

DETECCION DE PORTADORES DE *SALMONELLA TYPHI* MEDIANTE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA CON ANTIGENO Vi MUY PURIFICADO¹

Claudio F. Lanata,^{2, 3} César Tafur,^{2, 4} Luis Benavente E.,²
Eduardo Gotuzzo² y Carlos Carrillo²

INTRODUCCION

La fiebre tifoidea sigue siendo un importante problema de salud pública en muchos países en vías de desarrollo. El hombre es el único ser afectado y el reservorio natural de *Salmonella typhi*, agente causal de la enfermedad (1). Se calcula que entre 2 y 5% de los individuos que contraen fiebre tifoidea se convierten en portadores crónicos de *S. typhi* al alojarse esta en la vesícula biliar; tal condición puede durar toda la vida (2). La prevalencia de portadores crónicos es mayor en las mujeres, aumenta con la edad y guarda relación con la coleditiasis crónica (3). En zonas donde esta enfermedad es endémica, se ha estimado que la prevalencia de portadores crónicos puede ser de 500 a 700 por 100 000 habitantes (4).

La detección de portadores crónicos de *S. typhi* mediante selección de la población general es una medida potencialmente eficaz para controlar la fiebre tifoidea. Sin embargo, el elevado costo de los coprocultivos seriados que se necesitan para aislar el agente causal ha limitado la aplicación de este método en programas de salud pública. En 1930, Felix describió el antígeno Vi de *S. typhi* y la relación que existe entre la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-Vi en el suero y el estado de portador crónico (5, 6). Esto dio origen al uso de la prueba serológica Vi entre los años cuarenta y los sesenta; utilizando una cepa de *S. typhi* rica en antígeno Vi, se hacía una prueba de aglutinación directa para la detección de portadores crónicos (7). Sin embargo, esta técnica cayó en desuso por su alta proporción de resultados falsos positivos y falsos negativos (falta de sensibilidad y especificidad) (8).

¹ Se publicará en el *Bulletin of the Pan American Health Organization* Vol. 23, 1989. La investigación en que se basa este artículo fue patrocinada por la Organización Panamericana de la Salud.

² Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

³ Instituto de Investigación Nutricional. Dirección postal: Apartado postal 18-0191, Lima 18, Perú.

⁴ Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Centro de Investigación en Salud Dr. Hugo Lumbreras Cruz, Lima.

MATERIALES Y METODOS

Muestra de estudio

En las municipalidades de Lima existe un programa sanitario de control de manipuladores de alimentos; después de certificar que la persona tiene una radiografía negativa para tuberculosis y que es negativa la prueba serológica de la sífilis, se le otorga un carnet sanitario con un año de validez.

Como las mujeres mayores de 30 años que son manipuladoras de alimentos están consideradas como un grupo de alto riesgo en relación con el estado de portador crónico de *S. typhi* (3), se pidió a la Municipalidad del Distrito de San Martín de Porres que nos proporcionara muestras de suero (0,2 a 0,3 ml) de las mujeres de dicha edad que acudieran a solicitar el carnet sanitario durante un período de 24 meses. Las muestras de suero se enviaron al laboratorio junto con una ficha que incluía el nombre, dirección y edad de la persona, y fecha de obtención de la muestra.

Estudio serológico

Las muestras de suero se mantuvieron congeladas a -20°C hasta que fueron procesadas. El antígeno Vi muy purificado que se utilizó provenía de una cepa de *Citrobacter freundii* y se preparó según las técnicas descritas anteriormente (9, 10). Las muestras de suero se trataron previamente con eritrocitos de carnero no sensibilizados con el antígeno Vi para que absorbieran anticuerpos anti-eritrocitarios. Por otra parte, eritrocitos de carnero tratados con glutaraldehído se sensibilizaron con el antígeno Vi a una concentración de $10\ \mu\text{g/ml}$ (15). Se prepararon dos conjuntos de diluciones seriadas del suero; a uno se le agregaron eritrocitos sensibilizados con el antígeno

En 1972 se describió un método para preparar antígeno Vi muy purificado (9); esta fue la base para crear una prueba de hemaglutinación pasiva para la detección de portadores crónicos de *S. typhi* (10). Este nuevo método, denominado hemaglutinación indirecta con antígeno Vi muy purificado (HI-Vi, para abreviar), demostró tener alta sensibilidad (100%) y especificidad (97%) y resultó eficaz en la detección de portadores crónicos en Arkansas, Estados Unidos de América, zona donde la fiebre tifoidea no es endémica (11).

Recientemente, Lanata *et al.* (12) demostraron que un título de 1:160 obtenido con este método tenía una sensibilidad de 75% y una especificidad de 92% para la detección de portadores de dicho agente patógeno en Santiago, Chile, zona donde es endémica la fiebre tifoidea. Con base en estos resultados, se postuló que la HI-Vi tendría un valor predictivo de 8 a 17% si se utilizara para la detección de portadores crónicos en una población general (12). El valor real dependería de la prevalencia local de portadores. El valor predictivo se define como el porcentaje de sujetos con reacción serológica positiva en los que se comprueba el estado de portador crónico (13).

Con el objeto de medir el valor predictivo de la prueba de HI-Vi, evaluar su utilidad en un programa de salud pública destinado a identificar y eliminar el estado de portador crónico de *S. typhi* en una población de alto riesgo, y determinar su eficacia en función de los costos, se decidió aplicarla en un programa de control de mujeres manipuladoras de alimentos establecido en Lima, Perú, zona donde es endémica la fiebre tifoidea (14).

Vi y al otro, eritrocitos no sensibilizados (testigo). La hemaglutinación se evaluó al cabo de 2 horas de incubación a temperatura ambiente y luego de 18 horas a 4 °C. Los títulos que se tuvieron en cuenta fueron los de la última dilución que mostró una hemaglutinación positiva. Se incluyeron muestras testigo positivas y negativas en cada prueba.

Para implantar la técnica de la HI-Vi en Lima, primero fue necesario determinar el título límite para considerar positiva la reacción. Con este propósito se evaluaron tres conjuntos de muestras de suero. Uno provenía de 19 portadores crónicos de *S. typhi* con antecedente comprobado de más de un año de duración; estos sujetos formaban parte de otro estudio que se efectuaba en el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTAVH). El segundo conjunto se tomó de 135 personas que no excretaban *S. typhi* uno a seis años después de haber sufrido un cuadro clínico comprobado de fiebre tifoidea. El tercer conjunto lo formaron 72 muestras de mujeres adultas sanas que acudieron al Hospital Universitario Cayetano Heredia a solicitar un carnet de salud, y en quienes un bilicultivo y dos coprocultivos

resultaron negativos para *S. typhi*. Al analizar todas estas muestras se comprobó que un título de 1:40 tenía una sensibilidad de 79% y una especificidad de 99% en los expacientes de fiebre tifoidea y de 100% en la población adulta general (cuadro 1). Por lo tanto, se decidió usar este título como valor límite para la detección de manipuladores de alimentos.

Estudios bacteriológicos

Las mujeres con títulos $\geq 1:40$ en la prueba de HI-Vi fueron invitadas a someterse, previa autorización escrita, a un estudio bacteriológico para identificación de *S. typhi* que se realizó en el IMTAVH. Se citó a las mujeres con instrucciones de haber ayunado por lo menos cuatro horas, y en el momento de la visita se obtuvieron muestras para cultivo de origen rectal, mediante hisopo, y biliar, por medio de un hilo encapsulado (16). Solo se cultivaron los hilos impregnados con contenido duodenal, a juzgar por el color y un pH ≥ 6 . Además, se instruyó a las pacientes y se les proveyeron los medios necesarios —hisopos estériles y medios de transporte Cary Blair (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EUA)— para que tomaran y sembraran otras dos muestras rectales en días diferentes, las cuales debían ser entregadas al laborato-

CUADRO 1. Porcentaje de positividad de la prueba de hemaglutinación indirecta con antígeno Vi muy purificado efectuada en portadores crónicos de *Salmonella typhi*, individuos con antecedente de fiebre tifoidea y personas sanas. Lima, Perú, 1985

Grupo	No. de sujetos	Resultado positivo (título $\geq 1:40$)	
		No.	%
Portadores crónicos de <i>S. typhi</i>	19	15	79
Individuos con antecedente de fiebre tifoidea 1 a 6 años atrás	135	1	0,74
Adultos sanos	72	0	0

rio del IMTAVH antes de 24 horas. Cumpliendo con las recomendaciones de la OMS (17), las muestras de heces y líquido duodenal se sembraron en caldo Selenite-F (BBL) y en placas de Salmonella-Shigella (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) y de MacConkey (BBL). La identificación de *S. typhi* se hizo mediante las técnicas bioquímicas y serológicas corrientes (18). Las portadoras de *S. typhi* así identificadas fueron incluidas en un protocolo de seguimiento del IMTAVH para su posterior participación en un ensayo terapéutico con antibióticos orales.

RESULTADOS

Se estudiaron en total 1 931 muestras de suero de mujeres mayores de 30 años; solo 29 (1,5%) tuvieron resultado positivo de la prueba de HI-Vi (título $\geq 1:40$). En 26 de estas 29 mujeres se practicó el estudio microbiológico y solo cuatro excretaban *S. typhi*. Por lo tanto, el valor predictivo de la prueba fue de 15%. Como la sensibilidad de la prueba en Lima es de 79%, se estima que la prevalencia de portadores crónicos de *S. typhi* en mujeres mayores de 30 años manipuladoras de alimentos en dicha ciudad es de 292 por 100 000 habitantes.

Por otro lado, se pudo localizar a 21 de las 40 mujeres (52%) con algún título positivo pero $< 1:40$; ninguna era portadora de *S. typhi*. No obstante, dos de ellas excretaban *Salmonella paratyphi A*.

El costo de la prueba HI-Vi, incluidos los gastos de personal y el estudio bacteriológico de las mujeres con títulos $\geq 1:40$, fue de \$US 0,30 por persona. En contraste, si se hubieran hecho tres coprocultivos seriados de todas las mujeres, el costo hubiera sido de

\$US 1,72 por persona, o sea 573% mayor.

DISCUSION

El uso de la prueba serológica Vi fue muy popular a partir de los años cuarenta. En algunas industrias inglesas, tales como las relacionadas con el tratamiento del agua y los alimentos, una condición para poder obtener trabajo era que esta prueba fuera negativa (7). Sin embargo, al aumentar su uso se vio que daba resultados negativos en alrededor de 20% de los portadores crónicos de *S. typhi*, y positivos hasta en 20% de la población normal con cultivos negativos, especialmente en zonas donde la fiebre tifoidea era endémica (8). Esto ocasionó que la técnica fuera abandonada. El método de realizar coprocultivos seriados para aislar *S. typhi* nunca se empleó en forma masiva como método de detección de portadores crónicos, debido principalmente a su alto costo.

Al descubrirse que otras enterobacterias poseen antígeno Vi idéntico al de *S. typhi*, se elaboraron pruebas de hemaglutinación pasiva que utilizan antígenos crudos o parcialmente purificados. A pesar de que estas tienen mayor sensibilidad que la aglutinación bacteriana directa (6), su especificidad es baja (19, 20).

Cuando apareció el método de hemaglutinación indirecta con antígeno Vi muy purificado se vio que era sensible y específico en zonas donde la fiebre tifoidea no es endémica (10, 11). Esto se ratificó en una zona endémica (12), lo cual hizo pensar en su

probable utilidad para la detección de portadores crónicos de *S. typhi* (12).

Los resultados del presente estudio concuerdan con lo observado anteriormente en Santiago (12), que también es una zona endémica. Además, se pudo comprobar que el valor predictivo de la prueba HI-Vi en la selección de portadores de *S. typhi* en una población de alto riesgo (mujeres manipuladoras de alimentos mayores de 30 años) es de 15%. Esta técnica es también eficaz en función de los costos.

El título límite utilizado en Lima fue menor que el empleado en Santiago, lo cual subraya la necesidad de fijar dicho límite basándose en datos locales al momento de implantar la técnica.

Ante la posibilidad de que dicha diferencia en los títulos se debiera a cambios ocurridos en el antígeno o en la técnica empleada, un grupo de 25 sueros y parte del antígeno Vi del estudio de Lima fueron enviados al Centro para el Desarrollo de Vacunas de la Universidad de Maryland, Estados Unidos. Allí, las pruebas se repitieron por duplicado: unas con el antígeno de Lima y otras con un antígeno Vi guardado en la Universidad de Maryland (el mismo que se empleó en la investigación de Santiago). En ambos casos, los resultados de estas pruebas fueron semejantes a los que obtuvimos en el presente estudio; solo uno de los sueros, probado con el antígeno de Maryland, mostró más de dos diluciones de diferencia con el título previamente encontrado en Lima. Estos resultados indican que existen diferencias regionales en la prevalencia de anticuerpos anti-Vi en portadores crónicos de *S. typhi*.

CONCLUSIONES

La hemaglutinación indirecta con antígeno Vi muy purificado constituye un método práctico y eficaz en función de los costos para la detección de portadores de *S. typhi*, tanto en zonas donde la fiebre tifoidea es endémica como en aquellas donde no lo es. Por el momento, el método puede ser utilizado para detectar portadores y aplicarles medidas de tipo sanitario. Cuando exista un medio eficaz y de bajo costo, distinto del tratamiento quirúrgico, para tratar a estas personas, la detección de portadores crónicos se justificará plenamente como un método para el control de la fiebre tifoidea.

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio para determinar el valor predictivo y la eficacia en función de los costos de la prueba de hemaglutinación indirecta con antígeno Vi muy purificado como medio de detección de portadores de *Salmonella typhi* en un grupo de alto riesgo residente en una zona donde la fiebre tifoidea es endémica. El grupo estuvo formado por mujeres mayores de 30 años que participaban en un programa municipal de control sanitario de manipuladores de alimentos en Lima, Perú. Se consideraron positivas las pruebas con un título de anticuerpos anti-Vi $\geq 1:40$ (sensibilidad de 79% y especificidad de 99 y 100% para la población local). De esta manera, 29 mujeres (1,5%) de un total de 1 931 tuvieron resultado positivo. Mediante un estudio bacteriológico, se demostró que 26 de estas 29 eran portadoras de *S. typhi*. El valor predictivo de la prueba fue de 15%. La prevalencia de portadores en este grupo se calculó en 292 por 100 000 habitantes.

La prueba utilizada tuvo un costo de \$US 0,30 por persona; en contraste, el método de tres coprocultivos en serie para aislar el agente causal habría costado \$US 1,72. Se concluye que la prueba estudiada es bastante sensible, muy específica y eficaz en función de los costos cuando se utiliza para la detección de portadores de *S. typhi* en zonas donde la fiebre tifoidea es endémica. □

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su reconocimiento a J. B. Robbins, de la División de Productos Bacterianos del Centro Nacional de Medicamentos y Productos Biológicos, Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, quien proporcionó el antígeno Vi; a Myron M. Levine, del Centro de Desarrollo de Vacunas de la Universidad de Maryland, Estados Unidos, quien efectuó las pruebas de verificación; a la Municipalidad de San Martín de Porres, Lima, que colaboró con el estudio; a César López, quien transportó los sueros de la Municipalidad al Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, y a Carmen Ruiz, quien mecanografió el manuscrito.

REFERENCIAS

- 1 Anderson, G. W., Hamblen, A. D. y Smith, H. M. Typhoid carriers: a study of their disease producing potentialities over a series of years as indicated by a study of cases. *Am J Public Health* 26(4):396-405, 1936.
- 2 Feemster, R. F. y Smith, H. M. Laboratory criteria of the cure of typhoid carriers. *Am J Public Health* 35(4):368-372, 1945.
- 3 Ames, W. R. y Robins, M. Age and sex as factors in the development of the typhoid carrier state, and a method for estimating carrier

- prevalence. *Am J Public Health* 33(3):221-230, 1943.
- 4 Levine, M. M., Black, R. E. y Lanata, C. F. Precise estimation of the numbers of chronic carriers of *Salmonella typhi* in Santiago, Chile, an endemic area. *J Infect Dis* 146(6):724-726, 1982.
 - 5 Felix, A. y Pitt, R. M. A new antigen of *B. typhosus*. *Lancet* 2(5787):186-191, 1934.
 - 6 Felix, A. Detection of chronic typhoid carriers by agglutination tests. *Lancet* 2(6004):738-741, 1938.
 - 7 Public Health Laboratory Service Working Party. The detection of the typhoid carrier state. *J Hygiene* 59(2):231-247, 1961.
 - 8 Bokkenheuser, V., Smith, P. y Richardson, N. A challenge to the validity of the Vi test for the detection of chronic typhoid carriers. *Am J Public Health* 54(9):1507-1513, 1964.
 - 9 Wong, K. H. y Feeley, J. C. Isolation of Vi antigen and a simple method for its measurement. *Appl Microbiol* 24(4):628-633, 1972.
 - 10 Nolan, C. M., Feeley, J. C., White, P. C., Jr., Hambie, E. A., Brown, S. L. y Wong, K. H. Evaluation of a new assay for Vi antibody in chronic carriers of *Salmonella typhi*. *J Clin Microbiol* 12(1):22-26, 1980.
 - 11 Nolan, C. M., White, P. C., Jr., Feeley, J. C., Hambie, E. A., Brown, S. L. y Wong, K. H. Vi serology in the detection of typhoid carriers. *Lancet* 1(8220 Pt 1):583-585, 1981.
 - 12 Lanata, C. F., Levine, M. M., Ristori, C. et al. Vi serology in detection of chronic *Salmonella typhi* carriers in an endemic area. *Lancet* 2(8347):441-443, 1983.
 - 13 Vecchio, T. J. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. *N Engl J Med* 274(21):1171-1173, 1966.

- 14 Gotuzzo, H. E. Características epidemiológicas de la fiebre tifoidea en Lima. *Diagnóstico* (Lima) 8(2):76-81, 1981.
- 15 Barrett, T. J. Improvement of the indirect hemagglutination assay for *Salmonella typhi* Vi antibodies by use of glutaraldehyde-fixed erythrocytes. *J Clin Microbiol* 22(4):662-663, 1985.

- 16 Gilman, R. H., Islam, S., Rabbani, H. y Ghosh, H. Identification of gallbladder typhoid carriers by a string device. *Lancet* 1(8120):795-796, 1979.
- 17 Organización Mundial de la Salud, Programa de Lucha contra las Enfermedades Diarreicas. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. Ginebra, 1983. WHO Publication CDD/83.3, pp. 72-73.
- 18 Edwards, P. R. y Ewing, W. H. Identification of *Enterobacteriaceae*, 3a. ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972, pp. 146-207.
- 19 Landy, M. y Lamb, E. Estimation of Vi antibody employing erythrocytes treated with purified Vi antigen. *Proc Soc Exp Biol Med* 82(4):593-598, 1953.
- 20 Anderson, E. S. Screening test for typhoid carriers. *Lancet* 1(7125):653-1960.
- 21 Scioli, C., Fiorentino, F. y Sasso, G. Treatment of *Salmonella typhi* carriers with intravenous ampicillin. *J Infect Dis* 125(2):170-173, 1972.
- 22 Munnich, D. y Bekesi, S. Curing of typhoid carriers by cholecystectomy combined with amoxycillin plus probenecid treatment. *Chemotherapy* 25(6):362-366, 1979.

SUMMARY

SCREENING OF *SALMONELLA TYPHI* CARRIERS BY INDIRECT HEMAGGLUTINATION USING HIGHLY PURIFIED Vi ANTIGEN

A study was carried out to determine the predictive value and the cost-effectiveness of the indirect hemagglutination test using highly purified Vi antigen as a means of screening *Salmonella typhi* carriers in a high-risk group living in an area where typhoid fever is endemic. The group consisted of women over age 30 who were participating in a municipal sanitary control program for food handlers in Lima, Peru. Tests yielding an anti-Vi antibody titer $\geq 1:40$ were considered positive (79% sensitivity, and 99% and 100% specificity for the local population).

On this basis, 29 women (1.5%) tested positive out of a total of 1 931. A follow-up bacteriological study demonstrated that 26 of these 29 women were carriers of *S. typhi*; thus, the test had a predictive value of 15%. The prevalence of carriers in this group was estimated at 292 per 100 000 population. The test cost \$US 0.30 per person. In comparison, the method that requires a series of three fecal cultures to isolate the causative agent would have cost \$US 1.72. It can be concluded that the test studied is sufficiently sensitive, that it is highly specific, and that it is cost-effective when used to detect *S. typhi* carriers in areas where typhoid fever is endemic.