedad en desordenes recesivos ligados al cromosoma X es un fenómeno inusual. Sin embargo la literatura muestra reportes de mujeres sintomáticas heterocigotas para mutaciones en el gen del *FVIII* y con sesgo completo en la inactivación del cromosoma X.

El sistema HUMARA (*human androgen receptor*) es un método que permite analizar la inactivación del cromosoma X, basado en la correlación demostrada entre el estado de metilación del primer exón del gen y el estado de inactivación del cromosoma X sobre el cual reside.

La determinación de la inactivación no al azar (sesgada) del cromosoma X no sólo tiene un importante valor para poder explicar el estatus de porta-

dora sintomática en desórdenes recesivos ligados al cromosoma X (Puck & Willard 1998) como HA, sino también permite la investigación de clonalidad en enfermedades proliferativas (Vogelstein et al, 1985).

El objetivo de este presente trabajo fue proponer estudiar la cigosidad de mutaciones causales de hemofilia A severa caracterizadas en mujeres relacionadas a familias afectadas mediante el screening molecular de mutaciones pequeñas por CSGE (*conformation sensitive gel electrophoresis*) sobre todo el marco codificante del gen del factor VIII (FVIII) de coagulación y secuencias clave para el correcto *splicing* y mediante el estudio de la inversión del intrón 22 e intrón 1. También fue desarrollar y validar el sistema del gen HUMARA (*human androgen receptor*) para el análisis de sesgo (desbalance) en la inactivación del cromosoma X humano en mujeres sanas, normales (46, XX), y la aplicación de esta metodología al estudio de mujeres portadoras sintomáticas de hemofilia A. Asimismo fue propuesto el estudio del espectro del patrón de inactivación del cromosoma X y su asociación con el nivel de FVIII:C y la determinación de las causas de la expresión de la hemofilia en cada una de las pacientes estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada y extracción de DNA para el estudio del gen del FIX .

Fueron estudiadas un total de 72 mujeres de 61 familias con HA severa, con registro de los niveles de FVIII:C y 20 controles de la población general Argentina sin datos de FVIII:C.

Las muestras de DNA genómico fueron obtenidas alternativamente por el método de *salting out* (Lahiri, Nuremberg, 1991) o fenol-cloroformo (Sambrook et al, 1989) y precipitación alcohólica, desde leucocitos de sangre periférica en probandos, miembros de familias con HA e individuos control. La calidad y concentración de las muestras de DNA fue estimada por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV (260-280 nm).

Análisis del gen del FVIII.

Todas las secuencias exónicas relevantes del gen del FVIII (*F8*, el promotor, los 26 exones y las secuencias consenso asociadas al *splicing*) fueron amplificadas en una reacción de PCR múltiple (x4) (que incluye el análisis conjunto de 4 exones), 16 reacciones PCR multiplex (x2), en las cuales se analizan dos exones simultáneamente, y una reacción PCR simple (x1),

cuyos tamaños moleculares (227-612 pb), características y diseño estaban de acuerdo al método de *screening* de mutaciones elegido, CSGE (conformation sensitive gel electrophoresis) (Rossetti et al 2004). El termo-ciclado estándar óptimo consta de: treinta y cinco ciclos de 94°C, 30 seg.; 55°C (50°C o 58°C) 1 min.; 72°C 2 min.; precedidos por 94°C, 3 min. y seguidos por 5 min. a 72°C. Para el estudio de la inversión del intrón 22 e inversión del intrón 1, se aplicó la técnica de IS-PCR diseñada y desarrollada en nuestro laboratorio (Rossetti-Radic, et al, 2008).

Estudio de la inactivación del cromosoma X.

Dos microgramos de ADN genómico son tratados (o no tratados) con 20 U de la enzima de digestión HpaII (Fermentas, USA), las condiciones incluyen una digestión de 24 horas en 20 µl de volumen final a 37°C con el buffer recomendado y posterior inactivación de la enzima por 20 minutos a 65°C. Cuatro microlitros del ADN tratado o no tratado son sometidos por separado a la reacción PCR que amplifica el primer exón del gen *AR* (sistema HUMARA). Los *primers* se muestran en la tabla 1. Para el ajuste de la reacción PCR se aplicaron 2 condiciones distintas: *primer* HUMARA F marcado radioactivamente o *primers* sin marca. Para la reacción de marcación del *primer* se incubaron 10 pmoles de *primer*, por 1 hora a 37°C, utilizando la enzima T4 Polinucleótido Kinasa (Fermentas), el buffer T4 Polinucleótido Kinasa y γ -P³²-ATP. En la reacción PCR se incluyeron 3 µl del ADN digerido o no digerido, 200 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂ y 0,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Promega, Argentina). En la reacción que incluía el *primer* marcado, éste se agregó en relación 4:1 con el oligonucleótido no marcado, en un volumen final de 15 µl, en el caso de la reacción sin marcación radioactiva 0,6 mM de cada *primer* fueron agregados para obtener un volumen final de reacción de 25 µl. Para el análisis de los resultados de productos PCR marcados, se utilizaron geles de poliacrilamida al 5% (7 M urea, 29:1 acrilamida:bisacrilamida, 10X TBE), las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 70°C durante 2 minutos en el momento y se sembraron 2 a 3 ml de cada reacción. Finalizada la electroforesis, se adhirió el gel a papel Whatmann 3MM, se lo cubrió con film y se secó en un equipo secador de geles (Gibco BRL GD40/50D) durante 1 hora a 80°C. El gel ya seco se expuso para impacto de partícula β^+ sobre placas radiográficas (CP-BU, Afga) entre pantallas amplificadoras durante un mínimo de 18 horas a temperatura ambiente. Las placas se revelaron y fijaron por métodos convencionales. En el caso de amplificación PCR con oligonucleótidos no marcados, los resultados son primero analizados por electroforesis en geles

de poliacrilamida de 10 cm de largo al 11% (29:1 acrilamida:bisacrilamida) en condiciones no desnaturalizantes, para estimar la presencia (densidad) o ausencia de señal. Los resultados obtenidos son analizados en geles poliacrilamida de 40 cm al 12% (37.5:1 acrilamida:bisacrilamida), con *buffer* TBE 1X, en condiciones no desnaturalizantes, por 16-18 hs, a una diferencia de potencial constante (450 V). La lectura de resultados se realizó por coloración con plata. Los resultados fueron registrados por fotografía y la densidad de las señales analizada mediante el programa GELPRO32.

Tabla 1: Oligonucleótidos *primers* para el estudio HUMARA

Primer	Secuencia (5'>3')	Tamaño (pb)	MgCl ₂ [mM]	NG_009014.1 (nt)
HUMARA-F	TTCAGAACTCTGTTCCAGAGCGTGC	(255-324)*	1.5	1184-1207
HUMARA-R	GCTGTGAAGTTGCTGTTCTCAT			1448-1471

* El tamaño del amplímero dependerá del número de repeticiones del trinucleotido CAG (255-324 pb)

Análisis del patrón de inactivación del cromosoma X (XIP)

El XIP fue calculado mediante la fórmula $XIP = 100 - 50 \times (A'/A) \times (A+B) / (A'+B')$, siendo A y B las señales del ADN no-tratado, y A' y B' las correspondientes al tratamiento con la enzima de restricción sensible a mutilación (HpaII).

Secuenciación de ADN

Tanto los amplímeros exónicos con patrones o movilidad anómalos en el análisis por CSGE como los productos de amplificación del primer exón del gen *AR*, en el caso que fuesen homocigotas, fueron sometidos a secuenciación manual o automática y se procedió a la lectura de las secuencias y su comparación con las secuencias de referencia correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la serie de 72 mujeres de familias con hemofílicos A severos incluidas en el estudio, los casos donde el probando tenía realizado el diagnóstico, directamente se buscó el cambio específico en las mujeres de la familia. En los casos donde el probando no tenía estudiada la mutación o no se tuvo

acceso a su muestra, se aplicó el algoritmo de análisis para el *F8* sobre la eventual portadora. La serie mostró 44 mujeres portadoras de HA severa, 4 indeterminadas y 24 no portadoras. El espectro de mutaciones encontradas en las mujeres del estudio se muestra en la tabla 2. Los casos donde no se pudo establecer el status de portadora de hemofilia, fueron excluidas del estudio final de inactivación del cromosoma X.

Ajuste y validación de distintos abordajes para el análisis de los patrones de inactivación del cromosoma X mediante el sistema HUMARA.

Para estudiar patrón de inactivación del cromosoma X (XIP), primero se ajustó el método de análisis del sistema HUMARA de referencia descrito por Allen y colaboradores (1992), en muestras de ADN genómico humano control. En primera instancia, se ajustó un esquema de amplificación por PCR *touch down*, utilizando distintos ciclados hasta obtener una señal específica neta en geles de poliacridamida no desnaturizante de baja resolución (10 cm y tinción con plata). Con el objetivo de evitar el uso de radioisótopos, se desarrollaron tres métodos alternativos para el análisis del XIP. Catorce casos; tres casos de la población control (CN7, CN9, CN12), cinco casos de mujeres portadoras confirmadas de HA (P5, P6, P7, P8, P10), cuatro casos de mujeres no portadoras confirmadas (NP2, NP3, NP6, NP7) y dos casos indeterminados (ND1, ND2), fueron estudiados simultáneamente mediante el abordaje de referencia con el uso de marcación radioisotópica y desarrollo de autorradiografías por exposición (Allen *et al*, 1992) y tres métodos alternativos para resolución electroforética del producto obtenido por PCR-*touchdown* no radiactiva.

Los métodos alternativos utilizados fueron: (1) electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante, de alta resolución (en las mismas condiciones que los geles para secuenciación de ADN descritos por Allen *et al*, 1992, pero sin el uso de radioisótopos) (Naumova *et al*, 1995), (2) electroforesis en gel de poliacrilamida medianamente desnaturizante de alta y baja resolución (CSGE) y (3) electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizantes de alta resolución (materiales y métodos). En todos los casos el revelado fue por tinción con sales de plata. Para la elección del método óptimo se determinó la capacidad de discriminación de dos alelos contiguos (e.g., 24-25 repeticiones del motivo CAG del microsatélite-HUMARA) y la reproducibilidad del método. El método (3) presentó un mayor poder de discriminación alélica y mejor reproducibilidad en tres experimentos independientes.

El análisis preliminar de amplímeros mediante el sistema (3) de baja resolución fue realizado para identificar la presencia y abundancia relativa de la/s señales específicas. En algunos casos aún con baja resolución fue posible determinar la presencia de señales en heterocigosis (Fig. 1). Sin embargo los geles de alta resolución permitieron resolver los alelos de todas las muestras heterocigotas, validando los resultados obtenidos mediante autorradiografías del método de referencia (Fig. 2, Tabla 2).

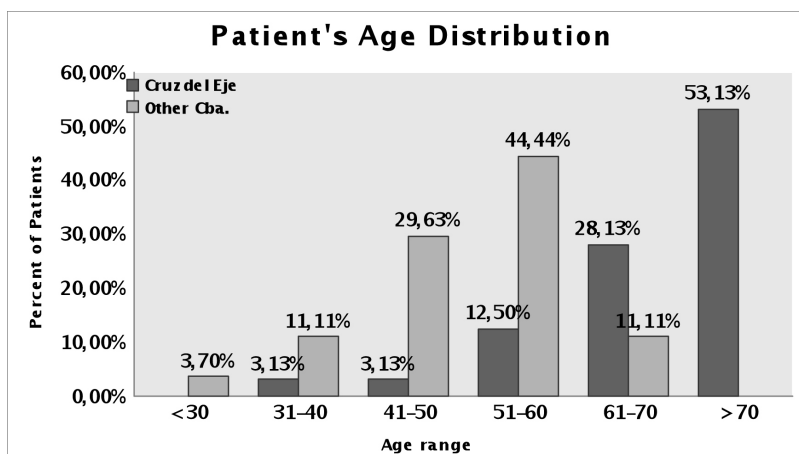


Figura 1. Análisis del sistema HUMARA mediante electroforesis de baja resolución. Se muestran las señales obtenidas a través de un gel de poliacrilamida de baja resolución para cuatro muestras, casos P3, P9, P11 y P16, en cada caso se detallan el tratamiento (D) o no (Sd) con la enzima de restricción sensible a metilación *Hpa*II. Nótese que a pesar de la resolución limitada, algunos casos muestran dos señales indicando la condición heterocigota para el polimorfismo de repetición (CAG)_n, caso P3 y P9. Esta instancia de análisis se aplica para poner en evidencia el éxito de la amplificación PCR y para el ajuste de intensidades para el análisis de alta resolución.

En la población control (para el ajuste técnico, sin datos de FVIII:C) (Tabla 2, CN), 14 de los 20 casos (70 %) resultaron heterocigotas para el polimorfismo (CAG)_n de HUMARA. En la población de portadoras de HA severa, 38 de las 44 mujeres estudiadas (86%) resultaron informativas y de las 24 no portadoras de HA, 21 (88%) también mostraron heterocigosis para el polimorfismo (CAG)_n del sistema HUMARA (Tabla 2), al igual que las cuatro mujeres indeterminadas (datos no incluidos en la tabla).

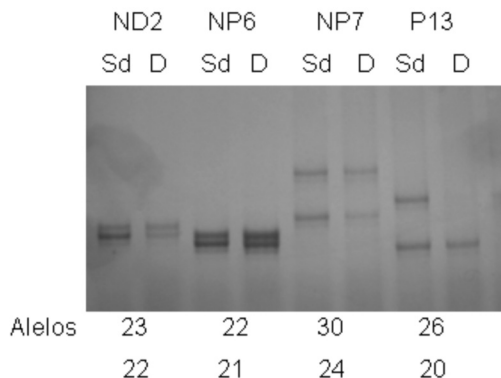


Figura 2. Detección señales del microsatélite HUMARA mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante de alta resolución. Se muestran las señales obtenidas en dos geles de poliacrilamida de alta resolución, con (D) y sin (Sd) aplicación del tratamiento con la enzima HpaII. Nótese que pueden distinguirse dos señales contiguas correspondientes a un único trinucleótido CAG de diferencia. Resultados de una muestra indeterminada (ND2), dos casos de no portadoras (NP6 y NP7) y una portadora (P13). El caso P13, muestra sesgo completo, i.e., el tratamiento con la enzima de restricción sensible a metilación solo el alelo 20 es amplificado.

Tabla 2. Tabla integrada de la serie de mujeres analizada con datos clínicos individuales, datos de inactivación del cromosoma X y de la caracterización molecular y cigosidad de mutaciones en el *F8*.

Caso	FVIII:C UI/dl	Edad (años)	Sistema HUMARA			XIP (%)		Mutación
			# Alelos	# Rep.	Longitud fragmento			
Portadoras heterocigotas								
P1	40	35	2	23/21	288/282	93.2		c.6919_6920delGA
P2	44	-	2	26/19	297/276	72		Inv22
P3	25	-	2	26/23	297/288	82.4		Inv22
P4	30	-	2	28/26	303/297	89.5		c.6769A>G p.2238Met>Val
P5	40	33	2	25/23	294/288	67.6	70.6	Inv22+/-
P6	80	35	2	24/20	291/279	59.8	55	c.1754T>C p.566Ile>Thr
P7	<1	14	2	25/24	294/291	79.5	75.1	c.4388_4391delCTTT
P8	40	25	2	23/22	288/285	54.4	58	c.6544C>T p.2163 Arg>Cys

Caso	FVIII:C UI/dl	Edad (años)	Sistema HUMARA			XIP (%)		Mutación
			# Alelos	# Rep.	Longitud fragmento			
P9	38	34	2	29/22	306/285	58		c.1909A>G p.618Asn>Asp
P10	<1	56	2	26/23	297/288	97.6	97.9	c.578G>C p.174Gly>Ala
P11	91	35	2	25/21	294/282	77		c.3061delAAGA
P12	79	28	2	25/19	294/276	74		c.6671G>A p.2209Arg>Gln
P13	65	30	2	26/20	297/279	97.4		Inv22
P14	34	28	2	32/26	315/288	55.6		Inv22
P15	1.5	22	2	29/27	306/300	99.2		c.4241C>A p.1395Ser>Stop
P17	76	15	2	24/21	291/282	74		Inv1
P18	107	35	2	27/18	300/273	51.3		c.1815C>A p.586Tyr>Stop
P19	103	41	2	19/22	276/285	91		c.1633delA p.1192delA
P20	16	20	2	21/22	283/285	87		c.1633delA p.1192delA
P21	46	-	2	24/21	291/283	68,8		Inv22
P22	32	37	2	23/22	288/285	54		c.2320C>T p.755Gln>Stop
P23	17	22	2	21/19	283/276	56.5		c.3633delA p.1192delA
P24	57	32	2	24/23	291/288	55,9		c.1718G>C p.554Cys>Ser
P25	78	19	2	25/23	294/288	56,3		c.6118T>C p.2021Cys>Arg
P26	55	9	2	25/21	294/283	57,1		c.6118T>C p.2021Cys>Arg
P27	42	35	2	25/16	294/267	57,6		c.3756delG Ex 14
P28	20	30	2	27/22	300/285	73,8		c.5130delT Ex 14
P29	46	-	2	26/25	297/294	85		Inv22
P30	70	28	2	25/21	294/283	66,6		c.6474T>C p.2139Ile>Ile
P31	1,2	-	2	23/19	288/276	92.8		P.O
P32	17	-	2	24/23	291/288	88,3		P.O
P33	110	18	2	24/22	291/285	61.6		Inv22
P34	<1	1	2	29/25	306/294	99,9		c.325A>G p.90Asn>Asp
P35	58	35	2	29/22	306/285	97,8		c.325A>G p.90Asn>Asp
P36	93	37	2	29/25	306/294	85,8		c.325A>G p.90Asn>Asp
P37	58	32	2	29/25	306/294	97,9		c.325A>G p.90Asn>Asp
P38	50	54	2	25/22	294/285	56,6		c.325A>G p.90Asn>Asp
Portadoras homo-hemicigota								
P16	1.5	24	2	27/22	300/285	81.4		c.3633delA Ex14 **
No Portadoras								
NP1	57	35	2	25/19	294/276	53.4		NP
NP2	72	34	2	27/25	300/294	62.8	64.7	NP

Caso	FVIII:C UI/dl	Edad (años)	Sistema HUMARA			XIP (%)		Mutación
			# Alelos	# Rep.	Longitud fragmento			
NP3	117	25	2	35/30	324/309	61.5	55.6	NP
NP4	110	31	2	27/26	300/297	66.2		NP
NP5	77	27	2	25/23	294/288	61.8		NP
NP6	99	21	2	22/21	285/282	60.5	61.3	NP
NP7	97	28	2	30/24	309/291	61.4	61.6	NP
NP8	92	-	2	24/21	291/282	67.9		NP
NP9	81	-	2	26/21	297/282	53.4		NP
NP10	168	18	2	28/25	303/294	91.6		NP
NP11	88	35	2	25/17	294/270	65.2		NP
NP12	135	21	2	20/19	279/276	57		NP
NP13	92	24	2	20/19	279/276	67		NP
NP14	120	24	2	27/22	300/285	78		NP
NP15	298	-	2	25/24	294/291	65.5		NP*
NP16	102	26	2	26/23	297/288	71.3		NP
NP17	47	17	2	26/23	297/288	80.2		NP
NP18	87	17	2	22/21	285/282	70,5		NP
NP19	33	13	2	22/20	285/279	73,9		NP
NP20	102	-	2			70.6		NP
NP21	71	-	2			95.7		NP
Controles								
CN1		58	2	27/22	300/285	55.9		-
CN2		20	2	22/19	285/276	67.2		-
CN3		50	2	24/22	291/285	71.4		-
CN4		51	2	29/22	306/285	64.1		-
CN5		41	2	26/24	297/291	56.4		-
CN6		74	2	29/25	306/294	51.3		-
CN7		-	2	26/23	297/288	60.5	64.5	-
CN8		40	2	25/23	294/288	75.3		-
CN9		-	2	24/22	291/285	79.4	82,3	-
CN10		-	2	22/11	285/255	71.2		-
CN11		34	2	20/19	279/276	80.1		-
CN12		-	2	30/23	309/288	78.1	85.5	-
CN13		69	2	25/22	294/285	79.9		-
CN14		-	2	25/21	294/282	96.9		-

En la tabla se detallan, el número de caso asociado al estado de portadora (P), no portadora (NP) o a los casos control de la población Argentina general (CN). El nivel de factor VIII (FVIII:C) en UI/dl, se indica sólo en los casos que corresponde (los casos CN no tienen mediciones de FVIII:C),

la edad, el número de alelos HUMARA, el número de repeticiones del trinucleótido (CAG)_n, el tamaño de cada fragmento de amplificación y el patrón de inactivación del alelo HUMARA (XIP): para Portadoras y No Portadoras obtenidos a partir de mediciones en geles nativos de poliacrilamida y tinción con plata; en los controles, mediciones de las señales en placa autorradiográfica. En los casos que se muestran dos valores en la columna del XIP, el primero corresponde al resultado obtenido por mediciones de las señales en placa autorradiográfica, y el segundo a mediciones en geles de poliacrilamida y tinción con plata. En la última columna se detalla el tipo de mutación en heterocigosis, en las portadoras. P.O indica portadora obligada y NP no portadora. Ex indica exón del *F8*, y Do, dominio involucrado en la mutación. * Embarazada. ** Indica la presencia de la mutación en homo-hemicigosis.

Estimación cuantitativa del patrón de inactivación del cromosoma X (XIP).

La evaluación densitométrica cuantitativa de las señales de las autoradiografías y geles teñidos con plata coloidal capturadas por fotografía digital fue realizada con asistencia de *Software* especializado (Fig. 3). El patrón de inactivación del cromosoma X (XIP: *X-chromosome Inactivation Pattern*), es un porcentaje asimétrico cuyos límites inferior 50% y superior 100% indican ausencia de sesgo y sesgo completo, respectivamente. En la tabla 2 se detallan los resultados de XIP obtenidos para todas las muestras 82 casos (se excluyen cuatro casos indeterminados para el *F8* y seis casos de la población general con un único alelo HUMARA). Los datos del XIP fueron obtenidos como un promedio entre tres mediciones densitométricas de ensayos repetidos e independientes para asegurar reproducibilidad.

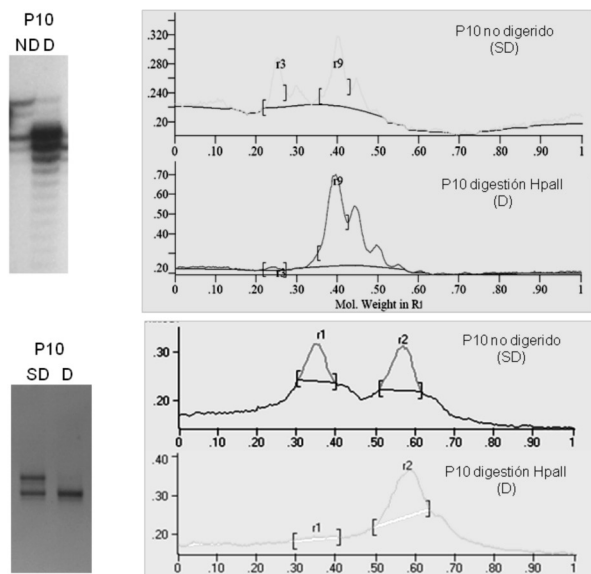


Figura 25. Densitometría de señales del sistema HUMARA y comparación de métodos. A. Análisis de la placa autoradiográfica de la muestra P10. Señales obtenidas con (D) y sin (SD) el tratamiento con la enzima HpaII, XIP 97,6%. B. Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante teñido con plata de la muestra P10, XIP= 97,9%. Igual que en (A) panel superior muestra las señales sin digestión (SD), y panel inferior, las señales obtenidas después del tratamiento con HpaII (D).

Asociación entre el XIP y los niveles de FVIII:C.

EL objetivo de correlacionar el FVIII:C con el XIP en sangre periférica es explorar la utilidad de estudiar el XIP en leucocitos de sangre periférica para sustentar el eventual desarrollo de síntomas de HA en mujeres portadoras heterocigotas. Los resultados de esta asociación se muestran en la tabla 3.

Asociación FVIII:C-XIP		
	XIP $\geq 90\%$	XIP $< 90\%$
FVIII:C extremo ($\geq 83,1$, $\leq 9,2$ UI/dl)	5	5
FVIII:C intermedio ($83,1$ - $9,2$ UI/dl)	4	23
Fisher $p = 0,0408^*$		

Los resultados mostraron modestas diferencias significativas ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

Este trabajo presenta el análisis de las causas de la expresión fenotípica de hemofilia en mujeres portadoras de HA severa, e investiga la asociación entre los niveles de FVIII:C en mujeres portadoras heterocigotas y controles y el patrón de inactivación del cromosoma X en muestras de sangre periférica.

La literatura muestra numerosos reportes de mujeres sintomáticas de hemofilia asociada a sesgo extremo en el patrón de inactivación del cromosoma X en sangre periférica y una mutación causal de hemofilia en heterocigosis (Nissen *et al*, 1989; Kling *et al*, 1991; Orstavik *et al*, 1999; Bicocchi *et al*, 2005).

En este trabajo se presentaron seis mujeres con fenotipo de HA severa, de ellas cinco resultaron heterocigotas para la mutación causal de hemofilia, y entre ellas cuatro, P10, P15, P31 y P34, mostraron sesgo completo en la inactivación del cromosoma X (XIP>90%), proveyendo una explicación directa para la expresión clínica de hemofilia en estas cuatro mujeres (inactivación preferencial del X ligado al *F8* mutado). Una mujer con fenotipo de hemofilia A severa, P16, resultó singular, pues mostró la microdelección c.3633delA en homo-hemicigosis (posiblemente asociado a consanguineidad) explicando la expresión fenotípica de HA severa en este caso. El caso P7, mostró el cambio c.4388_4389delCTTT en heterocigosis asociado a un patrón de inactivación no sesgado del cromosoma X (XIP 75%).

El sesgo en la inactivación del cromosoma X permitió explicar la causa de la expresión fenotípica en cuatro de las cinco mujeres portadoras sintomáticas de HA severa.

En contraste con la literatura (Orstavik *et al*, 2000) la población estudiada mostró una modesta asociación significativa entre los niveles de FVIII:C y el XIP en muestras de sangre periférica. Las diferencias encontradas con la literatura, se deberían principalmente a que la serie estudiada presenta un alto número de portadoras sintomáticas y que en este trabajo únicamente se estudiaron mujeres portadoras de HA severa. Asimismo se incluyó el grupo de no portadoras (relacionadas a pacientes con HA severa) como control.

ABSTRACT

Hemophilia is an X-linked bleeding disorder affecting 1 in 10,000 males in all human populations. Hemophilia A (HA) is characterized by deficit of coagu-

lation factor FVIII (FVIII). HA is not clinically distinguishable from hemophilia B (HB), associated with coagulation factor IX decrease; and is approximately 5 times more frequent than HB.

In hemophilia, as an X-linked recessive disease, males are affected whereas women are generally asymptomatic. Phenotypic evidence of hemophilia in women is an unusual phenomenon. However, most reports in the literature associated symptomatic heterozygous women for mutations in the FVIII gene with extremely skewed X-chromosome inactivation.

This work presents a molecular study of 72 women related to patients with severe hemophilia A, using a scheme for molecular analysis of the entire FVIII gene to determine the carrier status and zygosity in each one of them. In our patient's series we found, in the patients studied, 44 severe HA carriers, 24 non-carriers and 4 remained indeterminate. To study the cause of severe HA expression in heterozygous female carriers a system of the gene HUMARA for estimating X-inactivation patterns (XIP) was adjusted and validated. We studied six women with severe HA: one showed a hemi-homozygous mutation, c.3633delA, four showed heterozygous mutations with extremely skewed XIP, and one case, heterozygous for c.4388_4391delCTTT, showed a non skewed XIP in peripheral blood leukocytes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen R, Zoghbi H, Moseley A, Rosenblatt H, Belmont J. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51:1229-39
2. Brown CJ, Willard HF. Localization of a gene that escapes inactivation to the X chromosome proximal short arm: implications for X inactivation. *Am J Hum Genet* 1990; 46(2):273-9.
3. Favier R, Lavergne JM, Costa JM, Caron C, Mazurier C, Viéumont M, Delpech M, Valleix S. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood*. 2000 15; 96(13):4373-5.
4. Lahiri DK, Nuremberg JL. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444.
5. Naumova AK, O'Brien L, Bird LM, Slamka C, Fonseca M, Verner A, Wang M,

- et al (1995) Transmission-radio distortion of the X chromosome among the male offspring of females with skewed X inactivation. *Dev Genet* 17: 198-205.
6. Orstavik KH, Scheibel E, Ingerslev J, Schwartz M. Absence of correlation between X chromosome inactivation pattern and plasma concentration of factor VIII and factor IX in carriers of haemophilia A and B. *Thromb Haemost.* 2000 Mar; 83(3):433-7.
 7. Puck J and Willard H. X inactivation in females with X-linked disease. *The New England Journal of Medicine.* 1998, 338 (29): 325-328.
 8. Radic CP, Rossetti LC, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving *int22h* and *int1h* hotspots in the factor VIII gene. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008; 6: 830-6.
 9. Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Homeologous recombination between AluSx-sequences as a cause of hemophilia. *Human mutation* 2004 MIB #759 24(5): 440.
 10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York / USA, 1989.



EPIDEMIOLOGÍA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, GENOTIPO 2 (HCV-2) EN LA REGIÓN CENTRAL DE ARGENTINA

Viviana Ré^{1,5}; Andrés Culasso²; Silvia Mengarelli³; Adrián Farías¹; Fabián Fay⁴; Belén Pisano¹; Osvaldo Elbarcha⁵; Marta Contigiani¹; Rodolfo Campos²

¹Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. ²Cátedra de Virología, FFyBqca - UBA, ³Hospital San Roque, ⁴CIBICI-Rosario. ⁵Cátedra de Virología Fac. Cs Químicas- Universidad Católica de Córdoba.

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (HCV) es el principal agente causante de hepatitis crónica, cirrosis y cáncer de hígado, en el mundo (Poynard et al., 2003). Basado en la divergencia de la secuencia de nucleótidos se lo ha clasificado en 6 genotipos y numerosos subtipos (Simmonds, et al., 2005).

Mundialmente, la distribución de genotipos y subtipos es marcadamente heterogénea, aún en regiones geográficamente cercanas. Los genotipos 1, 2 y 3 están ampliamente distribuidos en el mundo mientras que los genotipo 4, 5 y 6 están confinados a áreas geográficas limitadas (Zein, 2000). Sin embargo, la distribución de genotipos se modifica continuamente debido tanto a cambios culturales que se asocian con nuevas conductas de riesgo como a movimientos poblacionales (Bortoloni et al., 2005).

Asimismo, la diversidad de las secuencias de HCV continua siendo el mayor obstáculo para el desarrollo de vacunas y terapias efectivas (Hultgren et al., 2004; Kaplan et al., 2005).

Esta diversidad de HCV es también un importante factor en la respuesta al tratamiento antiviral; la predicción de la respuesta virológica sostenida, post-tratamiento y la elección de la duración del tratamiento dependen del genotipo. Siendo el genotipo 1 el de mayor resistencia a la terapia (Hadziyannis et al., 2004).

La heterogeneidad genética de HCV y la forma de diseminación del virus entre los pacientes infectados puede ser examinada con exactitud mediante el análisis molecular (secuencia de nucleótidos) y bioinformático (análisis filogenético y de coalescencia). La utilización de esta estrategia experimental, ha permitido dilucidar brotes producidos en centros de hemodiálisis (Spada

E, et al. 2008) o establecer origen y vías de diseminación de este virus en diferentes regiones y a través del tiempo (Njouom R, et al. 2007, Thomas F, et. al. 2007, Arbegel A, et al. 2007).

En estudios previos se ha descrito la diversidad del genotipo 2 de HCV en Europa y África (Ruggeri et al., 1996; Martinot-Peignoux et al., 1999; Candotti et al., 2003, Martial et al., 2004; Ansaldi et al., 2005, Thomas et al., 2007, Njouom, et al. 2007, Cantaloube et al., 2008) pero poco se ha publicado hasta el momento, sobre la diversidad y características epidemiológicas del genotipo 2 en Sud América.

En estudios realizados en la región metropolitana (Ciudad de Buenos Aires y alrededores) y en regiones cercanas como es el sur de Brasil se ha demostrado una mayor prevalencia del genotipo 1 (principalmente 1b) (Oubiña et al. 1995, Picchio et al. 2006, Quarleri et al. 1998, 2000, da Silva et al., 2007). Sin embargo, estudios previos realizados en Córdoba muestran que la prevalencia de HCV varía entre 3- 11% y que el HCV-2 es el principal representante de estas infecciones (>50%) (Ré V et al., 2003, 2007; Mengarelli, 2006 a, b).

El objetivo de este estudio fue profundizar en el estudio molecular de un genotipo de baja circulación en el mundo (HCV-2) y analizar la hipótesis sobre su origen y diversificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: se estudiaron muestras de suero o plasma extraídas de pacientes de Cruz del Eje, provenientes de un estudio epidemiológico poblacional realizado en 2004 en el cual se analizaron 1870 muestras (Mengarelli, 2006a). Y muestras provenientes de individuos habitantes de la ciudad de Córdoba y otras ciudades más pequeñas de la provincia, que acudieron en forma regular al Instituto de Virología desde 1999 a 2008 para realizarse el diagnóstico molecular confirmatorio y genotipificación de HCV. Todas las muestras fueron obtenidas bajo consentimiento informado y con aprobación del comité de ética en investigación, Polo Sanitario del Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba y de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

RT-PCR y secuenciamiento

El ARN fue extraído del suero usando el reactivo comercial Trizol (Invitrogen - Carlsbad, CA) según las indicaciones del fabricante. La transcripción

reversa se realizó usando la enzima MMLV-RT (Promega) con primers al azar. Posteriormente, siguiendo el protocolo descrito por Chen & Weck, 2001, se realizó la amplificación (Nested PCR), de un fragmento de 367pb de la región NS5B usando Go Taq (Promega). Luego, a fin de amplificar un fragmento de la región E1/E2 se diseñaron los primers detallados en la Tabla 1. La amplificación del fragmento de 677pb de dicha región se realizó mediante Nested PCR usando 400 nM de los primers 2c-ES y 2c-EA para el Ciclado I (25 ciclos), y 400 nM de 2c-IS y 2c-IA para el Ciclado II (40 ciclos). En ambos casos las mezclas de PCR contenían 1.5 mM de Mg⁺⁺, 200 nM de cada dNTP y 1.25 U de Taq Polimerasa. La mezcla fue sometida a una desnaturalización inicial a 94 °C - 5min, luego se aplicó el siguiente programa: desnaturalización: a 94°C -1min, annealing: 55°C- 1min y extensión: 72°C, 1 min. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron directamente por MacroGen Inc.

Tabla 1. *Primers* utilizados para la amplificación del fragmento E2 del subtipo 2c de HCV.

Nombre	Secuencia	Inicio*	Final*
2c-ES	5'-TGG GAT ATG ATG AAC TGG T-3'	1298	1319
2c-EA	5'-AAT GCC ACA GCC TGT ARG GRT A-3'	2204	2183
2c-IS	5'-GGG GGC GTG GGC MAA RGT-3'	1435	1452
2c-IA	5'-TGA ARC AGT CYG TGG GGC A-3'	2111	2093

* Posiciones relativas al genoma de referencia del subtipo 2c de HCV BEBE1 nro. De acceso D50409.

Análisis Estadísticos

Se calculó la edad media de los pacientes al año 2004. Sólo se incluyó las muestras secuenciadas en la región NS5B. La diferencia de edades se analizó usando el test *t* de student, luego de comprobar la distribución normal y similitud de varianzas con el programa Graph Pad Prism 4 Software.

Análisis de Secuencias

Para analizar las secuencias obtenidas se procesaron construyeron 3 pares de matrices de datos, cada par correspondiente a secuencias NS5B y E2: 1) el primer par contenía todas las secuencias obtenidas (NS5B y E2), 2) secuencias sólo de Cruz del Eje (CdE NS5B y CdE E2), y 3) secuencias de otras localidades de Córdoba (OCL NS5B y OCL E2). Una última matriz

se generó con todas las secuencias NS5B obtenidas y todas las secuencias disponibles en Genbank para el subtipo 2c de HCV.

Para la genotipificación todas las secuencias de ambas regiones NS5B y E2 se alinearon usando el programa ClustalX con una base de datos de secuencias de referencia (Thompson et al., 1997). Los árboles filogenéticos fueron contruidos con el método neighbor joining usando el modelo Maximum Composite Likelihood con el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007). El bootstrap fue calculado analizando 1000 pseudoréplicas.

El análisis filogenético se construyó bajo el criterio de Maximum Likelihood con el programa PhyML. El modelo de sustitución nucleotídica fue acorde a lo sugerido por el ModelTest 3.7 (Akaike Information Criterion) para cada matriz analizada.

La edad del ancestro común más reciente (tMCRA) de las secuencias se calculó para las matrices de NS5B mediante el análisis Bayesiano de coalescencia [*Monte Carlo Markov Chains Bayesian Coalescent* (MCMC)] implementado en el programa BEAST 1.4.8 (Drummond et al., 2007). La tasa de sustitución usada para la región NS5B fue 5×10^{-4} sustituciones por sitio por año (s/s/y) y para E2 7.9×10^{-4} s/s/ (Pybus et al. 2001). Los Skylines Bayesianos (Bayesian Skyline Plots) fueron corridos bajo diferentes modelos de reloj molecular (estricto, no correlacionado log-normal y no correlacionado exponencial).

Secuencias de referencias

Para la genotipificación se obtuvo de NCBI Viral Genotyping Tool un panel de secuencias genómicas de referencia de HCV: Subtipo 1a: AF009606, AF011751, AF271632; Subtipo: 1b: D90208, AB049088, AF356827, AF139594; Subtipo: 1c: D14853, AY051292; Subtipo: 2a: D00944, AF169004, AB047639, AB047641; Subtipo: 2b: D10988, AF238486, AB030907, AY232730; Subtipo: 2c: D50409; Subtipo: 2i: DQ155561; Subtipo: 2k: AB031663; Subtipo: 3a: D17763, D28917, AF046866; Subtipo: 3b: D49374; Subtipo: 3k: D63821; Subtipo: 4a: Y11604; Subtipo: 5a: Y13184, AF064490; Subtipo: 6a: Y12083; Subtipo: 6b: D84262; Subtipo: 6d: D84263; Subtipo: 6g: D63822; Subtipo: 6h: D84265; Subtipo: 6k: D84264.

Para el análisis filogenético se utilizaron 56 secuencias de la región NS5B de subtipo 2c de HCV obtenidas de Genbank. Trece se descartaron debido a que alineaban sólo parcialmente con las secuencias obtenidas en este estudio. Las 43 secuencias usadas provenían de Alemania, Estonia, Canadá, Rusia, Lituania, Martinica, Italia y la mayoría (22/43) de Francia. Todas las secuencias de la región E1-E2, obtenidas de Genbank para el sub-

tipo 2c de HCV se descartaron debido a que no se encontraba secuenciado en ellas el segmento amino terminal de E2 (región hipervariable 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis estadísticos

El 80% de las muestras genotipo 2 analizadas se aislaron de pacientes mayores de 45 años. Cuando se discriminó entre las regiones geográficas estudiadas se halló diferencia entre la distribución de HCV-2 y la edad de los pacientes.

En Cruz del Eje el 80% de los pacientes tenía entre 61-80 años, mientras que en las muestras del resto de Córdoba los pacientes infectados fueron más jóvenes, el 70% tenía entre 45 y 60 años (Fig. 1). La edad media de los pacientes de Cruz del Eje (CdE) fue 66.15 ± 1.524 años y para los pacientes de otras localidades (OCL) fue de 49.77 ± 2.151 años. La diferencia hallada entre las edades se calculó en 16.38 ± 2.636 años y fue estadísticamente significativa $p < 0.0001$ (test-t Student).

Esta prevalencia de HCV – 2 en pacientes de mayor edad coincide con lo relatado previamente en estudios realizados en Italia en los cuales se la asoció a infecciones adquiridas en la comunidad, transmisión iatrogénica y/o hepatitis postransfusional (Ansali et al., 2005, Bortolloni et al., 2005).

La diferencia de edad hallada entre los dos grupos de muestras estudiados podría deberse: 1) a que en CdE este tipo viral circuló con anterioridad y luego se dispersó al resto de Córdoba, 2) a una vía especial de transmisión, 3) a que en la ciudad de Córdoba los pacientes tienen mayor acceso a información, a los centros de salud y por tanto a la terapia antiviral, con la consecuente disminución de la circulación viral en edades mayores.

Es importante destacar que los pacientes de CE no habían recibido terapia antiviral y han convivido con el virus hasta altas edades poniendo de manifiesto la baja virulencia de este subtipo viral.

Amplificación de las regiones NS5B y E2

De las 145 muestras de suero en 114 (88 CE + 26 OCL) se logró amplificar el fragmento de la región NS5B. De éstas se logró obtener 75 (49 CE + 26 OCL) secuencias NS5B aptas para secuenciamiento y análisis filogenéticos. De éstas, 42 también resultaron positivas en la reacción de PCR para la región E2 y 37 fueron secuenciadas y analizadas.

Análisis de Secuencias

El árbol generado por neighbor joining (Figura 2) con todas las secuencias NS5B obtenidas y las secuencias de referencia muestra que todas las cepas de HCV (CE y OCL) resultaron ser subtipo 2c, agrupando con un alto valor de bootstrap con el genoma de referencia D50409 (HCV-2c). Resultados similares se obtuvieron con las secuencias de la región E2.

En general, las secuencias Argentinas agruparon estrechamente con las secuencias del Sud Oeste de Francia. Las muestras de Cruz del Eje agruparon estrechamente entre sí pero sin soporte de bootstrap (Figura 3).

El estudio de coalescencia (método Bayesiano) fue usado para estimar la historia demográfica y tMCRA de las muestras analizadas. Los gráficos Skyline Bayesianos para todas las bases de datos generadas fueron compatibles con el modelo logístico demográfico, mostrando un crecimiento poblacional lento, sin ningún evento de crecimiento significativo, siendo estable en el presente.

La tMCRA para cada base de datos fue: 1858 (1754 a 1925) para todas las NS5B, 1882 (1777 a 1929) para CE NS5B y 1891 (1807 a 1942) para OCL NS5B, no encontrando diferencia significativa entre ambas regiones. Para el análisis de la región E2 se prescindió de la región HVRI y se utilizó la tasa de sustitución estimada previamente por Pybus et al., 2001: 5×10^{-4} substitutions/site/year (s/s/y) como media y 9×10^{-5} como desviación standard. Los resultados hallados con esta región fueron similares a los hallados con NS5B.

No obstante, la sospecha epidemiológica de la circulación previa de HCV-2c en CE no debe ser descartada por el estudio molecular, ya que la edad similar en los ancestros indica que la diversidad de virus encontrada en CE y OCL es similar. Ésto es compatible con una amplia circulación de HCV-2c en la región sin importar su foco inicial.

La estimación del tMRCA 1858 años coincide con el crecimiento poblacional producido por la inmigración Europea a partir de 1880.

La suma de los resultados obtenidos: edad de los pacientes, baja prevalencia de genotipos modernos, relación filogenética entre las cepas Argentinas y Franco- Italianas y evidencia histórica de migración nos guían a la conclusión de que en Córdoba hubo una múltiple introducción de genomas HCV -2 durante el proceso de inmigración que fue dispersándose luego al resto de la población de la provincia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ansaldi F, Bruzzone B, Salmaso S, et al. 2005. Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. *J Med Virol* 76:327–32.
2. Bortolotti F, Resti M, Marcellini M, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in 373 Italian children with HCV infection: changing distribution and correlation with clinical features and outcome. *Gut* ;2005, 54: 852-857.
3. Abergel A, Ughetto S, Dubost C, et al. 2007. The epidemiology and virology of hepatitis C virus genotype 5 in central France. *Aliment Pharmacol and Ther* 26: 1437-46.
4. Candotti D, Temple J, Sarkodie F, et al. 2003. Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize hepatitis C virus infection in Ghana, West Africa. *J Virol* 77:7914–23.
5. Cantaloube JF, Gallian P, Laperche S, et al. 2008. Molecular characterization of genotype 2 and 4 hepatitis C virus isolates in French blood donors. *J Med Virol*. 80:1732-9.
6. Chen Z, Weck K. 2002. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol*. 40:3127-34.
7. da Silva CMD, Costi C, Krug LP, et al., 2007. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 867-70.
8. Drummond AJ, Rambaut A. 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology* 7:214
9. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. PEGASYS International Study Group 2004. Peginterferon alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140: 346-55.
10. Hultgren C, Desombere I, Leroux-Roels G, et al. 2004. Evidence for a relation between the viral load and genotype and hepatitis C virus specific T cell responses. *J Hepatol* 40:971–8.
11. Kaplan DE, Sugimoto K, Ikeda F, et al. 2005. T-cell response relative to genotype and ethnicity during antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 41:1365–75.
12. Martial J, Morice Y, Abel S, et al. 2004. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in the Caribbean island of Martinique: Evidence for a large radiation of HCV-2 and for a recent introduction from Europe of HCV-4. *J Clin*

- Microbiol 42:784–791.
13. Martinot-Peignoux M, Roudot-Thoraval F, Mendel I, et al. 1999. Hepatitis C virus genotypes in France: Relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *The GEMHEP. J Viral Hepat* 6:435-443.
 14. Mengarelli S, Correa G, Farias A, et al. 2006. ¿Por qué el virus de la Hepatitis C en Cruz del Eje?, *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, 36:S.3
 15. Mengarelli S, Kohn Ij, Correa G, et al. 2006. Circulación del Virus C en la Provincia De Córdoba, *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*. 36: S.3
 16. Njouom R, Nerrienet E, Dubois M, et al. 2007. The hepatitis C virus epidemic in Cameroon: genetic evidence for rapid transmission between 1920 and 1960. *Infect, Genetics and Evol* 7: 361-7.
 17. Oubiña JR, Quarleri JF, Rudzinski M, et al. 1995. Genomic characterization of hepatitis C virus isolates from Argentina. *J Med Virol* 47: 97-104.
 18. Quarleri JF, Robertson BH, Mathet VL, et al. 2000. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from argentine patients: a six-year retrospective study. *J Clin Microbiol* 38: 4560-68.
 19. Quarleri JF, Robertson BH, Mathet VL, et al. 1998. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus strains from Argentina. *Medicina (B Aires)* 8:153-9.
 20. Picchio GR, Bare PC, Descalzi VI, et al. 2006. High prevalence of infection with a single hepatitis C virus genotype in a small rural community of Argentina. *Liver Int* 26: 660-65.
 21. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, et al. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095–2100.
 22. Pybus OG, Drummond AJ, Nakano T, et al. 2003. The epidemiology and iatrogenic transmission of Hepatitis C virus in Egypt: A Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol* 20:381–387.
 23. Ré V, Lampe E, Yoshida CF, et al. 2003. Hepatitis C virus genotypes in Cordoba, Argentina. Unexpected high prevalence of genotype 2. *Medicina (B Aires)* 63: 205-10.
 24. Ré V, Contigiani M, Yoshida C, et al. 2007. Identification of hepatitis C virus subtype 2c by sequencing analysis in patients from Córdoba, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(8): 995-8.
 25. Ruggieri A, Argentini C, Kouruma F, et al. 1996. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 2 variants in West Central Africa (Guinea Conakry). *J Gen Virol* 77:2073–76.
 26. Simmonds P, Buck J, Combet C, et al. 2005. Consensus proposals for a

unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962–73.

27. Spada E, Abbate I, Sicurezza E, et al. 2008. Molecular Epidemiology of a Hepatitis C Virus Outbreak in a Hemodialysis Unit in Italy. *J Med Virol* 80: 261-7.
28. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
29. Thomas F, Nicot F, Sandres-Saune K, et al. 2007. Genetic Diversity of HCV Genotype 2 Strains in South Western France. *J Med Virol* 79:26-34
30. Thompson J, Gibson TJ, Plewniak F, et al. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-82.
31. Zein N. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13: 223-35.

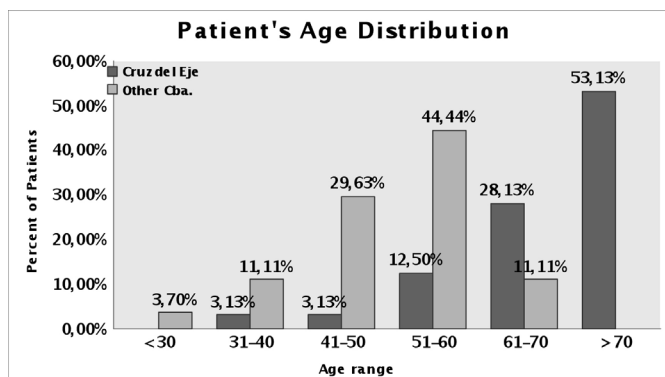


Figura 1. Distribución de subtipos 2c de HCV según los grupos etarios de los pacientes de Cruz del Eje y de otras localidades de Córdoba a 2004.

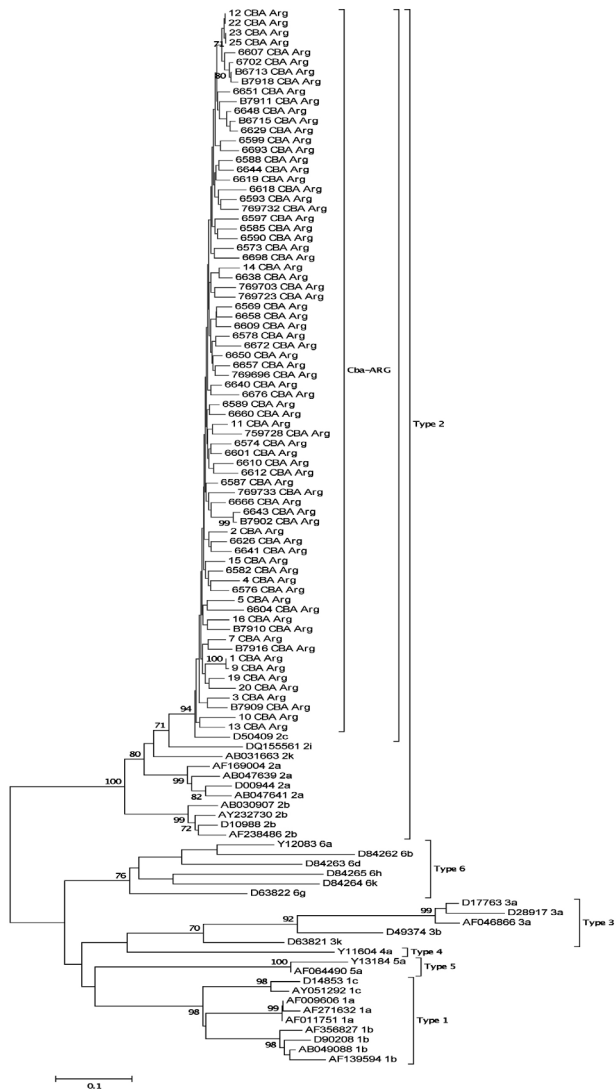


Figura 2. Árbol filogenético de la región NS5B (367bp) obtenido por neighbor joining y el modelo Maximum Composite Likelihood a partir de las 75 secuencias obtenidas de este estudio y 34 secuencias de referencia.

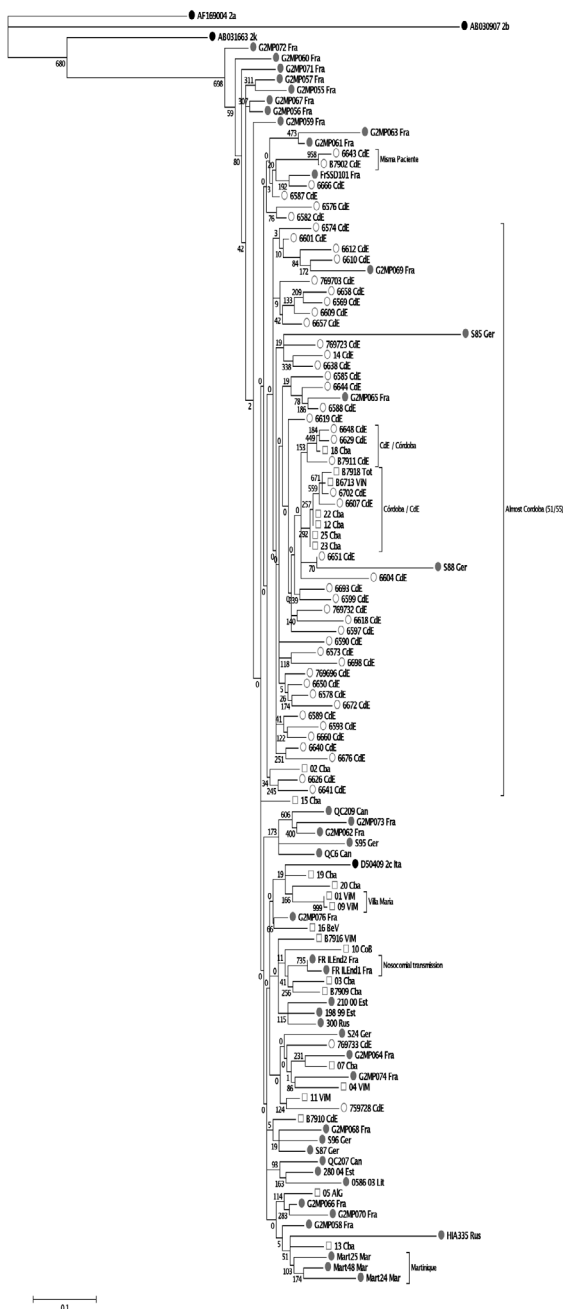


Figura 3. Árbol filogenético de la región NS5B (367bp) obtenido por Maximum Likelihood (Modelo de sustitución GTR+Γ+I) con las 75 secuencias 2c de HCV de CBA y CE y 43 provenientes de Alemania, Estonia, Canadá, Rusia, Lituania, Martínica, Italia y de Francia. Sobre las ramas se indica el valor de Bootstrap sobre 1000 pseudoréplicas.

SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) is a major worldwide agent for chronic hepatitis. The genetic diversity and distribution of HCV-2 in Argentina is poorly documented. Previous studies in Córdoba, Argentina have been demonstrated that the prevalence of HCV varies between 3-11% with a particular high prevalence of HCV genotype 2 (HCV-2), (>50%). The aim of this study is to gain insight into HCV-2 diversification process in Cordoba province.

A total of 418 HCV RNA positive samples were obtained from two distinct sources: 1) Cruz del Eje, 2004 and 2) Córdoba City, and other small cities of the province samples came from general population patients between 1999 to 2008. There were selected 145 samples that belong to genotype 2a/c previously analyzed by RFLP. These samples were submitted to amplification of a fragment of NS5B and E1/E2 regions of HCV genome. Seventy five and 41 samples were sequenced for NS5B and E1/E2 region, respectively.

All HCV-2 sequences grouped inside the clade of subtype 2c of the phylogenetic tree. The phylogenetic analysis did not reveal a monophyletic pattern of the Cordoba sequences. The majority of the sequences were interposed with strains circulating in European regions. Mean Age for Cruz del Eje (CdE) patients was 66.15 ± 1.524 years and 49.77 ± 2.151 years for other Córdoba locations (OCL) ($p < 0.001$).

All Bayesian Skyline Plots for NS5B datasets were compatible with a logistic demographic model. The estimated mean dates of the most recent common ancestor (tMCRA) for all NS5B datasets were: 1858 (CI 1754 - 1925), coincident with European immigration since 1880.

In summary: the age of patients, low prevalence of modern genotypes, phylogenetic relationship between Argentinean and Franco- Italians strains and historic evidence of immigration, lead to hypothesis that HCV-2c genotype originated in Córdoba with a multiple introduction during immigration process before spreading to other regions.

INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD *IN-VITRO* DE 6 DROGAS AZÓLICAS FRENTE A LEVADURAS AISLADAS DE EXUDADOS VAGINALES RECIDIVANTES

Rojas, Florencia; Mangiaterra, Magdalena; Giusiano, Gustavo
Departamento Micología. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del
Nordeste. Av. Las Heras 727. (3500) Resistencia, Chaco. Argentina.

INTRODUCCIÓN

Se considera que la micosis vulvovaginal es un problema universal que afecta a millones de mujeres en todo el mundo. Se estima que hasta un 75% de las mujeres sexualmente activas sufren, al menos, un episodio una vez en la vida y un 10% de ellas lo padecen de forma recurrente (1-7). Se define a la **candidiasis vulvovaginal recurrente** como la ocurrencia de cuatro o más episodios diagnosticados de infección durante un año (3,4,7). Esta afección supone un problema sanitario de indudable importancia, tanto por su frecuencia como, en ocasiones, por su difícil tratamiento.

El aislamiento de *Candida* a partir de exudados vaginales en mujeres asintomáticas es un hallazgo frecuente. Se estima que entre un 20 y un 25% de mujeres sanas en edad reproductiva presentan cultivo positivo para *Candida spp.* en vagina (1,3). Considerando esta alta frecuencia de aislamiento, es importante conocer las causas por las cuales una colonización puede transformarse en una infección clínica.

Diversos factores pueden actuar como condiciones predisponentes para el desarrollo de candidiasis vulvovaginal (CVV). El embarazo, la diabetes y los tratamientos antibióticos, entre otros, son considerados factores de riesgo (2,5-7). Los métodos anticonceptivos orales producen modificaciones hormonales y cambios de pH vaginal, que favorecen el desarrollo de estas levaduras. Otro factor que afecta la capacidad de adhesión de los hongos es la competencia con la microbiota vaginal. Una reducción de la biota lactobacilar condiciona un incremento del riesgo de infección micótica (1). Otros factores de riesgo son el estrés, las enfermedades autoinmunes, las drogas inmunosupresoras, los corticoides y los anticonceptivos intrauterinos (1,6).

Candida albicans (*C. albicans*) es informada en el 80 al 90% de las CVV (2,4,5). Durante los últimos años se ha observado un aumento significativo

en la frecuencia de aislamiento de especies no *C. albicans* como ser, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. parapsilosis* y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otras (1,2,4,5,8).

Las drogas azólicas son las elegidas en el tratamiento de la CVV, pero 5-25% de las afectadas recidivan y, algunas de ellas, evolucionan a infección crónica (2,5). El incremento de especies no *C. albicans* ha sido observado fundamentalmente en episodios de recurrencia de estas infecciones (1,4). Diferentes estudios han demostrado que los tratamientos profilácticos inadecuados pueden causar una selección de especies con capacidad de desarrollar resistencia a los compuestos azólicos, como *C. glabrata*, o bien con resistencia primaria al fluconazol por ejemplo, como ser *C. krusei* (1,2).

Distintas hipótesis se manejan a fin de explicar la recurrencia en la CVV. Por un lado, se postula la re infección a partir del sistema digestivo, del tracto urinario, o bien, por transmisión sexual. Por otro, la ausencia de una erradicación completa, ante un tratamiento inadecuado o por la presencia de cepas resistentes que puede ocasionar fallo terapéutico. Variaciones antigénicas y mutaciones podrían estar implicadas en un aumento de la virulencia micótica causando episodios recidivantes (1).

Clásicamente se ha utilizado el criterio clínico para el diagnóstico de la CVV debido a que los signos y síntomas son característicos. Los cultivos vaginales positivos pueden reflejar únicamente colonización y no deben ser utilizados como único método diagnóstico (3,5).

La CVV no es una enfermedad de informe obligatorio, por lo que se desconoce el porcentaje real de población afectada con CVV recurrente en nuestro país. En el noreste argentino es escasa la información al respecto.

El incremento observado en las tasas de recurrencia de episodios de CVV y la emergencia de levaduras con capacidad de desarrollar resistencia a los antifúngicos de uso clínico, enfatizan la importancia de conocer los microorganismos involucrados en estas infecciones y su perfil de sensibilidad, a fin de establecer una terapéutica eficaz y una acción preventiva de recidivas.

El objeto del siguiente trabajo fue estudiar la distribución de especies involucradas en episodios de CVV recurrentes y determinar la sensibilidad *in vitro* frente a los antifúngicos comúnmente utilizados para el tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre octubre de 2008 y octubre de 2010 se estudiaron todas las cepas levaduriformes aisladas de exudados vaginales de pacientes con signos y síntomas de CVV, que refirieron tener 2 o más episodios infección. Las muestras fueron recolectadas en el Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) y en laboratorios privados de la ciudad de Resistencia.

Los exudados vaginales fueron tomados de fondo de saco y de pared posterior de vagina con hisopo estéril, colocando previamente espéculo, sin lubricante. Para el aislamiento primario, las muestras se inocularon en medio de Sabouraud con antibióticos: cloranfenicol 250mg/litro y se incubaron a 37° durante 48 hs.

Todas las levaduras aisladas fueron derivadas al Departamento de Micología del Instituto de Medicina Regional para su identificación y estudio de sensibilidad antifúngica.

Las levaduras fueron identificadas por sus características morfológicas, pruebas bioquímicas y fisiológicas basadas en la metodología de Kreejer van-Rij (9) y por el sistema comercial API ID 32-C (Biomeriux-France®).

Para las pruebas de sensibilidad antifúngica *in-vitro* se empleó el método de difusión en agar basado en el método de referencia M44 A estandarizado por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), utilizando discos Neosensitabs (Rosco®) y se ensayó la actividad de: ketoconazol (KTZ), itraconazol (ITZ), fluconazol (FCZ) clotrimazol (CLZ), miconazol (MCZ). También se ensayó la actividad de nistatina (NIT) que, si bien no es una droga azólica, es de uso frecuente en este tipo de infecciones. Se interpretó como cepa Sensible (S), Resistente (R) o Intermedia (I) según la lectura de los halos y los puntos de corte establecidos por el fabricante.

RESULTADOS

Se estudiaron los aislamientos de 12 pacientes con CVV recurrente, con edades entre 16 y 41 años.

Diez pacientes presentaron 2 episodios de CVV, una presentó 3 episodios y otra paciente 4. Por esta razón, se analizaron en total 27 aislamientos levaduriformes.

Debido a que se encontraron 2 asociaciones, de los 27 aislamientos se obtuvieron 29 cepas de levaduras. Ambas asociaciones fueron *C. albicans* – *C. parapsilosis*.

C. albicans se aisló en el 72.4% (21/29), *C. parapsilosis* en el 17.2% (5/29), *C. glabrata* 6.9% (2/29) y *C. krusei* 3.5% (1/29).

De las 12 pacientes: siete presentaron dos episodios y una tres a *C. albicans*.

Dos pacientes presentaron un primer episodio con una asociación (*C. albicans* - *C. parapsilosis*) y el segundo solo a *C. albicans*.

Otra paciente presentó un primer episodio a *C. parapsilosis* y el segundo a *C. krusei*.

La paciente que presentó 4 episodios, 2 fueron a *C. glabrata* y 2 a *C. parapsilosis*.

El 65,5 % del total de las levaduras fueron sensibles a todos los antifúngicos testeados, entre ellas 14/21 *C. albicans*, 4/5 *C. parapsilosis* y 1/2 *C. glabrata*.

La única cepa de *C. krusei* aislada mostró su resistencia innata al fluconazol.

Una cepa de *C. parapsilosis* encontrada en una de las asociaciones resultó resistente al fluconazol.

Dos cepas de *C. albicans* aisladas de una misma paciente presentaron resistencia solo al MCZ.

Las 29 levaduras evaluadas fueron sensibles a NIT.

En 5 pacientes se observaron distintos perfiles de sensibilidad en las levaduras aisladas en los diferentes episodios de CVV. Ver **Tabla 1**.

Tabla 1: Perfiles de sensibilidad de las levaduras aisladas en las 5 pacientes que presentaron variaciones.

	PT 1		PT 2		PT 3		PT 4		PT 5	
	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>	
Episodio	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
FLZ	S	S	S	R	S	I	I	I	S	I
ITZ	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S
KTZ	S	I	S	S	S	S	I	I	S	S
CTZ	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
MCZ	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
NIT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

PT: paciente; S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente

DISCUSIÓN

Durante los últimos años se han producido dos hechos posiblemente interrelacionados entre sí: por un lado un significativo aumento en la frecuencia de aislamiento de especies diferentes de *C. albicans* y por otro, una mayor tasa de recurrencias de los episodios de vulvovaginitis. De hecho, el incremento de especies no *C. albicans* se ha observado fundamentalmente en los episodios recurrentes, donde se estima que se aíslan con una frecuencia de entre el 20 y el 30 % (1,4).

Coincidiendo con otros estudios publicados sobre CVV, *C. albicans* fue la levadura aislada en mayor porcentaje en nuestro trabajo, aunque con una frecuencia menor que la informada en la mayoría de las investigaciones (1-6). En un estudio realizado donde se compara frecuencia de aislamientos en vulvovaginitis esporádicas frente a vulvovaginitis recurrentes se observa una disminución en el porcentaje de *C. albicans* aislado (de 91,5% a 81,4%) y un incremento de las especies no *C. albicans* como *C. glabrata* (de 4.2% a 11.6%), así como la aparición de especies conresistencia innata como *C. kru-sei* (4). Probablemente esto se relaciona a una generalización de las terapias inadecuadas, entre ellas la automedicación, causando selección de especies (1). Esto podría explicar el alto porcentaje de especies no *C. albicans* obtenido en nuestro estudio (27.6%).

C. parapsilosis (17.2%) fue la segunda en frecuencia de aislamiento. Esta especie no es considerada un patógeno común en las CVV. Son pocos los

estudios que la informan y, en general, con un porcentaje menor al 4%. (5,6). No obstante esta levadura puede ser aislada como biota colonizante en mujeres asintomáticas (8). El rol que cumple *C. parapsilosis* como patógeno y su relación con los síntomas de las vulvovaginitis son cuestionables. Se ha comprobado *in vitro* que las cepas, tanto de *C. albicans* como de *C. parapsilosis*, involucradas en estas infecciones secretan más proteinasas que lo habitual. Esto provocaría la hidrólisis de Inmunoglobulina A, que es una de las barreras más eficaz contra la infección de la mucosa y afectaría la integridad normal de la pared vaginal (8,10). Otro estudio realizado para demostrar el papel patogénico de *C. parapsilosis*, muestra que el 65% de mujeres infectadas con esta levadura experimentó alivio sintomático después de erradicar la misma utilizando diversos antifúngicos (11). Es, por lo tanto importante el porcentaje encontrado en este estudio.

En este estudio se observaron 2 asociaciones y en uno de los casos *C. parapsilosis* mostró resistencia al FCZ. Por lo tanto, la búsqueda de asociaciones resulta importante dada la diferente sensibilidad que puedan tener las especies involucradas, que responderán de manera diferente a las drogas antifúngicas.

El tercer patógeno aislado fue *C. glabrata*. Esto difiere de las mayorías de las publicaciones donde se encuentra en segundo lugar, con una frecuencia que oscila entre 5 y 15%, (1,2,4-6,12). La aparición de *C. glabrata* como agente etiológico se atribuye a los tratamientos cortos con antimicóticos orales y de uso tópico, así como al uso del FCZ de forma profiláctica o en terapias prolongadas, dada su capacidad de desarrollo de resistencias secundaria a este antifúngico (5,12). En este estudio, en la paciente que presentó dos episodios a *C. glabrata* se observó un cambio en la sensibilidad al FCZ, de sensible a intermedia. Probablemente esto se deba al desarrollo de resistencia secundaria.

C. krusei fue aislada en el segundo episodio de una paciente. Esta levadura presenta resistencia primaria al FCZ, que es una de las drogas de elección en el tratamiento de estas infecciones (2). Probablemente su aparición sea consecuencia de la selección de especies generada por el uso indiscriminado de drogas azólicas, como terapia o profilaxis (1,2,4,5). En nuestro estudio *C. krusei* fue sensible al resto de los antifúngicos ensayados.

La alta sensibilidad *in vitro* encontrada a NIT coincide con lo informado en otras publicaciones (2,13). Esta droga es uno de los principales agentes antifúngicos utilizados en el tratamiento tópico de la CVV. Sin embargo, con frecuencia se presentan casos de mujeres que padecen CVV recurrente, las

cuales responden solo parcialmente al tratamiento con NIT, lo que sugiere que existen fallos terapéuticos o la aparición de cepas con sensibilidad disminuida o resistentes a la droga (13).

En el presente estudio se observaron cepas resistentes y/o con sensibilidad intermedia frente a la mayoría de las drogas de uso clínico: FCZ (24%), MCZ (13.8%), KTZ (10.3%), ITZ (6.9%) y CTZ (3.4%). Esto coincide con el estudio realizado por Saporiti et al. (2001) donde se informa una mejor actividad *in vitro* del KTZ y del ITZ que del FCZ, con un porcentaje de aislamientos resistentes a esta última droga de alrededor del 20% (2).

Es importante destacar la paciente que presentó en ambos episodios cepas multiresistentes y un cambio de sensibilidad al CTZ, quedando la NIT como única opción terapéutica. CTZ es empleado en el tratamiento tópico de las CVV (3). Es una droga de venta libre, lo que permite su uso indiscriminado sin seguimiento médico, y esto podría favorecer cambios de sensibilidad de las levaduras. Un estudio realizado en pacientes con terapia con CTZ revela que puede generarse resistencia intratratamiento, además de resistencia cruzadas con las demás drogas azolicas (14).

El 33,3 % de las *C. albicans* aisladas presentó resistencia y/o sensibilidad disminuida a alguna de las drogas empleadas, fundamentalmente al FCZ, KTZ y MCZ. Los aislamientos de *C. albicans* de dos pacientes mostraron diferentes sensibilidad sólo frente al FCZ en los dos episodios. Esto podría ser el resultado de tratamientos previos.

Actualmente se considera que todas las especies de *Candida* tienen la capacidad de desarrollar resistencia a los imidazoles. El desarrollo de resistencia cruzada a los azoles ha sido demostrado en aislamientos clínicos de *Candida* sp. Estas levaduras pueden desarrollar resistencia cruzada a KTZ, ITZ y FCZ (15,16). Esta podría ser una explicación más de la variación observada en la sensibilidad de las cepas aisladas de las 5 pacientes en que fue detectada.

En este estudio: se ha encontrado el 34.5% de aislamientos con resistencia a alguno de los antifúngicos testeados y principalmente a la droga de elección que es el FCZ, se han aislado cepas multiresistentes, se observaron cambios de sensibilidad en cepas obtenidas en diferentes episodios de CVV y se encontraron asociaciones de especies con distinto perfil de sensibilidad. Esto demuestra la importancia de la tipificación de los microorganismos involucrados en una CVV y del estudio de su perfil de sensibilidad, a fin de instaurar un tratamiento eficaz y desarrollar una profilaxis adecuada, que no favorezca los episodios de recidivas por desarrollo de resistencia a los antifúngicos de uso frecuente.

SUMMARY

Yeast isolates from vaginal swabs of patients with signs and symptoms of vulvovaginal candidiasis (VVC), who reported having 2 or more recurrent episodes of infection, were studied.

C. albicans was isolated in 72.4% (21/29), *C. parapsilosis* 17.2% (5/29), *C. glabrata* 6.9% (2/29) and *C. krusei* 3.5% (1/29).

Ten patients had 2 episodes of VVC, one 3 episodes and one patient 4 episodes. For this reason, we analyzed a total of 27 yeast isolates. Because were found in 2 associations, we studied 29 yeast strains. Both associations were *C. albicans* - *C. parapsilosis*.

In this study, we found 34.5% of resistance isolates to any of the antifungal tested and mainly to the FCZ, multiresistant strains have been isolated, sensitivity changes were observed in isolates from different episodes of VVC and we found associations of species with different sensitivity profile. This demonstrates the importance of the identification of microorganisms involved in VVC and the study of the sensitivity profile, in order to establish an effective treatment and develop an appropriate prophylaxis, which is not conducive to episodes of relapse by developing resistance to the antifungal often used.

BIBLIOGRAFIA

1. Gorka B Z. *Vulvovaginitis candidiásica*. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 22-24.
2. Saporiti AM, Gómez D, Levalle S, Galeano M, Davel G, Vivot W, et al. Candidiasis vaginal: etiología y perfil de sensibilidad a agentes antifúngicos de uso clínico. Rev Argent Microbiol 2001; 33: 217-22.
3. Sandoval Alarcón LP. Sensibilidad de *Candida* en pacientes previamente tratados con óvulos de nistatina y/o fluconazol en la consulta externa de ginecología y obstetricia del Hospital General San Juan de Dios. Tesis de la Universidad de Francisco Marroquín. Facultad de Medicina. 2001. Guatemala.
4. Lian C, Zhao J, Zhang Z, Liu, W. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. Mycoses 2004; 47: 495-502.
5. Suárez VL, Perurena Lancha MR. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. Rev

- Cubana Med Trop 2004; 56: 21-25
6. Perurena LM, Rodríguez Soto M, Fernández AC, Martínez Machín G, Flores CM. Determinación de morfotipos de *Candida spp* en exudados vaginales. Rev Cubana Med Trop 2003; 55:217-220.
 7. Ramírez-Santos A, Pereiro M Jr, Toribio J. Recurrent vulvovaginitis: diagnostic assessment and therapeutic management. Actas Dermosifiliogr 2008; 99:190-198.
 8. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen Clin Microbiol Rev 2008; 21: 606–625.
 9. Kreeger van Rij, NJW. The Yeasts: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1984.
 10. De Bernardis, F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W, Cassone A. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. J Infect Dis 1999; 179:201–208.
 11. Nyirjesy P, Alexander AB, Weitz MV. Vaginal *Candida parapsilosis*: pathogen or bystander? Infect. Dis Obstet Gynecol 2005; 13:37–41.
 12. Fidel PL Jr. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 80-96.
 13. Fernández Andreu C, Medina YE, González TC, Llanes D M. Sensibilidad in vitro a la nistatina de aislamientos vaginales de *Candida spp*. Rev Cubana Med Trop 2001; 53:194-198.
 14. Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh TJ. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: *in vitro* and clinical correlations. J Clin Microbiol 2000; 38:1563-8.
 15. Müllera FMC, Weigc M, Petera J, and Walsh TJ. Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 338-341.
 16. Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. J Antimicrob Chemother 1993; 31: 463-471.



CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN BACTERIEMIAS POR *ACINETOBACTER* SPP. MULTIRRESISTENTE EN PEDIATRÍA

Ruvinsky Silvina (1), Fiorilli Graciela (2), Casimir Lidia (2), Lopardo Horacio (2), Bologna Rosa(1)

(1) Servicio de Epidemiología e Infectología, (2) Servicio de Microbiología Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii multi-resistente (ABMR), se ha convertido, en estos últimos años en un patógeno de importancia en el ámbito hospitalario. Son microorganismos oportunistas, capaces de sobrevivir por largos períodos y causar infecciones en pacientes con compromiso grave que requieren internación en las unidades de cuidados intensivos (UCI). Puede ocurrir una rápida diseminación a través de reservorios humanos y objetos inanimados. Durante los últimos 30 años los aislamientos de *Acinetobacter* spp. han presentado en forma progresiva resistencia a penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, aminoglucósidos y carbapenemes. Estas infecciones tienen impacto en el sistema de salud no sólo por su morbilidad asociada sino además porque prolongan la internación y producen un incremento en los costos en salud (1-5).

Objetivo: Analizar características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de los pacientes pediátricos con bacteriemias por *Acinetobacter* spp multi-resistente.

Metodología: Se llevó a cabo un estudio de caso- control de los pacientes con bacteriemia por *Acinetobacter* spp. multi-resistente internados en el Hospital Garrahan. Se consideró **caso** a todo paciente con aislamiento en hemocultivos de *Acinetobacter* spp. multi-resistente y con al menos 48 hs de internación en nuestra institución y **control** a pacientes con bacteriemias por otros bacilos gram negativos no multi-resistentes. (Período de estudio: 2005-2008).

Análisis clínico y epidemiológico: Mediante revisión de historias clínicas se registraron variables demográficas, características clínicas, epidemiológicas y evolución final de los casos y controles incluidos.

Los estudios de la sensibilidad antibiótica (método de difusión y método de dilución) se realizaron según las recomendaciones del CLSI (6). Se realizó la detección fenotípica de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) (7) y de metalobetalactamasas (MBL) (8). Para la evaluación de resistencia a carbapenemes: se emplearon los métodos de Hodge (9) y Masuda (10). Clonalidad de los aislamientos: se realizó por PCR con oligonucleótidos degenerados (DO-PCR) (11). Curvas de muerte: Se realizaron con dos aislamientos representantes de cada clon encontrado en la colección. Se probaron los siguientes antibióticos: ampicilina-sulbactam (AMS), cefepime (FEP), meropenem (MEM), gentamicina (GEN), rifampicina (RIF) y polimixina (POL). Se enfrentaron además los mismos aislamientos a las siguientes combinaciones antibióticas: AMS+GEN, AMS+COL, FEP+COL, MEM+COL y RIF+COL. Se trabajó con concentraciones de droga factible de ser alcanzadas en suero, según las recomendaciones de Lorian (12).

Análisis estadístico: Para el análisis de las variables continuas se utilizó test de Wilcoxon y para las variables categóricas se utilizó Chi-cuadrado o Test de Fisher, dependiendo del tamaño muestral. Se consideró estadísticamente significativo los valores de $p < .05$. Finalmente se realizó un estudio de regresión logística para determinar las asociaciones independientes. Para el análisis estadístico se utilizó STATA 8.0.

RESULTADOS

Fueron evaluados 50 pacientes con bacteriemia por ABMR y un total de 100 pacientes con bacteriemias por otros bacilos gran negativos no multi-resistentes (grupo control). El lugar de adquisición de la bacteriemia fue en el 94% de los casos en UCI y solo el 6% en sala general, mientras que en los controles el lugar de adquisición fue en el 40% ($n=40$) en las UCI, en el 43% ($n=43$) en sala general y el 17% ($n=17$) en la comunidad.

Respecto a la identificación taxonómica de los 50 casos analizados: todas las cepas de *Acinetobacter* spp. se estudiaron con pruebas fenotípicas y genotípicas; para estas últimas se utilizó dot-blot para el gen *oxa 51*, que se considera actualmente como evidencia suficiente de la afiliación taxonómica de la especie *A. baumannii*. En el análisis de secuenciación tuvieron todas más del 98% de identidad con la secuencia homóloga de la cepa tipo de *Acinetobacter baumannii*. Se confirmó que los 50 aislamientos de ABMR y las cepas ambientales pertenecían todos a la especie *A. baumannii*. En la

tabla 1 se describen los patrones de sensibilidad antibiótica observados en los 50 aislamientos. Se analizó la sensibilidad a las tetraciclinas (Tabla 2), por los métodos de difusión y de dilución respectivamente. El método de difusión sufrió un cambio significativo en las categorías de interpretación en el año 2007, para esta familia de antibióticos (puntos de corte del CLSI M100-S17, 2007 vs M100-S16, 2006); mientras que no se efectuaron cambios en los puntos de corte del método de referencia (dilución). Se evaluó en la colección el impacto de estos cambios de punto de corte para el método de difusión, respecto del método de referencia (14). Se observó que, con los nuevos puntos de corte se cometen errores muy mayores con tetraciclina y doxiciclina, por lo que se sugeriría usar los puntos de corte anteriores (2006) para el método de difusión. Se estudió la sensibilidad antibiótica a los carbapenemes comparando los métodos de difusión- dilución y se obtuvieron iguales resultados (Tabla 3).

Respecto a la caracterización fenotípica de la resistencia a los carbapenemes: los 50 aislamientos (CASOS) se observó sinergia entre EDTA/SMA y carbapenemes en la colección: negativo, ensayo microbiológico Hodge: negativo, Ensayo microbiológico Masuda: negativo. En base a éstos resultados se confirmó ausencia de carbapenemasas de tipo metalobetalactamasas. No se hallaron beta-lactamasas de espectro extendido en la detección fenotípica de BLEE en la serie de casos evaluada. Al analizar la **clonalidad en la colección se observó que** en la especie *A. baumannii* se encontraron 5 clones diferentes (Tabla 4). Se realizaron ensayos de curva de muerte, variando las concentraciones de antibióticos que pudieran presentar sinergia bactericida. Como se observa en la tabla 5, todos los clones resultaron bactericidas con el antibiótico polimixina solo y en combinaciones con ampicilina-sulbactam (AMS), cefepime (FEP), meropenem (MEM) y rifampicina (RIF), sin embargo no se observó efecto sinérgico en las combinaciones antibióticas descriptas respecto a colistin monoterapia.

Al analizar las características clínicas de los pacientes (tabla 6), en el análisis univariado no se observaron diferencias significativas respecto a edad, sexo, presencia de enfermedad de base, tratamiento inmunosupresor, leucopenia, neutropenia, forma de presentación clínica, presencia de sepsis y evolución clínica final en relación a los casos y controles. Se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a: la mediana de días de internación previa a la aparición de la bacteriemia (16 días vs. 7 días), antecedente de tiempo de internación previa mayor a 14 días (53% vs 33 %). Al analizar el tipo de procedimiento invasivo; 100 % tenía catéter venoso central

(CVC) y se observaron diferencias significativas respecto a la utilización de asistencia respiratoria mecánica (ARM) y antecedentes de cirugía previa a la aparición de la bacteriemia.

Respecto a la presencia de enfermedad subyacente, si bien en el global no se observaron diferencias en ambos grupos, al considerar el tipo de enfermedad de base, los pacientes con cardiopatía o quemadura previa tuvieron mayor riesgo de presentar bacteriemia por ABMR (Tabla 7). Según el foco clínico inicial asociado los casos fueron bacteriemia asociada a CVC en el 40% (n=20), bacteriemia asociada a infección de quemadura en el 24% (n=12), bacteriemia primaria en el 22% (n=11), bacteriemia asociada a infección de sitio quirúrgico en el 10% (n=5) y bacteriemia relacionada con neumonía asociada a ARM en el 4% (n=2). El tratamiento implementado fue: colistin monoterapia en el 58% (n = 29) o asociado a: carbapenemes 26% (n =13), a piperacilina- tazobactam 10% (n = 5), a ampicilina- sulbactam 4% (n =2) o a cefepime 2% (n =1). Los casos tuvieron mayor tiempo de internación, mayor requerimiento de inotrópicos y una mayor duración del tratamiento antibiótico (Tabla 6).

Las variables finales incluidas como predictoras de bacteriemia por ABMR (regresión logística múltiple) fueron: antecedente de cirugía previa (OR 2.92, IC 95% 1.10 -7.92, p= .035), el haber recibido antibióticos parenterales previos (betalactámicos) (OR 5.5 IC 95% 1.46-20, p= 0.012) y el antecedente de asistencia respiratoria mecánica (OR 5, IC 95% 2-12, p=.000) como variables independientes.

Durante el año 2009 se llevaron a cabo dos estudios ambientales: En la UCI cardiovascular se encontró un único clon de ABMR circulante en el paciente y en las superficies cultivadas de la unidad paciente (baranda de la cama, perillas del respirador, superficie del monitor y baranda de la cama del paciente contiguo). En otro realizado en una de las Unidades polivalentes del hospital, se encontraron 3 clones circulantes.

DISCUSIÓN

Las infecciones por ABMR constituyen uno de los principales problemas causados por patógenos emergentes en las UCI de los hospitales de alta complejidad de nuestro país. Diversos estudios fueron publicados, correspondiendo en su mayoría a series de pacientes adultos (11-14) Las patologías subyacentes de los pacientes fueron similares a las reportadas en otras series (15-18), sin embargo los pacientes de mayor riesgo de adquisición fueron aque-

llos con cardiopatías congénitas y los internados en la unidad de quemados.

Las infecciones por ABMR fueron en su totalidad de origen hospitalario y la mayoría adquiridas en UCI, similar a lo reportado en otros estudios (11,15, 18). El momento de aparición de la bacteriemia fue más tardío en los casos respecto al grupo control, similar a otras series. (17,19)

Predominaron las bacteriemias relacionadas a CVC y en segunda instancia a infección de la quemadura; en población adulta el foco pulmonar constituye uno de los focos secundario más frecuentemente reportado. El motivo de aparición de las bacteriemias primarias por ABMR (22% de los casos) aun no está claro; algunos autores proponen el origen intestinal, por traslocación bacteriana, fenómeno común en pacientes críticamente enfermos (11,18- 20). Diversos esquemas terapéuticos fueron evaluados, en nuestra serie la mayoría de los pacientes recibieron colistin monoterapia, presentando buena evolución clínica y tolerancia al tratamiento. La eficacia global del uso de colistin en pacientes adultos y pediátricos con infecciones por ABMR ha mostrado tasas de cura y respuesta del 57 al 80% (24, 25).

En otros estudios de cohorte la respuesta clínica fue similar en los pacientes que recibieron colistin monoterapia respecto a terapia combinada (18, 25).

En esta serie ha habido pocos pacientes fallecidos y por lo tanto no se pudieron evaluar factores pronósticos de mortalidad. Sin embargo es de destacar que ningún paciente del grupo tratado con colistin como monoterapia falleció. Es probable que los distintos esquemas terapéuticos utilizados, hayan sido similares respecto de la evolución clínica como describen otros estudios. Interpretaciones probables son que el pronóstico de estas infecciones tiene mayor relación con la condición del huésped al momento de adquirir la infección y debido a la multi-resistencia probablemente no haya diferencia en la respuesta clínica en la monoterapia respecto de la terapia combinada (24,25).

En el análisis de regresión logística múltiple se determinaron como predictores independientes de la aparición de bacteriemia por ABMR al antecedente de haber recibido tratamiento antibiótico previo (principalmente carbapenem, cefalosporinas de espectro extendido), la asistencia respiratoria mecánica y cirugía previa. Estos factores son similares a los reportados en otras series, en las que se resalta el impacto de la utilización de antibióticos de amplio espectro en las UCI respecto a la emergencia de ABMR y asimismo la relación entre la ARM y la mayor posibilidad de colonización y posterior infección en pacientes críticos sometidos a procedimientos invasivos (3,10, 25-29).

Las bacteriemias fueron ocasionadas por *Acinetobacter baumannii* única-

mente; las cepas presentaron alta resistencia a varias familias de antibióticos pero un 100% de sensibilidad a minociclina y colistin, limitando las opciones de tratamiento.

En el estudio comparativo de antibióticos de la familia Tetraciclinas, se observó que existen errores mayores utilizando puntos de corte 2007 para los antibióticos tetraciclina y doxiciclina por lo que para estos antibióticos se deberían utilizar los puntos de corte de 2006 y confirmarlos por CIM. La resistencia a carbapenemes en el 98% se asoció con la presencia de enzimas oxacilinasas, en un 88% a la enzima OXA 23 y 6% a la enzima OXA 58, el 6% restante de las cepas probablemente porten otro tipo de enzima que confiera dicha resistencia.

En todos los clones analizados, polimixina presentó bactericidia y en 3 clones la combinación AMS +GEN presentó sinergia; esto sugiere que esta combinación o polimixina sola podrían considerarse como alternativa terapéutica según los estudios *in vitro*. Los estudios ambientales realizados resaltan la importancia de realizar una correcta limpieza y desinfección de superficies en las áreas críticas como parte del control de las infecciones por ABMR (23, 27).

Como conclusión: las bacteriemias por ABMR fueron detectadas en pacientes internados en UCI, con patología subyacente, internación prolongada, sometidos a procedimientos invasivos y con antecedentes de tratamientos antibióticos de amplio espectro. *In vitro* el efecto bactericida fue similar con colistin solo, respecto a las diferentes combinaciones testeadas. El grupo de pacientes tratados con colistin monoterapia presentó buena respuesta y tolerancia al tratamiento. Es necesario implementar programas de control de infección hospitalaria y de uso adecuado de antimicrobianos como parte fundamental del control de la infección por ABMR. Se requiere del desarrollo de nuevas estrategias que permitan limitar la diseminación de este microorganismo en las UCI.

Tabla 1. Sensibilidad antibiótica por el método de difusión en los 50 casos:

Tipo de ATB	% Resistencia
Penicilinas PIP	100
Betalactámicos combinados con inhibidores: AMS	98
TAZ / AMC	100
Cefalosporinas CAZ	98
FEP	100
Carbapenemes : IMI / MEM	100
Lipopéptidos: COL	0
Aminoglucósidos: AKN	100
GEN	72
Quinolonas: NAL / CIP	100
Inhibidor del Folato: TMS	100

PIP: piperacilina, **AMS:** ampicilina-sulbactam, **TAZ:** piperacilina-tazobactam, **AMC:** amoxicilina-clavulánico **CAZ:** ceftazidima, **FEP:** cefepime, **IMI:** imipenem, **MEM:** meropenem, **COL:** colistina, **AKN:** amikacina, **GEN:** gentamicina, **NAL:** ácido nalidixico, **CIP:** ciprofloxacina, **TMS:** trimetroprima-sulfametoxazol

Tabla 2. Evaluación de sensibilidad a Tetraciclinas:

		Difusión 2006	Difusión 2007
Tipo de tetraciclina	%Sensibilidad CIM	%Sensibilidad	%Sensibilidad
TET	30	6	56
MIN	100	100	100
DOXI	92	90	94

	%S	%I	%R	%Em	%EM	%EMM
TET CIM	30	32	38			
Dif 2006	6	50	44	36	0	0
Dif 2007	56	16	28	32	0	4
MIN CIM	100	0	0			
Dif 2006	100	0	0	0	0	0
Dif 2007	100	0	0	0	0	0
DOX CIM	92	0	8			
Dif 2006	90	4	6	4	2	2
Dif 2007	94	6	0	6	0	4

Em: error menor; **EM:** error mayor; **EMM:** error muy mayor

Tabla 3. Carbapemes: Sensibilidad antibiótica por el método de dilución en los 50 casos

				CIM	Disco
	CIM 50	CIM 90	Rango	%Sensibilidad	%Sensibilidad
MEM	64	128	0,125 – 512	0	0
IMI	64	128	0,125 – 512	0	0

Tabla 4-Estudio de Clonalidad en la colección:

En la especie *A. baumannii* se encontraron 5 clones diferentes:
clon I (n:28), clon II (n:10), clon III (n:3), clon IV (n: 6) y clon V (n: 3)

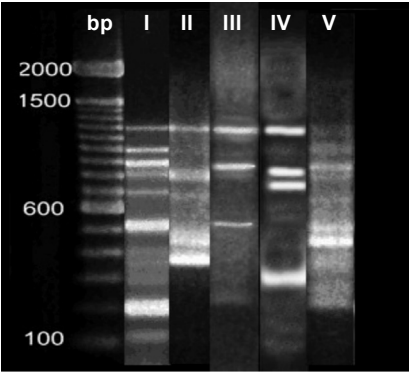


Tabla 5. Resultados de Curvas de muerte realizados en las 50 cepas

	Clones	AMS	POL	AMS+GEN
n: 28	I	-	+	++
n: 10	II	N	+	++
n: 3	III	N	+	N
n: 6	IV	N	+	N
n: 3	V	-	+	++

(N): efecto nulo, (+): bactericidia: es la disminución de 3 log en ufc/ml con respecto al inóculo inicial, (-) : tolerante: es la disminución de menos de 3 log en ufc/ml con respecto al inóculo inicial (++) , sinergia: es la disminución de ≥ 2 log entre la combinación y el antibiótico más activo.

Tabla 6: Características generales de los pacientes con bacteriemias por *Acinetobacter* multiR y de sus controles

Variable	Casos (n=50) N (%)	Controles+ (n=100) N (%)	OR (IC 95%)	P
Sexo Masculino	29(58)	51 (51)	1.33 (0.66- 2.63)	0.418
Edad Mediana (meses) RIC (meses)	13.5 (6-54)	23 (4-81)		0.63
Enfermedad base	45(90)	86(86)	1.46 (0.49-4.32)	0.48
Proced. Invasivo previo (*)	50(100)	83(83)		
Catéter Venoso Central	50 (100)	72(72)		
Sonda Vesical	26(52)	32(32)	2.9(1.40-6)	0.004
Asistencia respiratoria Mecánica	45(90)	35(35)	10 (4.07-25)	0.000
Cirugía	40(89)	47(47)	9 (3.28-24.7)	0.000
Días internación previa (mediana-RIC)	16 (6.5-32)	7 (3-21.5)		0.0001
Internación previa mayor a 14 días	26(53)	33(33)	2.29 (1.14- 4.61)	0.020
ATB parenterales previos (**)	47(94)	57(57)	11.81(3.44- 40.53)	0.000
Tratamiento inmunosupresor previo	10(20)	30(30)	0.58 (0.25- 1.31)	0.19
Leucopenia	8 (16)	19(19)	0.81 (0.32-2)	0.65
Neutropenia	5(10)	14(14)	0.68 (0.23-2)	0.48
Foco Clínico inicial	24(48)	39(38)	1.38 (0.85 2.22)	0.18
Tiempo total de antibióticos	14 (14-21)	14 (10-14)		0.18
Sepsis	26(52)	52(52)	1.173(0.59- 2.31)	0.64
Fallece	3(7)	4(4)		

+ Controles: *Klebsiella pneumoniae* (n=30, *Klebsiella oxytoca* n=8), *Escherichia coli* (n=24), *Pseudomonas aeruginosa* (n= 24), *Enterobacter cloacae*(n=5), *Serratia marcescens* (n=5), *Proteus mirabilis* (n=4)

* (antecedentes de Cateter venoso central, sonda vesical, asistencia respiratoria mecánica o cirugía)

** betalactámicos (ceftriaxona, ceftazidima, carbapenem, piperacilina-tazobactam) solos o asociados a vancomicina.

Tabla 7. Distribución según Enfermedades subyacentes en los casos y sus controles

Variable	Casos (n=45) N (%)	Controles (n=86) N (%)	OR (IC 95%)	P
Enfermedad Cardiovascular	15(33)	12 (14)	3.14(1.33-7.38)	0.009
Enfermedad Onco-hematológica	6(13)	20(23)	0.54 (0.20-1.45)	0.22
Quemadura	12(27)	8 (9)	3.63 (1.37-9.59)	0.009
Malformación Gastro-intestinal	3 (7)	17(20)		
Inmunodeficiencias	3(7)	1(12)		
*Otras	6(13)	28(32)		

* Otras: Malformaciones de vías urinarias, metabolopatías, transplantados hepáticos, enfermedades neurológicas, collagenopatías, síndromes genéticos.

ABSTRACT

Background: Multiresistant *Acinetobacter species* emerge as an important healthcare- associated pathogen, an understanding of the epidemiology is necessary in order to develop strategies to curtail their spread.

Aim: to analyze the epidemiology, clinical characteristics and antimicrobial profile of multiresistant *Acinetobacter spp.* bacteremia (MAB) in a pediatric hospital.

Methods: case- control study, demographic and clinical data from all MAB (cases) and from Gram-negative bacteremia non multi-resistant (controls) from 2005 to 2008 at Garrahan Hospital was collected .Time–kill studies and clonally relationships was identified by a polymerase chain reaction assay with degenerate oligonucleotide primers. Stata 8.0 was used for data analysis.

Results: A total of 50 MAB and 100 controls were analyzed, 100%of the MAB (n= 50) was confirmed as *A. baumannii*, and five clones was detected. Kill curves tested showed only bactericidal effects in 3 of 5 clones with ampicilin-sulbactam plus gentamicin and colistin alone showed bactericidal effect as well as with the different combination tested. Ninety four percent of the patients acquired MAB in ICU. Eighty eight percent had underlying condition: congenital heart diseases (33%), burn (27%) and oncohematological disease (13%) were the most frequent. All patients had invasive procedures previous to MAB: 100% central venous line, 90% mechanical ventilation, 52 % urinary catheter and 89 % had previous surgery .The median length hospitalization previous MAB was different vs. controls (16 days vs. 7 days, p=.0001). The final diagnosis were: central venous catheter-associated bacteremia (40%),

bacteremia related to skin and soft-tissue infections (24%) and primary bacteremia (22%).Treatment in MAB were: colistin alone (58%), colistin plus carbapenem (26%), colistin plus piperacilin- tazobactam (10%), colistin plus ampicilin- sulbactam (4%), and ceftazidime plus colistin (2%). Three of the cases died. In multivariate analyses: final predictors of MAB were: previous broad-antibiotics (carbapenems and third-generation cephalosporin): OR 5.5 IC 95% 1.46-20, $p = .012$, mechanical ventilation (OR 5, IC 95% 2-12, $p = .000$) and previous surgery (OR 2.92, IC 95% 1.10 -7.92, $p = .035$).

Conclusion: MAB was detected in a special group of patients with underlying conditions, invasive procedures and prolonged hospitalization. In vitro bactericidal effect was similar with colistin alone as well as with the different combination tested. The development of innovative control strategies is needed in order to limit the spread of these pathogens

BIBLIOGRAFÍA

1. Lenie Dijkshoorn, Alexandr Nemec and Harald Seifert .An increasing threat in hospitals:multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Natur e reviews microbiology 2007; 5:939-951.
2. Gales A C, Jones R N, Forward K R, Linares, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug- resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). Clin Infect Dis 2001; 32 (Suppl 2): S104-S13.
3. Gross Barrett T., Patchen E. et al. Quality standard for the treatment of Bacteremia. Clin Infect Dis 1994;18:428-30.
4. L. Silvia Munoz- Price, and Robert A. Weinstein. *Acinetobacter* Infection N Engl J Med 2008; 358:1271-81.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19 Vol.29 N° 3
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M 07-A8 Vol. 29 N°2
7. Consenso sobre criterio de ensayo interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad en los BNNF de importancia clínica.SADEBAC 2005.

8. Lee K, Lim Y. S., Yong D et al (2003) Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4623-4629.
9. Lee K, Chong Y, Shin HB, Yong D et al (2001) Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 7:88-91.
10. Masuda G, Tomioka S, Hasegawa M (1976) Detection of beta-lactamase production by gram-negative bacteria. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 29(6):662-664.
11. Limansky A, Viale A (2002) Can composition and structural features of oligonucleotides contribute to their wide-scale applicability as random PCR cebadores in mapping bacterial genome diversity? *Journal of Microbiological Methods* 50:291-297).
12. Lorian V. (ed.) Antibiotics in Laboratory Medicine 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1996.
13. Fiorilli G, Lopardo H, Galas M, RED WHONET, Pasterán F. Tetraciclinas en *Acinetobacter* spp: impacto del cambio del punto de corte del método de difusión por el CLSI. XI Congreso Argentino de Microbiología (2007) Póster
14. Yu-Chen Tseng , Jann-Tay Wang, Fe-Lin Lin Wu et al Prognosis of adult patients with bacteremia caused by extensively resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59 (2007) 181-190.
15. Manikal VM, Landman D, Saurina G et al. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis.* 2000; 31:101-106.16. Smolyakov R, Borer A, Riesenber K. et al (2003) Nosocomial multi_drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *J Hosp Infect* 54:32-38.
17. Go ES, Urban C, Burns J, et al. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet.* 1994; 344:1329-1332
18. Kuo LC, Yu CJ, Lee LN et al (2003) Clinical features of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia at a university hospital in Taiwan. *J Formos Med Assoc*102:601-606.

19. Garcia-Garmendia J-L, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, et al. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin Infect Dis*. 2001; 33:939-946.
20. Rebecca H. Sunenshine, Marc-Oliver Wright, Lisa L. Maragakis et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* Infection Mortality Rate and Length of Hospitalization. *Emerging Infectious Diseases* 2007;1:97-107.
21. Cisneros JM, Rodriguez-Bano J (2002) Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 8:687-693.
22. Seifert H, Strate A, Pulverer G. et al (1995) Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)* 74:340-349.
23. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States Hospitals: Clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 2000;31: 690-7.
24. Lisa L. Maragakis and Trish M. Perl *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46:1254-63
25. Anton Y. Peleg, Harald Seifert, and David L. Paterson *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen *Clinical Microbiology Reviews*, July 2008, p. 538-582
26. Emine Alp ; Duygu Esel ; Orhan Yildiz ; Andreas Voss et al. Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream infection isolates in a Turkish university hospital *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2006; 38: 335 - 340
27. Landman D, Quale JM, Mayorga D, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med*. 2002; 162: 1515-1520
28. Yoon J, Urban C, Terzian C et al. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 753-757
29. Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*. 2003; 36:1268-1274.



EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A NEUMOCOCO SEROTIPO ESPECÍFICA EN NIÑOS CON SOSPECHA DE INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA DESAFIADOS CON VACUNAS 23 VALENTE Y HEPATAVALENTE CONJUGADA.

Jessica Sardaños, Verónica Natoli, Daniela Carelli, María Isabel Gaillard,
Liliana Bezrodnik.

Grupo de Trabajo de Inmunología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Buenos
Aires. Gallo 1330 pabellón Q 1 piso.

Las infecciones bacterianas recurrentes en niños nos orientan a pensar en compromiso de la respuesta inmune; siendo la expresión clínica de diferentes deficiencias humorales.

Los pacientes pueden presentarse según el compromiso del compartimento inmune humoral con disminución o ausencia de uno o más anticuerpos, de linfocitos B en sangre periférica o tan solo defectos funcionales específicos frente antígenos proteicos y/o polisacáridos (1,2).

El estudio funcional de los anticuerpos frente al desafío antigénico natural o post vacinal resulta una herramienta fundamental para el diagnóstico de inmunocopenia. El fracaso en la respuesta nos permite arribar al diagnóstico de Inmunodeficiencia y en base al mismo la indicación terapéutica del tratamiento sustitutivo con gammaglobulina humana endovenosa en algunos casos, y en otros, la necesidad de antibióticos profilácticos (3)

Las infecciones causadas por el *streptococcus pneumoniae* son la mayor causa de morbi-mortalidad en el mundo. Neumonía, bacteriemia y meningitis son las manifestaciones mas comunes de la enfermedad invasiva, mientras que otitis media, sinusitis y bronquitis recurrentes son manifestaciones no invasivas, menos severas, con una alta morbilidad. (4) Todos los grupos etarios pueden ser afectados por este germen, aunque la incidencia es mayor en niños menores de 2 años, debido a su inmadurez inmunológica para desarrollar respuesta frente a antígenos polisacáridos (respuesta T-independiente)(5).

El polisacárido capsular del *streptococcus pneumoniae* representa un diverso número de polímeros que juegan un rol esencial en la virulencia de la bacteria. Hasta ahora se han identificado serológicamente más de 90 polisacáridos diferentes, de los cuales 40 serotipos son responsables de infecciones humanas y de éstos, 12 son responsables del 80% de las enfermedades invasivas.(6)

La valoración de la respuesta inmune frente al desafío con antígenos polisacáridos, resulta una herramienta fundamental en pacientes con sospecha de Inmunodeficiencia primaria Humoral (IDPH).

En 1997 el Grupo Latino Americano de Inmunodeficiencias (LAGID) recomendaba medir en niños mayores de 2 años con sospecha de IDPH la respuesta a por lo menos 6 serotipos (ST) del polisacárido capsular incluidos en la vacuna 23 valente. (7) En los últimos años el número de serotipos a evaluar ha aumentado a 10 o más y en algunos casos se valora no solo IgG total sino también IgA o subclases de IgG (IgG1 – IgG2).(7,8)

La vacuna polivalente para neumococo, contiene diferentes concentraciones de 23 serotipos del polisacárido capsular (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F y 33F) responsables de la mayoría de las infecciones. Sin embargo su indicación está limitada a niños mayores a 2 años.

El desarrollo de la vacuna heptavalente (compuesta por los serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) conjugada con un carrier proteico (toxóide tetánico o diftérico) ha permitido proteger a los niños menores de 2 años, por generar una respuesta T-dependiente.(5)

Dada la indicación masiva de la vacuna conjugada, y teniendo en cuenta que tanto ésta como la 23 valente generan anticuerpos anti neumococo por mecanismos inmunológicos diferentes, en niños que han recibido ambas vacunas se dificulta el análisis de los resultados al momento de valorar la respuesta específica a antígenos polisacáridos.

Actualmente se recomienda realizar la valoración de por lo menos 12 serotipos de neumococo, 6 contenidos en la vacuna 23 valente y 6 en ambas vacunas. (9)

Nuestro laboratorio estudia 10 serotipos (solo 4 exclusivos de la vacuna 23 valente), por lo cual surge la necesidad de ampliar el panel a 12 serotipos específicos, ya que esta técnica es una herramienta diagnóstica fundamental para pacientes con defectos funcionales anticorpóreos.

OBJETIVO

Evaluar la respuesta funcional humoral ampliando el panel a 12 serotipos específicos del neumococo, incluidos en la vacuna heptavalente conjugada y 23 valente, en pacientes mayores de dos años con sospecha de inmunodeficiencia humoral que hayan recibido ambas vacunas.

PACIENTES

En un periodo de un año, se evaluaron 30 niños mayores de dos años que concurrieron a nuestro servicio por presentar cuadro clínico de sospecha de inmunodeficiencia humoral (infecciones bacterianas recurrentes: otitis media aguda, neumonías, sepsis, meningitis, celulitis). 22 pacientes (Grupo I) recibieron una o más dosis de vacuna heptavalente conjugada antes de los dos años y luego de esta edad, se los desafió frente a antígenos polisacáridos con la vacuna 23 valente. 8 pacientes (Grupo II) mayores de dos años que inicialmente fueron desafiados con la vacuna 23 valente, y por sus características clínicas y de laboratorio, se decidió vacunarlos con la heptavalente conjugada.

MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los pacientes, se obtuvo por venopunción, 4 ml de sangre periférica recolectada en tubo sin anticoagulante.

En el Grupo I la extracción se realizó luego de 40 – 60 días post-vacuna 23 valente y en el Grupo II, una extracción basal (solo 23 valente) y a los 40 – 60 días post estímulo (conjugada).

Se evaluaron los niveles de anticuerpos específicos contra los serotipos (ST): 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, estudiados hasta el momento y, 11A y 33F incluidos luego en nuestro estudio para completar 12 serotipos.

Métodos: Determinación de la concentración de anticuerpos isotipo IgG anti neumococo serotipo específico, dirigidos contra 12 ST capsulares. Se empleó la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) casero según Indicaciones de la Organización Mundial de la Salud, con algunas modificaciones. (10,11)

Como antígenos se utilizaron los ST 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 11A, 33F purificados. (American Type Culture Collection, ATCC).

RESULTADOS

POBLACIÓN

Grupo I: Pacientes que recibieron vacuna conjugada + vacuna 23 valente.

N: 22

Distribución por sexo: 9 mujeres, 13 varones

Mediana de Edad: 3 años (rango: 2 a 8 años)

Grupo II: Pacientes que recibieron vacuna 23 valente + vacuna conjugada. Se estudiaron títulos basales (solo 23 valente) y Post estímulo (23 valente + conjugada)

N: 8

Distribución por sexo: 3 mujeres, 5 varones

Mediana de Edad: 8 años (rango: 3 a 21 años)

Los resultados obtenidos se evaluaron según criterios de LAGID 1997, correlacionándolos con las características clínicas y demás datos de laboratorio que permitan arribar al diagnóstico. Considerando respuesta normal frente al desafío con la vacuna 23 valente, un título ≥ 1.3 ug/ml para el 50% de los ST estudiados en niños menores de 5 años y para el 70% de los ST estudiados para aquellos mayores de 5 años.(7)

En el caso de los serotipos presentes en la vacuna heptavalente conjugada, se consideró título protector para enfermedad invasiva: 0.35 ug/ml, de acuerdo a criterios establecidos por la OMS (Organización Mundial de la Salud)

Grupo I

Se evaluó el número de pacientes con respuesta adecuada a cada serotipo, para los 4 serotipos presentes exclusivamente en la vacuna 23 valente.

Observándose que 4 niños no respondieron en forma adecuada a ningún serotipo, 8 respondieron solo a 1, 6 respondieron a 2, 4 respondieron a 3 y ningún niño respondió a los 4 serotipos. (Tabla 1).

Agregando al estudio 2 serotipos más (11A , 33F) podemos ver la variación en la distribución de la respuesta. (Tabla 2).

Teniendo en cuenta la edad de los pacientes y considerando los criterios de repuesta de LAGID, estudiando 4 ST, observamos que 13 pacientes fueron no respondedores, mientras 9 si respondieron. Al agregar 2 ST, 14 pacientes fueron no respondedores y 8 respondedores. (Tabla 3 y 4).

Tabla 1. Frecuencia de Respuesta (Rta.) sobre 4 Serotipos (ST) estudiados: S1, S3, S5, S7, presentes solo en la vacuna 23 valente.

Nº de Serotipos con Rta. Adecuada	0	1	2	3	4	Total
Frecuencia						
%	18.18	36.36	27.27	18.18	0 0	100
n	4	8	6	4		22

Tabla 2. Frecuencia de Respuesta sobre 6 ST estudiados: S1, S3, S5, S7, S11A, S33F presentes exclusivamente en la vacuna 23 valente.

Nº de Serotipos con Rta. Adecuada	0	1	2	3	4	5	6	Total
Frecuencia								
%	18.18	13.64	27.27	18.18	4.55	18.18	0 0	100
n	4	3	6	4	1	4		22

Tabla 3. Respuesta a 4 ST en grupo I

Respuesta	No	Si	Total
n	13	9	22
%	59.09	40,91	100

Tabla 4. Respuesta a 6 ST en grupo I

Respuesta	No	Si	Total
n	14	8	22
%	63.64	36.36	100

Evaluando 6 ST analizamos diferencias entre pacientes respondedores y no respondedores según la edad (mayores y menores de 5 años). Observamos que 9 (56%) pacientes menores de 5 años no respondieron en forma adecuada, mientras 7 (44%) si lo hicieron. En los mayores de 5 años, 5 niños (83%) no respondieron y solo uno (17%) si respondió. (Tabla 5).

Tabla 5. Respuesta por edad evaluando 6 ST

	< 5 años	≥ 5 años	Total
No rta	9	5	14
Si rta	7	1	8
Total	16	6	22

Evaluamos la respuesta frente a antígenos polisacáridos, comparando el estudio de 4 ST (1, 3, 5, 7F) vs. 6 ST (1, 3, 5, 7F, 11A, 33F) presentes exclusivamente en la vacuna 23 valente.

Analizando 4 ST: 13 pacientes fueron no respondedores y 8 respondedores. Al agregar 2 serotipos más (6 ST), solo 1 paciente (menor de 5 años) modificó su respuesta. (Tabla 6).

La Concordancia absoluta entre el estudio de 4 Serotipos y 6 Serotipos fue del 95%, con un índice Kappa de 0.9.

Tabla 6. Comparación de respuesta estudiando 4 Serotipos vs. 6 Serotipos

Respuesta	No (6ST)	Si (6ST)	Total
No (4ST)	13	0	13
Si (4ST)	1	8	9
Total	14	8	22

GRUPO II

En estos 8 pacientes se compararon títulos basales y Post estímulo:

Para los serotipos no presentes en la vacuna conjugada (ST1, 3, 5, 7F) no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) (Gráfico I)

Con respecto a los presentes en la vacuna conjugada sí se observó diferencia significativa en los serotipos 6B, 9V, 18C, 19F y 23F, ($p < 0.05$). Excepto en el serotipo 14 donde, si bien se vio aumento de título, no fue estadísticamente significativo. (Gráfico II)

Evaluando respuesta a los serotipos presentes en la vacuna conjugada (6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), en el total de pacientes estudiados ($n:30$), se observó que más del 95% alcanzó títulos mayores o iguales a 0.35ug/ml, nivel considerado protector para enfermedad invasiva por la OMS. (Gráfico III.)

Gráfico I

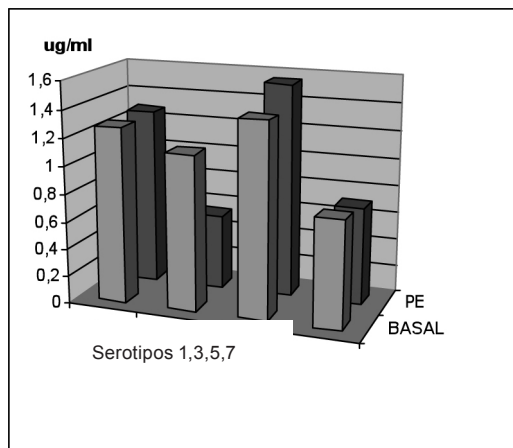


Gráfico II

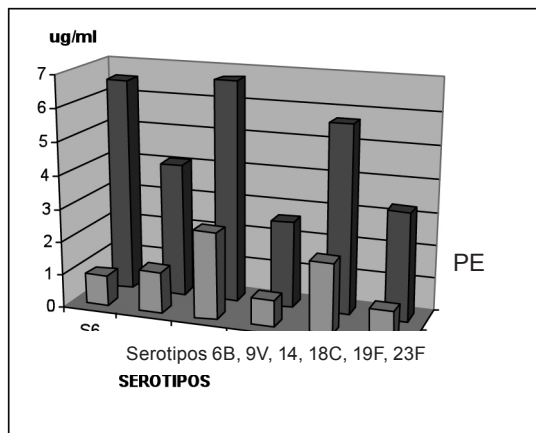
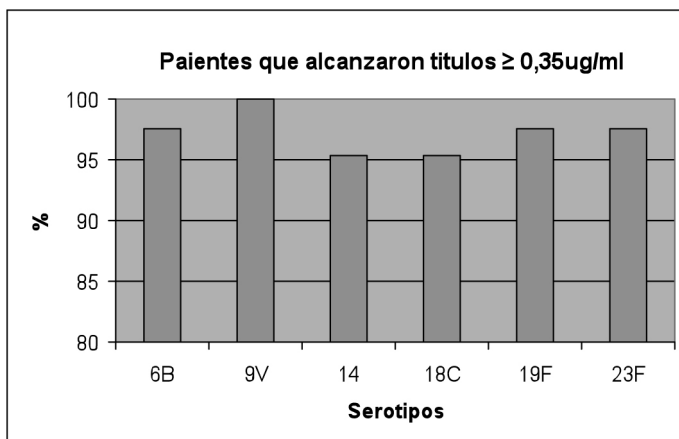


Gráfico III



CONCLUSIONES

De los 22 pacientes del grupo I, el 41% fueron respondedores y el 59%, no respondedores cuando se evaluaron 4 serotipos (1, 3, 5, 7F) exclusivos de la vacuna polisacárida 23 valente.

Al completar el estudio con un total de 6 serotipos (1, 3, 5, 7F, 11A, 33F), se observó que solo un paciente pasó a ser no respondedor, mientras que los 13 que eran no respondedores permanecieron como tales.

El valor de concordancia obtenido entre la evaluación de 4 y 6 ST fue del 95%, esto nos indica que ambos ensayos nos aportan la misma información. Sin embargo sabemos que cuanto más serotipos estudiemos, mayor valor estadístico tendrán nuestros resultados.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar porcentaje de respondedores y no respondedores según grupo etario (≥ 5 años vs < 5 años). Consideramos que esto se debe al tamaño de la muestra evaluada.

Los 14 pacientes que no cumplieron con los criterios de respuesta según la edad, presentando alteración en la respuesta a antígenos polisacáridos, fueron evaluados según sus características clínicas y otros datos de laboratorio a fin de tomar conducta terapéutica.

Con respecto a los pacientes del Grupo II, desafiados inicialmente con vacuna 23 valente se observó un aumento significativo, luego de recibir la vacuna conjugada, en los títulos de los serotipos 6B, 9V, 18C, 19F y 23F. Sin embargo, no se vio modificación en los títulos de los serotipos exclusivos de la vacuna 23 valente (1, 3, 5, 7F). En el caso del serotipo 14, si bien se vio aumento de título, éste no fue estadísticamente significativo. Suponemos que se debe a la presencia de valores basales altos, dada la frecuencia de dicho serotipo en nuestro medio.

El hecho de ampliar el panel de serotipos estudiados, nos permitió evaluar la capacidad de respuesta a antígenos polisacáridos en pacientes con sospecha clínica de IDPH que recibieron la vacuna conjugada heptavalente. Logrando de esta manera mejorar la utilidad clínica de nuestros resultados.

ABSTRACT

Recurrent bacterial infections in children may be the clinical expression of many different humoral deficiencies. Invasive pneumococcal disease leads to significant morbidity and mortality in the world.

Immunization with pneumococcal vaccine is useful to evaluate antibody response to polysaccharide (PLS) antigen in children older than 2 years suspected of having primary humoral immunodeficiency (IDPH).

At present we evaluate specific PLS response by measuring antibody response against 10 pneumococcal specific serotypes; only 4 of them being present exclusively in PLS vaccine.

Given the massive use of protein-pneumococcal conjugate vaccine which produces a humoral immune response different from PLS vaccine, in children who have received both vaccines it is difficult to assess specific polysaccharides response.

Objective: To evaluate humoral immunity in children older than 2 years, who have received both pneumococcal vaccine (conjugate and PLS), by studying an extended panel of 12 specific pneumococcal serotypes included in both (6 serotypes present in PLS vaccine).

Patients and Methods: We studied 30 children, older than 2 years suspected of humoral immunodeficiency, who had received both pneumococcal vaccine (conjugate and PLS). Twenty two of them (Group I) had received at least one dose of conjugate vaccine followed by one dose of PLS vaccine. Whereas 8/30 patients (group II) had received the vaccines the other way about.

Antibody (IgG) response against 12 pneumococcal serotypes (1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 11A, 33F, 6 only present in the PLS vaccine), was measured by enzyme immune assay method (ELISA) according to the recommendation of the World Health Organization (WHO).

Results: On evaluating antibody response to only 4 serotypes present in PLS vaccine, in Group I we found 9 patients (41%) who had a proper antibody response and 13 (59%) who did not.

When two more serotypes present in PLS vaccine were analyze in this Group, only one patient (pt) condition changed: 8 pts had a proper antibody response and 14 did not.

The concordance index obtained between 4 versus 6 serotypes assays was 95% with a kappa index: 0.9.

Dividing group I by age ($\geq$ or $<$ than 5 years old) there was no significant difference in the percentage of children with good and poor response to 6 serotypes.

On evaluating titers of antibody previous (pt only with PLS vaccine) and post immunization (with conjugate vaccine) in all pt of group II, differences in 5 serotypes (6B, 9V, 18C, 19F and 23F) included in conjugate vaccine were found, but no differences were found in titers to serotypes only present in PLS vaccine.

Conclusions: The high degree of concordance obtained between the analysis of 4 versus 6 serotypes (95%, with a kappa index: 0.9) leads us to conclude that both trials provide the same information. However, we know that studying more serotypes yield more statistical value to our results.

BIBLIOGRAFÍA

1. Síndrome de deficiencia de Anticuerpos anti polisacáridos con niveles séricos normales de inmunoglobulinas. Ferreyra P y col. Archivos de Alergia e inmunología Clínica.2001; 32, (4): 109-116.
2. Human primary immunodeficiency disease: a perspective. Alain Fischer. Nature Immunology. January 2004; 5 (1): 23-30.
3. Inmunoglobulina G Endovenosa: Mecanismos de acción e indicaciones Clínicas. Sisti AM, Manfredi MJ. Alerg Inmunol Clin 2000; 17 (4): 168-17.
4. Antibody deficiencies. Hans D. Ochs. Chapter 13 for Immunologic Disorders in infants and Children. Richard Stiehm.2004.
5. Inmunidad mediada por Linfocito B. Mirta Giordano. Capítulo 10. Introducción a la Inmunología Humana. Leonardo Fainboim. 2005.

6. Which Pneumococcal Serogroups cause the most invasive disease: implication for conjugate vaccine formulation and use. Hausdorff W. Clin Infect Dis, 2000;30:100-121.
7. Clasificación y Manejo de las Inmunodeficiencias de Anticuerpos Específicos con Inmunoglobulinas Normales. Boletín LAGID 1997. Sorensen R.
8. Age-Associated Differences in Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 Subclass Antibodies to Pneumococcal Polysaccharides Following Vaccination. Lottenbach K y col. Infection and Immunity. Sep. 1999; 67 (9): 4935-4938.
9. Assesment and clinical interpretation of polysaccharide antibody response. Paris K., Sorensen R. Annal of Allergy. Asthma immunology. 2007, Vol 99.
10. Training manual for Enzyme Linked immunosorbent assay for the quantitation of *Streptococcus pneumoniae* serotype specific IgG. Worl Health Organization Pnemococcal Serology Reference Laboratories at the institute of Child Health, University College London.
11. Anti-pneumococcal IgG antibodies. Operating Policies and Procedures. Children's Hospital. Immunology. New Orleáns.



CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS MESOTELIALES PLEURALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO: APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DERRAMES PLEURALES DE ORIGEN MALIGNO, INFECCIOSO Y TRANSUDATIVO.

Schierloh Luis Pablo¹ y Dra. Rosa M. Musella²

¹Instituto de Investigaciones Hematológicas "M. R. Castex", Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. ²Servicio de Tisioneumonología, Hospital Muñiz, CABA, Argentina.

RESUMEN

Las células mesoteliales (CM) conforman una monocapa que recubre internamente la cavidad pleural cuya función está ligada al control homeostático del volumen y composición del fluido pleural. Dado que su fenotipo y función es afectada por el microambiente en el que se hallan, durante el presente estudio analizamos diferentes parámetros de interés sobre CM presentes en efusiones pleurales derivadas de diferentes patologías mediante la técnica de citometría de flujo. Estos estudios permitieron identificar características específicas de CM de pleuresías tuberculosas y malignas, las cuales podrían ser la base para un rápido método de diagnóstico diferencial de estas enfermedades.

INTRODUCCION

La pleura, al igual que el peritoneo y el pericardio, es una membrana serosa constituida por una monocapa de células mesoteliales (CM) y tejido conectivo subyacente. Rodea los pulmones (pleura visceral) y recubre internamente la caja torácica definiendo una cavidad conocida como espacio pleural. Este espacio se encuentra bañado por una fina película de fluido cuyo volumen, composición y renovación se encuentran fisiológicamente controlados por el mesotelio pleural y, en menor medida por drenaje linfático. La función del líquido pleural (LP) es la de acoplamiento mecánico y lubricación entre la pared torácica y el pulmón durante los movimientos asociados a la respiración (Zocchi 2002).

En ciertas condiciones patológicas se produce un desbalance entre las fuerzas que controlan el volumen del LP dando lugar a un derrame o efusión pleural. Básicamente, estos derrames pueden clasificarse como trasudados o exudados dependiendo de su contenido en proteínas y celularidad. En los procesos inflamatorios de la pleura (pleuritis) pueden desarrollarse exudados que contienen leucocitos que arriban al foco, como así también descamaciones del mesotelio y/o células de origen maligno (Mutsaers 2002). Las poblaciones celulares presentes varían en función del origen etiológico y del tiempo de evolución de la pleuritis. De esta forma, infecciones bacterianas agudas desarrollan empiemas con un alto contenido en polimorfonucleares neutrófilos mientras que los derrames producto de infecciones crónicas (como con *Mycobacterium tuberculosis*) son ricos en linfocitos T (Antony & Mohammed 1999).

En trabajos previos, hemos estudiado *ex vivo* e *in vitro* diferentes poblaciones leucocitarias de LP de origen maligno e infeccioso, pero las características fenotípicas y funcionales del mesotelio aun no han sido analizadas en este tipo de muestras (Schierloh et al. 2005, 2007, 2009; Alemán 2005). Recientemente, estudios con líneas y cultivos primarios de mesotelio pleural y peritoneal han demostrado que además de su función clásica, este tipo celular es capaz de cumplir diferentes funciones inmunológicas como el reconocimientos de patógenos, síntesis de citoquinas y presentación antigénica (Valle et al. 1995; Basok et al. 2001; Kato et al. 2004; Hussain et al. 2008). En este sentido, se ha sugerido que la interacción entre el mesotelio y las células de sistema inmune podría jugar un papel relevante a nivel local durante el inicio, mantenimiento y resolución de la inflamación (Glik and Douvdevani 2006; Pace et al. 2008).

Teniendo en cuenta que el microambiente en el que se encuentran las CM tiene un alto impacto en sus características morfológico-funcionales (Yáñez-Mó et al. 2003), durante el presente trabajo analizamos y comparamos CM aisladas de efusiones pleurales de origen trasudativo, maligno e infeccioso mediante técnicas de citometría de flujo. Para esto, emplearemos dos abordajes experimentales: *ex vivo* e *in vitro*. En el primero, se determinamos la expresión de moléculas con relevancia inmunológica en células recientemente aisladas del LP. En el segundo, se obtuvimos cultivos primarios de CM humanas (CMH) y evaluamos cambios morfométricos y del nivel de expresión de receptores en respuesta a diferentes estímulos.

OBJETIVOS

Desarrollo y validación de técnicas de citometría de flujo orientadas a caracterizar fenotípica y funcionalmente a las células mesoteliales (CM) aisladas de efusiones pleurales. Establecimiento de características distintivas entre CM de derrames de origen maligno, infeccioso y transudativo, con especial énfasis en el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa.

MATERIALES Y METODOS

Población en estudio: Los pacientes fueron reclutados en el Pabellón de Tisioneumonología del Hospital Muñiz. Los pacientes incluidos en el estudio fueron HIV negativos con derrames pleurales a causa falla cardíaca congestiva (trasudados, CHF), cancer de origen no mesotelial (exudado, CNR) y tuberculosis (exudado, TB), quienes firmaron un consentimiento informado previo a la obtención de la muestra. El líquido pleural (LP) fue obtenido por el método de toracocentesis (Schierloh et al. 2005). El presente estudio ha sido avalado por los Comités de Ética de la Academia Nacional de Medicina y del Hospital Muñiz.

Análisis ex vivo de células mesoteliales pleurales humanas (CMH) por citometría de Flujo: Las células mononucleares fueron obtenidas a partir de LP mediante el método de centrifugación en gradiente discontinuo de Ficoll-Hypaque. Por citometría de flujo, se identificaron a las células mesoteliales de acuerdo con los siguientes parámetros específicos: Gran tamaño y complejidad celular (FSC/SSC alto), negatividad para el marcador de leucocitos (CD45-) y positividad para el marcador de mesotelio/epitelio citoqueratina (CKN+). Dentro de la población identificada, se efectuaron determinaciones de expresión de las siguientes moléculas fisiológicamente relevantes: i) Moléculas co-estimuladoras (CD83, CD86, CD80, ICAM-1), ii) receptores de reconocimiento de patógenos (DC-SIGN, Manosa Receptor, CD14, TLR2 y TLR4), iii) moléculas de presentación antigénica (HLA-I (A,B y C) y HLA-II (DR, DP y DQ)) y iv) receptores de moléculas co-estimuladoras/de adhesión (CD80,CD86, CD83, ICAM-1). Las determinaciones se realizaron empleando un citómetro FASCan operado con el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Para el análisis de datos se utilizó el programa FSCexpress (De novo Software).

Microscopía óptica y de Inmunofluorescencia: La validación de los resultados obtenidos por citometría de flujo se realizó mediante microscopía óptica (tensión de MGG y PAS) y de inmunofluorescencia (FITC-anticuerpo y DAPI). Para las observaciones morfológicas se empleó un microscopio invertido de campo claro (Olympus). Para el análisis de inmunofluorescencia se empleó un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss). Para su presentación, las microfotografías fueron mínimamente editadas con el programa PhotoShop (Adobe).

Cultivo primario de CMH: A partir células mononucleares de LP, se establecieron cultivos primarios enriquecidos en células mesoteliadas por adherencia en placas de 24 o 48 pozos, durante 5-12 días en medio RPMI 1640 15% SFB a 37°C y 5 % CO₂. Los cultivos resultantes (CD45⁻ CKN⁺) se replicaron en placas de 96 pozos a una densidad de 10⁴ células/pozo permitiendo alcanzar la confluencia a las 12-24h.

Estimulación in vitro de CMH: Los cultivos confluentes de primer repique de CMH fueron empleados en estudios funcionales de estimulación *in vitro*. Para la estimulación *in vitro* se emplearon células de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) de la cepa H37Rv inactivadas por radiación. También se utilizó interferón gamma (IFN- γ), que es la citoquina más abundante el sitio de infección y lipoconjugados asociados al reconocimiento innato de patógenos como Lipopolisacaridos (LPS de *E.coli*), Lipoarabinomananos (ManLAM de *Mtb* H37Rv) y lipopeptidos sintéticos (Pam₃CySK₄). Las dosis de estímulo y los períodos de incubación óptimos fueron determinados experimentalmente. Previo al análisis por citometría de flujo, las monocapas de CMH fueron tratadas con tripsina-EDTA a fin de obtener suspensiones unicelulares. La morfología y la modulación de moléculas de superficie fueron determinadas por citometría de flujo y/o microscopía de acuerdo a lo indicado anteriormente.

Análisis Estadístico: Para efectuar inferencias estadísticas entre distintos tratamientos o subpoblaciones dentro de una misma muestra aplicamos la prueba t-pareada (paramétrica), la prueba de Wilcoxon (pereada, no paramétrica) y ANOVA de un factor de mediciones repetidas para comparaciones entre más de 2 grupos. Para comparaciones entre muestras provenientes de distintos individuos aplicaremos la prueba Mann-Whitney (no pareada, no paramétrica) para 2 grupos y ANOVA de 1 factor para más de 2 grupos.

Empleamos el software Prisma® (GraphPad Software Inc) considerando valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Citometría de flujo de CM pleurales: validación de parámetros morfológicos y fenotípicos

Inicialmente, enfocamos nuestro esfuerzo en la puesta a punto de la técnica de análisis de CM pleurales por medio de citometría de flujo. En este punto, logramos establecer experimentalmente los parámetros morfológicos y marcadores fenotípicos propios de estas células que permiten diferenciarlas de las demás poblaciones celulares presentes en los LP.

El tamaño y complejidad intracelular pueden ser estimados por citometría de flujo en función de los parámetros “Fordward” y “Side” Light scatter, respectivamente. De este modo, establecimos una región de análisis (R1) de alto tamaño y complejidad que excluye las células linfoides, los monocitos y granulocitos y que incluye a las CM y a los macrófagos/células dendríticas (Figura 1).

Las CM son de origen mesodérmico y como tales, carecen del marcador pan-leucocitario CD45. Esta propiedad nos permitió diferenciarlas fenotípicamente de las células del sistema inmune que arriban al espacio pleural durante la inflamación. Otra característica de las CM que es compartida con los epitelios, es la alta expresión de la molécula de cito-esqueleto citoqueratina (CKN). En función de estos datos, validamos la medida de células CD45-CKN⁺ de gran tamaño y complejidad (región R1) por citometría de flujo como un nuevo método alternativo al estudio morfológico por microscopio. En este punto encontramos existe una correlación entre la cantidad de células con morfología mesotelial y el número de eventos CD45-CKN⁺ dentro de la región R1 en LP provenientes de diferentes etiologías (Figura 1). Más aún, cuando analizamos por inmunofluorescencia la expresión de CKN empleando el mismo anticuerpo del análisis por citometría encontramos que solo las células con morfología mesotelial dan una señal positiva (Figura 1).

La adaptación de la metodología de citometría de flujo al análisis de las CM ha requerido un esfuerzo significativo. Esto se debe a que esta herramienta ha sido originalmente concebida y desarrollada para el estudio de poblaciones celulares de origen hematológico como leucocitos, eritrocitos y precursores de médula ósea. Su aplicación en tipos celulares diferentes como endotelio,

mesotelio o epitelio, implica tres problemas básicos: i) Propiedades celulares diferentes (Ej.: tamaño, complejidad celular y adherencia intercelular, frecuencia); ii) Menor disponibilidad de reactivos específicos (Ej.: Anticuerpos monoclonales linaje-específicos) y iii) Menor experiencia (Ej.: Bibliografía técnica).

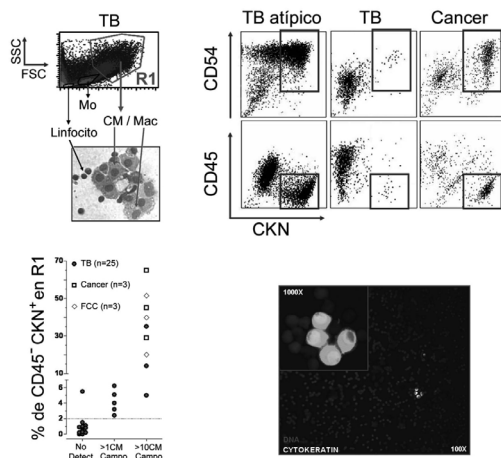


Figura 1: Validación del análisis fenotípico de células mesoteliales pleurales humanas por citometría de flujo. El análisis morfológico de las células mesoteliales (CM) pleurales por microscopía de campo claro fué utilizado para validar el análisis fenotípico por citometría de flujo. La frecuencia de células grandes, de núcleos regulares y baja relación núcleo/ citoplasma morfológicamente identificadas como CM, coincide con la frecuencia de eventos CD45 negativos/citokeratina (CKN) positivos / ICAM-1 (CD54) positivos circunscritos a la región de gran tamaño y complejidad (R1) determinada por citometría de flujo. El análisis simultáneo de morfología y fenotipo realizado por microscopía de inmunofluorescencia, empleando el mismo anticuerpo anti-CKN utilizado para citometría de flujo, corrobora estos resultados.

Expresión diferencial de moléculas asociadas al reconocimiento innato de patógenos en CM pleurales de diferente origen.

Luego de validar la utilidad del análisis de CM pleurales por citometría de flujo, nos abocamos a caracterizar la expresión de moléculas de superficie expresadas diferencialmente en células mesoteliales (CM) provenientes de efusiones pleurales (EP) de distinto origen. Para esto, comparamos pleuresías tuberculosas (TB), efusiones pleurales malignas no mesoteliomas (CNR) y trasudados (insuficiencia cardíaca congestiva, CHF) a fin de establecer comparaciones.

Los receptores de reconocimiento innato de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR), son moléculas localizadas en la superficie celular

o en vesículas intracelulares, que tienen la capacidad de unirse a estructuras moleculares presentes en microorganismos y ausentes la célula huésped. Mediante dicha interacción, los PRR desencadenan cascadas de señalización intracelular capaces de modular diversos mecanismos de defensa como fagocitosis, secreción de mediadores pro-inflamatorios, estallido respiratorio y presentación antigénica, entre otros. La funcionalidad de estas moléculas esta comúnmente asociada a leucocitos fagocíticos como células dendríticas, macrófagos, monocitos, polimorfonucleares y linfocitos B, aunque durante la última década se ha demostrado su expresión y función en otros tipos celulares como NK, linfocitos T, endotelio y epitelio. Por esto último, nos preguntamos si podrían detectarse PRRs en el mesotelio pleural humano y si, de existir, esta expresión tendría algún correlato con la inflamación en el espacio pleural.

Para esto, se determinó la expresión de 5 PRR (Toll like receptor 2 (TLR2), TLR4, CD14, DC-SIGN y Receptor de manosa (MR)) en células pleurales de gran tamaño y complejidad de origen mesotelial (CD45⁻) y de origen leucocitario (CD45⁺) como comparación. En los casos en que fue posible, se establecieron cultivos primarios de CM a fin comparar la expresión *in vitro* con la observada *ex vivo*.

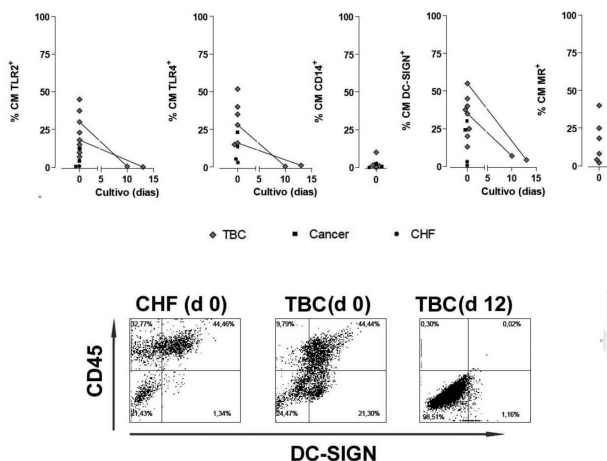


Figura 2: Expresión *ex vivo* e *in vitro* de receptores de reconocimiento innato de patógenos en CM
La expresión de TLR 2, TLR4, CD14, DC-SIGN y receptor de manosa (MR) fue determinada en CM recientemente obtenidas (*ex vivo*) o cultivadas (*in vitro*). TBC, tuberculosis; CHF, insuficiencia cardíaca congestiva; d 12, CM cultivadas durante 12 días.

Como se observa en Figura 2, el % CM que expresan TLR2, TLR4 y DC-SIGN es mayor en TBC y Cancer (EP inflamatorias) que en CHF (EP no inflamatorias). Por otra parte, CD14 no fue detectable en ninguno de estos grupos y la expresión MR solo fue determinada en TB por lo que aún no pueden establecerse comparaciones. Interesantemente, verificamos la desaparición de la expresión de TLR2, TLR4 y DC-SIGN en los cultivos primarios de CM, lo cual sugiere que el microambiente pleural tiene un papel en la inducción de PRR y que dicha inducción es reversible en ausencia de estímulos proinflamatorios. Estos resultados son cosistentes con hallazgos recientes en CM de origen peritoneal (Colmont et al. 2011).

Expresión diferencial de moléculas asociadas a la de presentación de Antígenos en CM pleurales de diferente origen.

Dependiendo de diferentes señales microambientales, las células blanco pueden modular la expresión de moléculas de superficie que permiten a los linfocitos T efectores reconocerlas y ser activados por ellas. Entre estas moléculas se encuentran los Antígenos mayores de histocompatibilidad de clase I y de clase II (HLA-I y HLA-II), las moléculas de Adhesión intercelular-1 (ICAM-1), y las moléculas co-estimulatorias (CD86, CD80, CD83). Dichas moléculas tienen un rol clave durante el proceso de presentación antigénica, y su expresión y capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T autólogos ha sido previamente demostrada en tumores de células mesoteliales (Mutti et al. 1998) y en CM peritoneales (Valle et al. 1995; Hausmann et al. 2000).

De acuerdo con lo que se observa en la Figura 3, encontramos expresión de HLA-II solo en subpoblaciones de CM obtenidas de TB y, en menor medida, en una de las muestras de CNR, pero esta molécula no se encuentra presente en CM de trasudados (CHF). Este resultado es consistente con observaciones realizadas en leucocitos (PMN, monocitos y macrófagos), donde se ha establecido que esta molécula aumenta su densidad de superficie en respuesta a estímulos proinflamatorios como IFN- γ y TNF α . Por otra parte, también observamos que luego de cultivar las CM de pacientes TB, la mayoría pierde la expresión de HLA-II, sugiriendo que esta molécula es up-regulada de modo reversible *in vivo* en respuesta a factores endógenos. Por otro lado, la expresión de HLA-I, fue detectable en la mayoría de la CM independientemente de su origen etiológico y su expresión se conserva a lo largo del cultivo, hecho que no resulta sorprendente dado que la expresión de esta molécula es ubicua y constitutiva en la mayoría de los tejidos.

En relación con la expresión de moléculas co-estimuladoras CD86, CD80 y CD83, no detectamos niveles notables de ninguna de estos 3 marcadores en CM independientemente de su origen. La expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 fue detectable en la mayoría de las CM notándose un aumento en su densidad en muestras derivadas de PE-TB.

Nuestros resultados preliminares señalan que HLA-II puede resultar un marcador promisorio para el diagnóstico diferencial de las efusiones pleurales de origen inflamatorio (exudados).

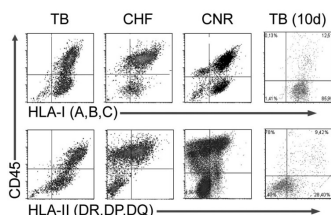


Figura 3: Expresión *ex vivo* e *in vitro* de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II en CM
La expresión de HLA-I (A,B,C) y HLA-II (DR,DP,DQ) fue determinada en CM recientemente obtenidas (*ex vivo*) o cultivadas (*in vitro*). TB, tuberculosis; CHF, insuficiencia cardíaca congestiva; CNR, cancer; 10d, CM cultivadas durante 10 días.

Patrón de expresión superficial de glicanos en CM pleurales

La gran mayoría de las proteínas y lípidos que constituyen la cara externa de la membrana plasmática se encuentran decorados por glúcidos de tamaño variable y diversa composición y configuración de azúcares. Más aún, una misma macromolécula puede encontrarse en diferentes “glicoformas” las cuales pueden alterar su frecuencia en función del estado metabólico de la célula. De acuerdo con nuestras observaciones, existen diferencias de expresión de varias moléculas inmunológicamente relevantes entre las CM provenientes de exudados inflamatorios y no inflamatorios, por lo tanto quisimos estudiar si también tenían lugar cambios en los perfiles de expresión superficial de azúcares. Para efectuar estos ensayos empleamos lectinas aisladas de plantas leguminosas, que son proteínas multiméricas con alta afinidad por motivos de azúcar (“glicotopes”). Una lista de las mismas indicando sus características y especificidad se detalla en tabla 1.

Tabla1: Especificidad, concentración y modificación química de las lectinas empleadas en el presente estudio.

	PHA	PWM [*]	Con A [*]	PSA	WGA [*]	SNA [*]	UEA	PNA
Specie ¹	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Phytoleacca americana</i>	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Triticum vulgaris</i>	<i>Sambucus nigra</i>	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Arachis hypogaea</i>
Specificity sugar ²	Oligo saccharide	(GlcNAc) ₂	α-D-Man α-D-Glc	α-Man	(GlcNAc) ₂ NeuNac	NeuNAc-β-Gal	α-L-fuc	β-Gal(1-3) GalNAc
Assay conc.	- - - - -	0.5µg/ml	- - - - -	- - - - -	- - - - -	0.25µg/ml	- - - - -	- - - - -
Labeling	- - - - -	- - - - -	FITC ³	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Biotin ⁴	- - - - -

¹ Taxonomic name of source organism.
² Most typical saccharide structure recognized.
³ Direct fluorescently labeled lectin with Fluorescein isothiocyanate (FITC). FACS excitation laser: 488nm. Detection channel: FL-1. *Home made label conjugation.
⁴ Biotinlated lectin indirectly labeled with Phycoerythrin-Cy5 conjugated streptavidin (PECy5-SA). FACS excitation laser 488nm. Emission channel: FL3. *Home made label conjugation

Los resultados preliminares que aquí presentamos indican que las CM obtenidas a partir de derrames pleurales tuberculosos difieren en la expresión superficial de glicanos con respecto a otras poblaciones celulares como los Macrófagos presentes en la misma muestra (Figura 1, ejemplo representativo).

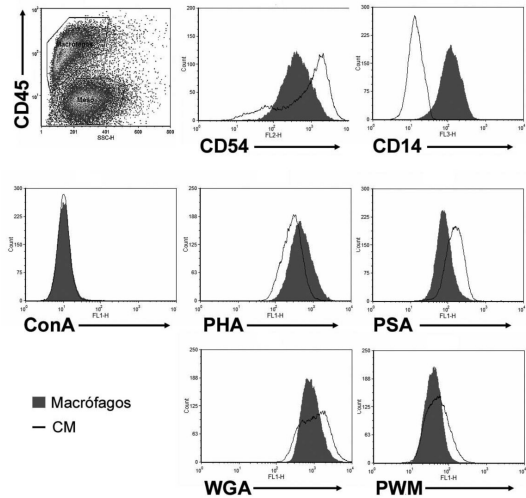


Figura 4: Expresión ex vivo de glicanos en CM comparada con macrófagos pleurales La expresión de glicanos de superficie fué analizada en CM (histogramas huecos) y en macrófagos pleurales (histogramas llenos grises) mediante lectinas descriptas en tabla 1.

La expresión de diferentes glicoproteínas en CM pueden tener un rol relevante en la defensa del mesotelio contra sustancias nocivas o la metástasis (Sharma et al. 2003; Gubbels et al. 2006). Para poder extraer conclusiones más valiosas, será necesario aumentar número y tipo de muestras dado que hasta el momento esta determinación solo se ha efectuado en 3 derrames con el mismo origen etiológico (tuberculosis). El empleo de lectinas como reactivos específicos tiene amplia y muy documentada aplicación en técnicas bioquímicas (ej.: western, ELISA, etc.) e histoquímicas, pero su utilización en FACS no es tan extendida. Este hecho significó la necesidad de poner a punto la técnica ajustando concentraciones y buffers de pegado compatibles con células no fijadas/no permeabilizadas. Además, en aquellos casos donde las lectinas conjugadas no se hallaban comercialmente disponibles, llevamos a cabo las reacciones de biotilación y/o FITCilación en nuestro laboratorio.

La estimulación induce cambios morfológicos en cultivos primarios de CMH:

Durante el análisis citológico rutinario de las muestras de efusiones pleurales es frecuente observar (dependiendo del origen de la efusión) cambios morfológicos sustanciales en las CM (Bryant-Greenwood et al. 2003; Yáñez-Mó M. et al. 2003). Estas células alteradas se denominan “reactivas” y a menudo presentan vacuolas intracitoplasmáticas y varios núcleos por célula. Dichos cambios implican un aumento en la complejidad intracelular, hecho que puede ser estimado por citometría de flujo sin la necesidad de adicionar reactivos específicos mediante el análisis de dispersión ortogonal de la luz: “Side-Scater” (SSC). Por tal motivo nos propusimos correlacionar la información morfo-métrica obtenida por microscopía y citometría de flujo y de valorar su posible aplicación al estudio de CM reactivas. Para tal fin, obtuvimos cultivos primarios de CM pleurales a confluencia y luego los tratamos con diferentes estímulos proinflamatorios. La elección de la citotoquina IFN- γ se debió a que este mediador soluble pro-TH1 es predominante en derrames pleurales de origen tuberculoso, a tal punto, que ensayos diagnósticos basados en su detección están siendo actualmente empleados (Losi et al. 2011). Paralelamente se utilizó *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) inactivado por radiación gamma, dado que en la pared de dicho patógeno ha sido descrita la presencia de un gran número de moléculas con propiedades inmuno-estimulatorias. Así mismo, empleamos un lipoglicano muy abundante en la pared de micobacterias denominado ManLAM que posee propiedades inmunosupresoras sobre las células presentadoras de Antígenos (Maeda et al. 2003).

En la figura 5 vemos que el tratamiento con Mtb induce profundos cambios morfológicos en los cultivos de CMH comparado con las células sin tratar. Más aún, el tratamiento combinado de Mtb con 250UI/ml de IFN- γ intensifica dichos cambios. Cabe señalar que la medición promedio de SSC (complejidad intracelular), correlaciona con las observaciones microscópicas de estructuras intracelulares refringentes en CM reactivas. Por otro lado, los tratamientos con ManLAM e IFN- γ solos o combinados imprimen cambios sutiles casi imperceptibles para la observación microscópica, pero detectables y cuantificables por citometría de flujo-SSC. Los resultados anteriores sugieren un nuevo y sensible método para la valoración cuantitativa y rápida de CM reactivas.

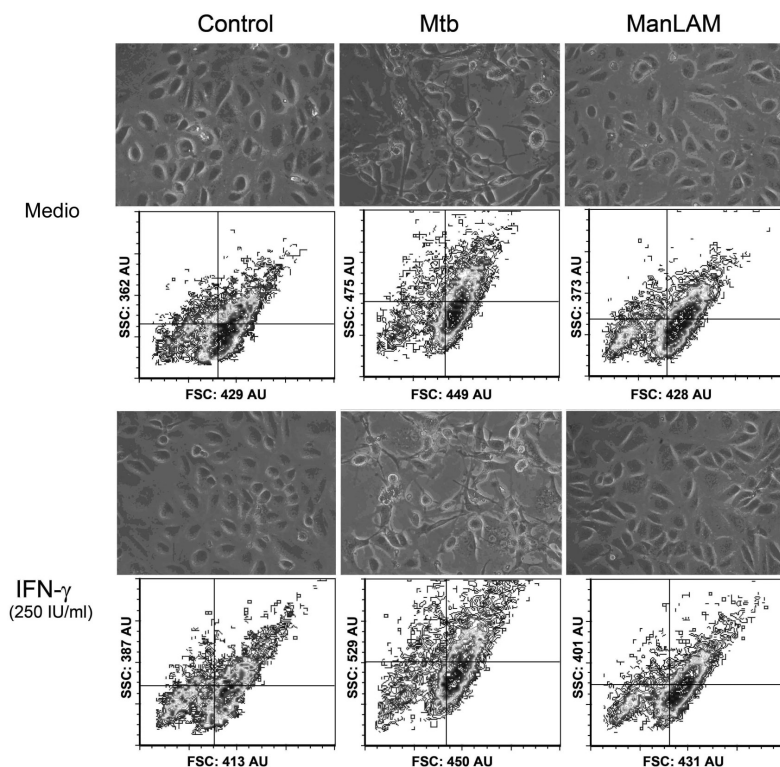


Figura 5: Alteraciones morfológicas en CM en respuesta a la estimulación *in vitro*

En estudios de este tipo, donde se busca reproducir in vitro condiciones a las que la célula se ve expuesta in vivo, es importante tener siempre claras las limitaciones del método al momento de arriesgar conclusiones. Esto es particularmente cierto cuando, como en nuestro caso, el cultivo in vitro no puede contener el complejo número de variables características del microambiente fisiopatológico. Por lo tanto, una de las dificultades fue la selección de la naturaleza y la concentración de los estímulos, las cuales fueron elegidas en función de nuestro conocimiento sobre el sistema y de la bibliografía existente.

Efecto de la estimulación sobre la expresión de receptores inmuno-relevantes en cultivos de CMH:

Nuestros hallazgos indican que en el contexto inflamatorio endógeno, las CM sufren un aumento de los receptores innatos de reconocimiento de patógenos (PPRs) el cual se pierde cuando las CM son cultivadas. A fin de estudiar la posible función de dichos receptores, empleamos los agonistas/ligandos de las moléculas TLR2 (Pam₃CysK₄), TLR4 (LPS) y DC-SIGN (ManLAM) como estímulos de CM en presencia o ausencia de la citoquina IFN- γ . También estimulamos las células con Mtb que es capaz de ser reconocida vía estos mismos receptores (Kleinnijenhuis et al. 2011).

Al cabo de 24h de estimulación, las CM fueron resuspendidas mediante triplicinización y marcadas para su análisis por citometría de flujo. Los resultados de la figura 6 (un experimento independiente representativo de 3 realizados) demuestran que el tratamiento con IFN- γ (250UI/ml) aumenta la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, lo cual sugiere que las CM pueden aumentar la interacción con leucocitos CD11a-b-c/CD18⁺ en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias. Por otro lado, la expresión de TLR2, TLR4 y DC-SIGN no se ve afectada por ninguno de los agonistas de TLR, ManLAM, ni tampoco Mtb.

Seguidamente, estudiamos el efecto que podrían tener otros estímulos solos o en combinación con IFN- γ . En este punto hallamos que ninguno de los estímulos es capaz por sí solo de modificar la expresión de las moléculas aquí analizadas. Por el contrario, el lipoglicano ManLAM inhibe parcialmente el efecto inductor del IFN- γ sobre la expresión de ICAM-1.

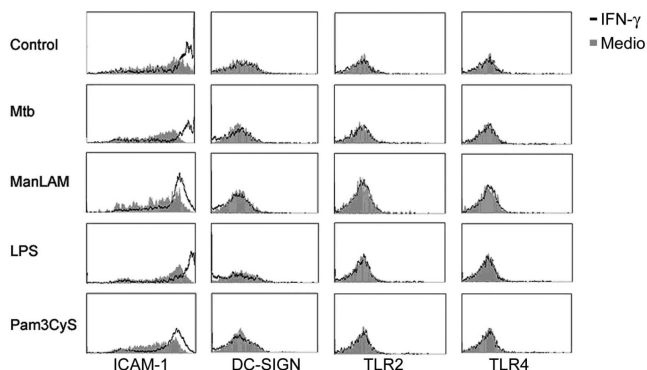


Figura 6: Modulación de inmunoreceptores en CMH estimuladas *in vitro*

ABSTRACT

Mesothelial cell monolayer internally covers the pleural cavity and its function is typically related with the homeostatic control of volume and composition of the pleural fluid. Given that mesothelial cell's phenotype and function can be strongly affected by the local microenvironmental conditions, herein by using the flow cytometry technique, we analyzed different parameters on mesothelial cells present in pleural effusions from several pathologies. These studies lead us to identification of specific characteristics that may be instrumental in the development of diagnostics methods for rapid differentiation among tuberculous and malignant pleurisy.

BIBLIOGRAFIA

1. Aleman M, de la Barrera SS, Schierloh PL, et al. 2005. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J Infect Dis.* 192(3):399-409.
2. Antony VB and Mohammed KA. 1999. Pathophysiology of pleural space infections. *Semin Respir Infect.* 14: 9-17.
3. Colmont CS, Raby AC, Dioszeghy V, et al. 2011. Human peritoneal meso-

- thelial cells respond to bacterial ligands through a specific subset of Toll-like receptors. *Nephrol Dial Transplant*. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21633096.
4. Basok A, Shnaider A, Man L, et al 2001. CD40 is expressed on human peritoneal mesothelial cells and upregulates the production of interleukin-15 and RANTES. *J Am Soc Nephrol*. 12(4):695-702.
 5. Bryant-Greenwood P, Sorbara L, Filie AC, et al. 2003. Infection of mesothelial cells with human herpes virus 8 in human immunodeficiency virus-infected patients with Kaposi's sarcoma, Castleman's disease, and recurrent pleural effusions. *Modern Pathology* 16(2):145-153
 6. Glik A and Douvdevani A. 2006. T lymphocytes: the "cellular" arm of acquired immunity in the peritoneum. *Perit Dial Int*. 26(4):438-48.
 7. Gubbels JAA et al. 2006. *Molecular Cancer*. 5:50
 8. Hausmann MJ, Rogachev B, Weiler M, et al. 2000. Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. *Kidney International*. 57: 476-486
 9. Hussain T, Nasreen N, Lai Y, et al. 2008. Innate immune responses in murine pleural mesothelial cells: Toll-like receptor-2 dependent induction of beta-defensin-2 by staphylococcal peptidoglycan. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295(3):L461-70.
 10. Kato S, Yuzawa Y, Tsuboi N, et al. 2004. Endotoxin-induced chemokine expression in murine peritoneal mesothelial cells: the role of toll-like receptor 4. *J Am Soc Nephrol*. 15(5):1289-99.
 11. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, et al. 2011. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*. 2011:405310.
 12. Losi M, Bocchino M, Matarese A, et al. 2011. Role of the quantiferon-TB test in ruling out pleural tuberculosis: a multi-centre study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 24(1):159-65.
 13. Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, et al 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem*. 278(8):5513-6.
 14. Mutsaers SE. 2002. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair *Respirology*. 7(3):171-91.
 15. Mutti L, Valle MT, Balbi B, et al. 1998. Primary human mesothelioma cells express class II MHC, ICAM-1 and B7-2 and can present recall antigens to autologous blood lymphocytes. *Int J Cancer*. 78(6):740-9.
 16. Pace E, Ferraro M, Mody CH et al. 2008. Pleural mesothelial cells express

- both BLT2 and PPARalpha and mount an integrated response to pleural leukotriene B4. *J Immunol*, 181: 7292–7299.
17. Schierloh P, Yokobori N, Geffner L, et al. 2009. NK cells from tuberculous pleurisy express high ICAM-1 levels and exert stimulatory effect on local T cells. *Eur J Immunol*. 39(9):2450-8.
 18. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, et al 2007. Mycobacterium tuberculosis-induced gamma interferon production by natural killer cells requires cross talk with antigen-presenting cells involving Toll-like receptors 2 and 4 and the mannose receptor in tuberculous pleurisy. *Infect Immun*. 75(11):5325-37.
 19. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, et al. 2005. Increased susceptibility to apoptosis of CD56^{dim}CD16⁺ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma- producing CD56^{bright} cells in tuberculous pleurisy. *J Immunol*. 175(10):6852-60.
 20. Sharma RK et al. 2003 *Chest*.124:682-687.
 21. Valle MT, Degl'Innocenti ML, Bertelli R, et al. 1995. Antigen-presenting function of human peritoneum mesothelial cells. *Clin Exp Immunol*. 101(1):172-6.
 22. Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R et al. 2003. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *New England Journal of Medicine*. 348:403-13.
 23. Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, et al. 2009. CD3 expression distinguishes two gammadeltaT cell receptor subsets with different phenotype and effector function in tuberculous pleurisy. *Clin Exp Immunol*.157(3):385-94.
 24. Zocchi L. 2002. *European Respiratory Journal*. 20: 1545–1558.