



ASOCIACIÓN
BIOQUÍMICA
ARGENTINA

ByPC

Bioquímica y Patología Clínica

Vol. 88 - Nº2

May.-Ago. de 2024

Ciudad de Bs. As. Argentina

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa

ISSN 2684-0359 Ed. electrónica

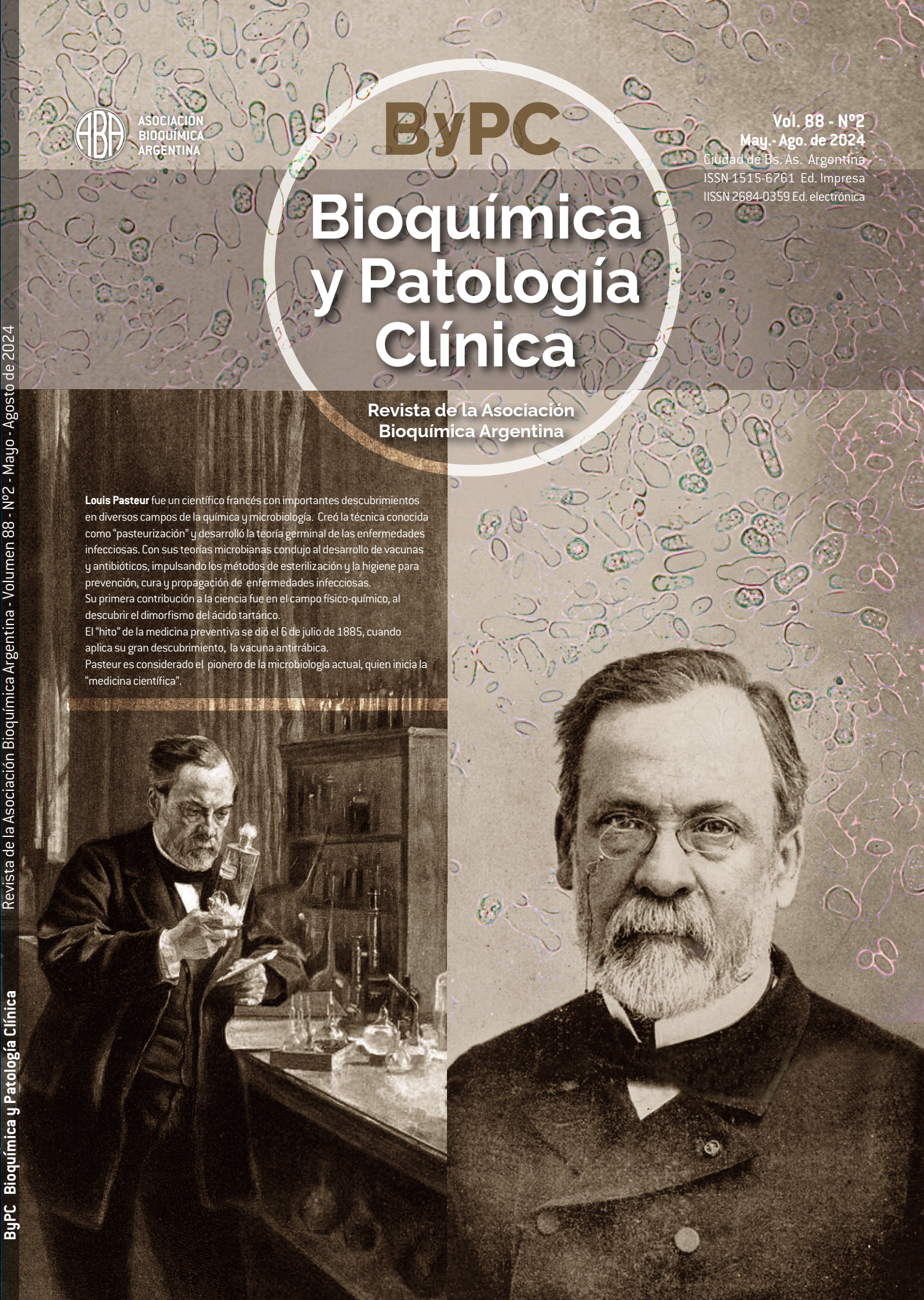
Revista de la Asociación
Bioquímica Argentina

Louis Pasteur fue un científico francés con importantes descubrimientos en diversos campos de la química y microbiología. Creó la técnica conocida como "pasteurización" y desarrolló la teoría germinal de las enfermedades infecciosas. Con sus teorías microbianas condujo al desarrollo de vacunas y antibióticos, impulsando los métodos de esterilización y la higiene para prevención, cura y propagación de enfermedades infecciosas.

Su primera contribución a la ciencia fue en el campo físico-químico, al descubrir el dimorfismo del ácido tartárico.

El "hito" de la medicina preventiva se dio el 6 de julio de 1885, cuando aplica su gran descubrimiento, la vacuna antirrábica.

Pasteur es considerado el pionero de la microbiología actual, quien inicia la "medicina científica".

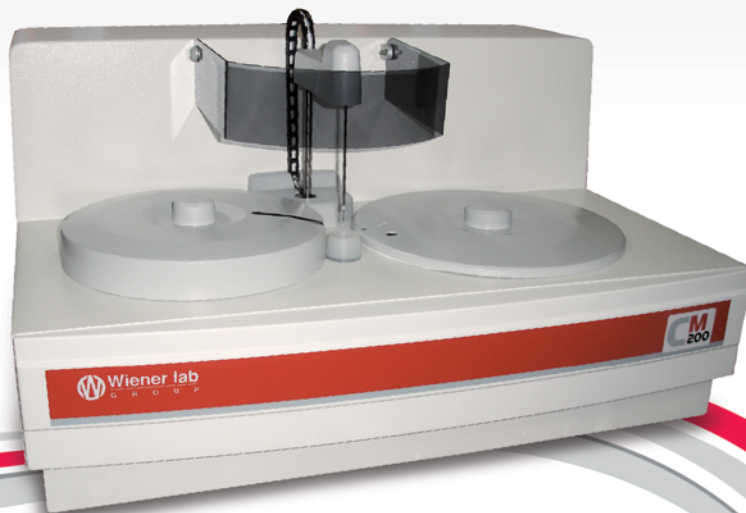


CM 200

¿Qué haría Ud. con 2 horas más 5 veces a la semana?

**Analizador automático
para bioquímica clínica**

- › Velocidad: 200 test/h
- › Consumo de agua: <0,5 litros/h
- › Posiciones para muestra: 48
- › Posiciones para reactivos: 48
- › Capacidad para resolver urgencias
- › Dilución automática de muestras
- › Control de calidad



El **CM200** es el primer instrumento diseñado específicamente para ser la "primera elección" en el momento que Ud. decida automatizar su rutina de Química Clínica.

De manejo sencillo y amigable, con capacidad para procesar hasta 200 test/hora, le asegura años de servicio de rendimiento excelente. Y lo más importante: **sin complicaciones**.

No obstante, es bueno saber que **Wiener lab.** cuenta con la **mayor red de distribución, asistencia técnica y asesoramiento bioquímico del país**. Que todos nuestros reactivos han sido **completamente adaptados al instrumento** siguiendo todas las normativas internacionales y que finalmente, el **CM200 está integralmente producido en la Argentina** por la empresa que lo acompañó desde siempre.

Consulte por nuestra oferta especial y planes de financiación en pesos.

Y vaya pensando qué hacer en su nuevo tiempo libre



Asistencia Técnica WL



www.wiener-lab.com
marketing@wiener-lab.com



Wiener Laboratorios SAIC

Riobamba 2944,
S2003GSD Rosario, Argentina
Tel.: +54 341 4329191/6

Moreno 1850, 2° piso,
C1094ABB Buenos Aires, Argentina
Tel.: +54 11 43754151/4

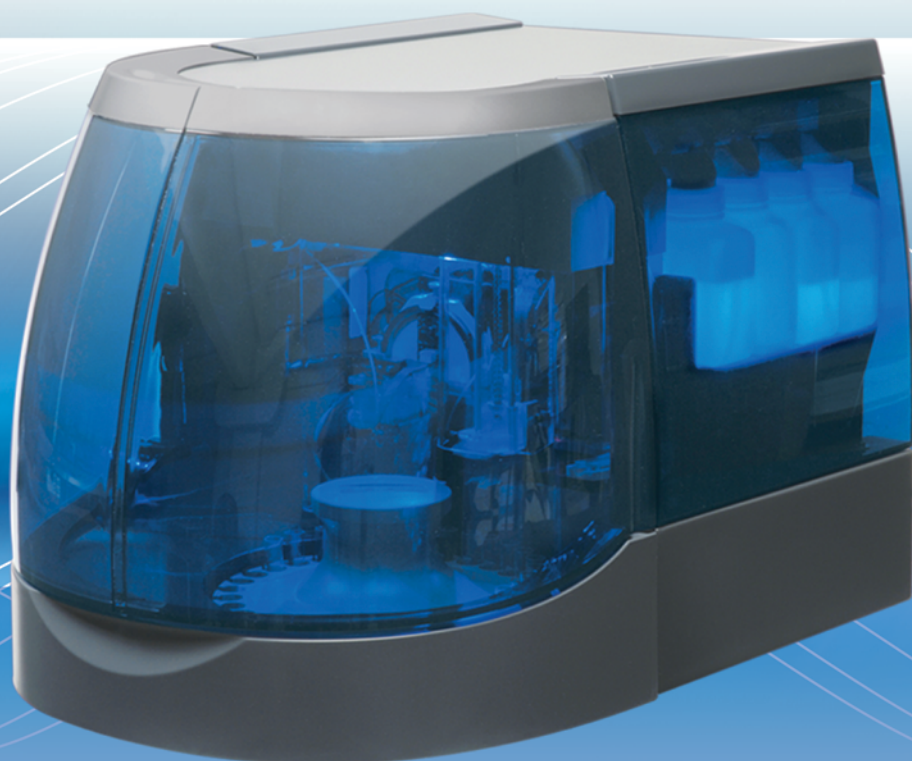
Wiener lab
G R O U P

www.wiener-lab.com

MINICAP

**UNA NUEVA DIMENSION EN
ELECTROFORESIS CAPILAR**

ÚLTIMA GENERACIÓN



MINICAP

30 tests / hora.

Dos muestras simultáneas.

Tubo primario.

Lector de códigos de barra.

Completa trazabilidad de muestras

**Transferencia de resultados vía
módem.**

Proteínas

Inmunotyping

Proteínas Alta Resolución

Hemoglobina

CDT

Orinas.

sebia

Sucursal Buenos Aires
Aráoz 86 | C1414DPB | C. A.B.A. | Argentina
Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876 | Fax: 54-11 4856-5652
bga@bganalizadores.com.ar - www.bganalizadores.com.ar


Sucursal Neuquén
Santa Cruz 1629 | CP 8300
Neuquén | Argentina | Tel.: 0299-4471385
bganqn@bganalizadores.com.ar




BG Analizadores
Soluciones Personalizadas

EDITORIAL

- Pág. 13 **La inmortalidad de Henrieta Lacks: la bioética médica nacida de una historia.**

The immortality of Henrietta Lacks: medical bioethics born from a story.

Orlando Gabriel Carballo.

ARTÍCULOS ORIGINALES

- Pág. 15 **Vigilancia activa de la portación de bacilos productores de carbapenemasas por PCR múltiple en tiempo real. Experiencia a cuatro meses de su implementación.**

Active surveillance of the carriage of carbapenemase-producing bacilli by real-time multiplex PCR. Experience four months after its implementation.

Togneri, Ana María; Pérez, Marcela Patricia; Pérez Catalán, Sebastián; Bastanza Anabela Mailen; Re, Wanda Carla Daniela; Gañete, Marcelo Alejandro; Salas Escalante, Rudy Adhemar; Sztokhamer, Daniel Gustavo; Sampere, Cecilia Liliana; Sablich, Juan Ignacio; Aguirre Herguero, Bernardo Nicolas; Aguirre Zuñiga, Silvia Vanessa; Sanabria, Julieta; Pirrone, Claudia Mabel; Corral, Pablo Rodrigo Jorge; Vindigni, Luis.

- Pág. 20 **Prevalencia de colestasis intrahepática gestacional en embarazadas del Hospital de la Madre y el Niño de La Rioja, Argentina. Período: 2015 - 2019.**

Prevalence of Intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) in pregnant women at the Hospital de la Madre y el Niño de La Rioja (La Rioja, Argentina). Period 2015 - 2019.

Colque López Terán, Sonia Elizabeth; Ríos Romero, Karina María Esther.

- Pág. 28 **Comparación de dos métodos de aglutinación para la detección de anticuerpos anti-Brucella en donantes de bancos de sangre.**

Comparison of two agglutination methods for detection of anti-Brucella antibodies in blood bank donors.

Rodríguez, Agustina Ayelén; Gaitán, Analía Mariela; Leiva, Gustavo Fabián; Bovone, Nora Silvia; Miguez, Gabriela Sandra.

- Pág. 35 **Aplicación de indicadores de calidad de la etapa preanalítica: experiencia de un laboratorio pediátrico**

Application of quality indicators of the preanalytical phase: pediatric laboratory experience

Shepherd Safar, Melanie; Alcalde, María Belén; Grau, María Emilia; Ortigosa, Agustina; Pessina, Lila María; Fresina, Karen Nicole; Satarich, Gisela Evelyn; Alegre, María; González, María Sandra.

- Pág. 41 **Nuevo prototipo de vacuna de mucosa contra el HSV-2 basada en partículas semejantes a bacterias como portador y adyuvante de antígenos.**

Novel mucosal vaccine against HSV-2 based on the LysM-BLP system as carrier and antigen adjuvant.

Raya-Tonetti, Fernanda; Villena, Julio; Vizoso-Pinto, María Guadalupe.

- Pág. 51 **Bacterias anaerobias aisladas en muestras clínicas de un hospital de adultos de Chaco, Argentina.**

Anaerobic bacteria isolated from clinical samples from an adult hospital in Chaco, Argentina.

Gritti, Micaela Andrea; Melo Favalesso, Marilía; Fernández, Mariana Soledad; Peichoto, María Elisa.

- Pág. 56 **Microbiota intestinal y alergia a la proteína de leche de vaca: revisión y perspectivas futuras.**

Gut microbiota and cow's milk allergy: review and future concerns.

Keller, María Lorena.

- Pág. 66 **PROGRAMA DE EDUCACIÓN CONTINUA**

Cursos A.B.A - Ciclo Lectivo 2024.



El científico Louis Pasteur

TAPA

Louis Pasteur nació en Dole, Francia, el 27/12/1822 y falleció en Marnes-la-Coquette el 28/09/1895. Fue un científico francés cuyos descubrimientos tuvieron una gran importancia en diversos campos de las ciencias naturales, especialmente, en la química y en la microbiología.

Creó la técnica conocida como “pasteurización” y desarrolló la teoría germinal de las enfermedades infecciosas. Con sus teorías microbianas condujo al desarrollo de vacunas, antibióticos, la esterilización y la higiene como métodos efectivos de cura y prevención contra la propagación de las enfermedades infecciosas.

Su primera contribución importante a la ciencia fue en el campo físico-químico, al descubrir el dimorfismo del ácido tartárico.

El “hito” de la medicina preventiva se dio el 6 de julio de 1885, cuando aplica su gran descubrimiento, la vacuna antirrábica, al niño Joseph Meister, quien había sido mordido por un perro “rabioso”, y logra salvarle la vida. Las vacunas de Pasteur estaban basadas en la atenuación de microorganismos vivos. Este acontecimiento constituye el nacimiento de la vacunación moderna.

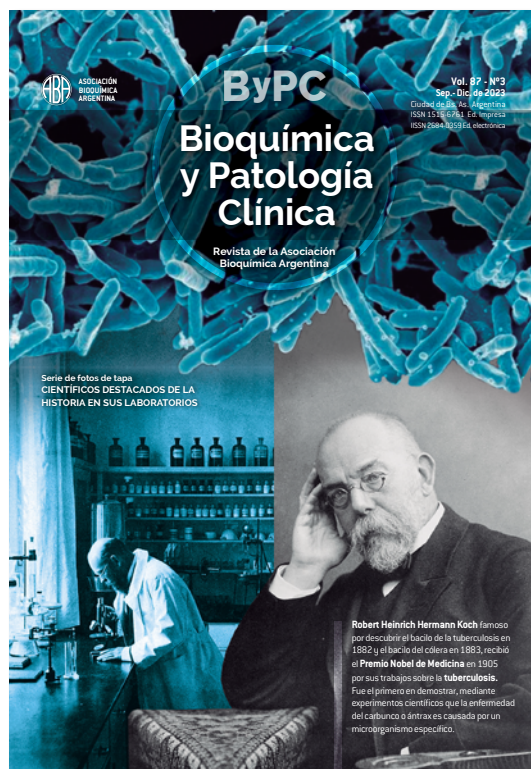
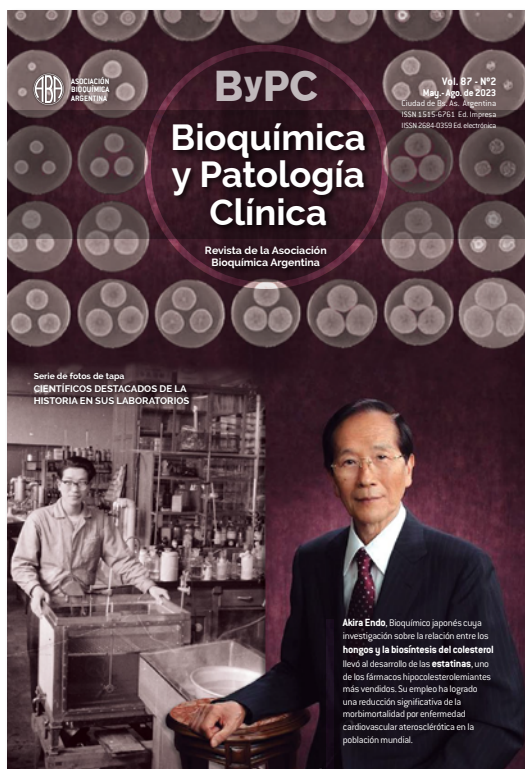
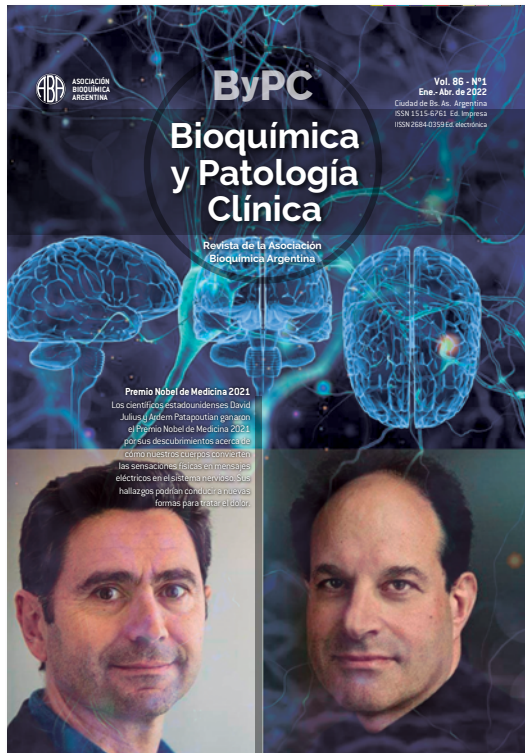
Pasteur es considerado el pionero de la microbiología actual. Debido a que, gracias a sus estudios comienza la “Edad de Oro de la Microbiología”, durante la cual se desarrollan vacunas, antibióticos, esterilización y la higiene como métodos efectivos de cura y prevención contra la propagación de enfermedades infecciosas, sin duda decimos que se inicia la “medicina científica”.

Fue hijo de Jeanne Etienne Roquide, ama de casa, y de Jean Joseph Pasteur, curtidor y exsargento de los ejércitos napoleónicos. Contrajo matrimonio el 29 de mayo de 1849 con Marie Laurent, y sus hijos fueron Jean Baptiste, Cécile, Marie Luise, Jeanne y Camile. Solamente llegaron a la vida adulta Jean Baptiste y Marie Luise; los otros tres fallecen a temprana edad afectados por el tifus, tragedias que lo motivaron a realizar investigaciones y a la búsqueda de la cura de las enfermedades infecciosas.

Respecto de sus estudios y logros, Louis Pasteur obtiene el título universitario de Bachiller en Ciencias Matemáticas en la Escuela Real de Besanzón. Posteriormente, logra el Doctorado en Ciencias con una tesis físico-química en la Facultad de París y se convierte en profesor de Física en la Escuela Normal Superior. Entre los años 1847 y 1853, fue profesor de física en Dijon y en Estrasburgo. En 1854 fue nombrado Decano de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Lille y, en 1857, se desempeñó en el cargo de Director de Estudios Científicos en la Escuela Normal de París.

En junio de 1887, se creó el Instituto Louis Pasteur, que abre sus puertas el 14 de noviembre de 1888, [Joseph Meister, quien fuera el niño al que Pasteur salvó la vida con la vacuna citada, se emplea como celoso guardián del Instituto]. Pasteur lo dirige desde la apertura hasta su fallecimiento.

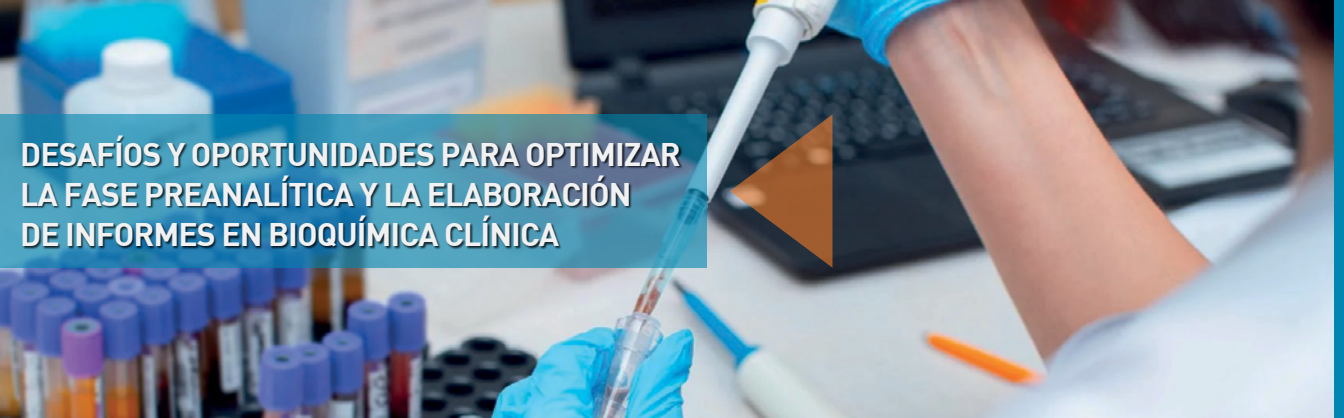
Resumimos su obra en las palabras del académico francés Henri Mondor: “*Louis Pasteur no era médico ni cirujano pero nadie ha hecho tanto como él en favor de la medicina y de la cirugía*”.





NUEVOS CURSOS 2024

DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA



DESAFÍOS Y OPORTUNIDADES PARA OPTIMIZAR LA FASE PREANALÍTICA Y LA ELABORACIÓN DE INFORMES EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

- Curso virtual asincrónico con evaluación final optativa

• Del 01/04/2024
al 15/07/2024

• Director:
Dr. Fernando Brites

• Codirector:
Dr. Leonardo Gómez Rosso

• Coordinadores:
Dra. Belén Davico y
Dr. Ezequiel Lozano Chiappe

• Docentes: Dra. Julia Ariagno (Estudio del Semen), Dr. Germán Astudillo (Parasitología), Dr. Ignacio Bressan (Lab. de HPLC y Espectrometría de Masa), Dr. Fernando Brites (Lípidos y Lipoproteínas), Dr. Gabriel Carballo (Autoinmunidad), Dr. Claudio Carbia (Hematología), Dra. María de la Paz Domínguez (Hemostasia), Dr. Marcelo Fermepín (Virología e Inmunoserología), Dr. Nahuel Fernández (Química General y Nefrológica), Dr. Nicolás Fernández (Monitoreo de drogas), Dr. Mauro Fernández Toscano (Lab. de Hemoterapia), Dr. Leonardo Gómez Rosso (Introducción General), Dra. Silvia González (Medio Interno), Dr. José Jara Aguirre (Normas y Recomendaciones), Dr. Jaime Kovensky (Bacteriología), Dr. José Magariños (Lab. de Urgencias), Dra. Patricia Maidana (Marcadores Oncológicos), Dra. Inés Marcone (Lab. de Pediatría), Dra. Patricia Otero (Endocrinología), Dra. María Silvia Pérez (Lb. De Biología Molecular), Dra. Adriana Rocher (Citología Exfoliativa), Dra. Sandra Rozental (Citogenética), Dra. Gabriela Ruibal (Hidratos de Carbono y Diabetes), Dra. Gabriela Santiso (Micología), Dra. Patricia Sorroche (Proteínas), Dr. David Sosa (Virología e Inmunoserología).



CALIDAD EN LABORATORIOS DE GENÉTICA FORENSE

- Directores: Dra. Claudia García Bonelli y Dr. César Collino
- Comienzo: Abril 2024



PRIMER CURSO INTERNACIONAL: CLÍNICA Y LABORATORIO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

- Directores: Dr. Orlando Gabriel Carballo y Dr. Carlos von Mühlen
- Comienzo: Mayo 2024



DILEMAS EN LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS DE LA SERIE MIELOIDE EN SANGRE PERIFÉRICA

- Director: Dra. Sandra Ayuso
- Comienzo: Mayo 2024

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP [1096]
Buenos Aires - Argentina
Tel/ fax: 4384-7415 / Tel: 4381-2907
e-mail: info@aba-online.org.ar
revista@aba-online.org.ar
www.aba-online.org.ar
REGISTRO NACIONAL DE DERECHOS DE AUTOR N° 034772
Publicación cuatrimestral

ByPC

Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación
Bioquímica Argentina

Vol. 88 - Nº2
May. - Ago. de 2024
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2684-0359 Ed. electrónica

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA
Fundada el 3 de septiembre de 1934

COMISIÓN DE LA REVISTA

Director:

Dr. Fernando D. Brites

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Secretaria Científica:

Dra. Fabrina Capece

Hospital General de Niños Pedro Elizalde. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Comité Editorial:

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Laboratorio Rossi.

Universidades del Hospital Italiano de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Dra. Isabel Desimone

Hospital Interzonal General de Agudos Evita, Lanús, provincia de Buenos Aires.

Universidad Kennedy, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Dr. Jaime Kovensky

Hospital Dr. Arturo Umberto Illia, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Carrera de Medicina, Universidad Nacional de la Matanza, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Dr. Julián Verona

Hospital Municipal Subzonal Dr. Felipe Fossati. Balcarce, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Asesores:

ESPAÑA

Aresio Plaza Lopez
Luis García de Guadiana Romualdo
Pablo Daniel Lapunzina Badía
EEUU
Carlos Alberto von Mühlen
CHILE
Carlos Calvo Monfil,
URUGUAY
Dora Ruchanzky
Fernando Antúnez
MÉXICO
Ignacio García de la Torre
PARAGUAY
M. Montserrat Blanes González

ARGENTINA

Adriana Factorovich
Alejandra Scaziotta
Alejandra Ginaca
Alberto Lazarowski
Alberto Villagra
Alicia Arechabala
Alicia Blanco
Angela Famiglietti
Belén Bouzas
Carlos Vay
Cesar Collino
Claudia Ayuso
Claudia Menghi
Daniel Bustos
Eduardo Mormandi
Fernando Goldbaum
Gabriel Migliarino
Gabriela Mendeluk
Gabriela Santiso
Gloria Cerrone
Graciela Ponce
Graciela Ramos
Jorge Guarlerik
Jorge Rey
José Margariños
Laura Boero
Leticia Madalena
María José Rial
M. Laura D' Ambrosio
Marta Martinuzzi
Monica Aixalá
Nestor Litwin
Nilda Fink
Nora Slobodianik
Patricia Otero
Patricia Sorroche
Sara Kauffman
Silvia González
Stella Carchio
Viviana Osta

Corrección de estilo:

Lic. Débora Schmer Miranda (Español)

Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés)

Secretarios administrativos:

Sr. Gastón Goldberg

Sr. Jorge Signorelli

COMISIÓN DIRECTIVA

Presidente: Dra. Silvia B. González

Vicepresidente: Dra. Patricia Otero

Secretaria: Dra. Viviana Osta

Tesorera: Dra. Isabel Desimone

1º Vocal Titular: Dra. María José Rial

2º Vocal Titular: Dr. Eduardo Mormandi

3º Vocal Titular: Dra. María Rugiero

1º Vocal Suplente: Dr. Alberto Villagra.

2º Vocal Suplente: Dra. M. de la Paz Domínguez

3º Vocal Suplente: Dra. Alejandra Svartz

COMISIÓN REVISORA DE CUENTAS

Titular 1º: Dra. Silvia Morilla

Titular 2º: Dra. Estella Meyer

Titular 3º: Dra. Silvia Cajiao

1º Vocal Suplente: Dra. Florencia Minotti

2º Vocal Suplente: Dra. Laura Colitto

COMISIONES INTERNAS

Prensa y Difusión

Presidente: Dra. Rocío Romero

Secretaria: Dra. Florencia Minotti

Vocales: Dr. Eduardo Mormandi

Dra Fabrina Capece

Dra. Nuria Cañellas

Certificación

Presidente: Dr. Alberto Villagra

Secretaria: Dra. Viviana Osta

Vocal: Dra. María José Rial

Comisión Cultura

Presidente: Dra. Silvia Morilla

Secretario: Dr. Alberto Villagra

Cursos

Presidente: Dra. Silvia González

Secretaria: Dra. María Soledad Caldirola

Vocales: Dra. María José Rial

Dra. María de la Paz Domínguez

Dra. Alejandra Svartz

Dra. Rocío Romero

Dra. Laura Colito

Comité Científico Asesor

Dra. Mónica Aixalá

Dr. Gloria Alvarez

Dra. Liliiana Arias

Dra. Alicia Blanco

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Silvia González

Dr. César Colino

Dr. Eduardo Mormandi

Dr. Jorge Rey

Dra. María José Rial

Dra. Sandra Rozental

Dra. Gabriela Santiso

Dra. Nora Slobodianik

Premios y distinciones

Dra. Alicia Blanco

Dr. Fernando Brites

Dra. Nilda Fink

Dr. Néstor Litwin

Dr. Miguel Angel De Cristóforo

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

Instrucciones para los autores

Los trabajos enviados a la Revista ByPC deben ser originales y no deben haber sido publicados o estar postulados simultáneamente en otras revistas u órgano de difusión científica nacional o extranjero, tanto en forma impresa como electrónica.

Para la preparación de manuscritos, se siguen los requerimientos de las Recomendaciones para la preparación, presentación, edición y publicación de trabajos académicos en revistas médicas (ICMJE, según su sigla en inglés) disponible en <http://www.icmje.org/icmjerecommendations.pdf>. Asimismo, se recomienda consultar las guías para publicación de distintos tipos de trabajos en:

<http://www.espanol.equator-network.org>.

La recepción de trabajos se realizará mediante el sistema OJS en la web oficial de la Revista ByPC:

<http://www.revistabypc.org.ar/>

Cualquier duda podrá despejarse ingresando al instructivo o solicitar asistencia a revistabypc.aba@gmail.com

Para incluir material de otras fuentes con derechos de autor en artículos a publicar en la revista, se debe obtener el correspondiente permiso, y adjuntar copia del mismo al artículo propuesto para publicación.

1. Requisitos para el envío de manuscritos

- Doble espacio en todas las partes del manuscrito.
- Empezar cada sección o componente en una nueva página.
- Revisar la secuencia: título; autores; lugares de trabajo; número de ORCID; datos del autor de correspondencia; resumen y palabras clave en castellano; título, resumen y palabras clave en inglés americano; introducción; materiales y métodos; resultados; discusión; agradecimientos, referencias bibliográficas, leyendas de las figuras; tablas; y figuras (cada una en página separada).
- Las ilustraciones no deben ser más grandes que 203 x 254 mm
- Incluir los permisos para reproducir material publicado previamente o usar imágenes que pueden identificar a las personas.

2. Carta al Director

Carta dirigida al Director de la Revista en la cual se solicita la publicación del artículo. Debe contener el título del trabajo, categoría a la cual pertenece (ver ítem 3), nombre y apellido de todos los autores, número de ORCID, dirección, teléfonos y dirección de e-mail del autor de contacto, una dirección de e-mail alternativa, una frase con valor de declaración jurada en la que se manifieste que el artículo cumple con todos los requisitos de publicación en ByPC, y que la última versión del manuscrito ha sido leída y aprobada por todos los autores.

3. Secciones de la revista

Secciones	Extensión máxima palabras	Resumen extensión palabras	Referencias bibliográficas máx.	Nº máx. tablas y figuras	Nº máx. fotos
Artículo original	2500	250	40	6	2
Comunicación breve y Casos clínicos	1400	150	15	4	-
Actualización o Revisión*, o Artículos especiales	2000 4000	150	20 40		
Comentarios	1300	-	10		
Consensos y guías*	sin especificar	150			
Cartas al editor*	1500	-	5		
Comentarios a libros	800				

* Revisiones, Cartas al Editor, guías y consensos

Las revisiones, cartas al editor, guías y consensos serán usualmente solicitados por el Comité Editorial de la Revista a autores considerados expertos en el campo, la disciplina o la especialidad en cuestión. Sin embargo, serán consideradas para su publicación las que fueran enviadas espontáneamente. Deberán seguir los lineamientos expuestos para la publicación de artículos originales, con la diferencia de que su texto no necesitará contar con resultados y discusión.

4. Preparación de los manuscritos

4.1. Generalidades:

El archivo deberá ser nombrado solamente con el apellido del primer autor y la leyenda "y col." si correspondiese (Ej.: Pérez y col.).

El texto debe estar dividido en secciones con los títulos de Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Los artículos extensos pueden requerir subtítulos dentro de algunas secciones (especialmente en las secciones de Resultados y Discusión) para aclarar sus contenidos.

Debe estar escrito en procesador de texto Word, en tamaño de página A4, con márgenes de al menos 25 mm, empleando letra Arial tamaño 12. Usar doble espacio, incluyendo la página del título, resumen, texto, agradecimientos, referencias bibliográficas, tablas individuales y leyendas.

Numerar las páginas consecutivamente empezando con la página del título. Poner el número de la página en la esquina inferior derecha de cada página.

4.2 La primera página debe contener:

- a) El título, que debe ser conciso pero informativo.
- b) El apellido y luego, separado por coma, los nombres completos de los autores, lo cual debe ir seguido de punto y coma, y los datos del siguiente autor. A continuación del nombre de cada autor, se debe colocar, a modo de superíndice, el número que haga referencia al lugar de trabajo al que pertenece dicho autor; y el número de ORCID. El autor al cual debe ir dirigida la correspondencia debe ser destacado con un asterisco también a modo de superíndice (Ej.: Ramírez, Juan Carlos^{1*}; Benítez, Laura²; Romero, Mario³).

c) Cada lugar de trabajo con el número asignado al autor correspondiente. No se deben emplear abreviaturas. Debe constar primero el nombre del servicio o laboratorio, luego el correspondiente al departamento y por último el de la institución, todo separado por comas y seguido de punto. A continuación, se debe incluir el nombre de la ciudad, la provincia y el país, también separados por comas y con punto final [Ej.: Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina].

d) Nombre completo del autor responsable de recibir la correspondencia, su lugar de trabajo, la dirección postal, y la dirección de e-mail.

4.3 La segunda página debe contener:

a) El resumen en castellano de no más de 250 palabras. Debe estar estructurado de la siguiente manera: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones. Se deben incluir dichos subtítulos de manera explícita. El resumen debe establecer los propósitos del estudio o investigación, procedimientos básicos (selección de los sujetos de estudio o animales de laboratorio; métodos de observación y analíticos), los hallazgos principales y las conclusiones más relevantes. Debería enfatizarse en los aspectos nuevos e importantes del estudio u observaciones. Se recomienda incluir los valores correspondientes a los hallazgos más relevantes acompañados de la forma de expresión de los mismos [Ej.: Media \pm D.E.] y el tratamiento estadístico, si correspondiese. En el resumen no se deben utilizar abreviaturas.

b) Palabras clave. Los autores deben colocar, e identificar como tales, tres a diez palabras clave o frases cortas que servirán para la indización cruzada del artículo y deben ser publicadas con el artículo.

4.4 La tercera página debe contener:

a) Título en inglés americano. Debe cumplir los mismos requisitos que el título en castellano.

b) Resumen en inglés americano (Abstract). Debe cumplir los mismos requisitos que el resumen en castellano e incluir los siguientes subtítulos: Introduction, Objectives, Materials and Methods, Results y Conclusions.

c) Palabras clave en inglés americano (Key words). Deben cumplir los mismos requisitos que las palabras clave en castellano.

4.5 Las páginas subsiguientes, comenzando cada sección en página aparte, deben contener:

a) Introducción. En la introducción, se debe expresar el contexto o los antecedentes del estudio (por ejemplo, la naturaleza del problema y su importancia) y enunciar el propósito específico u objetivo de la investigación o la hipótesis que se pone a prueba en el estudio u observación. A menudo, la investigación se centra con más claridad cuando se plantea como pregunta. Tanto los objetivos principales como los secundarios deberán estar claros, y deberá describirse cualquier análisis de subgru-

pos predefinido. Se deben incluir sólo las referencias que sean estrictamente pertinentes y no añadir datos o conclusiones del trabajo que se presenta.

b) Materiales y Métodos. Debe describir detalladamente los sujetos experimentales (humanos o animales), el equipamiento, los reactivos y los procedimientos utilizados, con la inclusión de las marcas registradas cuando corresponda y referencias al utilizar métodos establecidos.

Indicar las consideraciones éticas que correspondan si han participado en el estudio seres humanos (aprobación por comités de ética y obtención de consentimiento informado). ByPC adhiere a las normas éticas establecidas por el Comité de Ética de las Publicaciones (Committee on Publication Ethics -COPE- <https://publicationethics.org/>). También, indicar las consideraciones éticas que correspondan si se han utilizado en el estudio animales de experimentación (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL).

Se recomienda dividir la sección Materiales y Métodos mediante el empleo de subtítulos en el caso de ser demasiado extenso. Incluir una sección de "Análisis de datos" en la cual se describan las formas de expresión de los resultados y los métodos estadísticos empleados, si correspondiese. Estos deben ser descritos con suficiente detalle para permitir que un lector experto con acceso a los datos originales pueda comprobar los resultados que se presentan. Cuando sea posible, cuantificar los hallazgos y presentarlos con los indicadores de medida de error o de incertidumbre adecuados (como los intervalos de confianza).

Evitar basarse únicamente en la comprobación de hipótesis estadísticas, como el uso de valores p, que no dan información sobre la magnitud del efecto. Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos deberán corresponder a manuales o artículos habitualmente citados para tal fin (con los números de página incluidos). Definir también los términos estadísticos, abreviaturas y la mayoría de símbolos. Especificar el software utilizado.

En caso que corresponda, se sugiere incluir una sección de "Cálculo del tamaño muestral".

c) Resultados. Presentar los resultados siguiendo una secuencia lógica en el texto, tablas e ilustraciones, y destacando en primer lugar los hallazgos más importantes. No repetir en el texto los datos de las tablas o ilustraciones; resaltar o resumir sólo las observaciones más importantes.

Los materiales extra o suplementarios y los detalles técnicos pueden situarse en un anexo donde se puedan consultar para no interrumpir la secuencia del texto.

Cuando los datos se resuman en este apartado, los resultados numéricos no sólo deben presentar los derivados (por ejemplo, porcentajes) sino también los valores absolutos a partir de los cuales se calcularon, y especificar los métodos estadísticos utilizados para analizarlos.

Limitar el número de tablas y figuras a las estrictamente necesarias para ilustrar el tema del artículo y para evaluar su grado de apoyo. Usar gráficos como alternativa a las tablas con muchas entradas; no duplicar datos en los gráficos y tablas. Evitar usos no técnicos de términos estadísticos, como "azar" (que implica un dispositivo de aleatorización), "normal," "significativo,"

“correlaciones” y “muestra”. Cuando sea científicamente adecuado, incluir análisis en función de variables como edad y sexo. d) **Discusión.** Destacar los aspectos más novedosos e importantes del estudio y las conclusiones que de ellos se deducen, contextualizándolos en el conjunto de las evidencias más accesibles. No repetir en detalle datos u otro material que aparezca en la Introducción o en el apartado Resultados.

En el caso de estudios experimentales, es útil empezar la discusión resumiendo brevemente los principales resultados; a continuación, explorar los posibles mecanismos o explicaciones de dichos hallazgos, comparar y contrastar los resultados con los de otros estudios relevantes, exponer las limitaciones del estudio, y explorar las implicaciones de los resultados para futuras investigaciones y para la práctica clínica.

Relacionar las conclusiones con los objetivos del estudio, evitando hacer afirmaciones rotundas y sacar conclusiones que no estén debidamente respaldadas por los datos. En particular, evitar afirmaciones sobre los costes y beneficios económicos a menos que el manuscrito incluya datos económicos con sus correspondientes análisis. Evitar afirmaciones o alusiones a aspectos de la investigación que no se hayan llevado a término.

Cabe la posibilidad de establecer nuevas hipótesis cuando tengan base, pero calificándolas claramente como tales.

e) **Agradecimientos.** Una o más declaraciones deben especificar: a) Las contribuciones que necesitan agradecerse pero que no justifican una autoría, tales como apoyo general por una jefatura de departamento; b) Agradecimientos al apoyo técnico; c) Agradecimiento al apoyo financiero y material, que debe especificar la naturaleza del apoyo; y d) Las relaciones que pueden tener un conflicto de intereses.

Las personas que han contribuido intelectualmente al artículo, pero cuyas contribuciones no justifican una autoría, pueden ser mencionadas y sus funciones o contribuciones pueden ser descritas - por ejemplo, “asesor científico”, “revisión crítica de los propósitos del estudio”, “recolección de información” o “participación en el ensayo clínico”; tales personas deben haber dado sus permisos para ser mencionadas. Los autores son responsables de obtener los permisos escritos de las personas a quienes se agradece. La ayuda técnica debe ser agradecida en un párrafo aparte de los agradecimientos de otras contribuciones.

5. Aspectos que deben tenerse en cuenta en la redacción del manuscrito (Normas Vancouver actualizadas a 2016)

5.1 Citas bibliográficas:

Es la presentación textual o resumida, de ideas expresadas por otros autores que sirven de apoyo al investigador, se contraponen a lo que él dice o aportan mayor información sobre un tema determinado. Las citas son un tipo de texto incrustado en otro texto. Las citas en estilo Vancouver por lo general utilizan un sistema de secuencia numérica. Son numeradas consecutivamente en el orden de aparición en el texto. Se identifican con números arábigos entre corchetes, ejemplo [1].

a) Tipo de citas

- Cita directa: La que se transcribe textualmente. Ejemplo:

“La cita textual breve, de menos de cinco renglones, se inserta dentro del texto entre comillas, y el número correspondiente se coloca al final, después de las comillas y antes del signo de puntuación” [3].

- Cita corta: Menos de cinco renglones.
- Cita larga: Más de cinco renglones. Se escribe fuera del texto, dejando doble espacio y sangría, entre comillas y en bastardilla.
- Cita indirecta: Mención de las ideas de un autor con palabras de quien escribe. Se escribe dentro del texto sin comillas, el número de la referencia se escribe inmediatamente después de citar su idea. Ejemplo: La mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín [5].

b) Tipo de cita según redacción

- Cita integral: Es aquella donde el nombre del autor forma parte de la oración. El nombre se integra dentro del texto. El número de la referencia se escribe después del apellido del autor y antes de citar su idea. Ejemplos: Como dice Londoño [5] la mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín. Cita Indirecta Según Sanz Pinyol [1] “Desde el punto de vista de la caracterización de los discursos, en el aula suelen producirse diferentes géneros” Cita directa
- Cita no integral: No se menciona el nombre del autor dentro del texto. Ejemplos:
É la mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín [5]. Cita Indirecta
“Desde el punto de vista de la caracterización de los discursos, en el aula suelen producirse diferentes géneros” [1]. Cita directa

5.2 Referencias bibliográficas:

- Conjunto de datos suficientemente detallados que permite identificar un documento. En el caso de que la referencia citada disponga de un identificador de objeto digital (DOI) u otro homologable (ARK, Handle, etc) esta información deberá formar parte de la referencia de acuerdo a las normas de Vancouver. Deben ser numeradas consecutivamente en el orden en que son mencionadas en el texto. Identificar las referencias en el texto, cuadros y leyendas con números arábigos entre corchetes. Las referencias citadas sólo en los cuadros o en las leyendas de las figuras deben ser numeradas de acuerdo con la secuencia establecida por la primera identificación en el texto del cuadro o figura particular.
- Usar el estilo basado en los formatos utilizados por la US National Library of Medicine (NLM) en el Index Medicus. Los títulos de las revistas deben ser abreviados de acuerdo al estilo que utiliza el Index Medicus. Consultar la lista de revistas indexadas en el Index Medicus, publicado anualmente como una separata por la NLM y como una relación en el volumen del mes de enero del Index Medicus.
- Evitar el uso de los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos aceptados pero no publicados deben ser designadas como “en prensa” o “en avance”; los autores deben obtener permiso por escrito para citar tales artículos así como

la verificación de que ellos han sido aceptados para publicación. La información de los manuscritos remitidos pero no aceptados debe ser citada en el texto como “observaciones no publicadas” con el consentimiento escrito de los autores.

- No citar una “comunicación personal” a menos que proporcione información esencial no disponible de una fuente pública, en cuyo caso el nombre de la persona y la fecha de la comunicación deben ser citados entre paréntesis en el texto. Para los artículos científicos, los autores deben obtener permiso por escrito y confirmación de exactitud de la fuente de la comunicación personal.
- Las referencias deben ser verificadas por el autor o autores en los documentos originales.
- El estilo de Requisitos Uniformes (de Vancouver) se basa principalmente en el estilo estándar ANSI adaptado por la NLM para su base de datos.

a) Artículos de revistas

- Si una revista lleva paginación continua a través de un volumen (como muchas revistas médicas lo hacen), el mes y el número del volumen deben ser omitidos: Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996; 124: 980-3.
- Más de seis autores: Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996; 73: 1006-12.
- La organización como autor: The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 164:2824.
- Sin autor mencionado: Cancer in South Africa (editorial). *S Afr Med J* 1994; 84: 14.
- Artículo no escrito en inglés: Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral inftapatellar seneruptur hos tidligere frisk kv-vinne. *Tdsskr Nor Laegeforen* 1996; 116: 412.
- Volumen con suplemento: Shen M Zhang QF. Risk assesement of nikel carcinogenicity and occupational lung cancer *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1: 275-82.
- Número con suplemento: Paybe DK, Sullivan ME, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996; 23 [1 Suppl 2. 89-97].
- Volumen con parte: Ozben T, Nacirarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in noninsulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995; 32 (Pt 3): 303-6.
- Número con parte: People GH, Mills SM. One Hundred consecutive cases offlap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994,107 [986 PH]: 377-8.
- Número sin volumen: Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995; [320]:

110-4.

- Sin número, ni volumen: Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. *Curr Opin Gen Surg* 1993; 325-33.
- Compaginación en números romanos: Fisher GA, Sikie BI. Drug in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr 9(2): xi xii.
- Tipo de artículo indizado tal como es requerido: Enzensberger W, Fischer PA. Metronome in Parkinson's disease [carta]. *Lancet* 1996; 347 1337. Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen] *Kidney Int* 1992; 42: 1285.
- Artículo conteniendo una retractación: Garcy CE, Schwarzman AL, Rise ML. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retraction de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML. In: *Nat Genet* 1994; 6.: 426-31]. *Nat Genet* 1995,11: 104.
- Artículo retractado: Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBPgene expression during mouse development [retractado en *Invest Ophtholmo Vis Sci* 1994; 35: 31271. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 1083-8.
- Artículo con errata publicada: Hamlim JA, Kahn AM. Herniorraphy in symptomatic patients following inguinal hernia repair [publicado con errata en *West J Med* 1995; 162.2781]. *West J Med* 1995; 162 28-31.

b) Libros y otras monografías

- Autor (o autores) personal: Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publisher; 1996.
- El editor (es), compilador (es) como autor: Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York; Churchill Livingstone; 1996.
- Una organización como autor y editor: Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medical program. Washington (DC): The Institute; 1992].
- Un capítulo en un libro: Phillips SJ, Whisnant JP Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Kaven Press; 1995. p. 465-78.
- Libro de congreso: Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 199 Oct 1519; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.
- Ponencia de un congreso: Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degouler P, Piemme TE, Rienhoff O, editors MEDINFO 92 m Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10, Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

c) Informe científico o técnico

- Emitido por la agencia financiante o auspiciadora:
Smith P, Golladay K Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report N° HHSI-GOEI69200860.
- Emitido por la agencia ejecutante:
Field MJ, Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract N° AHCP R282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

d) Disertación

Kaplan SJ. Post-hospital home health care; the elderly's access and utilization [dissertation]. St Louis (MO): Washington Univ; 1995.

e) Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignance. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5.529,067, 1995 Jun Material publicado.

f) Artículo de periódico

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 5000 admissions annually. The Washington Post 1996; jun 21; Sect. A:3 [col5].

g) Material audiovisual

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St Louis (MO): Mosby-Year Book 1995.

h) Material legal

Ley Pública

Preventive Health Amendments of 1993, PubL. N° 103-183, 107 Stat, 2226 [Dec. 14, 1993].

Dispositivo no decretado

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong. 1st Sess [1995].

Código de regulaciones federales

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441. 257 [1995].

i) Material inédito

- En prensa o "en avance":
Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Eng J Med. En prensa 1997

j) Material electrónico

- Artículo de una revista en formato electrónico:
Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5], 1(1): [24 screens]. Available from: VRL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.
- Monografía en formato electrónico:
CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM]. Reeves JRT, Malbach H, CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 20. San Diego: CMEA; 1995.
- Archivo computarizado:
Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2 Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

6. Tablas

Todas las tablas deben agruparse a continuación de las leyendas de las figuras, cada una en página separada. Deberán estar numeradas secuencialmente con números romanos, contener un título antes de la tabla y aclaraciones al pie, si fuese necesario. Al pie de cada tabla debe figurar la aclaración de las abreviaturas empleadas, así como toda la información relacionada con la forma de expresión de los resultados y el tratamiento estadístico que los autores consideren necesaria. Las tablas deben ser comprensibles por sí mismas. Para la elaboración de las tablas, se recomienda utilizar el procesador de texto Word y seleccionar el Estilo de Tabla "Tabla básica 1".

7. Figuras

Todas las figuras deben agruparse a continuación de las tablas, cada una en página separada. Deberán estar numeradas secuencialmente con números arábigos. Las fotografías y las figuras podrán tener colores, aunque, en el caso de las figuras, el fondo debe ser blanco. El título de las figuras no debe incluirse junto a las mismas sino en la sección "Leyendas de Figuras". En dicha leyenda, debe incluirse el título de la figura, la aclaración de las abreviaturas empleadas y toda la información relacionada con la forma de expresión de los resultados y el tratamiento estadístico que los autores consideren necesaria. En caso de figuras, fotografías o tablas tomadas de otra publicación, se debe citar la fuente y además enviar el permiso escrito otorgado por el propietario intelectual de dicho material para que el mismo sea publicado en ByPC.

8. Ortografía y formas de expresión

- Se debe evitar la utilización de palabras en otros idiomas y, cuando ello sea indispensable, deberán ser colocadas en itálica [Ej.: in vitro].
- El estadístico "p" debe ser escrito en minúscula.
- En la expresión de los resultados, se debe dejar espacio entre la cifras y los símbolos o las unidades [Ej.: $p < 0,05$; 32 ± 2 g/L].
- Unidades: se deben emplear las unidades utilizadas más frecuentemente en nuestro medio para cada analito [Ej.: glucosa, urea, ácido úrico, lípidos, lipoproteínas, apoproteínas en mg/dL].
- Las abreviaturas deben ser aclaradas la primera vez que aparecen en el texto ubicándolas entre paréntesis, a pesar de que se trate de abreviaturas ampliamente conocidas [Ej. hemoglobina (Hb)].
- En la expresión de los resultados, tanto la media como la mediana deben contener la misma cantidad de decimales que sus respectivos desvíos estándar, errores, percentilos o rangos [Ej. $9,25 \pm 0,78$].
- En la expresión de los resultados, la separación entre el entero y los decimales se debe hacer mediante comas y no con puntos, lo cual es propio del idioma inglés (3,25), excepto para el resumen en inglés (Abstract), en el cual se deben emplear puntos (3.25).
- En el texto, cuando un número aparece al principio de la oración, deberá ser escrito en letras [Ej. Veinte pacientes].

La inmortalidad de Henrieta Lacks: la bioética médica nacida de una historia

Para muchos profesionales de la salud o investigadores en el área de la biología celular, el nombre *HeLa* se asocia a células de cultivo. De hecho, fue la primera línea celular humana de crecimiento indefinido. Estas células vienen siendo utilizadas desde hace mucho tiempo y fueron fundamentales en el desarrollo de la medicina. Su importancia puede mensurarse al poner en PubMed la palabra clave *HeLa*, que da 121.146 resultados (mes de noviembre 2023). Pero ¿cuál es su importancia? ¿Cuáles fueron los problemas derivados de su utilización en la investigación? ¿Cuál es la historia detrás de estas células que tuvo consecuencias trascendentes en la investigación biológica y construyó nuevos paradigmas en la ética médica? ¿Cuál es la idea de la inmortalidad?

Esta historia está ligada a Henrietta Lacks, una mujer afroamericana fallecida el 4 de octubre de 1951 a causa de un cáncer cervical, nacida en el pueblo de Roanoke, estado de Virginia en Estados Unidos, el 1 de agosto de 1920. Su inmortalidad fue planteada en un libro escrito por la periodista Rebecca Skloot y publicado en el año 2012, cuyo título es *The immortal life of Henrietta Lacks*¹. Debido a que las células provenientes de su cáncer cervical son la fuente de la línea celular conocida como *HeLa*, las cuales han sido fundamentales en la investigación científica y médica.

Henrietta Lacks fue diagnosticada y tratada según los estándares de la época en el hospital Johns Hopkins, construido en los últimos años del siglo XIX como un hospital de caridad. A pesar del tratamiento muy agresivo, el cáncer se esparció por el organismo y su condición de salud empeoró rápidamente, por lo que fue atendida con cuidados paliativos las dos últimas semanas de vida.

Una vez realizado el diagnóstico, el Dr. Howard Jones tomó una biopsia, y su jefe, el Dr. Richard Wesley TeLinde, reconocido experto en cáncer cervical, compartió los estudios anatomopatológicos con el Dr. George Otto Gey, director del Departamento de Cultivo Celular del Johns Hopkins.

El Dr. Gey estaba obsesionado con conseguir líneas de cultivo celular de origen humano de crecimiento indefinido, lo que ya se había conseguido en ratas. El Dr. Hayflick, en 1961, demostró que las células podían dividirse hasta 50 veces y luego morir debido al acortamiento de los telómeros (ley o límite de Hayflick), independientemente del tipo celular.^{2,3} Sin embargo, las células de Henrietta Lacks crecían indefinidamente. El Dr. TeLinde le comunicó a Henrietta su intención de tomar una biopsia. Cuando llegó el material al laboratorio para su cultivo, el Dr. Gey rotuló la muestra, como lo haría cualquier profesional del laboratorio de investigación clínica, con las iniciales del nombre y apellido del paciente: "HeLa" y allí nació el nombre de las células más

famosas y cultivadas del mundo.

El Dr. Gey comprobó que el crecimiento de las células *HeLa* era muy rápido, ya que se duplicaban cada 24 h, y, aunque esperaba que estas células murieran (cumpliendo con la ley de Hayflick), esto no sucedía. Una de las explicaciones de esta característica, probablemente se deba a la incorporación a las células de Henrietta de parte del genoma del HPV cerca del protooncogen *c-myc*, activándolo y elevando su ritmo de crecimiento⁴.

Por otro lado, se sabe que el envejecimiento y muerte celular se debe al acortamiento de los telómeros en cada división, sin embargo, las células de Henrietta poseen una telomerasa extremadamente activa que evita el acortamiento de los telómeros reconstituyéndolos después de cada división⁵. Así fue como se consiguió por primera vez una línea celular de crecimiento indefinido.

Las células *HeLa* fueron y son utilizadas en infinidad de investigaciones científicas. Uno de estos ejemplos fue la vacuna de la polio, que debe, en parte, su éxito a las células *HeLa*, ya que el Dr. Jonas Salk en 1952 estaba desarrollando esta vacuna en medio de la epidemia de polio de 1951. El Dr. Salk necesitaba un cultivo celular para probar la vacuna y resultó que las células *HeLa* eran particularmente sensibles al virus. El Dr. Gey envió, sin interés alguno, suficiente cantidad de células para realizar los experimentos y la producción de la vacuna contra el virus de la polio. También tuvieron importancia en la investigación sobre el VIH/sida, el cáncer, la biología celular y muchas otras condiciones médicas.

Otra línea celular muy utilizada en nuestro medio para el estudio de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes son las células HEP-2; inicialmente, se creía que eran derivadas de un paciente de 57 años con cáncer de laringe. Sin embargo, estudios recientes pudieron demostrar que contienen marcadores cromosómicos de las células *HeLa* y, por lo tanto, serían una cepa derivada de esta línea, surgida, probablemente, como contaminación cruzada. Se pudo demostrar que los resultados del análisis de diferentes isoenzimas, marcadores, son compartidos entre las células *HeLa* y las HEP-2.

Henrietta Lacks murió a una edad muy temprana, y sus células han sido cultivadas, infectadas, utilizadas en diferentes investigaciones, sin tener ella idea de esto. Sus familiares tomaron conciencia a principios de los setenta de que las estaban utilizando sin su consentimiento. En el 2010, la periodista Rebecca Sklot publicó el libro de investigación, *The immortal life of Henrietta Lacks*, que generó un debate en la medicina referido a los consentimientos informados, la ética, la bioética, el racismo, la propiedad del material biológico y los derechos que se tienen sobre ellos.

Diversas consideraciones éticas han surgido a través de los años. Una de las más importantes e impulsada por esta historia es la referida al consentimiento informado y la autonomía del paciente.

En la década del 50, las prácticas éticas en la investigación científica médica no eran tan estrictas como en la actualidad. Una consideración importante es la relacionada con la propiedad de las células, las que se distribuyeron y fueron utilizadas en muchas investigaciones y desarrollos científico-médicos. La familia, y mucho menos Henrietta, nunca usufructuaron beneficios ni tuvieron control alguno sobre las células de su propiedad.

En marzo de 2013, investigadores del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) secuenciaron el genoma completo de las HeLa, pero la familia Lacks protestó por primera vez en 60 años oponiéndose a esta publicación, aduciendo que se estaba invadiendo su privacidad.

Los científicos no dudaron en retirar la publicación y, posteriormente, se buscó un acuerdo para el uso controlado de los datos.

No menos importante es el impacto en la investigación, ya que, al no tener muchos requerimientos para su cultivo, han sido utilizadas en muchos experimentos científicos sin tener en cuenta que se comportan de manera diferente a otras células humanas en diferentes contextos, por lo que deben tomarse con precaución las conclusiones a la hora de extrapolar los resultados.

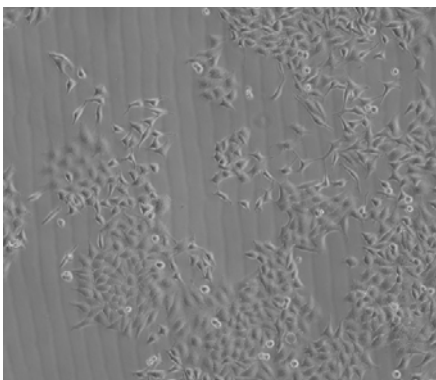
El uso de células plantea una pregunta más relacionada con la confidencialidad y privacidad referida, sobre todo, a la información genética; aunque la genética de las células HeLa no es exactamente igual, las células normales de Henrietta Lacks le siguen perteneciendo.

Las profundas discusiones éticas nacidas de esta historia aún persisten. El consentimiento informado, la propiedad del material biológico, el derecho a la información vertida al medio, la privacidad de la información genética y cualquier información que pueda derivar de la investigación, entre otros, son temas que necesariamente tenemos que tener en cuenta. La inmortalidad de Henrietta Lacks y su historia obliga a reflexionar sobre los límites y consecuencias de los actos en la investigación científica.

Es crucial resaltar que estas inquietudes éticas han propiciado cambios sustanciales en las prácticas de investigación médica y en la regulación ética relacionada con el tratamiento de muestras biológicas humanas. Se han intensificado el enfoque en el respeto a la autonomía del paciente, la obtención de consentimiento informado y la consideración metódica de los aspectos éticos en el ámbito de la investigación biomédica.⁶



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución -No Comercial- Compartir Igual 4.0 Internacional - Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.



► Arriba a la izquierda: Cultivo de células HEp-2. Contraste de fase 200X. Abajo a la izquierda: Cultivo de células HeLa. Contraste de fase 1000X.

Referencias bibliográficas

1. Skloot, R. (2010). *The Immortal Life of Henrietta Lacks*. Crown Publishers.
2. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585–621.
3. Hayflick, L., 1965, The limited in vitro time of human diploid cell strains, *Experimental Cell Research*, 37: 614-636.
4. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020;38(4):159–165.
5. *Biogerontology* [2007] 8:163–172 DOI 10.1007/s10522-006-9043-9.
6. *Dom. Cien.*, ISSN: 2477-8818 Vol. 9, núm. 4. Octubre-Diciembre, 2023, pp. 87-105.

• **Orlando Gabriel Carballo**^{ORCID}

Laboratorio Rossi.

Universidad Hospital Italiano de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

ARTÍCULO ORIGINAL

Vigilancia activa de la portación de bacilos productores de carbapenemasas por PCR múltiple en tiempo real. Experiencia a cuatro meses de su implementación

Active surveillance of the carriage of carbapenemase-producing bacilli by real-time multiplex PCR. Experience four months after its implementation.

Togneri, Ana María^{1*}; Pérez, Marcela Patricia^{1*}; Pérez Catalán, Sebastián^{1*}; Bastanza Anabela Mailen^{1*}; Re, Wanda Carla Daniela^{2*}; Gañete, Marcelo Alejandro^{3*}; Salas Escalante, Rudy Adhemar^{1*}; Sztokhamer, Daniel Gustavo^{3*}; Sampere, Cecilia Liliana^{3*}; Sablich, Juan Ignacio^{3*}; Aguirre Herguero, Bernardo Nicolas^{3*}; Aguirre Zuñiga, Silvia Vanessa^{3*}; Sanabria, Julieta^{3*}; Pirrone, Claudia Mabel^{1*}; Corral, Pablo Rodrigo Jorge^{4*}; Vindigni, Luis^{4*}.

¹Laboratorio de Bacteriología, Laboratorio Central, Hospital Interzonal General de Agudos "Evita". Lanús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

²Departamento de Enfermería, Hospital Interzonal General de Agudos "Evita". Lanús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

³Sala de Infectología, Clínica Médica, Hospital Interzonal General de Agudos "Evita". Lanús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

⁴Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos, Hospital Interzonal General de Agudos "Evita". Lanús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Togneri, Ana María. Laboratorio de Bacteriología, Laboratorio Central, Hospital Interzonal General de Agudos "Evita", Fray Mamerto Esquiú 169-1833, Turdera; anatogneri66@hotmail.com, datoswhonet.evita@gmail.com.

Resumen

Introducción: La portación de bacilos productores de carbapenemasas (BPC) en pacientes hospitalizados obliga a realizar una vigilancia activa para contener su diseminación, dadas las escasas opciones terapéuticas de las infecciones por estos microorganismos. Objetivo: Conocer la portación de BPC en los pacientes asistidos en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIA) del Hospital Interzonal de Agudos "Evita" de Lanús. Materiales y Métodos: Durante 4 meses se realizó un estudio descriptivo, prospectivo; con frecuencia semanal, se tomaron hisopados rectales de los pacientes de acuerdo con criterios pautados. Las muestras se estudiaron por PCR múltiple en tiempo real (BD Max™ System, Becton Dickinson, USA), con detección de las enzimas KPC, NDM, VIM/IMP y OXA. La información se recopiló en un formulario, se analizó en hojas de Excel, y se usó χ^2 para determinar las diferencias significativas ($p < 0,05$; programa Epidat 3.0). Resultados: Se realizaron 99 hisopados en 74 pacientes, de los cuales 36 resultaron positivos, lo que representó una portación por BPC del 48,6 %. La distribución porcentual de las distintas carbapenemasas fue la resultante: 40,4 % NDM; 30,7 % OXA; 17,3 % KPC; 5,8 % VIM; 5,8 % IMP/VIM. En 38,9 % de los portadores, se demostró la colonización por más de un tipo de carbapenemasa. La aparición posterior de un foco de infección por un BPC fue mayor en los pacientes colonizados ($p < 0,05$). Conclusiones: Estos datos resultan del primer estudio de vigilancia activa de pacientes colonizados por BPC, mediante PCR en tiempo real. La portación fue del 48,6% y constituye una línea de base para monitorear las acciones de control implementadas.

Palabras clave: portación, carbapenemasa, vigilancia activa, PCR.

Abstract

Introduction: The carriage of carbapenemase-producing bacilli (CPB) in hospitalized patients implies active surveillance to contain their spread, given the few therapeutic options for infections caused by these microorganisms. Objective: To determine the carriage of CPBs in patients hospitalized in the Adult Intensive Care Unit (ICU) of the Hospital Interzonal de Agudos "Evita" in Lanús, Buenos Aires, Argentina. Materials and Methods: A descriptive, prospective, weekly study was carried out for 4 months. Rectal swabs were taken from the patients according to established criteria. The samples were studied by real-time multiplex PCR (BD Max™ System, Becton Dickinson, USA), with detection of the following enzymes: KPC, NDM, VIM/IMP and OXA. The information was collected in a form, analyzed in Excel sheets, and χ^2 was used to determine the significant differences ($p < 0.05$; Epidat 3.0 program). Results: A total of 99 swabs were obtained from 74 patients; 36 were positive, representing a CPB carriage of 48.6%. The percentage distribution of the different carbapenemases was: 40.4% NDM; 30.7% OXA; 17.3% KPC; 5.8% MIV; 5.8% VIM/IMP. In 38.9% of carriers, colonization by more than one type of carbapenemase was demonstrated. The subsequent appearance of a focus of infection by a CPB was higher in colonized patients ($p < 0.05$). Conclusions: These data result from the first active surveillance study of patients colonized by CPBs, using real-time PCR. Carrying was 48.6% and constitutes a baseline to monitor the control actions implemented.

Keywords: carriage, carbapenemase, active surveillance, PCR.

Introducción

Desde la aparición de las primeras enzimas que hidrolizan a las cefalosporinas de amplio espectro, conocidas como *betalactamasas de espectro extendido* (BLEE), el aumento de las resistencias en las enterobacterias se ha incrementado hecho que implicó un aumento del consumo de carbapenemes. Con la aparición de nuevas enzimas denominadas *carbapenemasas* por su capacidad de romper la molécula de los carbapenemes, este grupo de antibióticos ha perdido su eficacia para el tratamiento de las infecciones severas por bacilos gram negativos (BGN).¹

Entre los enterobacteriales, las carbapenemasas representan el mecanismo de resistencia más importante, ya que estas enzimas se encuentran codificadas en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones, en general asociados con otros genes de resistencia, y dan como resultado la aparición de aislados multirresistentes o panresistentes, con la capacidad de diseminarse intra e interespecie, a la vez que facilitan la transmisión a modo de brote.

Hay diferentes clases de carbapenemasas definidas según su estructura molecular y su actividad hidrolítica; las de mayor prevalencia en clínica humana se agrupan en tres clases²:

- clase A o serino enzimas: principalmente enzimas del tipo KPC;
- clase B, o metalo-beta-lactamasas (MBL): principalmente enzimas del tipo VIM, IMP y NDM;
- clase D, oxacilinasas, principalmente OXA-48 y derivadas.

Si bien su presencia confiere un perfil de multiresistencia en los aislados que las portan, la diferenciación del tipo de enzima involucrada permite elegir una estrategia diferente frente al diseño del esquema terapéutico.

Varias publicaciones evidencian el aumento de la colonización por microorganismos productores de carbapenemasas en pacientes hospitalizados, principalmente en unidades de cuidado intensivos (UCI). Sumado esto al potencial riesgo para su diseminación y posterior desarrollo de brotes, se hace necesario implementar estrategias de vigilancia activa como la tamización rectal para la detección oportuna y precoz de pacientes colonizados, y contener su diseminación, considerando las importantes implicancias clínicas, epidemiológicas, y las escasas opciones terapéuticas para la infección por estos microorganismos.^{3,4}

Los factores de riesgo asociados a la adquisición de enterobacteriales productores de carbapenemasas (EPC) son la hospitalización prolongada, la estadía en la UCI, los procedimientos invasivos, la inmunosupresión y la terapia antibiótica previa. A su vez, un paciente colonizado con una EPC está en riesgo de padecer una infección por EPC, y se ha demostrado que esta bacteriemia tiene una mortalidad un 10 % mayor respecto de una bacteriemia causada por una enterobacteria sin este mecanismo de resistencia. En este sentido, en 2014, Gianella y col. diseñaron un *score*, *Gianella Risk Score*, para determinar la probabilidad de predecir la aparición de bacteriemia en pacientes con colonización rectal previa.^{5,6}

Dada la importancia de la detección precoz de pacientes

colonizados con bacilos negativos productores de carbapenemasas, el objetivo de este estudio es detectar la presencia de bacilos gram negativos productores de carbapenemasas (BPC) mediante hisopados rectales de los pacientes asistidos en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIA) del Hospital Interzonal de Agudos (HIGA) “Evita” de Lanús.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, de corte transversal, con frecuencia semanal, para detectar la portación de BPC en los pacientes asistidos en la UCIA del HIGA “Evita” de Lanús. Se tomaron muestras mediante hisopados rectales, sin materia fecal visible, de los pacientes, de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Pacientes internados en UCIA con internación ≥ 7 días, procedentes de la comunidad y sin antecedentes de internación.
- 2) Pacientes con < 7 días de internación, que hubieran sido derivados de otras instituciones y que presentaran alguna de las siguientes características:
 - 2.a) ≥ 48 h de internación, en cualquier sector;
 - 2.b) que provinieran de centros de cuidados de adultos mayores;
 - 2.c) que hubieran recibido tratamiento antibiótico en los 6 meses previos a la internación;
 - 2.d) que ingresasen y presentasen antecedentes de internación previa en la UCIA del HIGA “Evita” en los últimos 6 meses.

Criterio de exclusión: cualquier paciente que no cumpliera alguno de los criterios establecidos o con hisopado positivo en el corte semanal previo.

Para la investigación de la portación de BPC, se usó la metodología PCR múltiple en tiempo real empleando el equipo automatizado BD Max™ System (Becton Dickinson, USA, registro en ANMAT PM 634-526), respetando las indicaciones del fabricante. El sistema permite detectar la producción de carbapenemasas y, simultáneamente, discrimina el tipo de enzima presente dentro de las más frecuentes descritas en clínica: KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*) / IMP (*imipenemase*) y OXA-48like (*oxacillina-se-48 like variants*), sin llegar a la identificación bacteriana.

Se construyó una ficha para la recolección de datos clínicos y epidemiológicos. Se registraron los datos demográficos, el motivo de ingreso, las enfermedades de base/comorbilidades de los pacientes incluidos y el tiempo de internación hasta el último hisopado. Se registró la aparición de un foco de infección por BPC posterior a la detección de la colonización, de acuerdo con los resultados de los estudios microbiológicos realizados en los pacientes con signos clínicos de infección.

La información recopilada se analizó mediante el uso de hojas de cálculo Excel; se aplicó el estadístico χ^2 para analizar las diferencias significativas ($p < 0,05$) con el programa Epidat 3.0.

El período de estudio comprendió desde el 9/9/2021 al 5/1/2022.

Consideraciones éticas

El estudio fue sometido a evaluación y aprobado por el Comité Científico y el Comité de Ética en Investigación del hospital. Este proyecto se enmarca como práctica epidemiológica obligatoria en establecimientos de salud, en el contexto de vigilancia de brotes epidémicos o de infecciones intrahospitalarias, por lo que no se requiere de consentimiento informado. No se realizó ningún procedimiento que no estuviese dentro de los estándares de atención. Al analizar los datos recopilados, se respetó la confidencialidad de la identidad del paciente, a partir de la codificación alfanumérica de la misma.

Resultados

En los cuatro primeros meses del inicio de la vigilancia, se realizaron 99 hisopados rectales en 74 pacientes; 36 resultaron positivos, lo que representó una tasa de portación de BPC del 48,6 % (36/74).

La distribución porcentual de las distintas carbapenemasas detectadas (n=52) resultó: 40,4 % NDM (21); 30,7 % OXA (16); 17,3 % KPC (9); 5,8 % VIM (3); 5,8 % IMP/VIM (3), lo que implica que en el 52 % de los casos la carbapenemasa involucrada fue una metalo-carbapenemasa (MBL). La frecuencia de aparición durante la vigilancia se muestra en la Figura 1.

En 14 de 36 pacientes con hisopado positivo (38,9 %), se demostró que la colonización era causada por más de un tipo de enzima, con la siguiente distribución (n): NDM-OXA (10), KPC-NDM-VIM/IMP (1), NDM-OXA-KPC (1), KPC-VIM (1) y NDM-VIM/IMP (1). (Figura 2).

El tiempo hasta el resultado, desde la recepción de la muestra, promedió las 3 h, por lo que se pudo tener el dato el mismo día del hisopado.

La vigilancia activa incluyó a 74 pacientes internados en

UCIA, con una edad media [rango] de 60 años (23-93), de los cuales el 69,3% (52) eran varones.

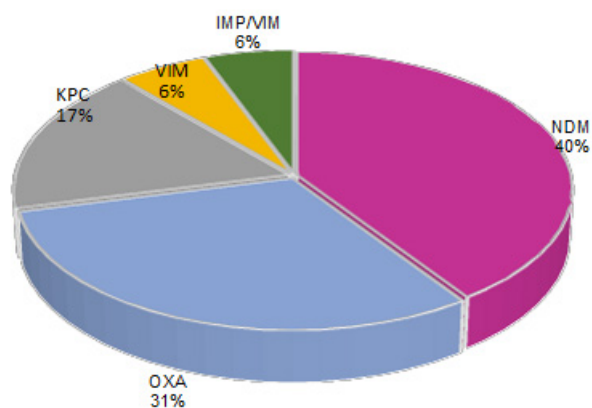
El motivo de ingreso a la UCIA fue (n=74): cardiopatía / infarto agudo (24); neumonía (12); sepsis (11); insuficiencia renal crónica en hemodiálisis (7); pos-quirúrgico (7), politrauma (7), accidente cerebrovascular (3), peritonitis terciaria (2), absceso de órgano profundo (1); edema agudo de pulmón (1); sin datos (2). En 26 pacientes (26/74), lo que equivale al 35 %, el motivo de internación se asoció a un proceso infeccioso.

El 89,2 % de los pacientes (n=66) presentó al menos una comorbilidad/enfermedad de base. La frecuencia de aparición fue: hipertensión arterial [HTA] (13); diabetes [DIA] más HTA (9); tumor sólido/enfermedad oncohematológica [TS-EOH] (8); enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC] (8); insuficiencia renal [IR] más HTA (6); insuficiencia renal crónica [IRC] (4); DIA (4); cardiopatía (3); EPOC más HTA (2); EPOC más DIA (2); IR más DIA (1); infección por virus VIH más DIA y lupus (1); HIV (1); accidente cerebrovascular (1) y otros (3).

El tiempo promedio de internación desde el ingreso al hospital hasta el último hisopado realizado [rango] en la población negativa resultó de 12,64 [3-32] días; para el grupo de pacientes colonizados, el promedio de días de internación [rango] fue de 17,4 días [1-53].

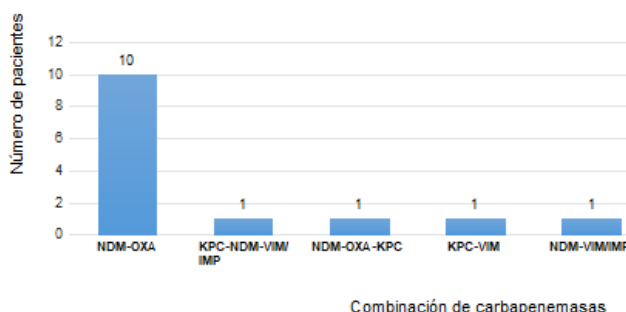
Se investigó la aparición de un foco de infección por un BPC, con confirmación bacteriológica, con posterioridad a la vigilancia intensificada de portadores de BPC. La misma se documentó en 9 de los 36 pacientes colonizados (33,3 %) y en 3 de los 38 pacientes no colonizados (7,9 %), dato que resultó significativo (p<0,05). La infección ocurrió entre los 4 y 22 días posteriores al hisopado de vigilancia intensificada en los pacientes colonizados, y entre 2 a 27 días en los no portadores.

Figura 1. Distribución porcentual de las 52 carbapenemasas de acuerdo con el tipo de enzima durante los meses de la vigilancia.



► KPC, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*; VIM, *Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*, NDM, *New Delhi metallo-β-lactamase*, OXA-48 like, *oxacillinase-48 like variants*; IMP, *imipenemase*.

Figura 2. Distribución de la combinación de carbapenemasas en los 14 pacientes colonizados con más de un tipo de enzima durante los meses de la vigilancia.



► La barra indica el número de pacientes colonizados por la misma combinación de carbapenemasas; KPC, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*; VIM, *Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*; NDM, *New Delhi metallo-β-lactamase*; OXA-48 like, *oxacillinase-48 like variants*; IMP, *imipenemase*.

Las acciones generadas a partir de la detección del paciente colonizado incluyeron: maximizar la aplicación de los criterios de aislamiento de contacto; intensificar la higiene de manos y la hospitalaria; adecuar el tratamiento empírico inicial (TEI) en forma individual ante la aparición de un foco de infección; hacer seguimiento de facilidades compartidas al egreso de la UCIA; coordinar con el área de admisión del hospital a efectos de optimizar el uso de las camas disponibles en las salas de internación al egreso del paciente.

Discusión

Las EPC han tomado gran importancia mundialmente debido al aumento en las tasas de morbimortalidad y en los costos hospitalarios. El tracto gastrointestinal es el principal reservorio de este tipo de microorganismos multirresistentes. Tanto en pacientes adultos como en neonatos, se ha evidenciado que la exposición prolongada a antibióticos de amplio espectro como cefalosporinas o carbapenémicos y la estadía prolongada en UCI de adultos o neonatal, incrementan el riesgo de colonización por EPC. Una de las estrategias primordiales de la vigilancia epidemiológica activa es la búsqueda de pacientes colonizados con BPC, a través de la realización de hisopado rectal. Una vez detectado el paciente portador, se deben instaurar medidas de aislamiento apropiadas y procedimientos que conduzcan a evitar su diseminación y causar brotes.⁷⁻¹⁰

Para la detección de BPC con hisopados rectales, se han desarrollado diferentes métodos fenotípicos, pruebas moleculares y técnicas como la nefelometría láser. Adicionalmente, las pruebas basadas en inmunocromatografía permiten diferenciar el tipo de carbapenemasa presente, con una sensibilidad y especificidad del 100 %, comparadas con técnicas de biología molecular.¹⁰⁻¹²

Los métodos de detección fenotípicos se basan en el empleo de medios de cultivo selectivos que permitan recuperar bacilos resistentes y evitar el crecimiento de la microbiota sensible. En los últimos años, se han desarrollado medios cromogénicos. La especificidad no siempre es tan alta, por lo que cualquier crecimiento debe ser confirmado. Esta aproximación genera aumento de la carga de trabajo que supone la confirmación de estos aislamientos e incrementa el tiempo hasta la obtención del resultado.¹²

Dentro de los métodos confirmatorios, existen diferentes pruebas fenotípicas (test de Hodge modificado, medición de la hidrólisis de los carbapenemes por espectrofotometría, métodos basados en la inhibición específica de las diferentes clases de carbapenemasas, métodos colorimétricos basados en el cambio de pH y método de inactivación de carbapenémicos). Estos varían en su sensibilidad y especificidad, en su capacidad de discriminar la clase de enzima involucrada, y la mayoría adiciona un día más de trabajo hasta obtener el resultado a las 24 h necesarias para el crecimiento bacteriano a partir del hisopado rectal.

Por lo expuesto, se plantean escenarios donde se requiere la implementación de técnicas moleculares, más aún ante la

reciente emergencia de mecanismos mixtos de resistencia que involucran en forma simultánea más de un tipo de carbapenemasa en la misma bacteria o en la misma muestra.¹⁴

Los métodos moleculares, en sus distintos formatos, permiten la identificación rápida del microorganismo resistente a través de la detección de genes de resistencia al antibiótico implicado. Esto tiene una importancia crucial en algunas situaciones de control epidemiológico de la infección, especialmente en el caso de brotes nosocomiales. Su principal ventaja es la posibilidad de dar un resultado entre 2-3 horas tras la toma de la muestra, pues detecta los genes de resistencia desde la muestra primaria sin necesidad de esperar el crecimiento del cultivo. Es importante resaltar su mayor sensibilidad y enfatizar la posibilidad de aplicación directa sobre la muestra clínica, lo cual es fundamental para tomar decisiones de control de infecciones. Como inconvenientes, podemos mencionar que solo identifica aquellos genes de resistencia diseñados en el ensayo y que pueden requerir de un cultivo posterior para la realización de estudios de sensibilidad antibiótica o de tipificación molecular. El mayor costo económico de las pruebas moleculares, respecto de los métodos basados en el cultivo, que implica una inversión para que el laboratorio disponga de esta metodología, debe ser analizado en un contexto global, dado que permite un mejor cuidado de los pacientes. Esto se traduce en una disminución de la transmisión de BPC, del número de infecciones por bacterias multirresistentes, del consumo de antibióticos, de la estadía hospitalaria y, consecuentemente, en una reducción en la morbimortalidad y en el costo de los cuidados sanitarios.^{7,11}

A través de este estudio, se pudo determinar y considerar como datos relevantes que: a) en los pacientes colonizados, el porcentaje de infección por BPC fue significativamente mayor respecto de los no colonizados; b) el tiempo promedio de internación fue mayor por cinco días; c) en el 38,9 % de los casos, la colonización se debió a más de un tipo de carbapenemasa; d) se detectó un incremento de la cantidad de enzimas involucradas al final del período de vigilancia; e) las metalcarbapenemasas fueron las enzimas predominantes, dato que complejiza la instauración del tratamiento en relación con los recursos disponibles.

Si bien en este estudio se puso mayor énfasis en las instancias de incorporar la técnica de PCR-RT por el sistema BD-MaxTM y en las estrategias para consolidar un equipo de trabajo, y no, en un análisis de costos, nuestros datos demostraron que los pacientes colonizados tuvieron una internación cinco días mayor; si multiplicamos el costo de cada día de internación en la UCIA por el número de pacientes BPC-positivos, se obtiene una estimación aproximada del potencial ahorro que implica disponer de una metodología que detecte al paciente colonizado en tiempo real, pues el resultado está disponible en 2-3 h y permite implementar acciones de contención, como las aquí mencionadas. Por este motivo, no debe ser valorada como un gasto generado por el laboratorio.

La existencia de pacientes colonizados con BPC es una de las principales vías de propagación de las bacterias multirresistentes, por eso su contención es una prioridad asistencial y de salud pública. Consideramos que los estudios de vigilancia activa en forma permanente son imprescindibles para una detección precoz de la colonización por estas bacterias, principalmente en los centros hospitalarios de mayor complejidad.

Los datos aquí presentados son el resultado del primer estudio prospectivo de vigilancia activa de pacientes colonizados por BPC durante 4 meses mediante PCR múltiple en tiempo real. Los resultados obtenidos en horas posteriores a la toma de la muestra permitieron implementar acciones de contención inmediatas. La tasa de colonización fue del 48,6%, hecho que, si bien supera lo publicado por otros autores, constituye una línea de base para monitorear las acciones de control implementadas.

Fuentes de apoyo

Los reactivos empleados para la vigilancia fueron cedidos, sin costo alguno para la institución, por la firma Becton Dickinson, USA, la cual no tuvo ninguna otra forma de participación en la investigación. Los investigadores no recibieron ningún incentivo a cambio.

Conflictos de interés

Los investigadores declaran no tener conflictos de interés.

Agradecimiento

A la Dra. Isabel Desimone, por apoyar la realización de este estudio.

Referencias bibliográficas

1. Nastro M, de Gregorio S, Rodríguez H, Farina J, Foccoli M, Vay C, et al. Enterobacterias portadoras de KPC en un hospital universitario. *AMA* 2016;129(2):10-12.
2. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of Beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3):969-76. DOI: 10.1128/AAC.01009-09
3. Ocampos Ugarte J, Vivian Estela Takahasi Alvarez. Enterobacterias productoras de carbapenemasas en pacientes del Servicio de Clínica Médica del Hospital Nacional de Itauguá. *Rev. virtual Soc. Parag. Med. Int* 2015;2(2):33-42. DOI: 10.18004/rvspmi/2312-3893/2015.02(02)33-042.
4. Echavarría G, Guevara Nuñez D, Bertona E, de Paulis A, Predari S, Benchetrit G. Colonización por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC en un hospital universitario. *Medicina* 2017;77(2):105-10. PMID: 28463215.
5. Giannellas M, Trearichi EM, De Rosa FG, Del Bono V, Bassetti M, Lewis RE, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(12):1357-62. DOI: 10.1111/1469-0691.12747
6. Cano A, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Gracia-Ahufinger I, Pérez-Nadales E, Causse M, et al. Risks of infection and mortality among patients colonized with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: validation of scores and proposal for management. *Clin Infect Dis* 2018;66(8):1204-10. DOI: 10.1093/cid/cix991.
7. Quintás Viqueira A, Hernández Milán B, Soler Francés MV. Enterobacte-

- rias productoras de carbapenemasas en un hospital pediátrico. *Acta Pediatr Esp* 2016; 74(8):183-7. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:78685223>.
8. Pintos-Pascual I, Cantero-Caballero M, Muñoz Rubio E, Sánchez-Romero I, Asensio-Vegas A, Ramos-Martínez A. Epidemiología y clínica de las infecciones y colonizaciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de tercer nivel. *Rev Esp Quimioter* 2020;33(2):122-9. DOI: 10.37201/req/086.2019
 9. Josa-Montero D, Yusef-Mejía S, Forero A, Leal R, Rojas J, Esparza G. Colonización rectal por *Enterobacteriales* productoras de múltiples carbapenemasas: Reporte de un caso de coproducción. *Infectio* 2021;25(3):193-6. ID: biblio-1250092.
 10. Sánchez M, Josa D. Detección rápida de Enterobacterias productoras de carbapenemasas en hisopados rectales de pacientes neonatos colonizados. *Infectio* 2021;25(2):89-93.
 11. Bou Arevalo G, Chaves Sánchez F, Oliver Palomo A, Oteo Iglesias J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2015. SEIMC. [Internet]. [Consultado 01/02/2022]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>
 12. Oteo J, Bou G, Chaves F, Oliver A. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017; 35(10):667-75. DOI: 10.1016/j.eimc.2015.12.013
 13. Josa D, Bustos G, Torres I, Esparza G. Evaluación de tres métodos de tamizaje para detección de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas en hisopados rectales. *Rev Chilena Infectol* 2018;35(3):253-61. DOI: 10.4067/s0716-10182018000300253.
 14. Programa Nacional de Control de Calidad en bacteriología. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Alerta epidemiológica emergencia de *Enterobacteriales* doble productores de carbapenemasas. Boletín Informativo nro.4-abril 2021. [Internet]. [Consultado 20/12/2022]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/05/Alerta-epidemiol%C3%B3gica-dobles-productores-de-carbapenemasa-COVID-19-v4.pdf>.



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución - No Comercial - Compartir Igual 4.0 Internacional - Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.

ARTÍCULO ORIGINAL

Prevalencia de colestasis intrahepática gestacional en embarazadas del Hospital de la Madre y el Niño de La Rioja, Argentina. Período: 2015 - 2019

Prevalence of Intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) in pregnant women at the Hospital de la Madre y el Niño de La Rioja (La Rioja, Argentina). Period 2015 - 2019.

Colque López Terán, Sonia Elizabeth^{1*}; Ríos Romero, Karina María Esther²

¹Laboratorio Central, Hospital de la Madre y el Niño. Departamento Capital, La Rioja, Argentina.

²Laboratorio, Hospital Doctor Ramón Carrillo. Departamento Famatina, La Rioja, Argentina.

*Contacto: Colque López Terán, Sonia Elizabeth, Laboratorio Central, Hospital de la Madre y el Niño, Av. 1° de Marzo S/N, La Rioja Capital, La Rioja, Argentina; soniateranlopez@hotmail.com.

Resumen

La colestasis intrahepática gestacional (CIG) es una enfermedad hepática que se caracteriza por una conjunción clínica y bioquímica; se traduce en un incremento de los ácidos biliares de leve a moderada severidad, acompañado de prurito, generalmente, de inicio palmoplantar y predominio nocturno. La CIG aparece en el tercer trimestre del embarazo y desaparece luego del parto, mientras que su incidencia varía en diferentes áreas geográficas. Esta patología se asocia con riesgo elevado de morbimortalidad fetal. Objetivo: Determinar la prevalencia de CIG con diagnóstico clínico y bioquímico en embarazadas asistidas en el Hospital de la Madre y el Niño de la ciudad de La Rioja en el período 2015 - 2019 describiendo a las embarazadas con CIG según edad, localización geográfica, edad gestacional y tipo de parto. Asimismo, determinar los valores de referencia de ácidos biliares en embarazadas sanas en dicho nosocomio. Materiales y métodos: Se llevó a cabo un estudio con enfoque cuantitativo, descriptivo, observacional, retrospectivo, de corte transversal (2015-2019), proveniente de historias clínicas del Servicio de Obstetricia. El diseño se realizó teniendo en cuenta los casos de embarazadas con CIG y los controles que se establecieron: embarazadas sin CIG. Además, se utilizaron técnicas de estadística descriptiva. Resultados: La CIG tiene una prevalencia de 1,3 %, y la capital es la zona de mayor incidencia. Se presenta en el tercer trimestre de gestación y en mayores de 27 años con predominio de cesárea. Los ácidos biliares tienen un VR: 1,0-8,3 $\mu\text{mol/l}$. Conclusión: El laboratorio tiene un rol fundamental para el diagnóstico, el manejo adecuado y la prevención de complicaciones fetales.

Palabras clave: colestasis intrahepática gestacional, embarazadas, ácidos biliares, prurito.

Abstract

Intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) is a liver disease characterized by a clinical and biochemical conjunction, in which there is an increase in bile acids of mild to moderate severity, accompanied by pruritus, generally with palmoplantar onset and predominantly at night. ICP appears in the third trimester of pregnancy and disappears after delivery, and its incidence varies in different geographical areas. This pathology is associated with a high risk of fetal morbidity and mortality. Objective: To determine the prevalence of ICP with a clinical and biochemical diagnosis in pregnant women assisted at the Hospital de la Madre y El Niño of the City of La Rioja, Argentina, in the period 2015-2019, by describing pregnant women with ICP according to age, geographic provenance, gestational age and type of delivery and by determining the reference values of bile acids in healthy pregnant women in the above-mentioned hospital. Materials and methods: Quantitative, descriptive, observational, retrospective cross-sectional approach (2015 - 2019) from medical records of the obstetrics service. The design was of cases (pregnant women with ICP) and controls (pregnant women without ICP). In addition, descriptive statistical techniques were used. Results: ICP showed a prevalence of 1.3 %, with La Rioja city being the area with the highest incidence. ICP occurred in the third trimester of pregnancy and in women over 27 years of age with a predominance of cesarean section. Bile acids had a RV: 1- 8.3 $\mu\text{mol/l}$. Conclusion: The laboratory has a fundamental role for the diagnosis, proper management and prevention of fetal complications caused by ICP.

Key words: Intrahepatic cholestasis of pregnancy, pregnant, bile acids, pruritus.

Introducción

En 2012, la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), en su actualización del protocolo de colestasis intrahepática gestacional (CIG), menciona que esta enfermedad es la hepatopatía más frecuente relacionada con la gestación y la 2ª causa de ictericia en el embarazo. Tiene una prevalencia de 0,7 % en los embarazos e incluye una variación geográfica amplia: se da en 1/300 a 1/2000 embarazos; en EEUU se observa en el 0,01 % a 0,02 % de embarazadas; en Chile, en 5 a 10 % de las gestantes (se incrementa en 20 % en partos gemelares).¹ También se concluye que la enfermedad es más frecuente en pacientes con antecedentes de CIG, así como con ingesta de anticonceptivos hormonales.¹

En 2016, en el Consenso de la Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia (FASGO) de CIG, se asevera que este trastorno hepático, que es más frecuente en la gestación, se genera por una alteración homeostática de los ácidos biliares, de manera tal que se traduce en un incremento de los mismos y presenta un cuadro clínico que se manifiesta por prurito, generalmente de inicio palmoplantar con predominio nocturno. Además, se hace hincapié en que los marcadores bioquímicos más precoces y sensibles son los ácidos biliares por lo que recomiendan un ayuno de 8 horas por lo menos para la toma de muestras de laboratorio. También se asevera que la aparición se da en el segundo trimestre tardío o tercer trimestre, y que se revierte el cuadro entre dos y ocho semanas después de culminar el embarazo. Asimismo, se menciona que la recurrencia es alta en los siguientes embarazos, con elevada morbimortalidad perinatal por las complicaciones del parto pretérmino y sufrimiento fetal.^{2-4,7}

En cuanto a su etiología, es multifactorial y está influenciada por una combinación de factores genéticos, endocrinos y ambientales.^{3,4} Como criterios de diagnóstico se establecen los síndromes clínico y bioquímico:

- Síndrome clínico: el síntoma principal es el prurito palmoplantar y/o prurito general. Generalmente, se presenta durante el último trimestre de gestación, en un 80 %, mientras que en el 1º y 2º trimestre se presenta en un 10 % y 25 %, respectivamente. Comienza generalmente en la región palmoplantar, con progresión central, generalizándose al resto del cuerpo; es de predominio nocturno, y puede provocar en la paciente excoりaciones que lleven a insomnio e irritabilidad¹. La ictericia se puede presentar en un 25 %, generalmente en la segunda semana posterior al cuadro pruriginoso; también pueden aparecer náuseas, vómitos, coluria, hipocolia y dolor en hipocondrio derecho.¹ Culminada la gestación, el cuadro clínico se revierte de manera espontánea en un tiempo máximo de cuatro semanas.

- Síndrome bioquímico: se produce una elevación de los ácidos biliares con o sin aumento de las enzimas hepáticas: glutámico oxalacético transaminasa (GOT), piruvato glutamato transaminasa (GPT), fosfatasa alcalina (FAL), gamma-glutamyltransferasa (GGT) y bilirrubina. La activi-

dad de protrombina, <70 % por malabsorción de vitamina K, es poco frecuente.

Los ácidos biliares en suero son el marcador más sensible y precoz para el diagnóstico de colestasis intrahepática de la gestación.^{2,4} El rango de referencia depende de la técnica utilizada para analizarlos. La mayoría de los estudios utiliza un límite superior normal de 10 µmol/L para un análisis enzimático de ácidos biliares séricos totales.

Los niveles de transaminasa pueden estar elevados 2 a 10 veces sobre el valor normal, a menudo antes de la elevación de ácidos biliares. La GPT es más sensible que la GOT en el diagnóstico de la colestasis intrahepática del embarazo.³ Debido a que la placenta produce grandes cantidades de FAL durante el embarazo, generalmente, no es útil en el diagnóstico de colestasis intrahepática de la gestación. La gamma glutamiltransferasa (GGT) puede estar elevada, pero, comúnmente, es normal. Las enzimas hepáticas en el diagnóstico de colestasis intrahepática de la gestación se normalizan 2 a 8 semanas después del parto. La mayoría de las complicaciones ocurren cuando los niveles de ácido biliar exceden 40 µmol/L.^{4,6,8,9}

Si la medición de ácidos biliares séricos no está disponible, el Real Colegio de Obstetras y Ginecólogos del Reino Unido recomienda que se diagnostiquen como colestasis intrahepática de la gestación los casos de mujeres con prurito típico y pruebas de función hepática anormales, ya habiéndose descartado otros diagnósticos diferenciales como diagnóstico probable de CIG (PCIG). Hasta tanto se realice la determinación de AB sérico, la paciente será guiada y tratada como CIG.³ En general, la mayoría de las pruebas hepáticas permanecen en el rango normal durante el embarazo, excepto las producidas por la placenta (fosfatasa alcalina, alfafetoproteína).

Se ha establecido una clasificación según niveles de riesgo para CIG, para un mejor manejo y tratamiento de esta patología, teniendo en cuenta: niveles bioquímicos (perfil hepático junto con AB), criterios clínicos, antecedentes relevantes como CIG en embarazos previos, antecedentes familiares de CIG, fetos muertos con o sin diagnóstico preciso de CIG.

Según los valores de AB, puede utilizarse la siguiente clasificación:

- Leve: los ácidos biliares de 10,0 a 19,9 µmol/L y el perfil hepático se encuentran dentro de parámetros normales.¹
- Moderado: los ácidos biliares se encuentran entre 20,0 y 39,9 µmol/L, y/o el perfil hepático se halla incrementado, pero no más del doble.¹
- Alto: los ácidos biliares están por encima de 40 µmol/L y/o el perfil hepático es más del doble y/o no hay respuesta al tratamiento médico.¹

El propósito final de esta investigación es aportar información para mejorar la atención sanitaria que reciben las pacientes embarazadas con CIG que asisten al HMyN, por lo que se hace necesario determinar la prevalencia de casos según los valores de referencia de los ácidos biliares séricos como tam-

Tabla I. Valores de referencia para los diferentes analitos.

Analitos	Intervalos de referencia
Ácido biliar	Menor de 10 $\mu\text{mol/L}$ *
GGT	7 – 32 *
GOT	10 – 32*
GPT	10 – 31*
FAL	64 – 300 *
Bilirrubina total	Menor de 1,0*
TP	70 % a 100 %

► *según valores de referencia referidos por el proveedor, a 37°C. GGT, gamma glutamil transpeptidasa; GOT, glutámico oxalaceticotransaminasa; GPT: gammaglutamiltransferasa FAL, fosfata alcalina; TP, tiempo de protrombina.

bién, describir otras características de las pacientes, motivo por el cual se establecieron los siguientes objetivos: determinar la prevalencia de CIG con diagnóstico clínico y bioquímico en embarazadas asistidas en el Hospital de la Madre y el Niño de la ciudad de La Rioja en el período 2015-2019 describiendo a las embarazadas con CIG según edad, localización geográfica, edad gestacional y tipo de parto. Asimismo, determinar los valores de referencia de los ácidos biliares en embarazadas sanas en dicho nosocomio. La importancia del diagnóstico radica en prevenir las complicaciones de la madre y del feto de forma precoz y evitar efectos perjudiciales para ellos.¹⁰⁻¹³

Materiales y métodos

Se realizó un estudio cuantitativo, descriptivo, de tipo observacional, con información retrospectiva, proveniente de historias clínicas del Servicio de Obstetricia e información del laboratorio bioquímico central del Hospital de la Madre y el Niño (HMyN), El estudio, de corte transversal, abarcó el período de 2015 a 2019. Se hizo un diseño retrospectivo de casos de embarazadas con CIG y controles sin CIG. .

El recorte que se realiza en la población de estudio corresponde al conjunto de todas las mujeres embarazadas asistidas por primera vez en el Servicio de Obstetricia del

HMyN de la ciudad de La Rioja en el período antes mencionado e incluye muestras de pacientes embarazadas con diagnóstico CIG según síndromes clínicos y bioquímicos.

Criterios de inclusión: pacientes registradas en el Hospital de la Madre y el Niño que contaran con historia clínica en el período 2015-2019; mujeres embarazadas cuyos partos fueron atendidos en el HMyN durante el período 2015-2019; pacientes que tuvieran resultados de perfil hepático, tiempo de protrombina y/o ácidos biliares como parte de los exámenes de laboratorio; pacientes que presentaran prurito de inicio palmoplantar con predominio nocturno y /o general; gestantes y recién nacidos cuyas historias clínicas contaran con los datos del estudio.

La base de datos se construyó con la recolección de información obtenida por las historias clínicas de las pacientes a partir de los objetivos de estudio. Para ello, se solicitó al director del Hospital, como así también al área correspondiente, su autorización para el acceso a las historias clínicas de las pacientes que ingresaron a dicho nosocomio durante el período del estudio.

La recopilación de datos se llevó a cabo mediante la revisión de historias clínicas de pacientes que cumplían con los criterios de inclusión, transcribiendo los datos de estudio a una base de datos elaborada en *Excel*: "Registro de datos".

Mediante el registro disponible de las historias clínicas de las pacientes con CIG y los registros de laboratorio, se establecieron las siguientes variables.

- Edad (en años cumplidos): 14-19, 20-24, 25-29, 30-34, 35-40, 41-45
- Localidad: de residencia del paciente (capital - interior)
- Prurito generalizado: sí/no
- Prurito palmoplantar: sí/no
- Edad gestacional: según los siguientes grupos: 20-25 / 26-30 /31-35 /más de 35
- Tipo de parto (posterior al diagnóstico de CIG): normal o cesárea
- Nacido vivo: sí/no
- CIG (según diagnóstico, que se realiza por la información de la historia clínica, que incluye síndromes clínicos, prurito palmoplantar de predominio nocturno, con la progresión de la enfermedad y la ausencia de tratamiento): sí/no
- Acido biliar: valor cuantitativo

Tabla II. Resultados de laboratorio de pacientes con colestasis intrahepática gestacional.

Resultado	FAL	GPT	GOT	GGT	Bilirrubina total	TP
Normales	8,7 %	29,8 %	45,3 %	31,0 %	56,5 %	96,9 %
Patológicos	79,8 %	64,6 %	49,7 %	44,7 %	16,8 %	0 %
S/D	12,4 %	5,6 %	5,0 %	24,3 %	26,7 %	3,1 %
Total con CIG (n=161)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

► FAL, fosfata Alcalina; GPT, piruvato glutamato transaminasa; GOT, glutámico oxalaceticotransaminasa; GGT, gamma glutamiltransferasa; TP, tiempo de protrombina; CIG, colestasis intrahepática gestacional.

- CIG según proveedor: presencia de CIG: sí/no
- Niveles de riesgo de CIG: alto, moderado y leve
- Hepatograma (bilirrubina, FAL, GGT, GOT, GPT): valor cuantitativo
- CIG (según el valor de referencia calculado por HMyN): sí/no
- Coagulación (TP, KPPT): valor cuantitativo

Medición de variables

Los criterios diagnóstico considerados fueron: criterios clínicos con la aparición de prurito palmoplantar de predominio nocturno, sin lesiones y prurito generalizado; criterio de normalidad bioquímica, que se estableció por medio de las determinaciones de los siguientes metabolitos teniendo en cuenta sus valores de referencias [Tabla I]: GOT, GPT, GGT, FAL, bilirrubina, TP y ácidos biliares, que fueron evaluados en muestras de sangre obtenidas de todas las pacientes por punciones venosas teniendo en cuenta su parte preanalítica y, luego, analizadas con sus respectivos métodos usando equipamiento y reactivos Wiener: Cm 250 Wiener y Col 4 Wiener.

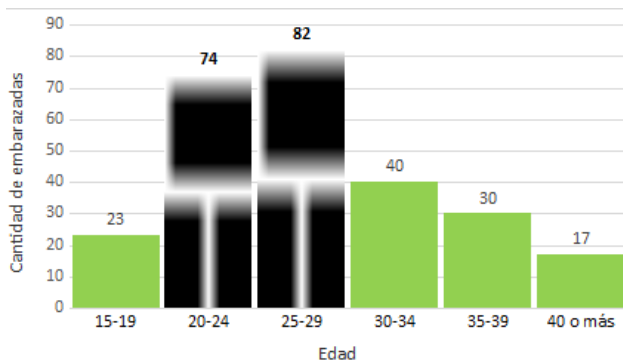
Tanto la enzima GOT como la GPT fueron determinadas a 37°C mediante el método UV optimizado (IFCC, International of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) a 340 nm, mientras que, en la determinación de la fosfatasa alcalina (FAL), se utilizó el método cinético optimizado (DGKC y SSCC) a 405 nm, y el método (Szasz modificado), para la determinación de gamma glutamil transpeptidasa (GGT. La bilirrubina [total y directa] reacciona específicamente con el ácido sulfanílico diazotado produciendo un pigmento color rojo - violáceo (azobilirrubina), que se mide fotocolorimétricamente a 530 nm. Si bien la bilirrubina conjugada [directa] reacciona directamente con el diazorreactivo, la bilirrubina no conjugada [indirecta] requiere la presencia de un desarrollador acuoso (Reactivo A) que posibilite su reacción. De tal forma, para que reaccione la bilirrubina total [conjugada y no conjugada] presente en la muestra, debe agregarse benzoato de cafeína al medio de reacción. Para el estudio del tiempo de protrombina, que analiza la vía extrínseca de la coagulación, determinación y/o deficiencia de factores y vitamina k, se utilizó tromboplastina cálcica en una etapa.

Todas las técnicas usadas fueron evaluadas con precisión y exactitud por sus respectivos calibradores y controles de calidad Standatrol SE, como así también, por su control externo ProgBA. Para los analitos, se tuvieron en cuenta los valores de referencia que se presentan en la Tabla I.

Los ácidos biliares, que constituyen el marcador más sensible y precoz, se determinaron por método enzimático colorimétrico a 540 nm mediante la reacción del azul de tetrazolio marca Randox, UK, con coeficiente de variación 1,2 %. La *performance* analítica fue evaluada según control de calidad interno, calibradores comerciales Randox. Luego, para los pacientes con CIG, se categorizaron los niveles de riesgo:

- Alto $\geq 40 \mu\text{mol/L}$
- Moderado: 21 hasta 39,9 $\mu\text{mol/L}$
- Bajo: 10 $\mu\text{mol/L}$ hasta 20,9 [8,10].

Figura 1. Edad de las embarazadas en la muestra general.



Análisis de datos

Se utilizaron técnicas de estadística descriptiva: tablas de frecuencias, contingencia, cálculo de indicadores descriptivos y elaboración de gráficos. El diagnóstico habitual de CIG, en el HMyN, se realiza mediante manifestaciones clínicas y de laboratorio por lo cual los positivos fueron considerados verdaderos positivos (VP) y, en el caso contrario, verdaderos negativos (VN).

Luego, el análisis con las manifestaciones clínicas de prurito palmoplantar y generalizado se realizó mediante el cálculo de la sensibilidad y la especificidad.

La sensibilidad es la capacidad del factor de diagnosticar los positivos y la especificidad es la capacidad de diagnosticar los negativos:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} \quad (a)$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} \quad (a)$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} \quad (b)$$

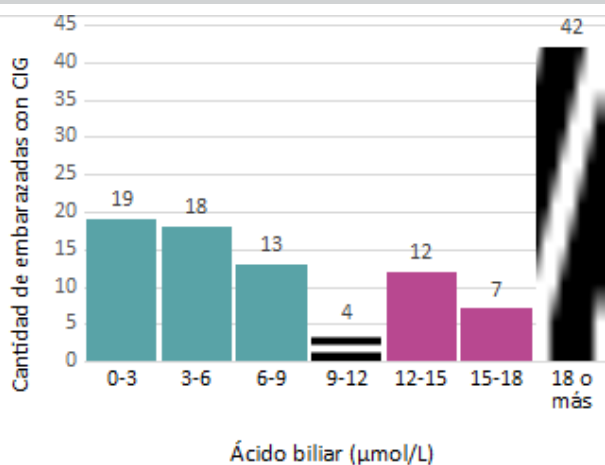
$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} \quad (b)$$

El cálculo de sensibilidad y especificidad se realiza para dos factores clínicos, el prurito palmoplantar y generalizado y para el factor de referencia del HMyN de ácido biliar. Estos indicadores permiten valorar el único factor utilizado para diagnosticar CIG. Por lo tanto, valores altos de especificidad indican una alta capacidad del factor clínico de detectar positivos. En general, estos valores se expresan en porcentajes.

Para la determinación de valores de referencia del HMyN de ácido biliar en embarazadas sanas, se estudió la distribución y se eliminaron valores *outliers* y, dado que la distribución es asimétrica, se calcularon el P₅ y el P₉₅.

Resultados

Se trabajó con una muestra de 266 pacientes embarazadas entre 15 y 45 años, con edad promedio de 27,5 años \pm 6,5 años. En la Figura 1, se observa mayor cantidad de pacientes en el grupo de 20 a 30 años, por lo tanto, las 156 [74

Figura 2. Valores de ácido biliar en embarazadas con colestasis intrahepática gestacional.

► CIG, colestasis intrahepática gestacional.

+ 82) representan el 58,6 % de las pacientes analizadas.

El 66,2 % (n = 176) tenía como localidad de origen o procedencia la ciudad capital, mientras que el resto, el 33,8 %, pertenecía a zonas del interior de la provincia. El rango de las semanas de gestación variaba entre 18 y 41 y solo un 1,9 % (n = 5) tuvo nacimiento con muerte fetal.

La prevalencia se calcula como el total de embarazadas diagnosticadas positivamente con CIG, según clínica y laboratorio, dividido el total de mujeres embarazadas asistidas por primera vez (N = 11981) en el período 2015 - 2019 en el HMyN.

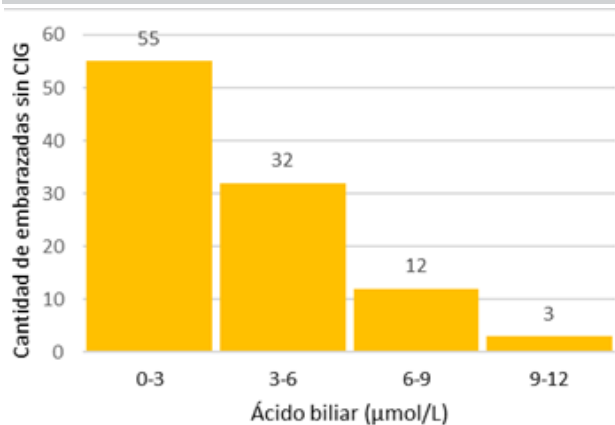
De la muestra de 266 pacientes, se obtuvo un n = 161 positivos de CIG, por lo tanto, la prevalencia de CIG es de 1,3 %.

Las pacientes diagnosticadas con CIG positivamente (n = 161) poseen una edad que varía entre 18 y 40 años, con un promedio de $27,4 \pm 6,4$ años. El 62,1 % (n = 100) reside en la ciudad capital de La Rioja y el restante 37,9 % (n = 61), en diversas localidades de la provincia. Estos valores son muy cercanos a la muestra general.

Por otro lado, las semanas de gestación varían entre 18 y 40, con un promedio de $34,9 \pm 3,7$ semanas.

En relación con el tipo de parto, el 79,5 % (n = 128) tuvo nacimientos vía cesárea y el resto, parto normal. En cuanto al ácido biliar (n = 115), en la Figura 2, se observa una distribución asimétrica, con mayor frecuencia de valores que superan los 18 µmol/L. Asimismo, se detectan valores menores de 10 µmol/L, correspondientes a pacientes diagnosticadas con signos clínicos. En los 161 casos (n = 46), no se realizó el análisis de ácido biliar por falta de reactivo por lo cual se los tomó como diagnóstico probable de CIG (PCIG).

Por otro lado, los registros de laboratorio presentaron valores anormales, principalmente en FAL, GPT, GOT, GGT y bilirrubina Total. No se presentaron valores anormales en TP, tal como se muestra en la Tabla II. La GPT exhibe un valor de 64,6 %, que es más sensible que la GOT en el diagnóstico de la CIG. Si bien obtuvimos un 79,8 % de FAL, sabemos que

Figura 3. Cantidad de embarazadas sin colestasis intrahepática gestacional en HMyN según valores de ácido biliar.

es un valor sin significancia clínica en la CIG debido a que la placenta produce grandes cantidades de FAL durante el embarazo y, por eso, generalmente, no es útil en el diagnóstico de CIG.

En embarazadas con ácido biliar igual o superior a 10 µmol/L, se calculó el nivel de riesgo y se registraron un 37,5 % de nivel leve, un 35,9 % de nivel moderado y un 26,6 % de nivel alto.

En el diagnóstico de estas embarazadas, los signos clínicos ocupan un papel fundamental, ya que, de los 161 casos, 126 presentaron al menos algún prurito (78 %).

Relación de CIG con prurito palmoplantar y generalizado

La relación entre la presencia de CIG y la manifestación clínica de prurito palmoplantar se presenta en la Tabla III. En la misma, se advierte que el 75,8 % de los positivos diagnosticados con factores clínicos poseen la presencia de prurito palmoplantar. Por lo tanto, la sensibilidad del prurito palmoplantar es del 75,8 % y la especificidad, del 68,2 %.

Además, se detectó una relación entre el diagnóstico de CIG con el factor prurito palmoplantar (Chi = 44,5; p < 0,001). Luego, se analizó la relación entre la presencia de CIG y la manifestación clínica de prurito generalizado. Estos resultados se presentan en la Tabla IV. En la misma, se advierte que el 61,9 % de los positivos diagnosticados con factores clínicos posee la presencia de prurito generalizado, por lo tanto, la sensibilidad es del 61,9 %. El 63,9 % de los negativos no presenta la manifestación de prurito generalizado, por lo tanto, la especificidad es del 64,0 %. Luego, se detectó una relación entre el diagnóstico de CIG con el factor prurito generalizado (Chi = 14,8; p < 0,001).

Determinación de valores de ácidos biliares en embarazadas del HMyN

Del total de la muestra de 266 embarazadas se registró el valor de ácido biliar en 217. En la Tabla V, se presentan los valores que describen la presencia de ácido biliar: *mínimo* y *máximo*, *media*, *mediana* y *percentiles*. Se incluye la medida

Tabla III. Relación diagnóstica de colestasis intrahepática gestacional con presencia de prurito palmoplantar.

Diagnóstico CIG		Prurito palmoplantar		Total
		NO	SÍ	
No [Controles]	N	60	28	88
	%	68,2	31,8	100,0
Sí [Casos]	N	37	116	153
	%	24,2	75,8	100,0
Total	N	197	144	241
	%	40,2	59,8	100,0

► Nota: De las 266 pacientes, 25 no poseen datos de prurito. CIG, colestasis intrahepática gestacional.

de variabilidad del rango intercuartílico, sugerida para medir la variación en distribuciones asimétricas, a partir de la cual se advierte que la variabilidad es mayor en el grupo de las embarazadas con CIG.

En la población de embarazadas sanas, se determinan los valores de referencia, que surgen de los registros del HMyN. La distribución del ácido biliar es asimétrica, según se observa en la Figura 3, por lo cual se calculó el P5 y P95 a fin de determinar los valores de referencia para el 90 % central.

Mediante el análisis de *outliers* o valores extremos de los registros de ácido biliar en embarazadas sanas, se calculó el valor límite de 9,25 $\mu\text{mol/L}$, a partir del cual se descartan valores, por lo que se censuraron 3 registros. Luego, con un $n = 99$ de casos, se calcularon valores de referencia P5 y P95 para el 90 % central de las embarazadas sanas. Los valores de referencia para embarazadas sanas del HMyN son los que se presentan en la Tabla VI. Para el percentil del 90 % central de embarazadas, los valores son de 1 - 8,3 $\mu\text{mol/L}$. De esta

Tabla V. Comportamiento del ácido biliar ($\mu\text{mol/L}$).

	Colestasis intrahepática gestacional	
	No [Controles]	Sí [Casos]
N	102	115
Sin registro de ácido biliar	3	46
Mínimo	0,4	0,9
Máximo	9,8	161,0
Media	3,6	21,9
DS	2,3	28,4
P5	1,0	2,0
P95	8,5	67,7

► Nota: En 49 embarazadas no se registró el ácido biliar. DS, desvío Estándar; P5, percentil del 5%; P95, percentil del 95%.

Tabla IV. Relación diagnóstica de colestasis intrahepática gestacional con presencia de prurito generalizado.

Diagnóstico CIG		Prurito generalizado		Total
		NO	SÍ	
No [Controles]	N	55	31	97
	%	64,0	36,0	100,0
Sí [Casos]	N	59	96	150
	%	38,1	61,9	100,0
Total	N	114	127	241
	%	47,3	52,7	100,0

► Nota: Hay 30 pacientes sin datos de prurito; CIG, colestasis intrahepática gestacional.

manera, en el HMyN se determinaron valores de referencia de ácido biliar en embarazadas sanas entre 1 y 8,3 $\mu\text{mol/L}$.

Relación del diagnóstico de CIG (clínica y laboratorio) con el diagnóstico de CIG según determinaciones de ácido biliar

Según el rango de ácido biliar provisto por el proveedor (RANDOX), es posible determinar la presencia de CIG en las embarazadas. Luego, si el ácido biliar alcanza o supera los 10 $\mu\text{mol/L}$, se determina que una paciente tiene CIG.

Las determinaciones de ácido biliar no fueron realizadas a la totalidad de pacientes debido al faltante de reactivos. De la muestra de 266 embarazadas, tal como se indicó en el punto anterior, se registró el ácido biliar de 217. Sobre este grupo de embarazadas, se estudió el porcentaje de diagnosticadas por la clínica/laboratorio y el porcentaje de diagnosticadas solo por el valor de referencia del proveedor (≥ 10 $\mu\text{mol/L}$). En la muestra total de embarazadas, se registra un 53 % diagnosticado con CIG mediante clínica y laboratorio (115/217). Sin embargo, el diagnóstico del registro del ácido biliar solamente es de 29,5 %. En la Tabla VII, se relacionan estos resultados y se señala que 115 embarazadas fueron diagnosticadas con CIG según clínica/laboratorio y,

Tabla VI. Valores de referencia de ácido biliar para embarazadas sanas del HMyN.

Indicador	Valor
N	99
Mínimo	0,4
Máximo	8,6
Media	3,5
P50	2,8
P5	1,0
P95	8,3

► P50, percentil del 50%; P5, percentil del 5%; P95, percentil del 95 %.

Tabla VII. Relación diagnóstica de colestasis intrahepática gestacional con colestasis intrahepática gestacional según valor de referencia de ácido biliar del proveedor.

Diagnóstico de colestasis intrahepática gestacional	Colestasis intrahepática gestacional según valor de referencia de ácido biliar del proveedor		Total
	No (< 10 µmol/L)	Si (≥10 µmol/L)	
No (Controles)	N	102	102
	%	100,0	100,0
Sí (Casos)	N	51	115
	%	44,3	100,0
Total	N	153	217
	%	70,5	100,0

► Nota: Hay 49 embarazadas que no tuvieron registro de ácido biliar.

de esas, solamente 64 presentaron ácido biliar ≥ 10 µmol/L (sensibilidad del 55,7 %).

Relación del diagnóstico de CIG clínico con el diagnóstico de CIG según valores de referencia de ácido biliar del HMyN

Si se toman los valores de referencia del HMyN, el porcentaje de embarazadas que se detectan como positivas según el ácido biliar es de 33,6 %, un porcentaje mayor que el correspondiente al valor habitual, que es 29,5 %. Existen 73 embarazadas (Tabla 10) que podrían ser diagnosticadas con CIG considerando solamente el valor de referencia del HMyN y 144 embarazadas que no serían diagnosticadas con este valor.

Por otro lado, el diagnóstico correspondiente al valor de referencia del HMyN (Tabla VIII) indica que se logra detectar el 93,1 % de negativos (especificidad) y el 57,4 % de positivos (sensibilidad). Estos valores propios de referencia poseen mayor sensibilidad que el valor de referencia del proveedor.

Discusión

Dentro de las enfermedades hepáticas de la gestación, la colestasis intrahepática gestacional es la patología más frecuente y puede generar severas complicaciones feto/neonatales, por lo cual la detección oportuna es importante para el Hospital de la Madre y el Niño de la provincia de La Rioja.

En el trabajo, se incluyeron 266 pacientes embarazadas, que fueron diagnosticadas con CIG según síndromes clínicos y bioquímicos y que asistieron por primera vez al Servicio de Obstetricia del Hospital de la Madre y el Niño de la ciudad de La Rioja durante el período 2015 - 2019.

La prevalencia de CIG es de 1,3 % en embarazadas del HMyN de la ciudad de La Rioja, capital de la provincia, donde se da la mayor incidencia. La mayoría de embarazadas diagnosticadas se encuentran en el tercer trimestre de gestación y son, principalmente, mayores de 27 años.

La edad gestacional promedio de las embarazadas diagnosticadas con CIG fue de 35 semanas. Por otro lado, la ma-

yoría de las embarazadas han tenido partos por medio de cesárea.

Existe una relación entre el diagnóstico CIG mediante la clínica y el laboratorio y la presencia de prurito palmoplantar y generalizado, ya que el 78 % presentó alguno de estos signos. En particular, el 75,8 % posee la manifestación de prurito palmoplantar y el 61,9 %, del generalizado, por lo que la sensibilidad (capacidad de detectar verdaderos positivos) es mayor en el palmoplantar. Toda mujer que presente prurito requiere estudios de laboratorio complementarios, ya que la CIG se basa en la presencia de prurito asociada a concentraciones elevadas de ácidos biliares séricos, y hepatograma.

En relación con los analitos estudiados en este trabajo, más del 44 % de las embarazadas presenta alteraciones de FAL, GPT, GOT y GGT. Para BT, un 26,7 % y para TP, un 3,1 % de alteraciones, lo que indica que estos últimos tienen escaso valor diagnóstico.

Mediante los niveles de ácido biliar y según las especificaciones del proveedor, se observó un 62,5 % de pacientes con un riesgo alto o moderado, hecho que evidencia la necesidad de realizar análisis de AB. Estos resultados concuerdan con la bibliografía consultada en este estudio, en la cual se considera que la alteración de los AB y enzimas hepáticas en suero materno son buenos predictores de la mayoría de las complicaciones que se presentan asociadas a la CIG, y que los AB constituyen el marcador más sensible y precoz de la enfermedad.

Se determinaron los valores de referencia propios para el HMyN mediante el percentil central del 90%, y se obtuvieron como resultado valores entre 1 y 8,3 µmol/L; este último es inferior al sugerido por el proveedor. Lo expuesto implica que con estos valores de referencia se podrían detectar más embarazadas con CIG. Este valor de referencia presenta para el diagnóstico CIG una sensibilidad (posibilidad de diagnosticar verdaderos positivos) de 57,4 % y una especificidad (posibilidad de diagnosticar verdaderos negativos) de 93,1%, indicadores más favorables al diagnóstico que el utilizado hasta el

Tabla VIII. Relación diagnóstica de colestasis intrahepática gestacional con ácido biliar con valor de referencia del HMyN.

Diagnóstico de colestasis intrahepática gestacional		Colestasis intrahepática gestacional según ácido biliar HMyN		Total
		No (< 8,3 μmol/L)	Sí (≥8,3 μmol/L)	
No (Controles)	N	95	7	102
	%	93,1	6,9	100,0
Sí (Casos)	N	49	66	115
	%	42,6	57,4	100,0
Total	N	144	73	217
	%	66,4	33,6	100,0

► Nota: Hay 49 embarazadas que no tuvieron registro de ácido biliar.

momento.

La CIG es una patología que se presenta con una prevalencia del 1,3 % en el Hospital de la Madre y el Niño de la ciudad de La Rioja, y la capital de la provincia es la zona con mayor incidencia. La más grande cantidad de embarazadas diagnosticadas se encuentra en tercer trimestre de gestación y las pacientes son, principalmente, mayores de 27 años.

El laboratorio fue fundamental para el diagnóstico de la patología, ya que los ácidos biliares, los primeros en aumentar acompañados por la alteración de las enzimas hepáticas, se mostraron más alterados y este hecho permitió que más de la mitad de las pacientes pudieran ser diagnosticadas.

El laboratorio conjuntamente con la clínica, que en el HMyN tiene un papel fundamental para el diagnóstico, contribuye al diagnóstico oportuno, el manejo adecuado y la prevención de complicaciones fetales. A partir de estos resultados, quedarán abiertos otros interrogantes, que podrán ser abordados para mejorar la atención en el área química del Laboratorio del HMyN.

Conflictos de interés

Los/as autores/as declaran no poseer conflictos de intereses.

Referencias bibliográficas

- Martínez-Terrón M, Ros C, Teixidó I, Palacio M. 17/01/2012 Protocolo colestasis intrahepática gestacional SEGO 2012, Institut Clinic de Ginecologia, Obstetricia y Neonatologia, Hospital Clinic de Barcelona.
- Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia. Colestasis Intrahepática Gestacional (CIG). Disponible en: http://www.fasgo.org.ar/archivos/consensos/Consenso_de_obstetricia. DOI: 10.1016/s0304-5013(05)72380-3
- Šimják P, Pařízek A, Vítek L, Černý A, Adamcová K, Koucký M, et al. Fetal complications due to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Perinat Med*. 2015;43(2):133–9. DOI: 10.1515/jpm-2014-0089
- Marschall HU. Management of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. DOI: 10.1586/17474124.2015.1083857

- Dalili H, Firouzeh, Mahdi, Hardani A, Kamal, Mamak, et al. Comparison of the Four Proposed Apgar Scoring Systems in the Assessment of Birth Asphyxia and Adverse Early Neurologic. *Plos One*. 2015;10(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0122116
- Diken Z, Usta IM, Nassar AH. A clinical approach to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Perinatol*. 2014;31(1):1-8. DOI: 10.1055/s-0033-1333673
- Shemer W, Thorsell E, Marschall M, Kaijser HU. Risks of emergency cesarean section and fetal asphyxia after induction of labor in intrahepatic cholestasis of pregnancy: A hospital-based retrospective cohort study. *Sexual / Reproductive Healthcare*. 2012. DOI: 10.1016/j.srhc.2012.11.005
- Monte MJ, Marin JGG, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(7):804-16. DOI: 10.3748/wjg.15.804
- Geenes V, Chambers J, Khurana R, Shemer EW, Sia W, Mandair D, et al. Rifampicin in the treatment of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015;189:59-63. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2015.03.020
- Floreani A, Gervasi MT. New insights on intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clin Liver Dis*. 2016;20(1):177-89. DOI: 10.1016/j.cld.2015.08.010
- Gabzdyl E, Schlaeger J. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. A critical Clinical Review. *The Journal of Perinatal & Neonatal Nursing*. 2014;29(1):41-50. DOI: 10.1097/JPN.0000000000000077
- Ovadia C, Williamson C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy Health Women's. For Lawrence C. Parish, MD. Academic Centre, King's College London. London, U.K.
- Sebiha O, Yasin C, Orhan VO, Sule Y. Review of a challenging clinical issue: Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(23):7134-41. DOI: 10.3748/wjg.v21.i23.7134



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución - No Comercial - Compartir Igual 4.0 Internacional. Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.

ARTÍCULO ORIGINAL

Comparación de dos métodos de aglutinación para la detección de anticuerpos anti-Brucella en donantes de bancos de sangre

Comparison of two agglutination methods for detection of anti-Brucella antibodies in blood bank donors.

Rodríguez, Agustina Ayelén^{1*}; Gaitán, Analía Mariela¹; Leiva, Gustavo Fabián¹; Bovone, Nora Silvia²; Miguez, Gabriela Sandra³

¹Laboratorio de serología e ITT, Servicio de Bioquímica, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Hospital Nacional Profesor Dr. Alejandro Posadas. El Palomar, Morón, Buenos Aires, Argentina.

²Laboratorio de Proteínas y Autoinmunidad, Servicio de Bioquímica, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Hospital Nacional Profesor Dr. Alejandro Posadas. El Palomar, Morón, Buenos Aires, Argentina.

³Servicio de Hemoterapia, Hospital Nacional Profesor Dr. Alejandro Posadas. El Palomar, Morón, Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Rodríguez, Agustina Ayelén; Hospital Nacional Profesor Dr. Alejandro Posadas, Presidente Illia y Marconi S/N (C.P. 1685), El Palomar, Morón, Buenos Aires, Argentina; agustina-rodriguez@live.com

Resumen

Introducción: Una de las pruebas de tamizaje realizadas en donantes de bancos de sangre es la determinación de anticuerpos anti-*Brucella*. Este estudio plantea la utilización del test de Rosa de Bengala en reemplazo del test de Antígenos Febriles. **Objetivos:** Evaluar la concordancia entre observadores para la técnica de Rosa de Bengala. Evaluar la concordancia entre ambas técnicas. Estimar la proporción de muestras y donantes reactivos entre dos períodos distintos durante los cuales se utilizó una u otra técnica. **Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio observacional, transversal y retrospectivo. Se utilizaron los resultados de pacientes que concurren al Servicio de Hemoterapia del Hospital Nacional Posadas entre el 01/11/2019 y el 18/08/2021. Ambas concordancias, entre observadores y en entre ambas técnicas - fueron evaluadas con el test kappa de Cohen. Las proporciones de donantes reactivos de cada período se contrastaron por test de comparación de dos proporciones. **Resultados:** La concordancia entre observadores arrojó un kappa de 0,78 [IC95%: 0,61 - 0,95]. La concordancia entre ambos test arrojó un kappa de 0,29 [IC95%: 0,15 - 0,43]. La proporción de donantes reactivos fue de 4,0 % para el período de Antígenos Febriles y de 1,6 % para el período de Rosa de Bengala. **Conclusiones:** Se observa una concordancia cualitativa aceptable entre ambos observadores; pero no, entre ambas técnicas. La diferencia de proporciones entre donantes reactivos de cada período fue altamente significativa. El cambio de metodología permitió aumentar la especificidad sin disminuir la sensibilidad. La utilización del test Rosa de Bengala posibilitó reducir el descarte de unidades de sangre.

Palabras clave: Anticuerpos anti-*Brucella*, Antígenos Febriles, Rosa de Bengala, Banco de Sangre.

Abstract

Introduction: One of the screening tests performed in blood bank donors is the determination of anti-*Brucella* antibodies. The present study proposes the use of the Rose Bengal test to replace the Febrile Antigens test. **Objectives:** i) To evaluate the interobserver agreement for the Rose Bengal technique and the inter-assay agreement between both techniques. ii) To estimate the sample proportion of reactive donors with either technique between two different periods. **Materials and Methods:** Observational, cross-sectional, retrospective study. The results of patients who attended the Hemotherapy Service of the National "Profesor Alejandro Posadas" Hospital (Buenos Aires, Argentina) from November 1st 2019 to August 18th 2021 were evaluated. Both interobserver and interassay agreement were evaluated with Cohen's Kappa test. The proportions of reactive donors of each period were contrasted through the two-proportion comparison test. **Results:** The interobserver agreement showed a Kappa of 0.78 [95%CI: 0.61 - 0.95], whereas the interassay agreement showed a Kappa of 0.29 [95% CI: 0.15 - 0.43]. The proportion of reactive donors was 4.0% for the Febrile Antigen period and 1.6% for the Rose Bengal period. **Conclusions:** An acceptable qualitative agreement was observed between both observers, but not between both techniques. The difference in proportions between reactive donors of each period was highly significant. The change in methodology allowed increasing the specificity without decreasing the sensitivity. The use of the Rose Bengal test reduced the discard of blood units.

Key words: Anti-*Brucella* Antibodies, Febrile Antigens, Rose Bengal, Blood Bank.

Introducción

El tamizaje en donantes de bancos de sangre abarca la determinación de distintos marcadores serológicos de infecciones transmisibles por transfusión (ITT) con el fin de prevenir su transmisión al futuro receptor. Una de las pruebas de tamizaje realizadas es la determinación de anticuerpos anti-*Brucella* mediante ensayos de aglutinación sobre portaobjetos o placas de vidrio. En el mercado, se encuentran disponibles distintos test, entre ellos, la prueba de aglutinación de Antígenos Febriles (AF) (Wiener Lab) y la de Rosa de Bengala (RB) (Monlab Test). Tanto AF como RB son pruebas útiles para el tamizaje de brucelosis humana, ya que no se necesita una infraestructura compleja ni un entrenamiento especial por parte del operador; además, son de bajo costo, gran difusión, rápidas y altamente sensibles. RB es una prueba recomendada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis. Presenta como ventaja que, debido a su bajo pH, privilegia la aglutinación de anticuerpos de isotipo IgG, lo que la convierte, además, en una prueba específica¹. Esto hace que RB sea una de las pruebas recomendadas¹ para el tamizaje de anticuerpos anti-*Brucella* en donantes de bancos de sangre, ya que, además de su alta sensibilidad, tiene una adecuada especificidad que minimiza las reacciones cruzadas.

Marco teórico

La brucelosis es una zoonosis infectocontagiosa de distribución mundial, conocida desde hace muchos años, sin embargo, continúa siendo un problema sanitario y económico de envergadura² por las grandes pérdidas que genera, ya que afecta a varias especies de mamíferos, principalmente, animales domésticos (perro), ganado (vacas, cerdos, ovejas, cabras), además de fauna silvestre y marina. El hombre es considerado un huésped accidental. Es causada por bacterias del género *Brucella*, que incluye distintas especies. *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis* son las principales especies que provocan enfermedad en humanos. En nuestro país, la brucelosis es endémica. En el ser humano, puede presentarse de manera aguda o gradual y evolucionar a la cronicidad o bien, pasar clínicamente inadvertida. El diagnóstico tradicional comienza con la sospecha clínica de la enfermedad, pero muchas veces la sintomatología de la misma es inespecífica, lo que dificulta el diagnóstico clínico, y por eso, la realización de pruebas de laboratorio es de suma importancia. El diagnóstico de laboratorio puede realizarse a través de métodos directos aislando el microorganismo en cultivo de sangre, médula ósea o tejidos o por métodos indirectos (serológicos), a través de la detección de anticuerpos en suero.³ Si bien el aislamiento del microorganismo es el método de referencia, la mayoría de los pacientes son diagnosticados por métodos indirectos, que son de uso masivo por su mayor simpleza y accesibilidad², ya que no siempre es posible aislar el microorganismo. Existen pruebas serológicas de tamizaje y confirmatorias.

La brucelosis presenta dos patrones epidemiológicos: el

Tabla I. Concordancia entre dos observadores con dos categorías para la técnica RB.

		Observador 1	
		Reactivo	No reactivo
Observador 2	Reactivo	13	3
	No reactivo	3	88

► Se pueden observar seis resultados discordantes (reactivo/no reactivo) entre los dos observadores.

urbano - alimentario por consumo de alimentos contaminados como lácteos no pasteurizados o carnes mal cocidas y el rural - laboral por inhalación de aerosoles con alto inóculo bacteriano o contacto con secreciones de animales enfermos; además, en algunos países como el nuestro, también se considera como un agente de riesgo de transmisión la vía transfusional⁴⁻⁷. En Argentina, por medio de la Ley Nacional 22990 / 83, es obligatorio el tamizaje para detección de brucelosis como infección transmisible por transfusión para *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, pero no, para *B. ovis* y *B. canis*, las cuales no están contempladas en la legislación. En nuestro país, la prevalencia estimada de test reactivos para brucelosis en bancos de Sangre osciló entre 0.39% y 1.09% en el período 2009 – 2019⁸. Un resultado reactivo puede corresponder a infección activa, pasada o reacción cruzada (falso positivo). Para los bancos de sangre, actualmente, se utilizan pruebas serológicas de tamizaje. Las características que estas deberían idealmente presentar son: alta sensibilidad y adecuada especificidad, para poder detectar a todos los individuos que podrían estar infectados. El resultado reactivo implica el descarte de la unidad (bolsa de sangre). Dentro de las pruebas de tamizaje, se encuentran las clásicas (Huddleson, Wright, fijación de complemento) y las más modernas (técnica de aglutinación con antígeno tamponado (BPA), prueba de aglutinación con Rosa de Bengala (RB), prueba de microaglutinación rápida en portaobjetos (RSAT)). Actualmente, en los bancos de sangre, las pruebas serológicas más comúnmente utilizadas son los ensayos de aglutinación, donde se emplean suspensiones de bacterias muertas y, de estar presentes los anticuerpos, se produce la reacción visible macroscópicamente como una aglutinación. El valor predictivo negativo de estas pruebas es elevado. La valoración adecuada de sus resultados requiere la utilización de un antígeno de calidad y bien estandarizado, ya que lo contrario es causa frecuente de títulos poco fiables y confusiones diagnósticas⁹.

Las cepas recomendadas por los organismos internacionales en la elaboración de las suspensiones antigénicas son *B. abortus* 1119-3 o 99 S. Estos antígenos permiten detectar anticuerpos anti-*B. abortus*, *suis* y *melitensis*¹⁵.

Por su rapidez, gran difusión, practicidad, bajo costo y elevada sensibilidad, RB y BPA son las recomendadas para tamizaje en bancos de sangre. Ambas, debido a su bajo pH,

privilegian la aglutinación de anticuerpos de isotipo IgG, dado que favorecen la expresión del componente aglutinante de los mismos, lo que las hace más específicas¹. BPA es ligeramente más sensible que RB¹.

RB es una prueba de aglutinación rápida, muy eficaz, que se utilizó inicialmente como prueba de cribado al permitir una aproximación diagnóstica en pocos minutos. No obstante, la experiencia práctica acumulada le ha concedido un protagonismo que va más allá del correspondiente a una simple prueba de cribado. El medio ácido en el que se efectúa la prueba favorece considerablemente la expresión del componente aglutinante de los anticuerpos que refleja infección actual. Su sensibilidad y especificidad para identificar anticuerpos aglutinantes anti-*Brucella* es muy elevada, de forma tal que solo excepcionalmente resulta negativa en la fase aguda de la infección y, con muy poca frecuencia, en las fases evolucionadas o crónicas de la enfermedad⁹.

El test de antígenos febriles (AF) de Wiener Lab es otro ensayo de aglutinación disponible comercialmente en nuestro país.

Objetivos

En primer lugar, evaluar la concordancia entre dos observadores para la técnica de Rosa de Bengala (RB), que fue implementada en reemplazo de la técnica de Antígenos Febriles (AF) para el tamizaje de brucelosis en donantes de Banco de Sangre en agosto del año 2020. En segundo lugar, evaluar la concordancia entre AF y RB, a la vez que estimar y comparar proporciones de muestras reactivas para brucelosis entre dos períodos durante los cuales se utilizó la técnica AF o la técnica RB y, finalmente, analizar esta diferencia en términos de unidades de sangre descartada.

Materiales y Métodos

Evaluación de la concordancia entre los observadores

Se seleccionaron prospectivamente 107 muestras de suero de donantes del Banco de Sangre que concurren al Servicio de Hemoterapia del Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. La selección fue previa a la implementación del test RB, en el período comprendido entre los meses de marzo y agosto de 2020. Estas muestras presentaban resultados reactivos y no reactivos por la técnica AF. Para la realización de la técnica AF, se utilizó el reactivo de An-

tígenos Febriles de Wiener Lab (Santa Fe, Argentina). Las muestras con resultados reactivos fueron tituladas en placa de vidrio, según las especificaciones del fabricante, considerando reactivos aquellos títulos iguales a o mayores de 1/40. A su vez, dichas muestras fueron ensayadas para el test RB utilizando el reactivo de Rosa de Bengala de Monlab Test (Barcelona, España) y observadas a doble ciego por dos observadores entrenados. Las muestras con resultado reactivo fueron tituladas siguiendo las especificaciones del fabricante, quien considera reactivas aquellas muestras con título igual a o mayor de 25 UI/ml.

De esta forma, se evaluó la concordancia entre los observadores para la técnica RB con el coeficiente kappa de Cohen y se aceptó un coeficiente igual o superior a 0,70 (70%) para considerar una concordancia cualitativa entre ambos.

Evaluación de la concordancia AF-RB

Se procedió a evaluar la concordancia entre las técnicas de AF y RB utilizando 105 muestras de suero de donantes del Banco de Sangre que concurren al Servicio de Hemoterapia del Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas en el período comprendido entre los meses de marzo y agosto de 2020; dichas muestras fueron ensayadas en simultáneo para ambas técnicas. Aquellas con resultado reactivo fueron tituladas en cada caso siguiendo las especificaciones del fabricante. Se evaluó la concordancia entre ambas técnicas a través de la utilización del coeficiente kappa de Cohen y se aceptó un coeficiente igual o superior a 0,50 (50%) para considerar una concordancia cualitativa aceptable entre ambas técnicas.

Análisis comparativo entre los períodos AF y RB

Se realizó un estudio retrospectivo utilizando los resultados obtenidos mediante el sistema de gestión de laboratorio *Infinity* (Laboratorio Roche SA®) para las pruebas de AF (Wiener Lab®) y RB (Monlab Test®) utilizadas durante dos períodos distintos, respectivamente. Para el ensayo AF, se tuvieron en consideración los resultados obtenidos entre el 01/11/2019 y el 31/07/2020 (período AF), mientras que, para el ensayo de RB, se tuvieron en cuenta los resultados entre el 15/08/2020 y el 18/08/2021 (período RB). La población en estudio incluyó individuos de ambos sexos, entre

Tabla II. Concordancia en los ensayos de Antígenos Febriles vs. Rosa de Bengala.

		Antígenos Febriles	
		Reactivo	No reactivo
Rosa de Bengala	Reactivo	16	1
	No reactivo	36	52

► Se pueden observar 37 pares de resultados discordantes (reactivo/no reactivo) entre ambos métodos.

Tabla III. Proporción de muestras reactivas para test AF y RB.

	Antígenos Febriles	Rosa de Bengala
Nº muestras reactivas	212	129
Tamaño muestral	5908	7922
Proporción (%)	3,6	1,6

► Se observa una diferencia altamente significativa en la proporción de casos reactivos en ambos períodos.

Tabla IV. Proporción de donantes reactivos para test AF y RB.

	Antígenos Febriles	Rosa de Bengala
Nº donantes reactivos	198	114
Tamaño muestral	4998	7147
Proporción (%)	4,0	1,6

► Se observa una diferencia altamente significativa en la proporción de donantes reactivos en ambos períodos.

18 y 65 años, que concurren como donantes de sangre al Servicio de Hemoterapia del Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas.

Los resultados fueron extraídos del sistema *Infinity* (Laboratorio Roche SA®) y analizados mediante el uso del programa estadístico *Epidat*.

Para cada período, AF y RB, se analizaron la cantidad total de registros, la distribución de resultados para el total de muestras analizadas (equivalente a unidades de sangre donadas) y la proporción de muestras reactivas. Asimismo, se analizó la distribución de resultados según el número de donantes que acudieron al servicio y la proporción de donantes reactivos.

Para calcular el total de los donantes, se tuvieron en cuenta los registros replicados de las muestras analizadas asumiendo de este modo la donación por reposición y seleccionando de cada caso replicado el último de los registros con relación a las fechas. Este criterio se basó sobre el supuesto de que si en la última donación el resultado había sido no reactivo, en donaciones previas también lo había sido; ya que en caso de ser reactivo el individuo es retirado del circuito de donación.

Posteriormente, se efectuó un análisis de comparación de proporciones entre muestras reactivas de cada período y entre población de donantes reactivos de cada período. Se estimó un intervalo de confianza del 95 % para la diferencia de proporciones y se consideró significativa una diferencia superior al 5 %. Se compararon los datos demográficos de sexo y edad de cada período. La distribución por sexo se analizó por comparación de proporciones, mientras que la distribución por edad se analizó a través de gráfico de cajas y se realizó contraste con el test de Mann-Whitney.

Resultados

Evaluación de la concordancia ente observadores

Luego de realizar la concordancia entre observadores para la técnica de RB, se pudo observar un índice kappa de Cohen de 0,78 (EE 0,0863), con IC95% [0,61 - 0,95] y valor p: 0,00001. En la Tabla I, se pueden observar seis resultados discordantes [reactivo/no reactivo] entre los dos observadores.

Evaluación de la concordancia AF-RB

La concordancia entre las técnicas AF-RB arroja un índice kappa de Cohen de 0,29 (EE 0,0695), con IC95% [0,15 - 0,43], con un valor p: 0,0001. Si se observan los datos de la Tabla II, se pone de manifiesto el hallazgo de 37 pares de resultados discordantes [reactivo/no reactivo] entre ambos métodos.

Análisis comparativo entre los períodos AF y RB

Se obtuvieron mediante el sistema de gestión de laboratorio *Infinity* (Laboratorio Roche SA®) 14044 registros, con 14000 registros válidos. Se eliminaron resultados como NM (*nueva muestra*), NRM (*no remite muestra*), etc. Del total de 14000 registros, se analizó la distribución por servicio para seleccionar a los donantes de sangre del Servicio de Hemoterapia y resultó un total de 13840 donantes, de los cuales 5913 (42,7%) corresponden al test AF y 7927 (57,3%), al test RB.

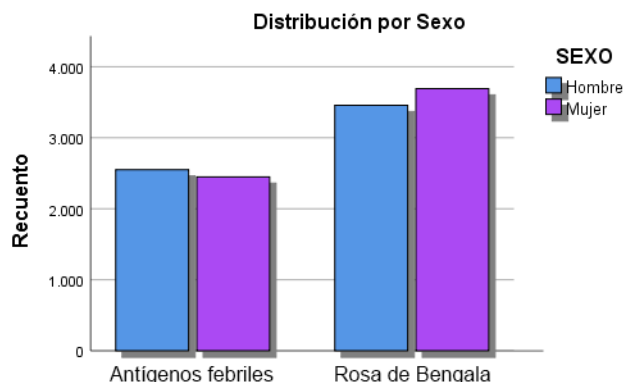
En el período AF, obtuvimos 5908 registros válidos, ya que se eliminaron de la casuística aquellos que no aportaban a los objetivos propuestos; de esta manera, se obtuvo un porcentaje de reactividad de 3,6 % (212 muestras entre 5908 resultados totales). La mayoría de los resultados reactivos obtenidos [178 reactivos de 212] se hallan en el valor de corte de la prueba [1/40].

Al tener en cuenta la donación por reposición, el total de muestras analizadas corresponde a una población menor de donantes. De esta manera, los 5908 registros corresponden a 4998 donantes, ya que 910 muestras fueron analizadas al menos dos veces. La proporción de donantes reactivos para el período AF fue de 4,0 % (198 reactivos de 4998). De la misma forma, podemos observar que la mayor proporción de reactividad se encuentra en el valor de corte de la prueba [1/40], dado que se hallan en este título 164 de los 198 donantes reactivos.

Por otro lado, el período RB comprende 7927 registros, de los cuales 5 fueron eliminados por no aportar resultado significativo a la casuística (por ejemplo, aquellos con resultado como MMR (*muestra mal remitida*), entre otros). Así, de los 7922 registros válidos, resultaron reactivos 129, de modo que el porcentaje de reactividad para el período RB fue de 1,6 %.

Del mismo modo que para el período AF, se procedió a cuantificar los casos de donantes duplicados para el período RB, es decir, aquellos pacientes que en el período analizado concurren dos o más veces a donar al Servicio de Hemoterapia. Así, los 7922 registros corresponden a 7147 donantes; en cada caso duplicado, se seleccionó el último de los registros con relación a las fechas ya citadas. El porcentaje de donantes reactivos para el período RB fue entonces de 1,6 %: 114 de los 7147 donantes. La mayoría de las muestras reactivas [119 de las 129 mencionadas] arrojaron resultados cercanos al valor de corte de la prueba, entre 25 UI/ml y 50 UI/ml. Lo mismo sucedió en el caso de los donantes reactivos testeados por RB: 105 de 114 donantes reactivos evidenciaron títulos bajos de reactividad.

Se procedió al análisis de comparación de proporciones de muestras reactivas de cada período, AF y RB; teniendo en cuenta el IC 95%, el resultado obtenido fue de 1,4 - 2,5 %, con

Figura 1. Distribución por sexo para los test Antígenos Febriles y Rosa de Bengala.

► No se observan diferencias significativas por sexo entre ambos métodos.

un valor $p: 0,00001$, lo que demuestra que la diferencia es altamente significativa. Estos resultados pueden observarse en la Tabla III. De este análisis, se desprende que, utilizando el test RB como prueba de tamizaje, cada 200 donaciones se descartan entre 3 y 5 unidades de sangre menos respecto del uso del test AF.

Si realizamos el mismo análisis de comparación de proporciones, pero teniendo en cuenta la proporción de donantes reactivos en los períodos AF y RB, el IC 95% arroja un resultado de 1,7 - 3,0%, con un valor $p: 0,00001$. De igual manera que para el caso anterior, la diferencia es altamente significativa y puede observarse en la Tabla IV.

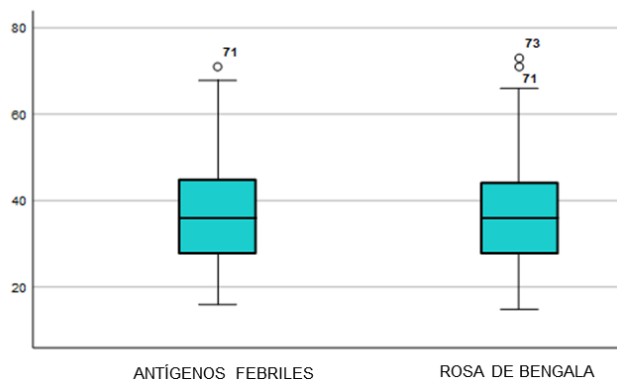
Además, se realizó la comparación de las proporciones de muestras reactivas en ambos períodos, AF y RB, según el sexo, y no se encontró una diferencia significativa en los resultados entre ambas poblaciones de donantes (ver Figura 1).

El test de Mann - Whitney se utilizó para contrastar la distribución por edades de los donantes reactivos en ambos períodos, y se obtuvo un $p: 0,347$, lo que indica que no existe una diferencia significativa en la distribución de la variable edad entre ambos grupos (ver Figura 2).

En la Figura 3 se pone de manifiesto que no se observa diferencia significativa en el porcentaje de reactividad entre el número de muestras y donantes para un mismo test (3,6 % muestras y 4,0 % donantes reactivos por AF) (1,6 % muestras y 1,6 % donantes reactivos por RB); pero por el contrario se observa una diferencia significativa en el porcentaje de reactividad entre ambos períodos AF/RB.

Discusión

Durante el mes de agosto del año 2020, se procedió a realizar el cambio en la metodología de tamizaje para brucelosis en donantes del Banco de Sangre que concurrían al Servicio de Hemoterapia del Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. En nuestro laboratorio, se utilizaba la prueba de aglutinación de Antígenos Febriles de Wiener Lab® y, si bien la especificidad y la sensibilidad reportadas por el

Figura 2. Distribución por edad para los test Antígenos Febriles y Rosa de Bengala.

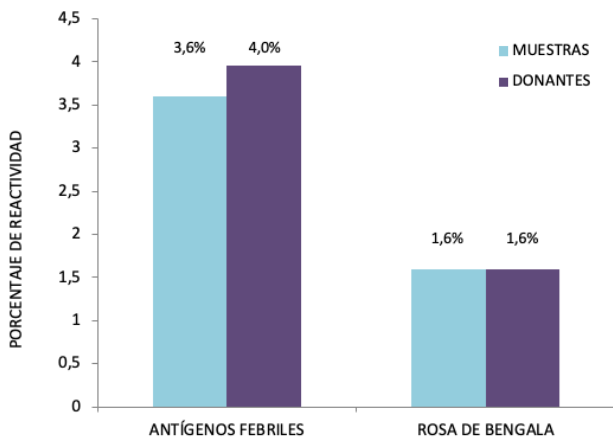
► No se observan diferencias significativas por rango etario entre ambos métodos.

fabricante para este ensayo son del 100 %, observábamos alta frecuencia de test reactivos a títulos bajos, lo que nos hacía pensar en posibles resultados falsos positivos. Por otra parte, la bibliografía documenta una mayor especificidad para el test Rosa de Bengala de Monlab Test®, por lo que se decidió implementar este último en reemplazo del test Antígenos Febriles (AF). Luego, se procedió en primer lugar a realizar la evaluación de la concordancia entre observadores para la nueva técnica empleada. Para ello se calculó el índice kappa de Cohen estableciendo como requisito una concordancia mayor de 0,7 (70 %). El resultado obtenido fue de 0,78 (EE: 0,0863), con IC 95%: 0,61-0,95, lo que nos indica que existe un acuerdo satisfactorio entre los dos observadores. Este hecho adquiere relevancia para asegurar la repetibilidad y trazabilidad de los resultados, independientemente del observador que realice el ensayo cada día.

Posteriormente, se realizó el ensayo de concordancia entre las técnicas AF y RB. El cálculo del índice kappa de Cohen arrojó un resultado de 0,29 (EE: 0,0695), con IC 95%: 0,15-0,43; este resultado se encuentra por debajo del mínimo establecido de 0,50 (50 %), lo que indica un acuerdo cualitativo no aceptable entre ambas técnicas. Si se observa la distribución de los resultados discordantes entre ambas técnicas, se pone de manifiesto que todos ellos se encuentran dentro del valor de corte para la técnica AF, establecido en 1/40, mientras que títulos superiores como 1/80 o 1/160 arrojan resultado reactivo para RB. Este hecho se fundamenta en la mayor especificidad que presenta el test RB que, debido a su bajo pH, favorece la aglutinación de anticuerpos isotipo IgG específicos en mayor proporción respecto del reactivo de AF y minimiza de este modo las posibles interferencias y reacciones cruzadas que arrojan resultados falsamente positivos.

Luego, se procedió a analizar el impacto en el cambio de técnica AF por RB. Al comparar las proporciones de donantes con resultado reactivo durante dos períodos distintos, donde se emplearon cada uno de los métodos, se observó

Figura 3. Proporción de reactividad en dos períodos para los test Antígenos Febriles y Rosa de Bengala.



► Se observa una diferencia significativa en el porcentaje de reactividad entre ambos períodos AF/RB.

que la diferencia de proporciones entre donantes reactivos de cada período fue altamente significativa, con una proporción del 4,0 % para el período AF (198 reactivos de 4998) y del 1,6 % para el período RB (114 reactivos de 7147). Los resultados obtenidos resultan esperables, si se tiene en cuenta, como se mencionó anteriormente, la elevada especificidad que presenta la técnica de RB en comparación con la técnica de AF. El fabricante del reactivo RB reporta en el inserto que el reactivo está compuesto por una suspensión de *B. abortus* cepa S99, pH 3,6, mientras que el reactivo AF contiene una suspensión de antígenos de *B. abortus* cepa 1119-3 en solución fisiológica^{10,11}. Ambos utilizan cepas antigénicas recomendadas por organismos internacionales, y la diferencia radica en el pH ácido que utiliza el reactivo RB. De este modo, el cambio de reactivo permitió aumentar la especificidad en el tamizaje sin disminuir la sensibilidad.

Los títulos reactivos para ambas técnicas fueron bajos, en el rango de 1/40 a 1/160 para AF, con 178 de 212 registros reactivos de 1/40, mientras que se observaron resultados en el rango de 25 UI/ml a 100 UI/ml para RB, con 119 de 129 registros reactivos en el rango de 25 UI/ml a 50 UI/ml. Estos resultados reactivos a títulos bajos sugieren resultados falsos positivos en ambos casos. Según el fabricante de AF, son concluyentes de enfermedad solamente títulos mayores de 1/320.

Partiendo del supuesto de que todos los individuos incluidos en el estudio son personas sanas, ya que superaron exitosamente el cuestionario previo a la donación, observamos una proporción de muestras reactivas de 1,6 % para el test RB, mientras que el porcentaje asciende a 3,6 % para el test AF. Este hecho apoya la sospecha de la existencia de una mayor proporción de falsos positivos para el test AF.

Si se tiene en cuenta que la proporción de donantes reactivos para el período RB fue de 1,6 %, se puede ver que este resultado se corresponde con el 1,4 % observado por Marder G.¹², mientras que, según MSAL, en Argentina la prevalen-

cia estimada de test reactivo para brucelosis en bancos de sangre es del 1 %, ligeramente inferior a la encontrada en este estudio. Acá cabe discutir la metodología utilizada en cada caso y la adecuada notificación a MSAL, sin embargo, a pesar de esto, la cifra de 1,6 % se acerca más en cuanto a proporción de donantes reactivos reportada por otros autores. Por otra parte, se debe tener en cuenta que los test de aglutinación pueden presentar reacciones cruzadas con otras enterobacterias que no son *Brucella* por similitud de la estructura antigénica de *Brucella* con otros microorganismos (incluso el suero de individuos vacunados contra cólera puede presentar reacciones cruzadas)¹³.

Para descartar cambios en los factores de riesgo de la población de donantes entre ambos períodos, se analizó la distribución por sexo y edad de cada período, y no se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos ni por rango etario, por lo que la disminución en el porcentaje de reactividad entre el período AF y RB puede atribuirse a una mayor especificidad de la técnica RB y no, a cambios en los factores de riesgo de la población estudiada.

Finalmente, una de las conclusiones que se desprenden del análisis realizado fue que, mediante la implementación del test RB, se descartan entre 3 y 5 unidades de sangre menos cada 200 analizadas. El cambio en el método de tamizaje por el test RB posibilitó reducir la exclusión de unidades de sangre que, de haberse usado el test AF, hubieran sido descartadas y, por lo tanto, permitió mayor disponibilidad de estas. Este hecho deriva a su vez en una menor necesidad de una nueva citación de donantes, que implica la notificación y repetición de ensayos y/o derivación del paciente al hospital o centro de referencia para confirmar la sospecha diagnóstica, y en la reducción de los costos consecuentes. Por lo expuesto anteriormente, concluimos que el test RB supera al test AF en cuanto a especificidad y, por lo tanto, en la reducción de detección de falsos positivos.

Referencias bibliográficas

1. Ministerio de Salud de Argentina. Enfermedades infecciosas, Brucelosis, Guía para el equipo de salud. Número 12. Buenos Aires, Argentina, Ministerio de Salud; 2013.
2. Castro HA, Gonzalez SR, Prat MI. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquím. Clin. Latinoam. 2005;39(2):203-16. ISSN [0325-2957].
3. Falquez C, Patiño C. Diagnóstico serológico (Rosa de Bengala) y molecular (PCR) de brucelosis en humanos. Ciencia y Tecnología. 2010;3(1):27-32. DOI: 10.18779/cyt.v3i1.86
4. Blejer J, Carreras Vescio L, Salamone H. Riesgo de transmisión de infecciones por vía transfusional. Medicina [Buenos Aires]. 2002;62(3):259-278. ISSN [0025-7680].
5. Wang W, Liao Q, Wu X, Hou S, Wang Y, Wu J, Shen C, Chen S, Allain JP, Li C. Potential risk of blood transfusion-transmitted brucellosis in an endemic area of China. Transfusion. 2015;55(3):586-92. DOI: 10.1111/trf.12853
6. Doganay M, Aygen B, Esel D. Brucellosis due to blood transfusion. J Hosp Infect. 2001;49(2):151-52. DOI: 10.1053/jhin.2001.1004
7. Akçakus M, Esel D, Çetin N, Paç-Kissarslan A, Kurtoglu S. Brucella melitensis en cultivos de sangre de dos recién nacidos debido a una transfusión de intercambio. Turk J Pediatr. 2005;47(3):272-4. PMID: 16250315
8. Boletín integrado de vigilancia. Dirección Nacional de Epidemiología y

- Análisis de la Situación de Salud Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. República Argentina. 2019;458:35-45.
9. Cardenal J. Brucelosis: aspectos actuales de principal interés. Control Calidad SEIMC. Servicio Enfermedades Infecciosas, C.S.U. de Bellvitge. *Rev Esp Quimioter.* 2006;19(3):237-243.
 10. Monlab Test. Rose de Bengala [Número de catálogo MO-165016]. Montornès del Vallès, España: Monlab Test; [consultada 29 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.monlab.es/document/Microbiologia/Rosa%20de%20bengala/IFU%20rosa%20bengala%20monlabtest.pdf>
 11. Wiener Lab. Antígenos Febriles [Número de referencia UR130715]. Rosario, Argentina: Wiener Lab; [consultada 29 de abril de 2023]. Disponible en: <https://access.wiener-lab.com/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/antigenos%20febriles.sp.pdf>
 12. Marder G, Franco Sycz AE, Czernik GE, Durán G. Seroprevalencia de brucelosis en hemodonantes del Banco de Sangre de Corrientes, Argentina. *Revista Argentina de Veterinaria* [en línea]. 2012 [consultada el 29 de abril de 2023]; 33(3): 144-147. DOI: 10.30972/vet.1621976
 13. Ruiz Castañeda M. Laboratory diagnosis of brucellosis in man. *Bull World Health Organ.* 1961;24(1):73-84. PMID: 13744655
 14. Díaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. The Rose Bengal Test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Apr 19;5(4):e950. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000950
 15. Torres-Padilla JC, López-Merino A, García-Escamilla RM, Gutiérrez-García JN. Seroprevalencia de anticuerpos anti-Brucella en disponentes de sangre con fines terapéuticos en tres bancos de sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Gac Med Mex* [revista en la Internet]. 2004 Ago [consultado 29 de abril de 2023]; 140(4): 391-398. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132004000400004&lng=es. ISSN 0016-3813
 16. Álvarez-Hernández M, Díaz-Flores M, Ortiz-Reynoso M. Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Revista de Medicina e Investigación* [en línea]. 2015; 3(2): 129-133. DOI: 10.1016/j.mei.2015.07.002
 17. Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Sangre y Hemoderivados. Resolución 1507/2015, de 14 de septiembre, por el que se aprobasen las modificaciones y anexos de las "normas administrativas y técnicas" y los "criterios de selección de donantes de sangre". *Boletín Nacional.* 2015 Sep 18. Consultado el 29 de abril de 2023. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resolucion-1507-2015-252134/texto>
 18. Picazo JJ, Fuertes Ortiz de Urbina A. Diagnóstico serológico de la brucelosis. En: Coordinación. *Protocolos de Diagnóstico Serológico Clínico.* Núm. 4. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, Centro Nacional de Microbiología; 1996. p. 1-18. Disponible en: <http://coli.usal.es/web/abydl/biblioteca/bibelectro.alu/documentos/protocolos3/brucelosis/brucelosis.html>



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución - No Comercial - Compartir Igual 4.0 Internacional - Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.

ARTÍCULO ORIGINAL

Aplicación de indicadores de calidad de la etapa preanalítica: experiencia de un laboratorio pediátrico

Application of quality indicators of the preanalytical phase: pediatric laboratory experience

Shepherd Safar, Melanie ^{1*}; Alcalde, María Belén ¹; Grau, María Emilia ¹; Ortigosa, Agustina ¹; Pessina, Lila María ¹; Fresina, Karen Nicole ¹; Satarich, Gisela Evelyn ¹; Alegre, María ¹; González, María Sandra ¹.

¹Laboratorio Central, Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Sor María Ludovica". La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Shepherd Safar, Melanie. HIAEP Sor María Ludovica, 57 N°934 9A, La Plata (C.P. 1900), Buenos Aires; shepherdsafar.m@gmail.com.

Resumen

Introducción: La etapa preanalítica incluye la solicitud de examen, la preparación del paciente, la recolección de la muestra primaria y el transporte hacia y dentro del laboratorio. Comúnmente, parte de estos procedimientos no son realizados por personal del laboratorio, por ello, su estandarización y control resultan dificultosos. **Objetivo:** Evaluar los errores preanalíticos relacionados con la toma, conservación y transporte de muestras. **Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio observacional descriptivo en el que se analizaron muestras de hemogramas y coagulogramas ingresadas entre el 1° de enero y el 31 de diciembre de 2019 en el Laboratorio de Guardia del Hospital de Niños "Sor María Ludovica". Se calcularon 5 indicadores de calidad (IC) armonizados. Se discriminó entre las extracciones realizadas por el personal del laboratorio y el personal de las salas de internación. Los resultados fueron comparados con las especificaciones de calidad del Grupo de Trabajo de Errores de Laboratorio y Seguridad del Paciente (WG-LEPS) y la métrica Six Sigma (6S). **Resultados:** Se analizaron 13568 muestras. El total de errores preanalíticos fue de 739 (5,45%), y el más frecuente correspondió a las muestras coaguladas (77%), para el cual se obtuvo un desempeño inaceptable, según WG-LEPS, y mínimo para la métrica 6S. Se alcanzó un mejor desempeño en las extracciones llevadas a cabo por personal de laboratorio en comparación con las realizadas por personal de las salas de internación. **Conclusiones:** Se observó un porcentaje de errores preanalíticos superior al observado por laboratorios de población general. Para todos los IC, el laboratorio obtuvo un mejor rendimiento que las salas de internación.

Palabras clave: fase preanalítica, pediatría, servicios de laboratorio clínico, control de calidad, indicadores de calidad de la atención de salud.

Abstract

Introduction: The pre-analytical phase includes: the request for the test, the preparation of the patient, the collection of the primary sample and the transport to and within the laboratory. In general, some of these procedures are not carried out by laboratory personnel; therefore, their standardization and control are difficult. **Objectives:** To evaluate preanalytical errors related to sample collection, conservation and transport. **Materials and methods:** Descriptive-observational study. The hematology samples collected between January 1 and December 31 2019 were analyzed in the stat laboratory of the "Sor María Ludovica" Children's Hospital, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Five harmonized quality indicators were calculated. We discriminated between extractions carried out by laboratory personnel and hospital room personnel. The results were compared with the quality specifications of the Working Group on Laboratory Errors and Patient Safety (WG-LEPS) and the Six Sigma (6S) metric. **Results:** A total of 13568 samples were analyzed. A total of 739 (5.45%) preanalytical errors were found, the most frequent being clotted samples (77%), for which an unacceptable performance was obtained according to WG-LEPS and minimal performance according to the 6S metrics. A better performance was obtained in the extractions carried out by laboratory personnel compared to those carried out by hospital room personnel. **Conclusions:** The percentage of preanalytical errors was higher than that observed by laboratories in the general population. For all quality indicators, the laboratory had a better performance than the hospital rooms.

Key words: Pre-Analytical Phase, Pediatrics, Clinical Laboratory Services, Quality Control, Quality Indicators, Health Care.

Introducción

La gestión de calidad en los laboratorios clínicos implica el control del proceso analítico en su totalidad incluyendo las fases preanalítica, analítica y posanalítica¹. En los últimos años, la mayor parte de los esfuerzos se han dirigido a detectar y corregir defectos en la etapa analítica del proceso de prueba, de modo que se ha logrado una reducción significativa de la incidencia de errores en esta etapa². Según distintos autores, los errores cometidos en la etapa analítica rondan el 10 % mientras que en la etapa preanalítica pueden representar hasta el 70 %³⁻⁵. La fase preanalítica se define como los pasos que comienzan en orden cronológico a partir de la prescripción médica e incluyen la solicitud de examen, la preparación del paciente, la recolección de la muestra primaria y el transporte hacia y dentro del laboratorio, y finaliza cuando comienza el procedimiento de examen analítico⁶. Comúnmente, parte de estos procedimientos no se realizan dentro del laboratorio clínico ni bajo supervisión de su personal; es por ello que la estandarización y control resultan dificultosos. Actualmente, se recomienda agrupar estos procedimientos en dos categorías: la primera está centrada en los errores preanalíticos, relacionados con la identificación del paciente y la segunda se ocupa de los problemas relativos a las muestras a analizar⁷.

Con el propósito de monitorear y evaluar el desempeño del laboratorio e identificar oportunidades de mejora, la Norma ISO 15189:2022 recomienda la utilización de indicadores de calidad (IC o IQ, por sus siglas en inglés) para cada una de las etapas del proceso analítico. Los IC representan herramientas que permiten valorar el funcionamiento de todos los procesos del laboratorio y compararlo con objetivos de calidad⁶. Por su parte, el Grupo de Trabajo de Errores de Laboratorio y Seguridad del Paciente (WG-LEPS) de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) ha desarrollado un Modelo de Indicadores de Calidad, que establece una

lista consensuada de IC para las distintas etapas del proceso analítico y tres niveles de desempeño - *mínimo*, *deseable* y *óptimo*- que representan objetivos de calidad para cada indicador. La armonización en la utilización de IC permite la comparación entre los datos recopilados en distintos laboratorios en el ámbito nacional e internacional⁸⁻¹⁰.

Otro método de evaluación del nivel de desempeño es la métrica Six Sigma (6S), la cual provee principios y herramientas que pueden ser aplicados para la medición de defectos o errores en cualquier proceso¹¹. El número de errores o defectos por millón (DPM) de un proceso puede ser transformado en un valor de 6S utilizando una tabla estadística. El valor 6S se relaciona con la frecuencia de aparición de errores: cuanto mayor sea, menos probable es que el laboratorio informe resultados equivocados; es decir, una valoración 6S más alta se correlaciona con un menor número de DPM y un mejor desempeño^{12,13}.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los errores preanalíticos relacionados con la toma, conservación y transporte de muestras utilizando IC armonizados y considerando las especificaciones de calidad, desarrollados ambos por el WG-LEPS de la IFCC, y la métrica 6S.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio observacional de corte transversal en el Laboratorio de Guardia del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría (HIAEP) "Sor María Ludovica" de la ciudad de La Plata. Se procesaron muestras urgentes, provenientes de pacientes pediátricos internados y ambulatorios, derivados desde Guardia Médica. La toma de muestras de los pacientes ambulatorios fue realizada por el personal del laboratorio mientras que las de los pacientes internados fueron tomadas, identificadas y transportadas por personal médico y/o de enfermería de la sala.

El personal del laboratorio evaluó la integridad de las muestras para su posterior análisis. En el caso de que una

Tabla I. Definición de los indicadores de calidad utilizados.

Indicador	Definición
QI-8 Muestras no recibidas	% de muestras de hematología no recibidas /n° total de muestras de hematología
QI-9 Muestras con anticoagulante incorrecto	% de muestras de hematología con anticoagulante incorrecto /n° total de muestras de hematología
QI-11 Muestras coaguladas	% de muestras de hematología coaguladas /n° total de muestras de hematología
QI-12 Muestras con volumen insuficiente	% de muestras de hemogramas con volumen insuficiente /n° total de muestras de hemogramas
QI-13 Muestras mal enrasadas	% de muestras de hemostasia con relación muestra-anticoagulante incorrecto /n° total de muestras de hemostasia

► QI, indicador de calidad.

Tabla II. Niveles de desempeño de indicadores de calidad para la fase preanalítica desarrollados por el Grupo de Trabajo de Errores de Laboratorio y Seguridad del Paciente (WG-LEPS) de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC)⁸

Indicador	Nivel de Desempeño			
	Óptimo	Deseable	Mínimo	Inaceptable
QI-8	<0,20	0,20-0,40	0,41-0,60	>0,60
QI-9	<0,07	0,07-0,13	0,14-0,20	>0,20
QI-11	<0,50	0,50-1,00	1,1-2,00	>2,00
QI-12	<0,40	0,40-0,80	0,81-1,20	>1,20
QI-13	<0,20	0,20-0,30	0,31-0,40	>0,40

► QI, indicador de calidad.

muestra cumpliera con algún criterio de rechazo, este se detalló en un campo de observaciones en el informe de resultados del paciente y quedó registrado en el *Sistema Informático del Laboratorio* (LIS). Los criterios de rechazo definidos por el laboratorio fueron: muestra coagulada (para las solicitudes de hemogramas y coagulogramas); inadecuada relación de volumen de muestra- anticoagulante (para coagulogramas); uso de anticoagulante incorrecto y volumen de muestra insuficiente.

Se incluyó la totalidad de las solicitudes de hemogramas y coagulogramas recibidas en el Laboratorio de Guardia entre enero y diciembre de 2019.

Variable Presencia de error preanalítico

El error en la extracción, conservación y transporte de las muestras se valoró a partir de los rechazos de las muestras de hematología (solicitudes de hemogramas y coagulogramas) en el Laboratorio de Guardia. Se utilizaron cinco IC definidos por la WG-LEPS y adaptados a nuestro laboratorio (Tabla I).

Recolección y análisis de datos

Los datos requeridos para calcular los IC se obtuvieron del LIS y se volcaron en tablas de *Microsoft Excel* para su análisis.

Para evaluar los errores en la etapa preanalítica, los porcentajes obtenidos para cada IC anual se compararon con los niveles de desempeño establecidos por el WG-LEPS (Tabla II).

Los porcentajes obtenidos para cada IC se convirtieron a la métrica 6S. Para ello, se calculó la tasa de DPM usando la siguiente fórmula:

$$DPM = (\text{número de errores} \times 1.000.000) / \text{número total de muestras o solicitudes.}$$

Esta tasa, luego, se convirtió en un valor de sigma de acuerdo con tablas disponibles *online*¹⁴.

Se establecieron los niveles de desempeño detallados en la Tabla III.

Se calcularon los IC anuales, y se realizó una comparación entre los resultados obtenidos para las extracciones llevadas a cabo por el personal de laboratorio, las salas

de internación (incluida la de neonatología) y las Salas de neonatología en particular. Los resultados obtenidos fueron comparados con las especificaciones de calidad del WG-LEPS y 6S.

Resultados

Durante el período de estudio en el Laboratorio de Guardia del HIAEP “Sor María Ludovica” se recibió un total de 13.568 solicitudes de hemogramas y coagulogramas. La distribución de muestras de hemogramas y coagulogramas, así como el número y porcentaje de rechazos, se especifican en la Tabla IV.

En la Tabla V, se detalla el número de defectos registrados, el total de muestras recibidas, porcentaje de errores, DPM, rendimiento y nivel sigma para cada IC para la toma, conservación y transporte de muestras. El tipo de error más frecuente correspondió a muestras coaguladas QI-11 (77%), y la frecuencia de los otros tipos de errores no superó el 10%.

En las tablas VI y VII, se detallan los niveles de desempeño alcanzados para cada IC cuando las extracciones fueron llevadas a cabo por personal del laboratorio, salas de internación o salas de neonatología. Para todos los IC, el laboratorio obtuvo un mejor desempeño que las salas de internación, según WG-LEPS y 6S. En las salas de neonatología, se obtuvieron porcentajes de errores mayores y niveles de 6S menores para los indicadores QI-8, QI-11, QI-12 y QI-13 en comparación con los resultados obtenidos en el total de las salas de internación.

Tabla III. Valores sigma y correspondencia con nivel de desempeño.

Nivel sigma	Nivel de desempeño
<3	Inaceptable
3 - 4	Mínimo
4 - 5	Bueno
5 - 6	Muy bueno

Tabla IV. Distribución de muestras de hemogramas, coagulogramas según lugar de obtención y número y porcentaje de rechazos.

Muestras	Hemogramas			Coagulogramas			Total		
	Recibidas	Rechazos		Recibidas	Rechazos		Recibidas	Rechazos	
		n	%		n	%		n	%
Laboratorio	2874	24	0,8	700	8	1,1	3574	32	0,9
Salas de internación	6916	395	5,7	3078	312	10,1	9994	707	7,1
Total	9790	419	4,3	3778	320	8,5	13568	739	5,4

Discusión

En el contexto actual, en el cual los resultados de laboratorio poseen un papel cada vez más relevante en la toma de decisiones clínicas, resulta prioritario trabajar en el aseguramiento de la calidad analítica con el fin de garantizar una atención más segura, un mejor uso de los recursos económicos y humanos y resultados clínicos confiables. Distintos estudios han demostrado que la mayoría de los errores en el laboratorio clínico se cometen en la etapa preanalítica^{3-5,15}. Es por ello que el aseguramiento de calidad en esta etapa ha adquirido un rol primordial, de tal manera que la mayor parte de los IC armonizados desarrollados por el WG-LEPS son específicos para esta etapa⁸.

Considerando los IC seleccionados, el total de errores registrados representó el 5,45 % de las muestras recibidas, de los cuales el error más frecuente correspondió a las muestras coaguladas. Experiencias de otras instituciones reportaron un porcentaje de error en la etapa preanalítica de entre 0,25 y 0,80 %, y el principal motivo de rechazo fue la recepción de muestras coaguladas o hemolizadas¹⁵⁻²⁰. Los valores de 6S reportados por la bibliografía son: QI-8: 4,5, QI-9: 4,9, QI-11: 4,4, QI-12/13: 4,5, que superan los obtenidos en el presente estudio²¹. Si bien la comparación es difícil porque no todos los estudios evalúan los mismos criterios de rechazo, y estos se encuentran influenciados por la subjetividad del operador, nuestros

porcentajes de error son marcadamente superiores a los reportados por la bibliografía. Sin embargo, si nos centramos en experiencias de centros exclusivamente pediátricos, se observaron porcentajes de rechazo de 0,81 a 5,4 % y valores de 6S similares a los del presente estudio, lo que pone en evidencia las dificultades inherentes a la toma de muestras en esta población^{22,23}.

En cuanto al análisis en función del personal a cargo de las extracciones sanguíneas, se observó un mejor rendimiento cuando estas estuvieron a cargo de personal de laboratorio, y se obtuvo un desempeño óptimo para los indicadores IQ-8, IQ-9 y IQ-12, según el WG-LEPS. Solo el indicador IQ-13 resultó inaceptable, hecho posiblemente asociado a un volumen insuficiente en relación con el anticoagulante debido a inconvenientes en la extracción en pacientes con difícil acceso venoso. En el análisis de los datos correspondientes a las salas de internación, solo se obtuvo un desempeño óptimo para el IQ-12 y desempeños mínimos (IQ-9) o inaceptables para el resto de los indicadores (IQ-8, IQ-11 y IQ-13).

La métrica 6S estuvo entre 3,93 (mínimo) y 6 (excelente) para los IC calculados para personal del laboratorio mientras que el correspondiente al total de las salas de internación estuvo entre 3,1 (mínimo) y 4,63 (bueno). Esta diferencia puede atribuirse a la mayor complejidad de las extracciones sanguíneas en pacientes internados

Tabla V. Indicadores de calidad anuales y rendimiento según WG-LEPS y 6S

	Indicadores de calidad anuales				
	QI-8	QI-9	QI-11	QI-12	QI-13
Total de defectos	69	19	570	7	74
Total de muestras	13568*	13568*	13568*	9790**	3778***
Porcentaje de defectos	0,51	0,14	4,20	0,07	1,96
Rendimiento según WG-LEPS	Mínimo	Mínimo	Inaceptable	Óptimo	Inaceptable
Nivel sigma	4,07	4,49	3,23	4,69	3,56
Rendimiento según 6S	Bueno	Bueno	Mínimo	Bueno	Mínimo

► *Corresponde al total de muestras para hemogramas y coagulogramas. **Corresponde al total de muestras para hemogramas. ***Corresponde al total de muestras para coagulogramas.

Tabla VI. Indicadores de calidad y desempeño, según WG-LEPS, para el laboratorio, salas de internación y neonatología.

	QI-8		QI-9		QI-11		QI-12		QI-13	
	(%)**	Desempeño según WG-LEPS	(%)**	Desempeño según WG-LEPS	(%)**	Desempeño según WG-LEPS	(%)**	Desempeño según WG-LEPS	(%)**	Desempeño según WG-LEPS
Laboratorio	0	Óptimo	0	Óptimo	0,76	Deseable	0,04	Óptimo	0,57	Inaceptable
Salas de internación*	0,69	Inaceptable	0,19	Mínimo	5,43	Inaceptable	0,09	Óptimo	2,27	Inaceptable
Neonatología	1,01	Inaceptable	0,1	Deseable	10,14	Inaceptable	0,14	Óptimo	2,39	Inaceptable

► *Para los cálculos se consideró el total de las salas de internación, incluyendo las salas de neonatología. **Porcentaje de defectos.

y a la falta de capacitación del personal que transporta muestras coaguladas, insuficientes o mal enrasadas al laboratorio creyéndolas pasibles de ser analizadas. El mejor control de la etapa preanalítica cuando la misma está supervisada por personal de laboratorio también fue reportado en otros trabajos^{16, 24, 25}.

Se analizó, además, de forma independiente el desempeño de las salas de neonatología considerando que podría producirse una mayor cantidad de rechazos debido a la especial dificultad en la toma de muestras de pacientes neonatos. En estas salas, se produjo un mayor porcentaje de errores para todos los IQ, con excepción de las muestras con anticoagulante incorrecto. Coincidiendo con estos hallazgos, en un estudio realizado por Rooper y col.¹⁶, se observó un mayor porcentaje de rechazos en muestras de neonatología en comparación con el resto de las salas en un centro de atención terciario.

Entre las limitaciones de este estudio se puede mencionar que el cálculo de IC pudo estar influenciado por subjetividades en la detección de errores preanalíticos y en la carga de datos en el sistema informático del laboratorio, procedimientos realizados por diferentes profesionales de guardia. Por otra parte, no fue posible el análisis del IC IQ-10 (porcentaje de muestras hemolizadas) debido a la falta de armonización en la percepción de la hemólisis y su informe por parte de los profesionales de la guardia.

La hemólisis se destaca como uno de los motivos más frecuentes de rechazo de muestras en otros trabajos y suele estar asociada a dificultades en la extracción sanguínea^{16,18,20,25}. Su análisis podría haberse traducido en un porcentaje de rechazos mayor.

Atendiendo a las dificultades que presenta garantizar la calidad de la etapa preanalítica en un centro pediátrico, donde la recolección de muestras es única y se requieren habilidades especiales para la realización de flebotomías, planteamos la necesidad de contar con especificaciones de calidad propias para pediatría y de realizar comparaciones o actividades de *benchmarking* entre laboratorios pares.

El presente trabajo brinda información valiosa que permite identificar los procesos vulnerables y errores frecuentes y establecer una línea de base sobre la cual seguir trabajando en el aseguramiento de la calidad analítica. En nuestro laboratorio, se observó un porcentaje de errores preanalíticos superior a lo observado por laboratorios de población general. Para todos los IC, el laboratorio obtuvo un mejor rendimiento que las salas de internación. Muchas variables que contribuyen al rechazo de muestras ocurren fuera del laboratorio clínico, lo que resalta la importancia de capacitar al personal médico y de enfermería en las buenas prácticas para la toma de muestras.

Tabla VII. Indicadores de calidad y desempeño, según 6S, para el laboratorio, salas de internación y neonatología

	QI-8		QI-9		QI-11		QI-12		QI-13	
	6S	Desempeño según 6S	6S	Desempeño según 6S	6S	Desempeño según 6S	6S	Desempeño según 6S	6S	Desempeño según 6S
Laboratorio	6	Excelente	6	Excelente	3,93	Mínimo	4,89	Bueno	4,03	Bueno
Salas de internación*	3,96	Mínimo	4,39	Bueno	3,1	Mínimo	4,63	Bueno	3,5	Mínimo
Neonatología	3,82	Mínimo	4,59	Bueno	2,77	Inaceptable	4,48	Bueno	3,48	Mínimo

► *Para los cálculos se consideró al total de las salas de internación, incluyendo las salas de neonatología.

Referencias bibliográficas

- World Health Organization. Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio/quality management system in the laboratory. 2016. [Consultado 20 abr 2023]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/252631>
- Cerioti F, Cappelletti P, Caputo M, Di Serio F, Messeri G, Ottomano C, *et al.* A risk-analysis approach to the evaluation of analytical quality. *Clin Chem Lab Med.* 2011;50(1):67-71. doi: 10.1515/cclm.2011.740
- Carraro P, Plebani M. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency 10 years later. *Clin Chem.* 2007;53:1338-42. doi: 10.1373/clinchem.2007.088344
- Lippi G, Chance JJ, Church S, Dazzi P, Fontana R, Giavarina D, *et al.* Pre-analytical quality improvement: from dream to reality. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49:1113-26. doi: 10.1515/cclm.2011.600
- Tadesse H, Desta K, Kinde S, Hassen F, Gize A. Clinical chemistry laboratory errors at St. Paul's Hospital Millennium Medical College [SPHMMC], Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Res Notes.* 2018;11(1):789. doi: 10.1186/s13104-018-3893-5
- International Organization for Standardization (ISO). Medical laboratories-particular requirements for quality and competence. ISO 15189, Geneva, Switzerland, 2022.
- Plebani M, Sciacovelli L. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. *Clin Chem Acta.* 2013;432:44-48.
- Sciacovelli L, Plebani M. The IFCC working group on laboratory errors and patient Safety. *Clin Chem Acta.* 2009;404:79-85. doi: 10.1016/j.cca.2009.03.025
- Plebani M, Sciacovelli L, Lippi G. Quality indicators for laboratory diagnostics: consensus is needed. *Ann ClinBiochem.* 2011;48:479. doi: 10.1258/acb.2011.011088
- Sciacovelli L, O'Kane M, Skaik YA, *et al.* Quality indicators in laboratory medicine: from theory to practice. Preliminary data from the IFCC Working Group Project "Laboratory Errors and Patient Safety". *ClinChem Lab Med.* 2011;49:835-844. doi: 10.1515/cclm.2011.128
- Coskun A. Quality Management and Six sigma. Rijeka, Croatia: Sciyo; 2010.
- Gras JM, Philippe, M. Application of the Six Sigma concept in clinical laboratories: a review. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45:789-796. doi: 10.1515/cclm.2007.135
- Coskun A, Unsal I, Serteser M, Inal T. Six Sigma as a Quality Management Tool: Evaluation of Performance in Laboratory Medicine, Quality Management and Six Sigma. Rijeka, Croatia: InTech Europe; 2010:247-262. doi: 10.5772/9928
- Six Sigma Calculators - Westgard [Internet]. [Consultado 20 abr 2023]. Disponible en: <https://www.westgard.com/six-sigma-calculators.htmSix>
- Chawla R, Goswami B, Singh B, Chawla A, Gupta V, Mallika V. Evaluating Laboratory Performance With Quality Indicators. *Laboratory Medicine.* 2010;41(5):297-300. doi: 10.1309/lms2cbxba6y0owmg
- Rooper L, Carter J, Hargrove J, Hoffmann S, Riedel S. Targeting Rejection: Analysis of Specimen Acceptability and Rejection, and Framework for Identifying Interventions in a Single Tertiary Healthcare Facility. *J Clin Lab Anal.* 2017;31(3):e22060. doi: 10.1002/jcla.22060
- Atay A, Demir L, Cuhadar S, Saglam G, Unal H, Aksun S, *et al.* Clinical biochemistry laboratory rejection rates due to various types of pre-analytical errors. *Biochem Med.* 2014;24(3):376-82. doi: 10.11613/BM.2014.040
- Dikmen ZG, Pinar A, Akbiyik F. Specimen rejection in laboratory medicine: Necessary for patient safety?. *Biochem Med.* 2015;25(3):377-85. doi: 10.11613/bm.2015.037
- Codagnone F, Alencar S, Shcolnik W, Chaves S, Silva L, Henriques V *et al.* The use of indicators in the pre-analytical phase as a laboratory management tool. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2014;50(2). doi:10.5935/1676-2444.20140002
- Greco DS, Vlad DC, Dumitrascu V. Quality indicators in the preanalytical phase of testing in a stat laboratory. *Lab Med.* 2014;45(1):74-81. doi: 10.1309/lm9zy92ybzrpfqy
- Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, Pellosso M, Chiozza ML. Performance criteria and quality indicators for the pre-analytical phase. *Clin Chem Lab Med.* 2015 May;53(6):943-8. doi:10.1515/cclm-2014-1124
- Hjelmgren H, Nilsson A, Andersson-Papadogiannakis N, Ritzmo C, Ygge BM, Nordlund B. Retrospective study showed that blood sampling errors risked children's well-being and safety in a Swedish paediatric tertiary care. *Acta Paediatr.* 2019;108(3):522-528. doi: 10.1111/apa.14528
- Mannion H, Nadder T. Three alternative structural configurations for phlebotomy: A comparison of effectiveness. *Clin Lab Sci.* 2007;(20):210-214.
- Ouz E, Kara, F, Kızılgün, M. Preanalytical Error Sources: Pediatric Laboratory Experience. *stanbul Med.* 2017;(18):28-31. doi: 10.5152/imj.2017.91885
- Wallin O, Soderberg J, Van Guelpen B, Stenlund H, Grankvist K, Brulin C. Preanalytical venous blood sampling practices demand improvement – A survey of test-request management, test-tube labelling and information search procedures. *Clin Chim Acta.* 2008;(391):91-97. doi: 10.1016/j.cca.2008.02.016



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución - No Comercial - Compartir Igual 4.0 Internacional - Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.

ARTÍCULO ORIGINAL

Nuevo prototipo de vacuna de mucosa contra el HSV-2 basada en partículas semejantes a bacterias como portador y adyuvante de antígenos

Novel mucosal vaccine against HSV-2 based on the LysM-BLP system as carrier and antigen adjuvant

Raya-Tonetti, Fernanda^{1,2,3}; Villena, Julio³; Vizoso-Pinto, María Guadalupe^{1,2}

¹Laboratorio de Biología de las Infecciones, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET-UNT. Tucumán, Argentina.

²Laboratorio de Ciencias Básicas y Or. Genética, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.

³Laboratorio de Inmunobiología, Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA-CONICET). Tucumán, Argentina.

*Contacto: Vizoso-Pinto, María Guadalupe, Laboratorio de Ciencias Básicas y Or. Genética, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán. Av Kirchner 2100, [C.P. 4000], Tucumán, Argentina; mgvizoso@fm.unt.edu.ar.

Resumen

Introducción: El desarrollo de una vacuna contra el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), el cual causa una infección de transmisión sexual de por vida, sería un gran paso para mejorar la salud sexual y reproductiva mundial. **Objetivos:** Estudiar las respuestas inmunes de mucosa y sistémica inducidas por una vacuna experimental, consistente en partículas semejantes a bacterias (BLP) derivadas de lactobacilos, que conservan su matriz de peptidoglicano y exponen el antígeno gD del HSV-2 en su superficie gracias a la fusión con dominios LysM. **Materiales y métodos:** Ratones BALB/c de seis semanas de edad fueron inmunizados por vía nasal con el complejo His-Acglu-gD-BLP027 los días 0, 14 y 28. Como control, se administró His-Acglu-gD por vía intranasal o His-gD con adyuvante completo de Freund por vía peritoneal. Se evaluaron los niveles de inmunoglobulinas específicas en suero y en lavado broncoalveolar (BAL), así como la producción de citoquinas por parte de los esplenocitos, en respuesta a la reestimulación antigénica. **Resultados:** La vacuna experimental indujo mayores niveles de IgA en BAL en comparación con los ratones inmunizados con el adyuvante de Freund. **Conclusiones:** Este nuevo sistema de presentación de antígenos podría ser una herramienta útil para el desarrollo de vacunas mucosas que estimulen la inmunidad local y a distancia.

Palabras clave: vacunas de mucosas, partículas semejantes a bacterias, presentación de antígenos, adyuvantes, respuesta inmune adaptativa.

Abstract

Introduction: The development of a vaccine against herpes simplex virus type 2 (HSV-2), which causes a lifelong sexually transmitted infection, would be a great step to improve sexual and reproductive health worldwide. **Objectives:** To study the mucosal and systemic immune responses induced by an experimental vaccine consisting of bacterium-like particles (BLP) derived from lactobacilli, which retain their peptidoglycan matrix and expose the HSV-2 gD antigen on their surface thanks to its fusion with LysM domains. **Materials and methods:** Six-week-old BALB/c mice were nasally immunized with the His-Acglu-gD-BLP027 complex on days 0, 14, and 28. As a control, His-Acglu-gD was administered intranasally or His-gD with complete Freund's adjuvant peritoneally. The levels of specific immunoglobulins in serum and in bronchoalveolar lavage (BAL), as well as the production of cytokines by splenocytes after the antigenic restimulation, were evaluated. **Results:** The experimental vaccine induced higher levels of IgA in BAL than in mice immunized with Freund's adjuvant. **Conclusions:** This new antigen presentation system could be a useful tool for the development of mucosal vaccines that stimulate local and distant immunity.

Key words: mucosal vaccines, bacterium-like particles, antigen presentation, adjuvants, adaptive immune response.

Introducción

El desarrollo de una vacuna contra el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), una infección de transmisión sexual (ITS) de por vida, mejoraría de manera crítica la salud sexual y reproductiva mundial¹. Según la OMS, en 2016 había 491 millones de personas de 15 a 49 años (13 % de la población) infectadas en todo el mundo, de las cuales el 64 % eran mujeres². El HSV-2 puede causar lesiones genitales dolorosas, recurrentes y, a menudo, se asocia con efectos psicosociales negativos como vergüenza, ansiedad y depresión³. Además, está demostrado que la infección por HSV-2 triplica el riesgo de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)⁴. Por otro lado, este virus puede causar herpes neonatal cuando el recién nacido se expone al HSV en el canal parto. Este tipo de herpes tiene una frecuencia estimada de 10 casos por cada 100.000 nacidos en todo el mundo, pero es una afección grave que puede producir discapacidad neurológica persistente e incluso la muerte⁵.

Los antiviricos como el aciclovir, el famciclovir y el valaciclovir son los más eficaces para el tratamiento de las personas infectadas por HSV. Sin embargo, aunque pueden reducir la intensidad y frecuencia de los síntomas, no curan la infección⁶.

Por todo lo expuesto, es necesario desarrollar mejores intervenciones de tratamiento y prevención y, en particular, vacunas contra el HSV-2, ya que este virus causa 23 millones de infecciones nuevas cada año. El desarrollo de vacunas de subunidad se ha centrado principalmente en la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos a la glicoproteína D (gD) de la envoltura viral. Esta glicoproteína media la fusión con la membrana celular y se ha demostrado que los anticuerpos contra gD impiden la entrada del virus⁷.

Aunque aún no hay vacunas de administración nasal disponibles para enfermedades de transmisión sexual, existen antecedentes que indican que este abordaje sería el más apropiado, ya que estas son capaces de estimular la producción de anticuerpos específicos en la mucosa vaginal^{1,8}. Las vacunas administradas por esta vía también estimulan la respuesta inmune celular, en particular, la de las células T de memoria, indispensables en las infecciones crónicas como la causada por el HSV-2^{1,9}.

La administración de antígenos a través de las vías mucosas es un desafío porque puede generar tolerancia en lugar de respuestas inmunitarias efectoras. La inmunotolerancia es la respuesta inmune natural de la mucosa, que ha evolucionado para prevenir respuestas inflamatorias dañinas, a los antígenos solubles¹⁰. Ante este escenario, las bacterias lácticas (BL) con capacidad inmunomoduladora o inmunobióticas surgen como potenciales vectores de antígenos y adyuvantes para el desarrollo de vacunas de mucosa¹¹⁻¹³. La cepa *Lactocaseibacillus rhamnosus* IBL027 tiene propiedades inmunomoduladoras antivirales intrínsecas y propiedades como adyuvante de mucosas¹⁴. Como la viabilidad de las BL no es un requisito indispensable para lograr un efecto inmunomodulador óptimo¹⁵, empleamos las partículas similares a bacterias (BLP) derivadas de la cepa IBL027 (BLP027), las cuales mejoran las respuestas inmunes locales y sistémicas, humorales y celular-

res cuando se administran junto con una vacuna viral por vía mucosa¹⁶.

Las BLP se obtienen mediante el tratamiento de las BL con ácido y calor, lo que resulta en la muerte bacteriana y la pérdida de ADN y proteínas citoplasmáticas. Este tratamiento expone el peptidoglicano (PG) presente en la pared celular, de modo que la capacidad de unión de proteínas con motivos LysM aumenta al menos 10 veces¹⁷. El motivo LysM es un dominio de unión de pared celular ampliamente distribuido en la naturaleza que se une de manera no covalente a los residuos de N-acetilglucosamina del PG^{18,19}. Hasta la fecha, más de 40 antígenos diferentes de naturaleza bacteriana, viral o parasitaria se han fusionado con el dominio C-terminal de AcmA - una autolisina de *Lactococcus lactis*²⁰ -, el cual les permitió unirse a las BLP y quedar expuestas en su superficie.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en trabajos anteriores, desarrollamos una plataforma para vacunas mucosas que explota el potencial inmunomodulador bien descrito de *L. rhamnosus* IBL027 en combinación con los 5 dominios LysM de la glicoproteína manosil-endo-beta-N-acetilglucosamidasa (Acglu) (GenBank: KPH22907.1) derivada de *Limosilactobacillus fermentum*, capaz de estimular la respuesta inmune celular y humoral, tanto mucosa como sistémica, cuando se administra por vía intranasal²¹. En este enfoque, la pared celular gruesa y rígida de *L. rhamnosus*, libre de proteínas y ácidos teicoicos expone el PG para unir proteínas con dominios LysM. La unión no covalente de los antígenos del patógeno a la superficie de las BLP se logra mediante la simple mezcla de los antígenos heterólogos purificados con las partículas lácticas²¹. En este trabajo, proponemos el uso de esta plataforma para presentar la glicoproteína gD del HSV-2 como antígeno en su superficie. Por último, proponemos estudiar las respuestas inmunes de mucosa y sistémica provocadas por la vacuna experimental utilizando inmunizaciones intranasales en un modelo de ratón. Aunque será necesario realizar estudios que evalúen los niveles de anticuerpos inducidos por esta plataforma en la mucosa genital, su capacidad de neutralización viral y la capacidad protectora de la vacuna frente a un desafío con HSV-2, los resultados preliminares obtenidos en este trabajo indican que la plataforma constituida por Acglu-BLP027 es una herramienta prometedora para la generación de vacunas mucosas.

Materiales y métodos

Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

L. fermentum IBL038 y *L. rhamnosus* IBL027, depositados en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán (Tucumán, Argentina), se cultivaron durante 12 h a 37 °C en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (fase logarítmica final).

Las cepas de *E. coli* (TOP10, DH5 α , DB3.1 y Rosetta) se cultivaron en caldo Luria Bertani o en placas de agar a 37 °C suplementadas con 100 μ g/ml de ampicilina, 50 μ g/ml de gentamicina o 17 μ g/ml de cloranfenicol para el plásmido de selección.

Clonado recombinante de la glicoproteína gD del HSV-2

El antígeno viral usado en el desarrollo de esta vacuna experimental fue un polipéptido recombinante de 45 kDa que comprende los aminoácidos 1 - 340 de la glicoproteína gD [GenBank: JQ956374.1] de HSV-2. Se partió del plásmido pENTRY207-gD perteneciente a la genoteca del Laboratorio de Biología de Infecciones de INSIBIO (Tucumán, Argentina). La secuencia codificante para gD sin los dominios transmembrana, flanqueada por los sitios attB fue subclonada en el vector de destino personalizado pETG-N-RGS-His-[rfB] con el objetivo de agregarle a dicha proteína una etiqueta de polihistidina (His) que permitirá, luego, purificarla y usarla como control. También, el antígeno de interés fue subclonado en el vector pENHAC-[rfb] donde, además de la etiqueta de polihistidina, se agregó la secuencia de Acglu, que permitirá unir el antígeno de interés a la superficie de las BLP para generar una vacuna de mucosa. Para este fin se usó la LR-clonasa II (clonado recombinatorio Gateway®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló con el kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) y la integridad de los vectores resultantes se verificó mediante análisis de restricción con HindIII/XbaI (New England Biolabs) seguido de electroforesis en agarosa.

Expresión y purificación de las proteínas recombinantes His-gD e His-Acglu-gD

Las proteínas recombinantes se identificaron en *E. coli* Rosetta, como se describió anteriormente^{22,23}. La expresión de la proteína His-gD se indujo con 1 mM de IPTG de acuerdo con lo descrito en la literatura²⁴. Por otro lado, se puso a punto la expresión de His-Acglu-gD por tratarse de una proteína aún no descrita. Para ello, se indujeron cultivos de 10 ml con diferen-

tes concentraciones de IPTG (0,1; 0,5; 1,0 o 2,0 mM) durante 2, 3 o 4 h, se centrifugaron a 4 °C para separar el sedimento celular del sobrenadante, y las fracciones de proteínas nativas y desnaturizadas se obtuvieron como se describió previamente²³.

Ambas proteínas se purificaron utilizando cromatografía Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión y pureza de las proteínas recombinantes se analizaron mediante SDS-PAGE seguida de la tinción con el colorante azul de Coomassie y se verificaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal anti-RGS-His de ratón (Qiagen, Alemania). Las proteínas purificadas se almacenaron a -80 °C. La concentración de proteínas se determinó con el reactivo de Bradford (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de la vacuna His-Acglu-gD-BLP027

Se prepararon las BLP027 como se describió anteriormente¹⁶. Se incubaron diferentes concentraciones de la proteína recombinante His-Acglu-gD purificada en condiciones desnaturizantes (30, 70 o 90 µg de proteína) con las BLP (10⁸ partículas) en rotación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Las partículas se lavaron 3 veces con PBS estéril, se resuspendieron en el mismo buffer y se almacenaron a -80 °C. La cantidad de proteína unida se comparó con estándares de BSA por SDS-PAGE utilizando el programa ImageJ.

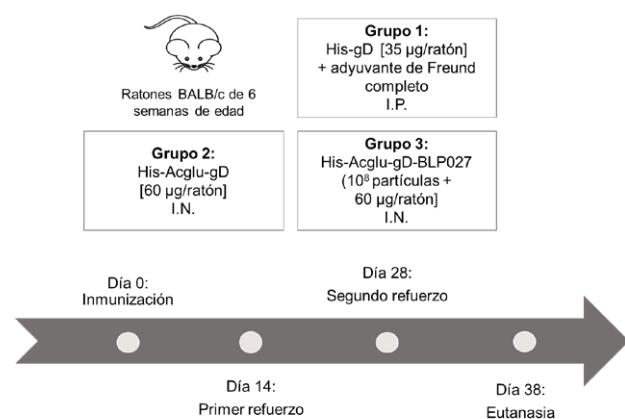
Inmunización de los ratones

Los ratones BALB/c se obtuvieron de una colonia cerrada, mantenida en CERELA-CONICET (Tucumán, Argentina). Se alojaron en jaulas de plástico a temperatura ambiente con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los parámetros se estudiaron en 8 ratones por grupo. Todos los grupos fueron alimentados con una dieta balanceada convencional *ad libitum*. Antes de la eutanasia, todos los animales fueron anestesiados anestesiaron usando una mezcla de clorhidrato de ketamina y clorhidrato de xilazina en una proporción de 20:1. No se observaron signos de malestar o dolor durante el experimento.

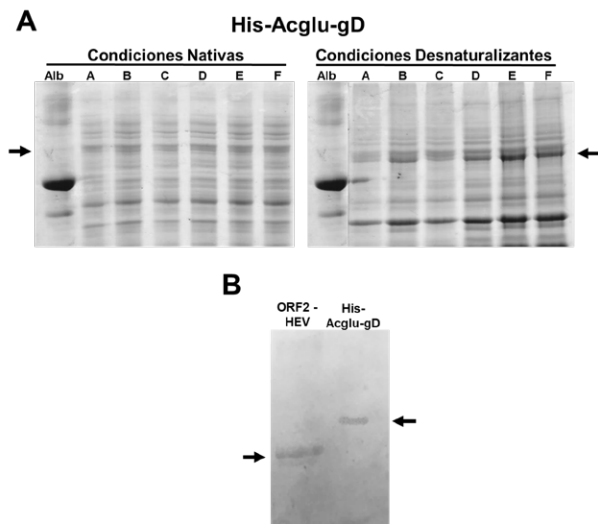
Los experimentos se realizaron de acuerdo con la *Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* y fueron aprobados prospectivamente por el Comité Ético de Cuidado Animal del CERELA (protocolos n.º BIOT-CRL/11).

Para las inmunizaciones, se utilizaron ratones BALB/c de seis semanas de edad divididos en tres grupos. El grupo 1 se inmunizó por vía intraperitoneal con 35 µg de His-gD con adyuvante completo de Freund. El grupo 2 recibió 60 µg de la proteína His-Acglu-gD por vía intranasal y el grupo 3 se inmunizó usando His-Acglu-gD-BLP027 por la misma vía (10⁸ partículas/ratón con 60 µg de proteína). De esta manera, los 3 grupos recibieron la misma cantidad (en micromoles) de proteína. Todos los grupos de animales fueron inmunizados con una primera dosis el día 0 y recibieron dos refuerzos los días 14 y 28, respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Esquema de inmunización.



- ▶ Los ratones BALB/c de seis semanas de edad se inmunizaron por vía intraperitoneal (I.P.) con His-gD con adyuvante completo de Freund los días 0 (primera dosis), 14 y 28 (refuerzos). Este grupo fue usado como control para las comparaciones. El resto de los ratones fueron vacunados por vía intranasal (I.N.) His-Acglu-gD o His-Acglu-gD-BLP027. Diez días después del primer o del segundo refuerzo, se obtuvieron muestras de suero y BAL para la determinación de anticuerpos específicos IgG e IgA. Cada grupo experimental estuvo integrado por 8 ratones.

Figura 2. Expresión de la proteína His-gD recombinante.

► (A) SDS-PAGE de His-Acglu-gD (75 KDa) expresada en seis clones de *E. coli* Rosetta (A-F) después de la inducción con 1 mM de IPTG en condiciones nativas (CN) o desnaturalizantes (CD); Alb, albúmina de 65 KDa usada como marcador de peso molecular. (B) *Western blot* de la proteína recombinante His-Acglu-gD en condiciones desnaturalizantes utilizando un anticuerpo primario anti-RGS-His y la proteína ORF2 del HEV de 66 KDa como control.

Detección de anticuerpos en suero y BAL

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cardíaca 10 días después del segundo refuerzo y se recogieron en tubos heparinizados. Las muestras de lavado broncoalveolar (BAL) se obtuvieron como se describió anteriormente¹⁴. Brevemente, se expuso la tráquea y se intubó con un catéter. Se realizaron dos BAL secuenciales en cada ratón inyectando 1 ml de PBS estéril; el fluido recuperado se centrifugó durante 10 min a 900 x g. Los sobrenadantes

se congelaron a -80 °C para análisis posteriores. Los anticuerpos anti-gD específicos (IgA e IgG) se determinaron por ELISA siguiendo lo descrito anteriormente¹⁴, sensibilizando las placas de poliestireno con 3 µg de la proteína His-gD por pocillo.

Análisis de datos

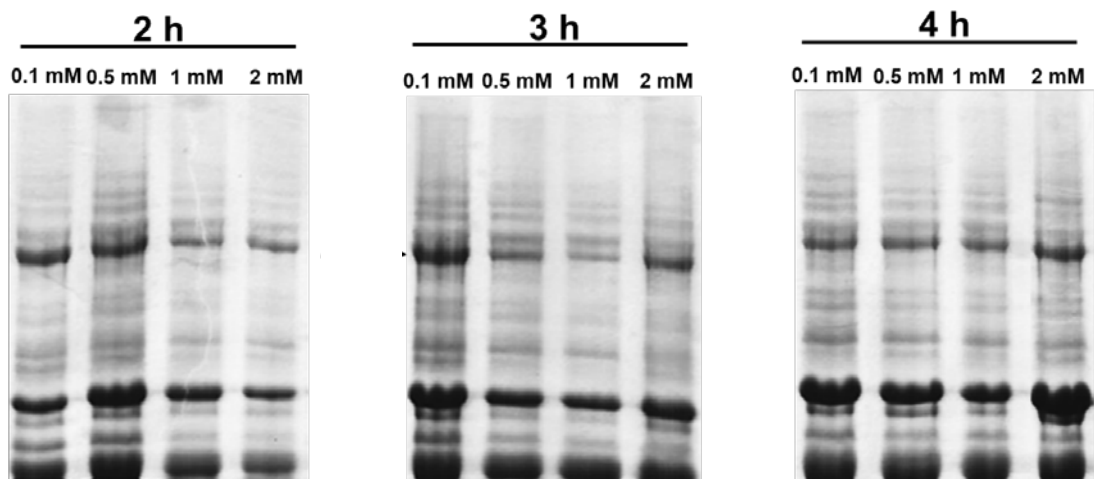
Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media ± DE. La prueba de Tukey, para comparaciones por pares de las medias, se utilizó para evaluar las diferencias entre los grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Expresión y purificación de las proteínas quiméricas gD del HSV-2

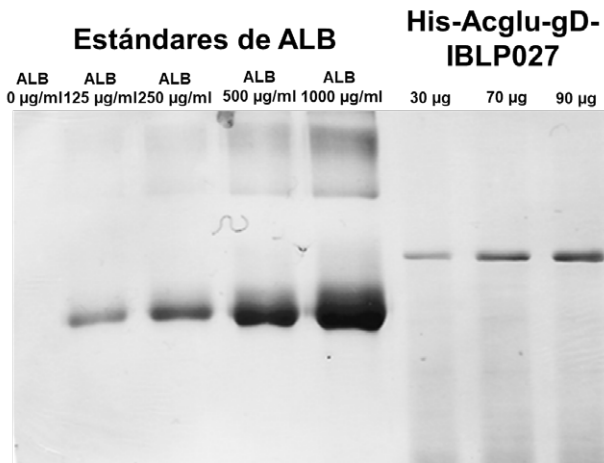
La proteína recombinante His-gD del HSV-2 (45 KDa) se expresó en *E. coli* Rosetta después de la inducción con 1 mM de IPTG, según lo descrito en la literatura²⁴, utilizando los plásmidos pETG-N-RGS-His-gD y pENHAc-N-gD. Las proteínas de la fracción citoplasmática (CN) y de los cuerpos de inclusión (CD) fueron analizadas mediante SDS-PAGE. Encontramos una mayor cantidad de His-gD en condiciones desnaturalizantes (Figura 2A). Esta proteína se purificó con *buffer* urea 8 M usando cromatografía de afinidad Ni-NTA. Su pureza se analizó mediante SDS-PAGE (Figura 2A) y se verificó mediante *Western blot* usando un anticuerpo monoclonal anti-RGS-His de ratón (Figura 2B) y la proteína ORF2 del virus de la hepatitis E (*Hepatitis E virus*: HEV) de 66 KDa como control²⁵.

Además, se establecieron las condiciones óptimas de expresión de la proteína recombinante His-Acglu-gD (75 KDa). Para ello, se indujo la expresión en cultivos de 10 ml usando cuatro concentraciones diferentes de IPTG (0,1; 0,5; 1 y 2 mM) y diferentes tiempos de inducción (2, 3 y

Figura 3. Condiciones óptimas de expresión de His-Acglu-gD.

► SDS-PAGE de His-Acglu-gD (75 KDa) expresada en *E. coli* Rosetta, inducida con las siguientes concentraciones de IPTG: 0,1; 0,5; 1 y 2 mM a 37°C durante 2, 3 o 4 h. La flecha negra indica la condición de inducción seleccionada para los siguientes experimentos.

Figura 4. Unión de la proteína recombinante His-Acglu-gD a las BLP027.



► SDS-PAGE de His-Acglu-gD (75 KDa) expresada en *E. coli* Rosetta después de la inducción con 0,1 mM de IPTG y purificada en condiciones desnaturalizantes (CD), unida a las BLP de *Lactiseibacillus rhamnosus* IBL027. Tres concentraciones diferentes (30, 70 y 90 µg) de la proteína recombinante purificada se unieron a 108 BLP027. La cantidad de proteína unida se determinó en comparación con los estándares de ALB.

4 h). Las proteínas obtenidas en CN y CD, en cada una de las condiciones, fueron analizadas mediante SDS-PAGE. La banda correspondiente a His-Acglu-gD se visualizó en mayor cantidad en CD en todas las condiciones analizadas (Figura 3). Sorpresivamente, se observó una mayor cantidad de proteína luego de 3 h de haber inducido la expresión con IPTG a la menor concentración testada (0,1 mM). Se pudo determinar que un tiempo de inducción de 4 h no aumenta la expresión de la proteína (Figura 3).

Desarrollo de una vacuna de mucosa experimental usando gD como antígeno

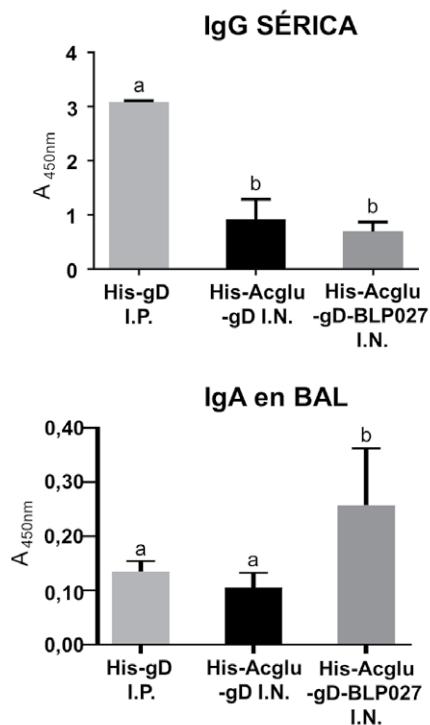
A continuación, se desarrolló una vacuna experimental mediante el uso de una proteína de fusión, resultado del dominio LysM de Acglu, las BLP027 y gD del HSV-2 como antígeno. Para ello, se mezclaron diferentes concentraciones de la proteína recombinante His-Acglu-gD purificada por cromatografía Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific) en condiciones desnaturalizantes (30, 70 o 90 µg de proteína) con las BLP (10^8 partículas) con el objetivo de determinar cuál era la máxima cantidad de proteína que podía unirse a las partículas, ya que, según los resultados obtenidos previamente²¹, una mayor cantidad de antígeno sería capaz de estimular la respuesta inmune celular con mayor eficiencia. Después del lavado, las partículas se sometieron a un análisis por SDS-PAGE y se compararon con estándares de albúmina sérica bovina (ALB). El análisis de la densidad de las bandas realizado con *ImageJ* indicó que 10^8 BLP027 podrían unirse como máximo a 60 µg de His-Acglu-gD (Figura 4). La vacuna experimental se designó *His-Acglu-gD-BLP027*.

Inmunogenicidad de la vacuna experimental basada en gD-BLP027

Para investigar si la vacuna experimental His-Acglu-gD-BLP027 era inmunogénica, realizamos experimentos en ratones adultos inmunocompetentes. Para estandarizar las inmunizaciones, dados los diferentes PM de las proteínas de fusión, elegimos administrar el mismo número de moles (10^{-6}) en cada dosis según lo detallado en la sección "Materiales y Métodos". Diez días después del segundo refuerzo, se analizaron los niveles de IgG específicos en suero, así como los niveles de IgA en BAL por ELISA (Figura 5).

Se observó que His-gD es inmunogénica cuando se administra por vía intraperitoneal con el adyuvante completo de Freund, ya que se detectaron anticuerpos IgG específicos de gD en suero (Figura 5). Además, este protocolo de inmunización también fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en el tracto respiratorio, ya que se encontraron anticuerpos IgA específicos de gD en BAL (Figura 5). La respuesta más potente se observó en el grupo experimen-

Figura 5. Inmunogenicidad de la vacuna experimental His-Acglu-gD-BLP027.



► Los ratones BALB/c de seis semanas de edad se inmunizaron por vía intraperitoneal (I.P.) con His-gD con adyuvante completo de Freund los días 0 (primera dosis), 14 y 28 (refuerzos). Este grupo fue usado como control para las comparaciones. El resto de los ratones fueron vacunados por vía intranasal (I.N.) con His-Acglu-gD o His-Acglu-gD-BLP027. Diez días después del segundo refuerzo, se obtuvieron muestras de suero y BAL para la determinación de anticuerpos específicos IgG e IgA por ELISA. Las placas de poliestireno se sensibilizaron con 3 µg de la proteína His-gD por pocillo. Cada grupo experimental estuvo integrado por 8 ratones. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos. $P < 0,05$ se consideró significativo.

tal que recibió la inmunización intraperitoneal con His-gD asociada al adyuvante completo de Freund, el cual es uno de los adyuvantes conocidos más eficaces, cuyo uso está restringido para humanos (Figura 5). Las inmunizaciones intranasales con His-Acglu-gD y el complejo His-Acglu-gD-BLP027 resultaron en niveles elevados de anticuerpos IgG específicos anti-gD, sin diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, se observó que la vacuna experimental desarrollada en este trabajo tiende a inducir mayores niveles de IgA en BAL en comparación con los grupos de ratones inmunizados con His-Acglu-gD o con el adyuvante de Freund (Figura 5).

Discusión

Diferentes cepas de *Lactobacillus* pueden estimular las respuestas inmunitarias innatas y específicas y, en consecuencia, se han propuesto como vectores de vacunas²⁶. La activación de la respuesta inmune innata está mediada por los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) expresados en las células inmunes que reconocen estructuras moleculares conservadas, los MAMP, que activan la producción de citoquinas, quimioquinas y otros efectores innatos. El reconocimiento de los *Lactobacillus* por el huésped está mediado predominantemente por el receptor TLR2, que reconoce el PG de la pared celular, lo que conduce a la activación y maduración de las células dendríticas²⁷ y a la diferenciación de precursores monocíticos²⁸. Además, la viabilidad de las BL no es necesaria para lograr este efecto inmunomodulador. De hecho, previamente, este equipo de trabajo demostró que las partículas semejantes a bacterias derivadas de la cepa IBLO27 mejoran las respuestas inmunitarias locales y sistémicas, humorales y celulares cuando se administran conjuntamente con una vacuna oral contra el rotavirus¹⁶, con la vacuna contra el virus de la influenza administrada por vía nasal¹⁴ o cuando son usadas como vectores del antígeno modelo Venus²¹. La interacción MAMP-RRP desencadena una respuesta inflamatoria controlada, que es el principal mecanismo de acción observado en las BLP utilizadas como plataformas de liberación de antígenos²⁵.

Tradicionalmente, las especies de *Lactobacillus* se han diseñado con el fin de expresar antígenos virales y bacterianos para inducir respuestas inmunitarias protectoras. Este enfoque tiene un problema regulatorio, ya que genera organismos genéticamente modificados que están estrictamente controlados por entes gubernamentales²⁶. En el sistema que desarrollamos en nuestro laboratorio, los antígenos etiquetados con Acglu, una proteína con dominios LysM, se adhieren pasivamente a la superficie de las BLP027 sin alteración del genotipo y, por lo tanto, sin generación de microorganismos transgénicos. Por esta razón, se espera que las vacunas basadas en esta estrategia de presentación de antígenos tengan un proceso de aprobación más fácil, más rápido y menos costoso. Teniendo esto en cuenta, se estudió si esta estrategia es adecuada para el desarrollo de una vacuna candidata contra el HSV-2.

Los virus del herpes simple son la principal causa de úlceras genitales en todo el mundo y se transmiten principalmente por

vía sexual. La respuesta inmunitaria al HSV-2 típicamente controla la infección mucosa aguda; sin embargo, el virus permanece latente en los ganglios, y hay una excreción esporádica de bajo grado del virus durante toda la vida desde las neuronas sensoriales hacia la mucosa. Por lo tanto, mientras el HSV se esconde de por vida en los ganglios del trigémino, autonómico o de la raíz dorsal, se reactiva y se elimina de manera asintomática, lo que hace que la transmisión sea alta²⁹. La terapia actual incluye tratamiento antivírico episódico para reducir el tiempo de curación y terapia antiviral supresora diaria para reducir la frecuencia de las recurrencias, la diseminación del virus y el riesgo de transmisión³⁰. Por este motivo, las vacunas preventivas o terapéuticas son muy deseables para controlar la infección y/o las enfermedades por herpes³¹. A pesar de los intentos de desarrollar vacunas eficaces contra el HSV-2, actualmente, no hay ninguna vacuna aprobada disponible.

Una vacuna preventiva sería ideal para prevenir la infección activa y la transmisión del virus, lo que evitaría la infección latente de los ganglios de la raíz dorsal, la reactivación y las manifestaciones clínicas que la acompañan. También evitaría las secuelas de la infección primaria y la propagación viral dentro de la población y las complicaciones graves que implica la reactivación³³. Sin embargo, la utilidad de tal vacuna está en duda. La mayoría de las infecciones por herpesvirus ocurren en la adolescencia³⁴, por lo que cualquier vacuna profiláctica solo tendría una utilidad óptima si su administración fuera segura durante la primera infancia. Entonces, podría ser más realista centrarse en vacunas terapéuticas, ya que el propósito de estas vacunas no es solo prevenir la diseminación del virus, sino también destinarlas a personas que ya están infectadas por el virus, con el objetivo de reducir la recurrencia clínica, la duración o gravedad de la misma³². Aunque la mayoría de las vacunas terapéuticas no son tan eficaces para atacar el virus latente, el trabajo reciente en la edición del genoma que involucra endonucleasas autoguiadas y los sistemas CRISPR/cas9 ofrecen un puente para completar la eliminación viral³⁵. Una vacuna terapéutica sería rentable y se administraría de manera más eficiente en comparación con una vacuna profiláctica, dirigida al subconjunto de individuos seropositivos con síntomas clínicos. Si bien la infección por HSV-2 tiene una amplia gama de presentaciones, que varían según el individuo (que van desde asintomáticas hasta complicaciones graves como la queratitis ocular), esta sería una estrategia más eficaz para la prevención de complicaciones clínicas graves en comparación con las vacunas profilácticas³⁴.

Se demostró que gD es la glicoproteína más abundante en el virión y el principal estímulo para la generación de anticuerpos neutralizantes contra el virus, por lo tanto, es importante su estudio para el diseño de vacunas y para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas³⁶. Sin embargo, hasta el momento, los estudios clínicos realizados con candidatos a vacunas contra el HSV-2 han resultado decepcionantes, a pesar de los datos preclínicos prometedores con vacunas diseñadas para provocar respuestas de anticuerpos neutralizantes que se dirigen principalmente contra gD³⁷. A pesar de los estudios

preclínicos prometedores y de un ensayo clínico de fase 3 de parejas serodiscordantes, que demostraron protección en mujeres doblemente seronegativas para HSV-1 y HSV-2 (pero no en hombres), realizados con una vacuna formulada con la proteína recombinante gD-2, un adyuvante patentado de hidróxido de aluminio (alumbre) y monofosforil lípido A, gD2-ASO4 (GlaxoSmithKline, Brentford, Reino Unido), un ensayo de campo posterior no encontró protección contra la infección o enfermedad por HSV-2 en mujeres doblemente seronegativas^{38,39}. La vacuna se administró por vía intramuscular a los 0, 1 y 6 meses.

Otra vacuna que completó los ensayos clínicos de fase I es una cepa de HSV-2 defectuosa en la replicación, con dos genes involucrados en la replicación viral eliminados (UL5 y UL29), denominada *dI5-29 (HSV529)*, Sanofi Pasteur, Lyon, Francia⁴⁰. En estudios preclínicos, la vacuna fue segura, indujo respuestas robustas de anticuerpos y células T y redujo el establecimiento de latencia en los nervios periféricos^{40,41}. El estudio de fase I, donde se administró HSV529 o placebo mediante inyección intramuscular los días 0, 30 y 180, también encontró que la vacuna era segura y provocó un aumento de >4 veces en las respuestas de anticuerpos en participantes seronegativos para HSV, pero no, un aumento sostenido en las respuestas de anticuerpos en participantes seropositivos. Además, solo un subconjunto de participantes tuvo respuestas significativas de células T CD4 e incluso, menos CD8^{40,41}.

Actualmente, existe un impulso para examinar el potencial de otros adyuvantes y rutas de inmunización para lograr alcanzar una respuesta inmune protectora contra el herpes genital.

Por otro lado, la inmunogenicidad de una vacuna se ve afectada por la forma en que se presentan los antígenos virales (virus atenuado, con replicación defectuosa, de ciclo único, virus inactivado o subunidad de proteína con adyuvante), así como la dosis y la vía de administración. La vía de inmunización se basa a menudo en consideraciones pragmáticas más que inmunológicas. Las vacunas inactivadas pueden ser más inmunogénicas cuando se administran por vía intradérmica, por ejemplo, debido a la abundancia de células inmunoestimuladoras como las células dendríticas en la dermis³⁷.

Se demostró en estudios experimentales en animales y humanos que la inmunización nasal es un medio eficaz para inducir respuestas de memoria celular y de anticuerpos contra antígenos en el tracto respiratorio, así como en la mucosa del tracto genital⁴². Sin embargo, la vacuna contra la influenza viva atenuada Flumist® es actualmente la única vacuna nasal autorizada. Se han propuesto diferentes adyuvantes y sistemas de administración para el desarrollo de nuevas vacunas nasales eficaces. No obstante, los esfuerzos previos en humanos con adyuvantes experimentales derivados de toxinas para la inmunización nasal han fracasado debido a los casos notificados de parálisis facial transitoria (parálisis de Bell) después de la vacunación nasal⁴². Por lo tanto, la seguridad de los nuevos inmunoestimuladores diseñados para la administración nasal en humanos debe evaluarse a fondo.

Los adyuvantes actualmente aprobados están restringidos,

en gran medida, para promover respuestas a las rutas parenterales de inmunización. Sin embargo, la próxima generación de vacunas requerirá la inclusión de adyuvantes que también den lugar a potentes respuestas celulares de tipo Th1 que puedan contribuir significativamente a la inmunidad contra infecciones por patógenos intracelulares. Las nuevas estrategias de vacunación deben usar adyuvantes que estimulen las respuestas mucosas y sistémicas a través de diferentes rutas de inmunización³⁷.

En este trabajo, se evaluó la capacidad de la construcción His-Acglu-gD-BLP027 para inducir respuestas inmunes específicas cuando se administra por vía nasal a ratones adultos inmunocompetentes. La proteína recombinante His-Acglu-gD, administrada por la misma vía, se usó para las comparaciones. Se observó que la inmunización nasal con His-Acglu-gD-BLP027 fue eficaz para estimular las respuestas inmunes humorales, respiratorias y sistémicas, lo cual fue demostrado por el aumento de los niveles de anticuerpos específicos en BAL y en las muestras de suero de los ratones vacunados. El complejo His-Acglu-gD-BLP027 incrementó los niveles de IgA específica en BAL, sin embargo, los niveles de anticuerpos séricos en ratones tratados con His-Acglu-gD no fueron estadísticamente diferentes de los observados en los ratones que recibieron el complejo con las BLP027 por vía nasal. Cabe recordar que la exhibición de proteínas implica una compensación entre una alta exposición, que mejorará las interacciones con las CPA, y una baja exposición, que protegerá la proteína mostrada. El grado de exposición y su efecto sobre la inmunogenicidad no se puede medir ni racionalizar¹⁰. De hecho, el uso del sistema de anclaje propuesto en este trabajo puede resultar en respuestas del hospedador claramente diferentes⁴³; esto debe tenerse en cuenta al diseñar estrategias de entrega basadas en BLP.

Existen estudios en donde la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano-16 (*human papillomavirus: HPV-16*) se ha mostrado con éxito en la superficie de *L. lactis*, y la inmunización intranasal de ratones C57BL/6 con las bacterias recombinantes indujo una respuesta inmune específica para E7⁴⁴. Basándose en estos resultados, Ribelles *et al.* exploraron la posibilidad de generar una BAL no modificada genéticamente que muestre la oncoproteína. Para lograr esto, E7 se unió a la superficie de *L. lactis* o *L. casei* (no recombinante). La administración de estas cepas provocó una respuesta inmune débil en comparación con las respuestas observadas para las cepas modificadas genéticamente⁴⁵. Este estudio muestra claramente que la localización del antígeno juega un papel importante, pero no revela una tendencia general sobre qué tipo de localización es más prometedora o sobre cuál será la respuesta inmune inducida.

Por otro lado, recientemente, se ha demostrado que el dominio LysM es un agonista del TLR2 y que actúa como adyuvante: los dominios LysM mezclados o fusionados con antígenos pueden provocar respuestas inmunes robustas contra los mismos⁴⁶. Este efecto parece ser independiente de cualquier activación de células T o de la presencia de epítomos de células T, que es para lo que se utilizan a menudo los adyuvantes de

proteínas. Además, se ha identificado que los dominios LysM son capaces de aumentar la inmunogenicidad de los antígenos que se coadministran o se unen a ellos y también, de aumentar los títulos de anticuerpos funcionales específicos para dichos inmunógenos^{18,46}. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria potenciada, provocada por los adyuvantes inmunológicos LysM no es una respuesta proinflamatoria genérica, sino una respuesta específica que es útil para adyugar vacunas. Es así como nuestros resultados sugieren que para algunos antígenos se podría prescindir del uso de las BLP porque, al fusionarlos con el dominio Acglu, se obtiene una respuesta inmune humoral sistémica semejante a la formulación con las partículas. Aunque es necesario realizar nuevos estudios para profundizar en este punto y para evaluar si ajustando ciertos parámetros como la dosis o el esquema de inmunización se puede obtener un efecto similar en la producción de anticuerpos en las mucosas, el uso del dominio LysM como adyuvante simplificaría el proceso de preparación de la vacuna y disminuiría los costos de la misma.

Además, los esplenocitos de los ratones tratados con este complejo produjeron niveles más altos de TNF- α e IFN- γ en respuesta a la estimulación con el antígeno específico en comparación con los otros grupos (datos no mostrados). Estos resultados indican que la vacuna experimental probada es capaz de inducir una respuesta inmune celular mediada por linfocitos Th1. Estos hallazgos son importantes, ya que diversos estudios han demostrado que, aunque los anticuerpos, especialmente de tipo IgG, contribuyen significativamente a la protección contra el herpes genital, la inmunidad protectora contra el HSV-2 se correlaciona con el desarrollo de una respuesta potente por parte de las células T CD4⁺ o CD8⁺ y del IFN- γ , ya que pueden reducir la gravedad de la infección primaria producida en ratones, eliminar el virus del sistema nervioso y protegerlos contra la reactivación *ex vivo*³⁰. Sin embargo, no todas las vacunas administradas por vía intranasal son capaces de estimular respuestas inmunes celulares. En este sentido, se realizaron estudios en donde se probó la capacidad del adyuvante IC31[®] en combinación con la glicoproteína D del HSV-2 para inducir inmunidad protectora contra la infección por herpes genital en ratones C57BL/6 luego de administrarlo a través de las vías intranasal, intradérmica o subcutánea. La inmunización con gD más IC31[®] a través de las tres rutas desarrolló respuestas elevadas de anticuerpos vaginales y séricos específicos con actividad neutralizante de HSV-2. Sin embargo, solo la inmunización intradérmica dio como resultado una significativa respuesta a IFN- γ esplénico⁴⁷.

Aunque el tracto genital es un componente del sistema inmune de las mucosas, presenta características únicas, que no comparte con otros tejidos mucosos, y secreciones externas típicas. Tanto los tejidos del tracto genital masculino como femenino carecen de sitios mucosos inductivos, análogos a las placas de Peyer intestinales. En consecuencia, las respuestas inmunes humorales y celulares locales, estimuladas por infecciones genitales son débiles o están ausentes, y las inmunizaciones intravaginales repetidas solo dan como resultado respuestas humorales mínimas⁴². En línea con esta observación,

varios estudios han documentado el valor de la inmunización nasal para montar inmunidad protectora contra el herpes genital en ratones⁴⁸. Por ejemplo, la inmunización por vía intranasal con gD combinada con una serie de adyuvantes de probada eficacia como la emulsión de aceite en agua MF59, las micropartículas de poli[D,L-lactida-co-glicólido] (PLG) (encapsuladas o coadministradas), los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) (incorporados o coadministrados con iscomatrix) y la enterotoxina desintoxicada de *E. coli* LT-K63 indujeron respuestas de anticuerpos IgA de mucosas (lavado nasal, saliva y lavado vaginal) que fueron mayores que las inducidas por la administración intramuscular de gD con MF59. La inmunización intranasal con estas formulaciones también indujo niveles sustanciales de IgG en suero y anticuerpos neutralizantes⁴⁹. Otros estudios probaron que la inmunización intranasal con gD en combinación con alfa-galactosilceramida (alfa-GalCer) provoca una fuerte respuesta sistémica de IgG específica de gD, así como una respuesta linfoproliferativa con un perfil mixto de citoquinas Th1/Th2 en el bazo, los ganglios linfáticos mediastínicos y los ganglios linfáticos genitales, y potentes respuestas linfoproliferativas e IFN- γ específicos de gD en los ganglios linfáticos genitales y en el bazo⁵⁰. La vacuna experimental His-Acglu-gD-BLP027 presentada en este trabajo, administrada a ratones adultos inmunocompetentes por vía intranasal fue eficaz para estimular las respuestas inmunes humorales, respiratorias y sistémicas y para inducir una fuerte respuesta inmune celular mediada por linfocitos Th1. Desde el punto de vista de la aplicación, el dominio LysM puede sacarse de su contexto natural y fusionarse con otras proteínas. Por lo tanto, la plataforma presentada en este trabajo permitiría unir cualquier proteína o péptido de interés al PG de las bacterias Gram positivas. Aunque es necesario realizar más estudios, esto abre la posibilidad al desarrollo de vacunas de mucosas multivalentes que permitirán aprovechar la capacidad adyuvante de las BLP optimizando los costos de producción y facilitando la administración de las mismas a la población. Además, como se demostró previamente²¹, la presentación de proteínas recombinantes en la superficie de las IBLP es una excelente estrategia por razones relacionadas con la estabilidad y la accesibilidad de la proteína presentada.

Por otro lado, las BLP derivadas de *L. lactis* con el dominio de unión al PG AcmA se evaluaron ampliamente como portadoras de antígenos respiratorios e intestinales, y se obtuvieron respuestas inmunes mucosas, específicas de dichos antígenos⁵¹. Sabiendo que las BLP se pueden usar de dos maneras: como adyuvantes al mezclarlas con los antígenos o como portadoras cuando el antígeno se une a su superficie a través de una etiqueta de unión al PG, Bi *et al.* Diseñaron una vacuna de administración nasal contra el HIV tipo 1 (HIV-1)⁸. En este estudio, unieron trímeros de la proteína gp120 del HIV-1 a la superficie de las BLP utilizando AcmA o mezclaron la proteína gp120 con las partículas, y se usaron dos vías, intramuscular o intranasal, para inmunizar ratones y cobayas. Encontraron que ambas formulaciones indujeron IgG específica de gp120, pero solo el antígeno unido a las BLP como vehículo de administración indujo

con éxito IgA mucosa en ratones, no solo en la cavidad nasal, sino también en los sitios de la mucosa vaginal y rectal. Además, los lavados nasales de cobayas inmunizadas con gp120 unida a las BLP pudieron neutralizar pseudovirus del HIV-1 de nivel 1⁸. Esto indica que la unión de trímeros de gp120 a las BLP es una buena estrategia para inducir respuestas inmunes humorales y mucosas y que las BLP utilizadas como portadores de los trímeros de gp120 en su superficie inducen mejores respuestas inmunitarias de la mucosa que las BLP mezcladas con los trímeros de esta proteína.

Si bien en este trabajo se valoró la producción de anticuerpos sistémicos y del tracto respiratorio específicos para gD, es necesario continuar con más estudios que evalúen los niveles de anticuerpos presentes en la mucosa genital, su capacidad de neutralización viral y la capacidad protectora de la vacuna frente a un desafío con HSV-2.

Se requiere una vacuna que, administrada por vía intranasal, pueda activar el sistema inmunológico estimulando los sitios mucosos distantes. Los resultados aquí obtenidos y los antecedentes mencionados nos permiten proponer la plataforma constituida por Acglu-BLP027 como una herramienta prometedora para la generación de vacunas mucosas que estimulen no solo la inmunidad local, sino que también potencien la respuesta inmune en sitios mucosos distantes.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada con becas competitivas de la Fundación Allende y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2016-0853) de la Dra. María Guadalupe Vizoso Pinto y (PICT-2016-0410) del Dr. Julio Villena.

Conflicto de interés

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Kardani K, Basimi P, Fekri M, Bolhassani A. Antiviral therapy for the sexually transmitted viruses: recent updates on vaccine development. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2020;13(9):1001-46. doi:10.1080/17512433.2020.1814743
- Johnston C, Gottlieb SL, Wald A. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine.* 2016;34(26):2948-52. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.076
- Spicknall IH, Looker KJ, Gottlieb SL, Chesson HW, Schiffer JT, Elmes J, et al. Review of mathematical models of HSV-2 vaccination: Implications for vaccine development. *Vaccine.* 2019;37(50):7396-407. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.067
- Stinn T, Kuntz S, Varon D, Huang ML, Selke S, Njikan S, et al. Subclinical Genital Herpes Shedding in HIV/Herpes Simplex Virus 2-Coinfected Women during Antiretroviral Therapy Is Associated with an Increase in HIV Tissue Reservoirs and Potentially Promotes HIV Evolution. *J Virol.* 2020;95(1). doi:10.1128/JVI.01606-20
- LaTourette PC, 2nd, Awasthi S, Desmond A, Pardi N, Cohen GH, Weissman D, et al. Protection against herpes simplex virus type 2 infection in a neonatal murine model using a trivalent nucleoside-modified mRNA in lipid nanoparticle vaccine. *Vaccine.* 2020;38(47):7409-13. doi:10.1016/j.vaccine.2020.09.079
- Byrne CM, Gantt S, Coombs D. Effects of spatiotemporal HSV-2 lesion dynamics and antiviral treatment on the risk of HIV-1 acquisition. *PLoS Comput Biol.* 2018;14(4):e1006129. doi:10.1371/journal.pcbi.1006129
- Egan KP, Hook LM, Naughton A, Pardi N, Awasthi S, Cohen GH, et al. An HSV-2 nucleoside-modified mRNA genital herpes vaccine containing glycoproteins gC, gD, and gE protects mice against HSV-1 genital lesions and latent infection. *PLoS Pathog.* 2020;16(7):e1008795. doi:10.1371/journal.ppat.1008795
- Bi J, Li F, Zhang M, Wang H, Lu J, Zhang Y, et al. An HIV-1 vaccine based on bacterium-like particles elicits Env-specific mucosal immune responses. *Immunol Lett.* 2020;222:29-39. doi:10.1016/j.imlet.2020.03.002
- Sato A, Suwanto A, Okabe M, Sato S, Nochi T, Imai T, et al. Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. *J Virol.* 2014;88(23):13699-708. doi:10.1128/JVI.02279-14
- Lykke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):592-605. doi:10.1038/nri3251
- Villena J, Chiba E, Tomosada Y, Salva S, Marranzino G, Kitazawa H, et al. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunol.* 2012;13:53. doi:10.1186/1471-2172-13-53
- Villena J, Medina M, Vintini E, Alvarez S. Stimulation of respiratory immunity by oral administration of *Lactococcus lactis*. *Can J Microbiol.* 2008;54(8):630-8. doi:10.1139/w08-052
- Villena J, Racedo S, Aguero G, Bru E, Medina M, Alvarez S. *Lactobacillus casei* improves resistance to pneumococcal respiratory infection in malnourished mice. *J Nutr.* 2005;135(6):1462-9. doi:10.1093/jn/135.6.1462
- Tonetti FR, Islam MA, Vizoso-Pinto MG, Takahashi H, Kitazawa H, Villena J. Nasal priming with immunobiotic lactobacilli improves the adaptive immune response against influenza virus. *Int Immunopharmacol.* 2020;78:106115. doi:10.1016/j.intimp.2019.106115
- Villena J, Barbieri N, Salva S, Herrera M, Alvarez S. Enhanced immune response to pneumococcal infection in malnourished mice nasally treated with heat-killed *Lactobacillus casei*. *Microbiol Immunol.* 2009;53(11):636-46. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00171.x
- Raya Tonetti F, Arce L, Salva S, Alvarez S, Takahashi H, Kitazawa H, et al. Immunomodulatory Properties of Bacterium-Like Particles Obtained From Immunobiotic Lactobacilli: Prospects for Their Use as Mucosal Adjuvants. *Front Immunol.* 2020;11:15. doi:10.3389/fimmu.2020.00015.
- Visweswaran GR, Leenhouts K, van Roosmalen M, Kok J, Buist G. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(10):4331-45. doi:10.1007/s00253-014-5633-7.
- van Roosmalen ML, Kanninga R, El Khattabi M, Neef J, Audouy S, Bosma T, et al. Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods.* 2006;38(2):144-9. doi:10.1016/j.jmeth.2005.09.015.
- Bosma T, Kanninga R, Neef J, Audouy SA, van Roosmalen ML, Steen A, et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(1):880-9. doi:10.1128/AEM.72.1.880-889.2006.
- Van Braeckel-Budimir N, Hajjema BJ, Leenhouts K. Bacterium-like particles for efficient immune stimulation of existing vaccines and new subunit vaccines in mucosal applications. *Front Immunol.* 2013;4:282. doi:10.3389/fimmu.2013.00282.
- Raya-Tonetti F, Muller M, Sacur J, Kitazawa H, Villena J, Vizoso-Pinto MG. Novel LysM motifs for antigen display on lactobacilli for mucosal immunization. *Sci Rep.* 2021;11(1):21691. doi:10.1038/s41598-021-01087-8.
- Osterman A, Vizoso Pinto MG, Haase R, Nitschko H, Jager S, Sander M, et al. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Virology journal.* 2012;9:28. doi:10.1186/1743-422X-

- 9-28.
23. Vizoso Pinto MG, Pfrepper KI, Janke T, Noelting C, Sander M, Lueking A, et al. A systematic approach for the identification of novel, serologically reactive recombinant Varicella-Zoster Virus (VZV) antigens. *Virology journal*. 2010;7:165. doi: 10.1186/1743-422X-7-165.
 24. Domingo C, Gadea I, Pardeiro M, Castilla C, Fernandez S, Fernandez-Clua MA, et al. Immunological properties of a DNA plasmid encoding a chimeric protein of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B and glycoprotein D. *Vaccine*. 2003;21(25-26):3565-74. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00423-7.
 25. Arce LP, Raya Tonetti MF, Raimondo MP, Muller MF, Salva S, Alvarez S, et al. Oral Vaccination with Hepatitis E Virus Capsid Protein and Immunobiotic Bacterium-Like Particles Induce Intestinal and Systemic Immunity in Mice. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019. doi: 10.1007/s12602-019-09598-7.
 26. LeCureux JS, Dean GA. Lactobacillus Mucosal Vaccine Vectors: Immune Responses against Bacterial and Viral Antigens. *mSphere*. 2018;3(3). doi: 10.1128/mSphere.00061-18.
 27. Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SC, Singh SK, Valence F, et al. S layer protein A of Lactobacillus acidophilus NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19474-9. doi: 10.1073/pnas.0810305105.
 28. Song J, Lang F, Zhao N, Guo Y, Zhang H. Vaginal Lactobacilli Induce Differentiation of Monocytic Precursors Toward Langerhans-like Cells: in Vitro Evidence. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2437. doi: 10.3389/fimmu.2018.02437. eCollection 2018.
 29. Chentoufi AA, Dhanushkodi NR, Srivastava R, Prakash S, Coulon PA, Zayou L, et al. Combinatorial Herpes Simplex Vaccine Strategies: From Bedside to Bench and Back. *Front Immunol*. 2022;13:849515. doi: 10.3389/fimmu.2022.849515. eCollection 2022.
 30. Bernstein DI, Flechtner JB, McNeil LK, Heineman T, Oliphant T, Tasker S, et al. Therapeutic HSV-2 vaccine decreases recurrent virus shedding and recurrent genital herpes disease. *Vaccine*. 2019;37(26):3443-50. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.05.009.
 31. Schiffer JT, Swan DA, Corey L, Wald A. Rapid viral expansion and short drug half-life explain the incomplete effectiveness of current herpes simplex virus 2-directed antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(12):5820-9. doi: 10.1128/AAC.01114-13.
 32. Kardani K, Basimi P, Fekri M, Bolhassani A. Antiviral therapy for the sexually transmitted viruses: recent updates on vaccine development. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2020;1:46. doi: 10.1080/17512433.2020.1814743.
 33. Krishnan R, Stuart PM. Developments in Vaccination for Herpes Simplex Virus. *Front Microbiol*. 2021;12:798927. doi: 10.3389/fmicb.2021.798927.
 34. Ames C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KM, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 2020;98(5):315-29. doi: 10.2471/BLT.19.237149.
 35. Zhang I, Hsiao Z, Liu F. Development of Genome Editing Approaches against Herpes Simplex Virus Infections. *Viruses*. 2021;13(2). doi: 10.3390/v13020338.
 36. Du R, Wang L, Xu H, Wang Z, Zhang T, Wang M, et al. A novel glycoprotein D-specific monoclonal antibody neutralizes herpes simplex virus. *Antiviral Res*. 2017;147:131-41. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.10.013.
 37. Burn Aschner C, Pierce C, Knipe DM, Herold BC. Vaccination Route as a Determinant of Protective Antibody Responses against Herpes Simplex Virus. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(2). doi: 10.3390/vaccines8020277.
 38. Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DI, Mindel A, Sacks S, et al. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med*. 2002;347(21):1652-61. doi: 10.1056/NEJMoa011915.
 39. Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, Wald A, Levin MJ, Stapleton JT, et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med*. 2012;366(1):34-43. doi: 10.1056/NEJMoa1103151.
 40. Dropulic LK, Oestreich MC, Pietz HL, Laing KJ, Hunsberger S, Lombard K, et al. A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Phase 1 Study of a Replication-Defective Herpes Simplex Virus (HSV) Type 2 Vaccine, HSV529, in Adults With or Without HSV Infection. *J Infect Dis*. 2019;220(6):990-1000. doi: 10.1093/infdis/jiz225.
 41. Bernard MC, Barban V, Pradezynski F, de Montfort A, Ryall R, Caillet C, et al. Immunogenicity, protective efficacy, and non-replicative status of the HSV-2 vaccine candidate HSV529 in mice and guinea pigs. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121518. doi: 10.1371/journal.pone.0121518.
 42. Mestecky J, Moldoveanu Z, Russell MW. Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development. *Am J Reprod Immunol*. 2005;53(5):208-14. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00267.x.
 43. Michon C, Langella P, Eijsink VG, Mathiesen G, Chatel JM. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microbial cell factories*. 2016;15:70. doi: 10.1186/s12934-016-0468-9.
 44. Cortes-Perez NG, Bermudez-Humaran LG, Le Loir Y, Rodriguez-Padilla C, Gruss A, Saucedo-Cardenas O, et al. Mice immunization with live lactococci displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;229(1):37-42. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00778-X.
 45. Ribelles P, Benbouziane B, Langella P, Suarez JE, Bermudez-Humaran LG. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013;97(3):1231-9. doi: 10.1007/s00253-012-4575-1.
 46. Altindis Edo U, Liberatori S, Soldani E. *Inventor Vaccine adjuvants 2015*.
 47. Cuburu N, Wang K, Goodman KN, Pang YY, Thompson CD, Lowy DR, et al. Topical herpes simplex virus 2 (HSV-2) vaccination with human papillomavirus vectors expressing gB/gD ectodomains induces genital-tissue-resident memory CD8+ T cells and reduces genital disease and viral shedding after HSV-2 challenge. *J Virol*. 2015;89(1):83-96. doi: 10.1128/JVI.02380-14.
 48. Wizel B, Persson J, Thorn K, Nagy E, Harandi AM. Nasal and skin delivery of IC31((R))-adjuvanted recombinant HSV-2 gD protein confers protection against genital herpes. *Vaccine*. 2012;30(29):4361-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.019.
 49. Uguzzoli M, O'Hagan DT, Ott GS. Intranasal immunization of mice with herpes simplex virus type 2 recombinant gD2: the effect of adjuvants on mucosal and serum antibody responses. *Immunology*. 1998;93(4):563-71. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00441.x.
 50. Lindqvist M, Persson J, Thorn K, Harandi AM. The mucosal adjuvant effect of alpha-galactosylceramide for induction of protective immunity to sexually transmitted viral infection. *Journal of immunology*. 2009;182(10):6435-43. doi: 10.4049/jimmunol.0900136.
 51. Lu J, Hou H, Wang D, Leenhouts K, Roosmalen MLV, Sun T, et al. Systemic and mucosal immune responses elicited by intranasal immunization with a pneumococcal bacterium-like particle-based vaccine displaying pneumolysin mutant Plym2. *Immunology letters*. 2017;187:41-6. doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.003.







Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International. Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.

ARTÍCULO ORIGINAL

Bacterias anaerobias aisladas en muestras clínicas de un hospital de adultos de Chaco, Argentina

Anaerobic bacteria isolated from clinical samples from an adult hospital in Chaco, Argentina

Gritti, Micaela Andrea ^{1*}; Melo Favalesso, Maríla ¹; Fernández, Mariana Soledad ²; Peichoto, María Elisa ¹

¹Laboratorio de Bioquímica, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) - ANLIS "Dr. Carlos G Malbrán". Puerto Iguazú, Misiones, Argentina.

²Laboratorio de Microbiología, Hospital "Dr. Julio C. Perrando". Resistencia, Chaco, Argentina.

*Contacto: Gritti, Micaela Andrea. Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT), Almafuerie y Ámbar s/n, CP: 3370, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina; micagritti@gmail.com.

Resumen

Introducción: Las bacterias anaerobias ocupan diferentes nichos ecológicos y regulan la respuesta inmune innata del huésped; sin embargo, algunas de ellas se consideran patógenos oportunistas, ya que pueden invadir y producir daño. **Objetivo:** Determinar la prevalencia de bacterias anaerobias en muestras clínicas de pacientes internados y ambulatorios en el Hospital (de adultos) "Dr. Julio C. Perrando" de la ciudad de Resistencia (Chaco, Argentina) durante el período de abril del 2017 a agosto del 2018. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y, a la vez, experimental y prospectivo identificando muestras enviadas para cultivo en anaerobiosis. **Resultados:** Se analizaron 419 muestras provenientes de los diferentes servicios del nosocomio. En 46 de ellas (11%), se determinó la presencia de microorganismos anaerobios; predominaron las muestras de pacientes de sexo femenino (88 %) tomadas de cavidades uterinas (33 %) y heridas quirúrgicas (23 %) y provenientes de la sala de ginecología (66 %). Solo un 7 % de las coloraciones de Gram fue compatible con bacterias anaerobias y 13 % tuvo cultivo bacteriológico positivo; de estas últimas, el 86 % correspondió a bacterias estrictamente anaerobias. El género aislado con mayor frecuencia fue *Prevotella* spp. (56 %), predominantemente a partir de muestras ginecológicas (66 %). **Conclusión:** En este estudio, se reveló una prevalencia del 11 % de bacterias anaerobias en muestras clínicas de uno de los principales hospitales públicos del noreste de Argentina; se destaca *Prevotella* spp. como patógeno oportunista que debe considerarse para adaptar el tratamiento empírico al perfil epidemiológico local.

Palabras clave: infección, anaerobios, *Prevotella*, vigilancia epidemiológica.

Abstract

Introduction: Anaerobic bacteria occupy different ecological niches and regulate the innate immune response of the host; however, some of them are considered opportunistic pathogens as they can invade and cause damage. **Objective:** To determine the prevalence of anaerobic bacteria in clinical samples from both hospitalized and ambulatory patients at the Dr. J.C. Perrando Hospital, located in the city of Resistencia (Chaco, Argentina), during the period April 2017 - August 2018. **Materials and methods:** A retrospective observational and prospective experimental study was carried out, identifying samples sent for culture in anaerobiosis. **Results:** Four hundred and nineteen samples from different services of this hospital were analyzed. The presence of anaerobic microorganisms was determined in forty-six of them (11%), predominantly female patient samples (88%), taken from uterine cavities (33%) and surgical wounds (23%), and from the gynecology room (66%). Only 7% of the Gram stains were compatible with anaerobes and 13% yielded positive bacterial cultures; of the latter, 86% corresponded to strictly anaerobic bacteria. The genus most frequently isolated was *Prevotella* spp. (56%), predominantly from gynecological samples (66%). **Conclusion:** This study revealed an eleven percent prevalence of anaerobic bacteria in clinical samples from one of the main public hospitals in northeastern Argentina, and *Prevotella* spp. highlighted as an opportunistic pathogen to be considered to adapt empirical treatment to the local epidemiological profile.

Key words: Infection; Anaerobes; *Prevotella*; Epidemiological surveillance.

Introducción

En el ámbito mundial, las bacterias anaerobias son consideradas como verdaderos patógenos en numerosas infecciones graves, sin embargo, en pocas oportunidades, se realizan pruebas de identificación y susceptibilidad antibiótica de aislamientos en laboratorios de rutina¹. Las infecciones por bacterias anaerobias son, en general, endógenas y pocas veces, de origen exógeno. La mayoría se desarrolla cerca de las mucosas [orofaringe, piel, intestino y tracto genital femenino]³, donde los anaerobios predominan como parte de la microbiota habitual. Las bacterias anaerobias son aquellas que solo pueden desarrollarse en ausencia de oxígeno (<0,5 %) y bajo condiciones de potenciales redox muy reducidas. Si bien la mayoría de las especies anaerobias que habitan la piel y mucosas del cuerpo humano sobreviven bajo condiciones estrictas de anaerobiosis, los anaerobios que producen infecciones con mayor frecuencia en humanos son generalmente aerotolerantes, es decir, que pueden tolerar un 2 a 8 % de oxígeno (ej. *Bacteroides fragilis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*). Esta condición les permite sobrevivir por un tiempo en presencia de oxígeno, pero no pueden replicarse².

La superficie mucosa y epitelial del cuerpo humano está colonizada por bacterias anaerobias en distinta concentración, según el lugar de colonización, desde 10³ UFC/g en la piel a 10¹¹⁻¹³ UFC/g en la materia fecal. La relación aerobio - anaerobio es variable según la localización, por ejemplo, 10³:1 en la piel y 1:10³ en el colon³. Las bacterias anaerobias colonizan la cavidad oral, el tracto gastrointestinal, la vagina y el tracto genitourinario².

En Argentina, el primer consenso para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de bacterias anaerobias de importancia clínica en humanos se llevó a cabo en Buenos Aires hacia finales de 2011. Son varios los géneros relacionados con infecciones en humanos^{3,4} y, con el correr del tiempo, van surgiendo nuevas especies y modificaciones en la nomenclatura de estas bacterias. Por medio de la identificación genotípica como procedimiento complementario o alternativo, se consigue una mayor rapidez y precisión en la identificación de algunas bacterias. Sin embargo, no todos los laboratorios cuentan con la identificación por métodos moleculares y, en algunos casos, estos no son necesarios porque se logra una identificación confiable y rápida con los métodos fenotípicos. Es por ello que, en la actualidad, se continúa realizando la identificación de los aislamientos clínicos por medio del estudio de características microscópicas, macroscópicas y fenotípicas⁴.

Considerando que es importante avanzar en el entendimiento de la epidemiología local de bacterias anaerobias, este estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de bacterias anaerobias en muestras clínicas de pacientes internados y ambulatorios en el Hospital "Dr. Julio C. Perrando" de la ciudad de Resistencia (Chaco, Argentina) durante el período de abril de 2017 a agosto de 2018.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional, retro-prospectivo. Se analizó la base de datos del Servicio de Microbiología del Hospital "Dr. Julio C. Perrando" para identificar las muestras de pacientes adultos con sospecha clínica de infección por bacterias anaerobias y/o mixta, enviadas para cultivo en anaerobiosis, desde abril de 2017 hasta mayo de 2018.

Entre junio de 2018 y agosto del mismo año, se recolectaron muestras que fueron tomadas en las distintas salas (Ginecología, Guardia y Emergencia, Clínica Médica, Odontología, Consultorios Externos y Traumatología) del hospital y derivadas al Servicio de Microbiología en frascos de anaerobiosis (caldo de tioglicolato sin indicador, suplementado con vitamina K1, hemina y CO₂) para su posterior estudio. Se utilizaron medios de cultivo selectivos y no selectivos: agar Brucella suplementado con hemina y vitamina K1 más el agregado de gentamicina o ampicilina (BRU c/ATB) para inhibir el desarrollo de microorganismos anaerobios facultativos y agar Brucella suplementado con hemina y vitamina K1, pero sin el agregado de antibióticos (BRU s/ATB), para el aislamiento de las diversas colonias e identificación de las mismas, respectivamente. También se usó un medio líquido para reserva, que se suministró al médico para que directamente hiciera la toma de muestra. Para la confirmación del carácter anaerobio y la tolerancia al oxígeno de las distintas colonias estudiadas, se utilizó agar chocolate incubado en aerobiosis (la ausencia de desarrollo en estas placas confirma que se trata de una bacteria anaerobia).

Para el procesamiento de las muestras, se verificó que hubieran sido remitidas al laboratorio en frascos de anaerobiosis y sembradas en BRU C/ATB recientemente preparado y en agar chocolate. Luego, se realizó la coloración de Gram tomada directamente del frasco de anaerobiosis y se observó en el microscopio. Esto permitió sospechar una morfología compatible con anaerobios y orientar el tratamiento empírico.

Las placas de BRU C/ATB sembradas se colocaron en una jarra con generadores comerciales de anaerobiosis (GENbag anaer, bioMérieux SA), se incubaron a 37°C durante un mínimo de 48 h y un máximo de 7 días. Las placas de agar chocolate sembradas se incubaron en aerobiosis a 37°C, solo para control aeróbico. Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron las placas de la jarra, se realizó la descripción macroscópica de cada colonia (tamaño, forma, bordes, color, opacidad y alguna otra característica importante como *pitting*, pigmento o hemólisis) y la coloración de Gram para luego observarlas microscópicamente con objetivo de 100x. También se realizó incubación anaerobia de subcultivos de cada colonia en BRU S/ATB para realizar pruebas rápidas de identificación. En estas placas, se colocaron discos de vancomicina (5 µg), colistina (10 µg), kanamicina (1000 µg) y bilis al 20 %. Para los cocos Gram positivos se agregó la prueba de sensibilidad al polianetol sulfonato de sodio (PSS, disco con 1000 µg). A cada colonia, también se le realizó la prueba de catalasa, indol, nitrato y esculina para

poder entrar a las tablas de identificación con base en el perfil de discos obtenidos y resultados de las pruebas rápidas³, a la vez que se llevó a cabo la confirmación del carácter anaerobio y la tolerancia al oxígeno sembrándolas en agar chocolate. Las placas fueron incubadas a 37°C en aerobiosis.

Se usó una base de datos anonimizada para el análisis de los datos prospectivos y retrospectivos. Las frecuencias de las categorías de las variables se compararon y clasificaron mediante la prueba de χ^2 y *posthoc* de los residuos ajustados ($\alpha = 0.05$), utilizando el lenguaje R [versión 4.2.0] y el paquete *Tidyverse* [versión 1.3.1].

Resultados

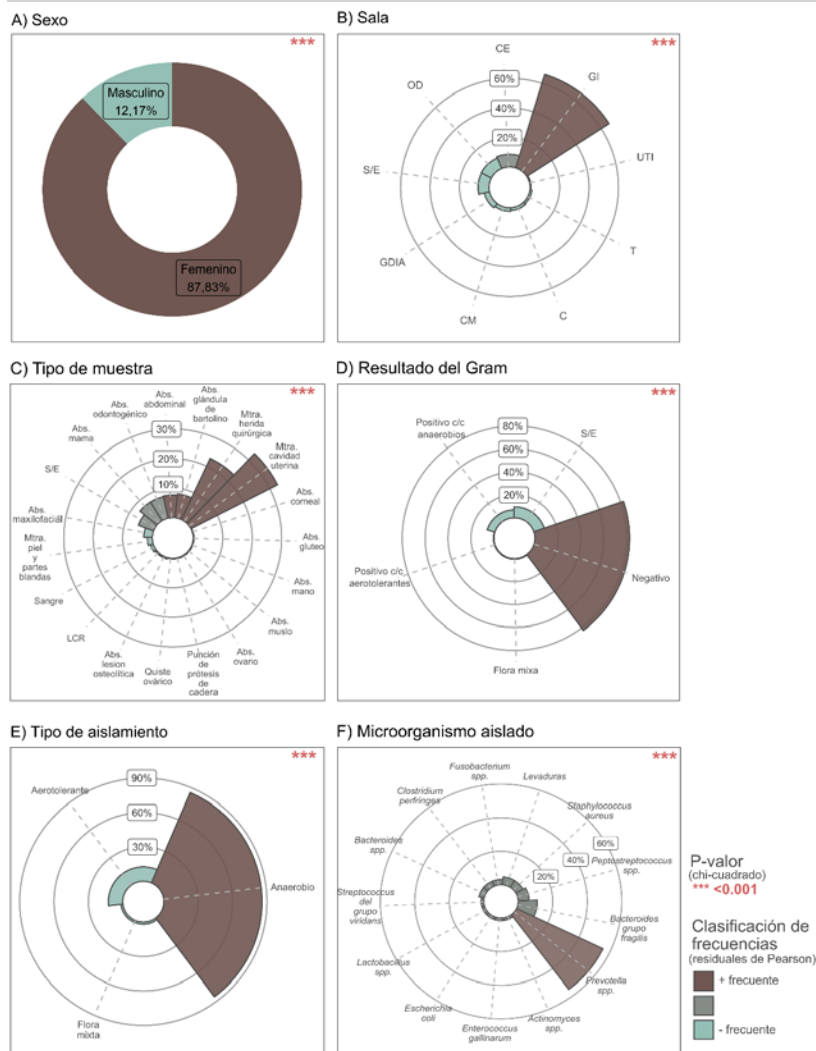
De las 419 muestras analizadas (estudio retrospectivo $n = 358$ y prospectivo $n = 61$), en 46 de ellas (11 %), se determinó la presencia de microorganismos estrictamente anaerobios. En la Figura 1, se muestran los resultados de las muestras analizadas discriminando por sexo, sala, tipo de muestra, resultado de la coloración de Gram, tipo de aislamiento y microorganismos aislados.

En este estudio, se encontró que el mayor porcentaje de muestras analizadas pertenece a pacientes del sexo femenino (88 %) [Figura 1A], deriva de la sala de ginecología (66 %) [Figura 1B] y corresponde a cavidades uterinas (33 %) y heridas quirúrgicas (23 %) [Figura 1C]. En este estudio, también se muestra que solo el 7 % de las muestras analizadas resultó compatible con microorganismos anaerobios al realizar la coloración de Gram [Figura 1D].

De las 419 muestras recibidas, 56 (13 %) tuvieron cultivo bacteriológico positivo, de las cuales, 48 (86 %) correspondieron a aislamientos de anaerobios estrictos [Figura 1E], y el género aislado más frecuente fue *Prevotella spp.* 35 (56 %) [Figura 1F].

En la Tabla I, se muestra la categorización de los aislados bacterianos según la muestra de origen; *Prevotella spp.* fue el aislamiento más frecuente, principalmente recuperado a partir de muestras ginecológicas (66 %).

Figura 1. Características epidemiológicas y bacterias aisladas en muestras ($n = 419$) de pacientes con sospecha clínica de infección por bacterias anaerobias.



► Distribución según: A) Sexo; B) Sala; C) Tipo de muestra; D) Resultado de la coloración de Gram; E) Tipo de aislamiento; F) Microorganismo aislado. Arriba de cada gráfico de barras circular, se indica la frecuencia de cada categoría. El aumento significativo de la frecuencia se indica con el cambio de color de los gráficos de barras circulares. Fuente: para el estudio retrospectivo ($n = 358$), se usaron datos obtenidos a partir del sistema operativo BD EpiCenter™. GI, Ginecología [Maternidad preparto, Tocoginecología, Maternidad alto riesgo]; CE, Consultorio externo; OD, Odontología; S/E, sin especificar; GDI, Guardia y Emergencia; CM, Clínica médica; C, Cirugía; T, Traumatología; UTI, Unidad de terapia intensiva; LCR, líquido cefalorraquídeo; Mtra, muestra; Abs, absceso; c/c, compatible con; anaerobios, microorganismos anaerobios estrictos; aerotolerantes, microorganismos aerotolerantes; flora mixta, anaerobios y aerotolerantes.

Discusión

Las bacterias anaerobias poseen un rol importante en la mayoría de las infecciones en humanos y su identificación ha sido un gran desafío para los laboratorios. Con el presente trabajo, se pretendió realizar un aporte a la epidemiología nacional y, en especial, a la regional, de este grupo heterogéneo de microorganismos.

Las superficies mucosas y el epitelio del cuerpo humano están colonizados por bacterias anaerobias. Allí las lesiones tisulares asociadas a traumatismos o cirugías, la alteración de la irrigación sanguínea, la obstrucción de una víscera hueca (vías aéreas, tubo digestivo, vías biliares) o la presencia de un cuerpo extraño favorecen la creación de un ambiente apropiado

para que bacterias que no requieren de oxígeno para su desarrollo se puedan reproducir e invadir². Esto explica en gran medida el predominio observado en las diferentes muestras del presente estudio.

El procesamiento inicial de las muestras para el estudio de anaerobios sigue los principios generales para la investigación de muestras en microbiología. El origen de la muestra sumado a la observación directa macroscópica y microscópica puede orientar sobre la presencia de anaerobios, lo cual es primordial para instaurar un tratamiento antibiótico empírico.

En este trabajo, las coloraciones de Gram compatibles con biota anaerobia no fueron numerosas, lo cual puede explicarse por el hecho de que no siempre los microorganismos aerobios y anaerobios son distinguibles por la morfología que se presenta en el Gram². Sin embargo, es importante informar en la coloración de Gram compatible con biota anaerobia, cuando se observan gérmenes que sugieren tal situación, ya que los tiempos de cultivo prolongados para estos microorganismos hacen inviable esperar estos resultados para tomar una determinación terapéutica. Esta coloración permite sospechar la presencia de reacción inflamatoria, orientar el tratamiento empírico y evaluar la calidad del procedimiento, ya que la no recuperación de los microorganismos observados en la microscopía podría indicar una falla en algunos pasos del procesamiento (muestreo, transporte, técnica de siembra) o que el paciente hubiese recibido antibióticos³. No obstante, es necesario realizar los cultivos, dado que, en ocasiones, se pueden encontrar patógenos únicos no predecibles que conduzcan a cambiar la terapia antibiótica, por lo que informar bacterias clínicamente relevantes especificando grandes grupos o identificación en el nivel de género, por ej., *Bacteroides spp.*; *Clostridium spp.*; *Fusobacterium spp.*, y realizar pruebas de sensibilidad, cuando corresponda (aislamientos únicos, o de infecciones severas como osteomielitis, bacteriemias, endoftalmis), resultan procedimientos necesarios para el diagnóstico,

seguimiento y tratamiento de la infección².

Reforzando la importancia de los cultivos de los microorganismos emergentes, en este trabajo, se encontró un elevado porcentaje de bacterias anaerobias aisladas, lo cual difiere de otros estudios similares^{5,6}, y estas variaciones podrían deberse no solo a los diferentes procedimientos de aislamiento, sino también a los diferentes tipos de muestras consideradas.

En este estudio, se encontró que el mayor porcentaje de muestras analizadas pertenece a pacientes del sexo femenino, deriva de la sala de ginecología y corresponde a cavidades uterinas y heridas quirúrgicas. Esto podría explicarse debido a que dicho hospital cuenta con un Servicio de Tocoginecología preparado para realizar los controles postoperatorios de cirugías ginecológicas, donde se toman diferentes muestras para sus cultivos, mientras que las demás salas remiten a sus pacientes para controles postoperatorios a sus centros de referencia (centros de salud u hospitales zonales).

Lo anteriormente expuesto también puede justificar que *Prevotella spp.* haya sido el género aislado más frecuente en este estudio, lo cual difiere de otros trabajos, donde se encontró una menor frecuencia que la observada aquí⁷⁻⁹. Esta diferencia podría ser atribuida a los métodos y medios utilizados, el tamaño y origen muestral, el período del estudio, la región geográfica y la presión antibiótica.

La terapia antibiótica es casi exclusivamente empírica debido a las inherentes técnicas de cultivo en condiciones anaeróbicas y, fundamentalmente, al prolongado tiempo de emisión de los informes microbiológicos^{10,11}. En las infecciones graves, siempre se debe pensar en la participación de bacterias anaerobias. Por esta razón, aunque no se realice cultivo o no se aislen anaerobios, el tratamiento debe dirigirse a cubrir aerobios y también anaerobios². En la mayoría de las situaciones clínicas, es suficiente con arribar a la identificación del género o grupo bacteriano y, en otras, es necesario llegar a la identificación de la especie como,

Tabla I. Agente etiológico recuperado según la muestra de origen.

Microorganismos	Origen			
	ginecológico	abdominal	de cabeza y cuello	sangre
	n	n	n	n
<i>Prevotella spp.</i>	23	4	7	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	5	1	0	1
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	2	0	1	1
<i>Bacteroides spp.</i>	0	0	2	0
<i>Clostridium perfringens</i>	1	0	0	1
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	0	1	0
<i>Actinomyces spp.</i>	1	0	0	0
<i>Lactobacillus spp.</i>	1	0	0	0

por ejemplo, la categorización taxonómica para realizar vigilancia epidemiológica. Esta información es de utilidad para la elección del tratamiento a implementar y para dilucidar el origen de la infección³.

En el Hospital "Dr. Julio C. Perrando", los tratamientos empíricos que se utilizan para combatir las infecciones por bacterias anaerobias son ampicilina - sulbactam, metronidazol y clindamicina, dependiendo del sitio de infección, según las recomendaciones de la Sociedad Argentina de Infectología¹¹. El cultivo de bacterias anaerobias no es un evento rutinario, sino que responde a objetivos epidemiológicos y clínicos específicos. Se recomienda realizar la vigilancia en forma periódica, institucional y multicéntrica, con alcance local y regional, a fin de conocer los microorganismos emergentes y eventualmente modificar los esquemas terapéuticos empíricos evaluando nuevos agentes antimicrobianos. De acuerdo con el género aislado con mayor frecuencia según su muestra de origen, la sensibilidad antibiótica de *Prevotella spp.* publicada por Legaria y col.⁴, que coincide con el tratamiento empírico utilizado en el centro en cuestión, puede cubrir al género más prevalente.

Por otro lado, la vigilancia antibiótica mundial muestra que la resistencia a los antibióticos entre las bacterias anaerobias es creciente¹² y, por tal motivo, de acuerdo con las recomendaciones generales del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹³, es necesario realizar vigilancias en los ámbitos hospitalario y nacional para controlar la resistencia a los antibióticos entre los microorganismos anaerobios. Las bacterias anaerobias cumplen un rol importante en las infecciones e intoxicaciones de los seres humanos, por lo que es importante conocer la prevalencia de los diferentes microorganismos involucrados en cada población.

Los resultados de este estudio proporcionan información que permite orientar la toma de decisiones referidas a tratamientos empíricos. La articulación de los conocimientos y comprensión de dichas bacterias, en especial, lo relacionado con su prevención y tratamiento es un proceso continuo que debe adaptarse a cada contexto particular y a las nuevas realidades del sistema de salud. Es fundamental conocer datos epidemiológicos en el ámbito regional y nacional que sustenten las bases para estudios multicéntricos y promover la salud. Estos resultados podrían ser analizados y considerados en las diferentes salas de los servicios de los hospitales y centros de salud para mejorar o cambiar medidas sanitarias, cuando sea necesario, disminuyendo la morbimortalidad, días de internación, costos y resistencia antimicrobiana.

A pesar de que, por cuestiones presupuestarias, no se llegó a la identificación de especies, este trabajo brinda un panorama inicial sobre la prevalencia de anaerobios en uno de los principales hospitales del NEA argentino, donde *Prevotella spp.* fue el género de mayor prevalencia aislado. Además, sirve de base para orientar futuras investigaciones, sustentar políticas de vigilancia epidemiológica e instaurar guías locales de prevención, diagnóstico y tratamiento.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de interés alguno para declarar. Todos los autores han efectuado una contribución sustancial a la concepción, el diseño del estudio, la recolección, análisis o interpretación de los datos; también, han participado en la redacción del artículo o en la revisión crítica de su contenido intelectual, han aprobado la versión final del manuscrito y son capaces de responder respecto de todos los aspectos del manuscrito de cara a asegurar que las cuestiones relacionadas con la veracidad o integridad de todos sus contenidos han sido adecuadamente investigadas y resueltas.

Referencias bibliográficas

- Nagy E, Schuetz A. Is there a need for the antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria? *Anaerobe*. 2015; 31:2-3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.11.002>
- Fernandez Canigia L. Infecciones asociadas a bacterias anaerobias. Diagnóstico, identificación y estudio de sensibilidad. Vol. 2. Argentina: Cursos a Distancia sobre Microbiología Clínica; 2017. p. 1–20.
- Predari SC. Microorganismos anaerobios. In: Predari SC, editor. Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2016. p. 1-305. [Consultado 08 abr 2023]. Disponible en: <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte III.pdf>
- Legaria MC, Bianchini HM, Castello L, Carloni G, Di Martino A, Fernández Canigia L, et al. Primer consenso Argentino para el estudio de la sensibilidad in vitro a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias de importancia clínica en humanos. *Rev Argent Microbiol*. 2011;43(1): 51–66.
- Solano Alpizar LB. Epidemiología de bacterias anaerobias aisladas en muestras clínicas en el hospital san juan de dios, San José, Costa Rica, durante el trienio 2014, 2015 y 2016. *Rev Costarric Salud Pública*. 2018;27(2): 82–92.
- Quesada Gómez C, Rodríguez Cavallini E, Gamboa Coronado M del M. Anaerobic bacteria in clinical samples from adult patients treated in a regional hospital in Costa Rica. *Rev Biomédica*. 2007;18(2):89–95. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=21403>
- Cobo F, Guillot V, Navarro Mari JM. Breast abscesses caused by anaerobic microorganisms: Clinical and microbiological characteristics. *Antibiotics*. 2020;9(6): 1–7.
- Shenoy PA, Vishwanath S, Gawda A, Shetty S, Anegundi R, Varma M, et al. Anaerobic bacteria in clinical specimens – frequent, but a neglected lot: A five year experience at a tertiary care hospital. *J Clin Diagnostic Res*. 2017; 11(7): DC44–8.
- Paiva M, Cogo LL, Kussen GMB, Lima MEM, Souza HAPHM, Rosa AR, et al. Bactérias anaeróbicas em processos infecciosos: ocorrência e significado clínico. *Brazilian Journal of Clinical Analyses (RBAC)*. 2016;48(3):103–8. Disponible en: http://sbac.org.br/rbac/wp-content/uploads/2016/09/RBAC_2016-supl.-01-completa-corrigida.pdf
- García JJ, Tomás JGG, Rodríguez JC. Carta al Director Hacia el tratamiento empírico de elección en las infecciones por anaerobios. *Off J Spanish Soc Chemother*. 2018;31(5): 455–6.
- Clara L, Rodríguez VM, Saúl P, Dominguez C, Esteban M. Infecciones intraabdominales. Puesta al día y recomendaciones de la sociedad Argentina de infectología. *Med (Buenos Aires)*. 2018;78(Nº6):417–26. En: <http://www.medicinabuenosaires.com/PMID/30504109.pdf>
- Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Hecht DW, Goldstein EJC, et al. Lessons learned from the anaerobe survey historical perspective and review of the most recent data [2005-2007]. *Clin Infect Dis*. 2010; 50 (SUPP.1).
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard 8th Edition M11-A8; CLSI: Wayne, PA, USA, 2012. [Consultado 08 04 2023]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m11/>



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International. Permite compartir copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.

ARTÍCULO ORIGINAL

Microbiota intestinal y alergia a la proteína de leche de vaca: revisión y perspectivas futuras

Gut microbiota and cow's milk allergy: review and future concerns

Keller, María Lorena ¹

¹Área Microbioma Humano, Instituto de Análisis Fares Taie. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Keller, María Lorena. Instituto de Análisis Fares Taie, Rivadavia 3343 [C.P. 7600], Mar del Plata, Argentina; lkeller@farestaie.com.ar

Resumen

La microbiota es el conjunto de microorganismos que coloniza el cuerpo humano. La microbiota intestinal es la más diversa y abundante, ya que alberga más de 100 trillones de células microbianas y 1000 especies diferentes. Entre sus numerosas funciones, la microbiota intestinal contribuye a la modulación de la respuesta inmune y la tolerancia oral a los alimentos. La disbiosis intestinal (alteraciones o desequilibrios de la microbiota en su composición y/o función) se ha descrito en numerosos desórdenes incluyendo enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celíaca, obesidad, asma y alergias. La alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV) es la alergia alimentaria más común en niños. Se sabe que la estructura de la microbiota en los primeros 6 meses de vida es relevante en el desarrollo de alergias, y que la disbiosis podría influenciar tanto la aparición como el curso de las mismas. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión bibliográfica de las características de la microbiota intestinal en pacientes con APLV, identificar los factores que influyen en su conformación en la edad temprana y analizar si ciertas alteraciones en la microbiota podrían asociarse con el desarrollo de APLV. Se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando las palabras clave indicadas; también se seleccionaron y analizaron estudios clínicos y revisiones de los últimos 15 años. La literatura consultada evidencia que, a pesar de los avances tecnológicos en secuenciación y análisis bioinformático, aún no se conoce con exactitud qué microorganismos influyen en el desarrollo de enfermedades alérgicas, e inclusive se han hallado resultados controvertidos. Esto revela la necesidad de seguir avanzando en el estudio de la microbiota de poblaciones pediátricas y, más específicamente, en el conocimiento de las alteraciones que se presentan en niños con APLV.

Palabras clave: microbiota intestinal, disbiosis, alergia alimentaria, alergia a la proteína de leche de vaca.

Abstract

The microbiota is the complex community of microorganisms that colonize the human body. The gut microbiota is the most diverse and abundant, hosting more than 100 trillion microbial cells and 1,000 different species. Among its several functions, the gut microbiota contributes to the modulation of the immune response and oral tolerance to foods. Gut dysbiosis, which refers to alterations or imbalances in the composition and/or function of the gut microbiota, has been described in several metabolic and immune disorders, including inflammatory bowel disease, celiac disease, obesity, asthma, and allergies. The structure of the microbiota in the first 6 months of life is relevant in the development of allergies, and gut dysbiosis could influence both their appearance and course. One of the most common food allergies is cow's milk allergy (CMA). This work aims to present a bibliographic overview of the characteristics of the gut microbiota in patients with CMA, identify the factors that influence its conformation at an early age, and analyze whether certain alterations in the microbiota could be associated with the development of CMA. For this purpose, a bibliographic search was performed in PubMed (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov), using the indicated keywords, and clinical studies and reviews from the last 15 years were selected and analyzed. The bibliography consulted shows that, despite technological advances in sequencing and bioinformatic analysis, the bacteria involved in the development of allergic diseases are not yet known in detail, and even controversial results have been found. This shows the need to continue advancing in the study of the microbiota of pediatric populations, and of the alterations that occur in children with CMA.

Keywords: gut microbiota, dysbiosis, food allergy, cow's milk allergy.

Introducción

La microbiota es una comunidad compleja de microorganismos que coloniza el organismo, principalmente conformada por bacterias, pero también por virus, hongos (en especial levaduras), protozoos y arqueas. Se define como microbioma todo el hábitat en que estos se encuentran, incluyendo los microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales circundantes (metabolitos, elementos genéticos móviles, estructuras microbianas, moléculas de señalización, etc.).^{1,2}

La microbiota intestinal, especialmente la localizada en el colon, llega a alcanzar densidades de 10^{11} - 10^{12} células/ml.^{3,4} Está compuesta principalmente por dos filos bacterianos, Firmicutes y Bacteroidetes (que suponen el 90 % de la microbiota intestinal) y, en menor medida, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia.^{4,5} El filo Firmicutes incluye un gran número de géneros; algunos de los más importantes son *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Ruminococcus*. El filo Bacteroidetes incluye bacterias pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*. El principal género perteneciente al filo Actinobacteria es *Bifidobacterium*. Las proteobacterias están representadas fundamentalmente por miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que el filo Verrucomicrobia tiene un único integrante, *Akkermansia muciniphila*.

Las bacterias de la microbiota intestinal ejercen numerosas funciones, tales como la metabolización de alimentos que el organismo no puede procesar, como la fibra dietética y los carbohidratos complejos; la protección contra patógenos; la síntesis de metabolitos esenciales, como algunas vitaminas y neurotransmisores; el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal y la modulación de la respuesta inmune, incluyendo la tolerancia oral a los alimentos.^{6,7}

La microbiota intestinal se establece, diversifica y madura desde el nacimiento hasta los 2 o 3 primeros años de vida.^{7,8} En su formación, intervienen componentes genéticos, epigenéticos y ambientales. El establecimiento de la microbiota intestinal comienza por la exposición a microorganismos a través del canal de parto y por el contacto con la piel materna y la microbiota del entorno.⁹ Los primeros colonizadores consisten en una mezcla de microorganismos cutáneos y entéricos, dominados por *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y estafilococos coagulasa negativa. A medida que estos consumen el oxígeno del medio intestinal, son reemplazados por anaerobios obligados, tales como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *ε-bacterium*.

Existen evidencias de que la microbiota intestinal evoluciona en forma simultánea con el sistema inmunitario del bebé y con la programación metabólica y neurológica.⁸ En esta coevolución, las bacterias comensales juegan un papel fundamental en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa, contribuyen a la integridad y función de la barrera intestinal, inhiben la colonización por patógenos e intervienen en las respuestas linfocitarias de tipo B y T regulatoria.⁶

Varios estudios han reportado una aparente estabilización de la microbiota intestinal, que se aproxima a una configuración de adulto dentro de los 3 primeros años de vida. Uno de los mayores estudios realizados incluyó 903 niños de 4 países (Alemania, Finlandia, Suecia y EEUU) seguidos durante 3 años, en el cual se observó que después de los 31 meses los filos dominantes y la diversidad permanecen estables con predominio del filo Firmicutes.⁸ En forma similar, un estudio en 2016 evaluó a 367 individuos japoneses sanos entre 0 y 104 años y reportó que la microbiota intestinal cambia con la edad. Firmicutes fue el filo predominante en la población adulta, mientras Actinobacteria fue el más hallado en menores de 1 año. La abundancia relativa de actinobacterias en niños fue disminuyendo después del destete, y la composición de la microbiota intestinal fue aproximándose a la de adulto cerca de los 3 años de edad.⁹

Numerosos estudios y revisiones han remarcado la importancia del desarrollo de la simbiosis entre microbiota y hospedador para la salud del bebé y sus consecuencias durante toda la vida.⁸ En los últimos años, la prevalencia de las alergias alimentarias ha mostrado un marcado crecimiento, principalmente en sociedades industrializadas en todo el mundo, y esto ha ocurrido paralelamente con los cambios de estilo de vida en esos países, que llamativamente son los mismos que afectan la conformación de la microbiota en la edad temprana, lo cual sugiere una posible intervención de la misma en el desarrollo de las alergias.

El objetivo de este estudio fue realizar una revisión bibliográfica exhaustiva acerca de las características de la microbiota intestinal en pacientes con APLV, identificar los factores más relevantes que influyen en el establecimiento de la microbiota en la edad temprana y analizar si ciertos taxones específicos o "firmas" microbianas podrían asociarse con el desarrollo de APLV.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando las palabras clave indicadas, y se seleccionaron estudios clínicos y revisiones de los últimos 15 años provenientes de revistas de alto impacto. Se analizaron en total 38 publicaciones relevantes para el objetivo propuesto.

Resultados

Microbiota intestinal: desarrollo, factores que influyen en su conformación y relación con la salud y la enfermedad. Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal en la vida temprana

Se han descrito varios factores que modulan el establecimiento de la microbiota intestinal en la vida temprana y que son determinantes para la salud del individuo durante toda su vida. Entre estos, destacan dos factores clave que son: el tipo de parto -vaginal o por cesárea- y el tipo de lactancia -materna o artificial-. Dado que el establecimiento y la maduración de la microbiota intestinal ocurre en los llamados "1000 días", que van desde la concepción hasta los primeros 2 años de vida del niño, este período se considera una

ventana crítica de oportunidad para realizar intervenciones que contribuyan a la conformación de una microbiota saludable⁸ (Figura 1).

El tipo de parto puede producir profundas diferencias en los patrones de colonización intestinal de los bebés. El parto vaginal permite el contacto del bebé con la microbiota vaginal y fecal, lo cual resulta en una colonización neonatal dominada por *Lactobacillus* y *Prevotella*.⁷ El parto por cesárea se ha asociado con menor abundancia y diversidad de los filos Actinobacteria y Bacteroidetes, y mayor abundancia y diversidad del filo Firmicutes en los primeros 3 meses de vida.⁴ Con respecto al género, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* son más abundantes en niños nacidos por parto vaginal, a diferencia de los niños nacidos por cesárea, que presentan mayor colonización por *Clostridium* y *Lactobacillus* hasta los 3 meses de vida. Otros trabajos evidencian menor abundancia de *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* en niños nacidos por cesárea, posiblemente por efecto del uso de antibióticos en esta práctica quirúrgica. Estos bebés presentan típicamente una microbiota enriquecida con *Staphylococcus* y *Streptococcus*, comparable con la microbiota de la piel materna.^{5,7} Asimismo, presentan mayor cantidad de patógenos oportunistas como *Enterococcus*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.¹⁰

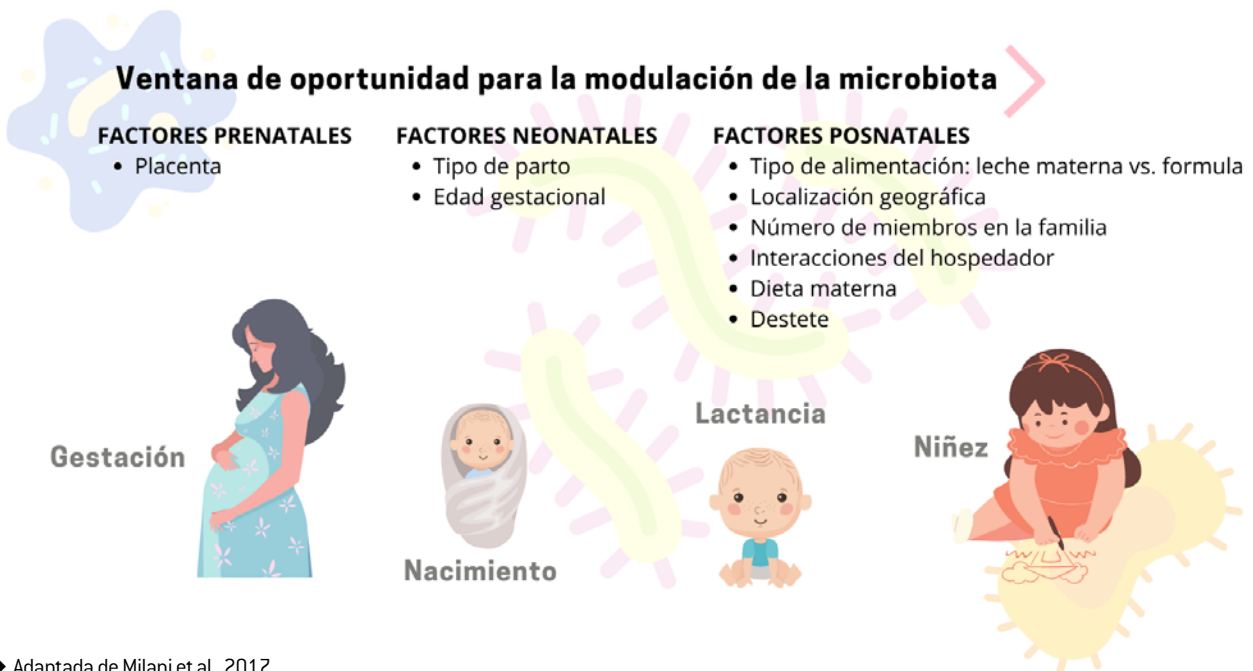
Con respecto a la lactancia, hay numerosas evidencias que muestran que la leche materna contribuye al desarrollo de un microbioma saludable, ya que aporta no solo micronutrientes y compuestos prebióticos que estimulan la colonización y el crecimiento de bacterias comensales, sino también factores inmunológicos activos, oligosacáridos y bacterias, los cuales modulan las respuestas inmunes.

Hace algunos años se pensaba que la leche materna era estéril. Sin embargo, fueron Jiménez *et al.* quienes demostraron por primera vez, en un experimento en ratones con *Enterococcus* marcados genéticamente, que las bacterias pueden transferirse a los hijos a través de la leche materna¹¹, resultados que fueron confirmados en ensayos posteriores en humanos.¹²

La microbiota intestinal de lactantes alimentados con leche materna es menos diversa, pero contiene altos niveles de especies del género *Bifidobacterium*, como *B. breve*, *B. bifidum* y *B. longum* capaces de metabolizar los oligosacáridos de la leche humana (HMO), así como también, menor presencia de patógenos potenciales que los niños alimentados con fórmula.⁷ Los HMO son polisacáridos complejos que alcanzan el colon sin ser digeridos y estimulan el crecimiento selectivo de ciertas bacterias comensales, como las bifidobacterias, actuando de esta manera como prebióticos. Han sido identificadas más de 200 estructuras de HMO diferentes que dan cuenta de un tercio de los componentes sólidos de la leche materna, que siguen en abundancia a la lactosa y los lípidos y que se hallan en mayor concentración [20 g/l] en el calostro humano.⁹ La suplementación de fórmulas infantiles con galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) en una proporción 9:1, parece simular en cierto grado el efecto de los HMO sobre la microbiota intestinal estimulando el desarrollo de bifidobacterias. La cesación de la lactancia materna, más que la introducción de alimentos sólidos, es el principal factor que produce un cambio de la microbiota de los lactantes.⁸

Es por las razones antes expuestas que los niños nacidos por parto vaginal y alimentados con leche materna en

Figura 1. Ventana crítica de oportunidad para realizar intervenciones que contribuyan a la conformación de una microbiota saludable.



► Adaptada de Milani *et al.*, 2017.

forma exclusiva presentan el microbioma más saludable y beneficioso, con altas concentraciones de *Bifidobacterium* y bajas cantidades de *Clostridioides difficile* y *E. coli*.¹⁰

La edad gestacional es otro factor que afecta el establecimiento de la microbiota, ya que los bebés nacidos antes de término (con menos de 37 semanas de gestación) tienen un sistema inmunitario inmaduro y, frecuentemente, afrontan largas estancias hospitalarias y alimentación artificial o parenteral, factores que interfieren con el establecimiento de una microbiota saludable.⁷

Otros factores relevantes que modulan la microbiota intestinal en la infancia temprana son: el uso de antibióticos prenatales o durante los primeros meses de la vida del bebé, la vida en ambientes rurales, el tamaño de la familia, el número de hermanos y la presencia de mascotas.⁷ Las alteraciones de la microbiota a causa del uso de antibióticos en niños han sido documentadas en varios estudios. Este fenómeno se observó incluso hasta 2 años después de su utilización, con disminución de bifidobacterias y aumento de enterobacterias, sumado a una disminución en la diversidad.⁸ También se ha reportado que los niños cuyas madres reciben profilaxis intraparto por colonización vaginal por estreptococos del grupo B, ruptura prematura de membranas o bien por cesárea exhiben alteraciones en la diversidad y riqueza de su microbiota intestinal.¹³

Técnicas de estudio de la microbiota intestinal

El estudio de la microbiota se realiza mediante técnicas de secuenciación de próxima generación -*Next Generation Sequencing*- (NGS), a través de dos abordajes: la técnica metataxonómica secuencía el ADN que codifica para el ARN ribosomal 16S y requiere la amplificación previa por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las regiones V3 - V4 de este gen. Los productos amplificados son secuenciados y dichas secuencias, comparadas con bases de datos de microorganismos ya conocidos para determinar las abundancias taxonómicas relativas de cada especie en la muestra. Esta técnica solo detecta células procariontas, porque se amplifica el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S únicamente presente en bacterias. En la figura 2, se muestra esquemáticamente este procedimiento.

La metagenómica total (*"shotgun"*) permite secuenciar todo el ADN de una muestra, incluyendo bacterias, hongos, parásitos y arqueas. Implica una fragmentación al azar del ADN, la secuenciación de estos fragmentos y la superposición de los datos generados para obtener las secuencias completas de los microorganismos presentes. Esta técnica permite detectar nuevas especies microbianas y caracterizar grupos de genes funcionales.

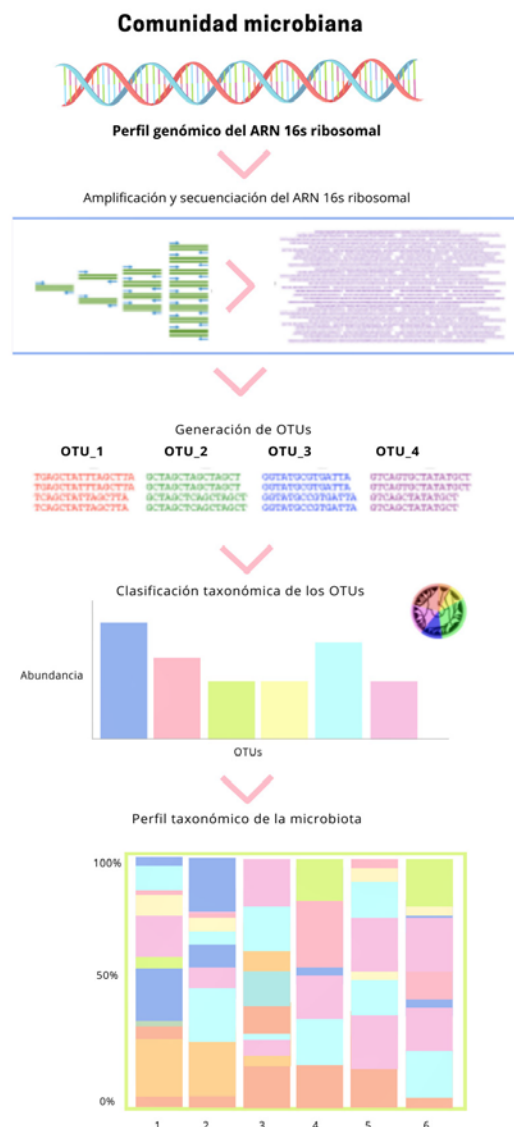
Relación entre disbiosis y enfermedad

Las alteraciones en la composición y abundancia de los componentes de la microbiota intestinal en la vida temprana, denominadas *disbiosis*, han sido asociadas con desórdenes en la salud en niños y adultos; entre ellos, se encuentran: sobrepeso, obesidad, manifestaciones atópicas,

asma, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, síndrome de intestino irritable, enfermedades crónicas inflamatorias y condiciones relacionadas con el neurodesarrollo.¹⁴⁻¹⁶

Muchas de estas enfermedades crónicas, propias de la "vida moderna", conocidas como enfermedades crónicas no transmisibles, están asociadas de forma similar con factores de riesgo medioambientales modernos y se han incrementado en las últimas décadas. En las enfermedades metabólicas como la diabetes, existe una inflamación crónica de bajo grado, que podría ser inducida y perpetuada por estados de disbiosis intestinal, a través de varios mecanismos. Por ejemplo, el pasaje del lipopolisacárido de bacterias patógenas al torrente sanguíneo causa una endotoxemia metabólica que contribuye al estado proinflamatorio. Las

Figura 2. Esquema del análisis de la microbiota intestinal por secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S.



► Adaptada de Milani et al., 2017.

dietas ricas en grasas y bajas en fibra, el sedentarismo y el consumo de azúcares refinados contribuyen a la disbiosis y al aumento de la permeabilidad intestinal que perpetúa este estado inflamatorio.¹⁷

En el caso de las enfermedades alérgicas, aunque factores genéticos pueden afectar la tendencia actual del desarrollo de las mismas, el rápido incremento observado en los últimos 20 años, especialmente en países industrializados, sugiere que deben existir factores ambientales y dietarios. Algunos de ellos han sido identificados: el incremento de los partos por cesárea, el uso de antibióticos y un alto consumo de dietas ricas en grasas y bajas en fibra. El hecho de que todos estos factores a su vez modulen la microbiota intestinal, sugiere un papel de la misma en el desarrollo de las alergias, sobre todo por su importante función en la regulación de la respuesta inmune y la tolerancia oral en la vida temprana.¹⁶

Microbiota intestinal y alergias alimentarias

La alergia es la enfermedad crónica no transmisible de inicio más temprano, que comienza a menudo en los primeros meses de vida. Las alergias alimentarias se presentan como parte de un conjunto de manifestaciones alérgicas, conocidas como “marcha atópica”, en la cual aparece en los primeros meses la dermatitis atópica, seguida por alergias a alimentos entre los 2 y 5 años. Asma y rinitis alérgicas suelen manifestarse en la edad escolar.^{10,14}

Notablemente, la evolución de la epidemia de alergias ha crecido paralelamente con los cambios de estilo de vida en los países industrializados, tales como una progresiva urbanización, programas de sanitización ambiental, uso desmedido de antibióticos, inactividad física y consumo de alimentos altamente procesados. Todos estos cambios han llevado a una reducción de la exposición a microorganismos en la vida temprana y a una pérdida de la diversidad microbiana intestinal.¹⁰

Se han postulado algunas teorías para explicar el gran incremento de las enfermedades alérgicas, especialmente en los países occidentalizados. Una de ellas denominada “Teoría de la Higiene”, propuesta por Strachan a fines de los ‘80, basada en la evidencia epidemiológica de que el contacto temprano con factores ambientales que incrementan una exposición natural a microorganismos (como el parto vaginal, la vida en ambientes rurales, familias numerosas, presencia de mascotas y ausencia de antibióticos) protege contra enfermedades alérgicas y autoinmunes y predispone menos al desarrollo de diabetes, obesidad y enfermedades inflamatorias. Un ambiente extremadamente aséptico aumenta la incidencia de estos trastornos.^{10,14} El hecho de que algunos investigadores hayan sugerido un papel crítico de las señales inmunorregulatorias por parte de las bacterias comensales en la regulación de la hiperreactividad alérgica ha llevado a la reformulación de la hipótesis de la higiene como la de los “viejos amigos”. Esta hipótesis propone que los cambios en el entorno, la dieta y el estilo de vida de los países industrializados, sumados a una alta exposición a antibióticos, un mayor consumo de grasas

saturadas y baja cantidad de fibra, han modificado la microbiota intestinal alterando de este modo el natural desarrollo de la tolerancia inmune, lo cual ha conducido al aumento de las enfermedades alérgicas.¹⁴

En la figura 3, se muestra cuáles son los factores que predisponen al desarrollo de alergias alimentarias en individuos genéticamente susceptibles. En relación con el mecanismo inmunológico de la enfermedad alérgica, se sabe que la dominancia de la respuesta tipo Th2 sobre Th1 es clave en el desarrollo de la misma. Los linfocitos Th2 producen interleucinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que están involucradas en el inicio y perpetuación del fenotipo alérgico. La IL-4 promueve la diferenciación de células T vírgenes a Th2 y el cambio de clase a IgE en los linfocitos B. La IL-5 actúa en la diferenciación y activación de los eosinófilos, y la IL-13 actúa también en el cambio de clase a IgE en los linfocitos B. Además, activa mastocitos y promueve la migración de eosinófilos hacia las mucosas. Por el contrario, una respuesta de tipo Th1 mediada por interferón gamma (IFN- γ) inhibe la respuesta Th2. Como consecuencia, un desbalance inmune entre estas respuestas dirigido hacia un incremento de la respuesta tipo Th2 aumentaría el riesgo de padecer enfermedades alérgicas. La diferenciación hacia Th1 y Th2, así como hacia otros tipos de respuestas T que son relevantes en la enfermedad alérgica, como T regulatoria, Th17 y Th9, está controlada estrictamente por mecanismos epigenéticos.¹⁸

Nagler y otros autores proponen que la tolerancia a antígenos dietarios y por lo tanto la prevención de la alergia alimentaria requieren de una respuesta inmune regulatoria específica de antígeno y una respuesta protectora de la barrera intestinal inducida por las bacterias comensales. La interrupción de la comunicación entre el epitelio intestinal y las células inmunes por alteraciones del microbioma, im-

Figura 3. Factores que predisponen al desarrollo de alergias alimentarias en individuos genéticamente susceptibles.

Factores asociados al estilo de vida moderno



► Adaptada de Iweala and Nagler, 2019.

pacta negativamente en la homeostasis inmune impidiendo el desarrollo de la tolerancia oral.¹⁴

El mecanismo primario de tolerancia oral a antígenos dietarios es la inducción de las células T regulatorias. La respuesta tolerogénica a antígenos lumenales depende de la translocación de estos a través de la barrera epitelial intestinal, en la que intervienen las células M presentes en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Allí son captados por las células presentadoras de antígenos, fundamentalmente las células dendríticas CD103+, las cuales migran hacia los nódulos linfáticos mesentéricos y presentan dichos antígenos a los linfocitos T vírgenes. Esta interacción en presencia de ácido retinoico (metabolito de la vitamina A) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) producidos por las células dendríticas CD103+ favorece la conversión a células T regulatorias foxP3+ específicas de antígeno, productoras de IL-10. Algunas T regulatorias migran hacia el torrente sanguíneo promoviendo tolerancia sistémica y vuelven a la lámina propia donde producen TGF- β , que promueve el cambio de clase a IgA en los linfocitos B. Si bien el papel de la microbiota en la regulación de la captación y la presentación de antígenos aún no ha sido completamente dilucidado, se sabe que en el intestino delgado, donde se absorben los antígenos alimentarios, los fagocitos mononucleares residentes en la lámina propia (MNP) expresan el receptor de quimioquinas CX3CR1. La estimulación microbiana de los *Toll-like receptors* (TLRs) y la señalización mediante la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88) inducen la generación de extensiones de las células dendríticas en el intestino delgado. Tanto la presentación de antígenos como la producción de IL-10 por parte de los MNP CX3CR1+ son requeridas para la tolerancia. Se ha observado que, en ratones tratados con antibióticos, los MNP CX3CR1+ pierden la capacidad de expresar IL-10, lo que sugiere un papel crítico de la microbiota en su función.^{13,14}

Los microorganismos comensales también influyen en el desarrollo de linfocitos T regulatorios en forma directa, a través de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que son los productos finales de la fermentación de la fibra dietética por las bacterias comensales, en especial los Firmicutes. Se ha demostrado una correlación positiva entre el número de T regulatorios y la concentración de AGCC. Uno de los mecanismos por los cuales los AGCC protegen contra enfermedades alérgicas es de tipo epigenético, mediante la inhibición directa de deacetilasas de histonas, que regulan la expresión de las células linfoides innatas para la protección de la barrera intestinal, a través de la producción de IL-22. Esta induce la producción de péptidos antimicrobianos por parte de las células de Paneth, y de mucus mediante las células Globet en un intestino con microbiota saludable.¹³ En particular, el acetato es capaz de incrementar el porcentaje y actividad de las células T regulatorias causando un aumento en el estado de acetilación del promotor de foxP3+ a través de la inhibición de la deacetilasa de histona HDAC9. El butirato inhibe estas enzimas afectando la activación, al menos

parcial, del factor de transcripción NF- κ B. La acetilación inducida por los AGCC producidos por *Clostridium*, *Anaerostipes* y *Eubacterium*, así como la metilación del ADN inducida por el folato sintetizado a partir de bacterias comensales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, estimulan el desarrollo y el balance inmune del intestino.¹⁸

Todos estos datos sugieren que las células T regulatorias foxP3+, inducidas en forma específica tanto por los antígenos alimentarios como por las bacterias comensales, cooperan para prevenir la respuesta alérgica a los alimentos.¹³

Alergia a la proteína de leche de vaca (APLV)

La APLV es la alergia alimentaria más común en niños. Se presenta generalmente antes de los 2 años de edad y es reconocida como un indicador de desregulación de la respuesta inmune en la edad pediátrica.^{10,19} De hecho, los niños afectados por APLV en el primer año de vida tienen un riesgo incrementado de desarrollar otras manifestaciones atópicas a lo largo de su vida, así como otros desórdenes crónicos inmunomediados.¹⁵ La incidencia mundial es de 2 a 3 % en el primer año de vida y, en la actualidad, el único tratamiento posible es retirar de la dieta todos los alimentos que contengan proteínas de leche de vaca.^{18,20}

En cuanto a la prevalencia en Argentina, un estudio retrospectivo que analizó casos confirmados de APLV durante 11 años en un hospital universitario detectó una prevalencia acumulada de 0,8 %, con un incremento porcentual de la misma desde 0,4 % en 2004 hasta 1,2 % en 2014, lo que representa un aumento de tres veces en la prevalencia de esta alergia.²¹ La APLV suele tener una evolución favorable con resolución espontánea hacia los 5 años de vida, y, en un 90 % de los casos, antes de los 2 años de vida.²²

Con base en la reacción inmune implicada, se distinguen tres tipos de APLV: mediada por IgE, no mediada por IgE (la mayoría debidas a reacciones de inmunidad celular) y trastornos mixtos.²³ Las primeras se caracterizan por la aparición de forma inmediata (menos de 2 horas desde el contacto) de sintomatología cutánea, como dermatitis atópica, o respiratoria, como rinitis o asma. En estos pacientes, es posible determinar la existencia de anticuerpos IgE específicos en sangre o de una prueba cutánea positiva (*Prick test*). La APLV mediada por IgE es la forma responsable de la expresión más extrema de APLV, que es la anafilaxia. Las formas no mediadas por IgE ocasionan una sintomatología predominantemente digestiva de aparición tardía, cuya forma más común de presentación es la proctocolitis alérgica, y, en la mayoría de los casos, no es posible confirmar la implicación de un mecanismo inmunológico mediante pruebas complementarias.²² Otras formas de presentación son la enteropatía o la enterocolitis inducida por proteína de leche de vaca.²⁴

El diagnóstico de APLV se realiza teniendo en cuenta criterios clínicos y de laboratorio establecidos en consensos nacionales e internacionales.²⁹

Para el diagnóstico de la variante mediada por IgE, se

requiere una historia clínica detallada y compatible, con la aparición de síntomas inmediatos (menos de 2 hs tras la ingesta), manifestaciones cutáneas y/o respiratorias y/o digestivas ligadas a mecanismos IgE: urticaria, angioedema, síndrome de alergia oral, rinoconjuntivitis, sibilancias, hipersensibilidad gastrointestinal inmediata o anafilaxia, más la determinación de sensibilización a proteínas de leche de vaca (mediante test cutáneos o IgE específicas) y mejoría absoluta de los síntomas al suprimir la alimentación a base de proteínas de leche de vaca y derivados.

- Pruebas cutáneas (*Prick test*)

Se coloca una gota de alérgeno (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, caseína, histamina como control positivo y suero salino como control negativo) en la cara anterior del antebrazo; se pincha con lanceta encima de cada gota para que la solución penetre en la piel y se mide el tamaño de la pápula a los 15 minutos. Se considera positivo un tamaño de pápula superior a 3 mm; una pápula superior a 10 mm se asocia con alergia persistente.

- Determinación de IgE específica en suero

Se determina la IgE específica para proteínas de la leche de vaca con un punto de corte de 0,35 kU/L. Valores superiores a 2,5 tienen un alto valor predictivo positivo.

- Prueba de provocación oral

Su realización puede omitirse si la probabilidad de APLV es alta, con base en los test cutáneos o las IgE específicas positivas, o si la misma tuviera un riesgo elevado de presentar síntomas severos (p. ej., antecedente de anafilaxia).

El diagnóstico de las variantes no mediadas por IgE requiere una historia clínica detallada y compatible, más la prueba de exclusión - provocación. La historia clínica debe evaluar antecedentes familiares y personales de atopía para establecer el riesgo, la asociación y tiempo transcurrido entre la exposición al alimento y la aparición de los síntomas, características y gravedad de los mismos, edad de comienzo, historia nutricional y dietética completa y factores asociados o desencadenantes.

- Prueba de exclusión - provocación

Es la prueba *gold standard* para confirmar el diagnóstico de APLV no mediada por IgE. Consiste en excluir la leche de vaca y derivados de la dieta por un período de 4 a 6 semanas, comprobar la resolución de los síntomas y posteriormente volver a introducirla de forma controlada, excepto en los casos de enterocolitis inducida por proteínas. Si el niño está alimentado con pecho exclusivamente, la madre debe realizar la dieta de exclusión en forma estricta. Si se encuentra recibiendo fórmula artificial, se indica una fórmula extensamente hidrolizada.

Alteraciones de la microbiota intestinal en alergias alimentarias

En humanos, el primer estudio que exploró la hipótesis de que la enfermedad alérgica estaría asociada con una microbiota alterada en niños fue realizado en Suecia en los años 90 utilizando técnicas dependientes de cultivo. Hallaron que los niños alérgicos estaban menos colonizados con

lactobacilos y tenían mayor proporción de bacterias aeróbicas y menos Bacteroidetes que los niños sin alergias.⁶ Sin embargo, este tipo de estudios arrojaban resultados parciales, dado que la mayoría de las bacterias intestinales no pueden ser cultivadas. Desafortunadamente, no se han realizado trabajos en esta área utilizando metagenómica total, pero numerosos estudios basados en secuenciación del ARN ribosomal 16S han demostrado que los niños con alergias alimentarias exhiben una microbiota diferente a la de aquellos sin alergias.²⁶ En la Tabla I, se mencionan los estudios publicados hasta la fecha en alergias alimentarias mediadas por IgE. Los estudios muestran resultados dispares, si bien parecería existir un aumento de *Enterobacteriaceae* y *Bacteroides*, y disminución de bifidobacterias en varios de ellos.

Los estudios en alergia alimentaria no mediada por IgE son aún más escasos. Por ejemplo, Berni Canani *et al.* hallaron disbiosis intestinal caracterizada por enriquecimiento de *Bacteroides* y *Alistipes* en niños con APLV IgE no mediada, en comparación con el grupo control.¹⁵

Por otra parte, estudios en animales de experimentación revelan evidencias acerca del papel de la microbiota en el desarrollo de alergias. Ratones tratados con antibióticos han mostrado predisposición al desarrollo de enfermedad alérgica. Similarmente, ratones libres de microorganismos o *germ-free* (GF) no desarrollan tolerancia inmune y mantienen una respuesta Th2 a antígenos administrados oralmente. Este efecto puede revertirse mediante la reconstitución del microbioma a edad temprana, pero no más tarde en la vida.²⁶ Otra cuestión interesante es que la microbiota intestinal es capaz de transferir susceptibilidad a alergia alimentaria, lo cual fue probado en ratones GF a los cuales se les reconstituía la microbiota con otra proveniente de un modelo de ratones susceptibles a alergia alimentaria.²⁷ Un estudio del grupo de Cathryn Nagler demostró que ratones GF estaban protegidos de desarrollar anafilaxia a la leche de vaca si se colonizaban con microbiota de niños sanos, pero no, con microbiota proveniente de niños con APLV.²⁸

Aunque cada vez surgen más evidencias de asociaciones de la microbiota con enfermedades alérgicas, algunos estudios no han hallado diferencias en la microbiota de niños con estos cuadros o han encontrado asociación con ciertos fenotipos alérgicos, pero no con otros.⁶ Si bien sabemos que la estructura de la microbiota en los primeros 6 meses de vida es relevante en el desarrollo de alergias, y que la disbiosis intestinal podría influenciar tanto la aparición como el curso de las alergias alimentarias, aún no se han detectado taxones específicos asociados con estas patologías.²⁶ Esto puede deberse tanto a la heterogeneidad en los diseños experimentales como al momento de la toma de muestra, los métodos utilizados para la caracterización de la microbiota o los diferentes tipos de alergia estudiados, lo cual dificulta establecer una clara asociación entre taxones específicos y el desarrollo de alergias.

Algunos autores han hallado que una disminución de la

Tabla I. Estudios de microbiota intestinal en pacientes pediátricos con y sin alergia alimentaria mediada por IgE.

	Alergia alimentaria	Diversidad microbiana	Alteraciones en taxas
Ling <i>et al.</i> 2014 (n=34) ³¹	Leche de vaca, huevo, pescado, trigo, maní	Igual	Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria Firmicutes
Chen <i>et al.</i> 2015 (n=23) ³²	Huevo, leche de vaca, trigo, maní, soja	Disminuida	Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria <i>Veillonella</i>
Azad <i>et al.</i> 2015 (n=12) ³³	Leche de vaca, huevo, maní	Igual	<i>Bacteroidaceae</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i>
Berni Canani <i>et al.</i> 2016 (n=39) ³⁴	Leche de vaca	NR	<i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
Inoue <i>et al.</i> 2017 (n=4) ³⁵	Huevo, trigo, soja, leche de vaca, maní	NR	<i>Lachnospira</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Sutterella</i> <i>Dorea</i> , <i>Akkermansia</i>
Savage <i>et al.</i> 2018 (n=14) ³⁷	Leche de vaca, trigo, huevo, maní, soja	Igual	<i>Citrobacter</i> , <i>Oscillospira</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Dorea</i>
Bunyavanich <i>et al.</i> 2016 (n=226) ¹⁹	Leche de vaca	NR	Bacteroidetes, <i>Enterobacter</i>
Fazlollahi <i>et al.</i> 2018 (n=141) ³⁶	Huevo	NR	<i>Lachnospiraceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i>
Dong <i>et al.</i> 2018 (n=60) ²⁰	Leche de vaca	Disminuida	<i>Bacteroidaceae</i>
Thompson <i>et al.</i> 2010 (n=16) ³⁸	Leche de vaca	NR	<i>Lactobacillaceae</i> <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>

► NR, no reportada. Adaptada de Di Costanzo, 2020.

diversidad microbiana precede al desarrollo de eczema, sensibilización atópica, rinitis alérgica y asma, lo cual sugiere que esta pérdida de diversidad podría ser incluso más importante como factor predictivo que la presencia o ausencia de determinados taxones microbianos.⁶

Discusión y perspectivas futuras

La bibliografía consultada evidencia que, a pesar de los avances tecnológicos en secuenciación y análisis bioinformático, aún no se conoce con exactitud qué microorganismos son cruciales en el desarrollo de enfermedades alérgicas, y aunque las más estudiadas son la dermatitis atópica, el eczema, la rinitis alérgica y el asma, también se obtuvieron resultados controvertidos. Esto sugiere la necesidad de seguir avanzando en el estudio de la microbiota de poblaciones pediátricas y en el conocimiento de las alteraciones que se presentan en niños

con APLV teniendo en cuenta las particularidades etarias y regionales.

Por otra parte, es importante tener presente que la programación inmune inducida por la microbiota intestinal ocurre en los primeros años de vida. Este periodo constituye la ventana en la cual las intervenciones serían efectivas en la prevención de las alergias.

La evidencia acumulada sobre la influencia de la microbiota intestinal y sus metabolitos en el desarrollo de alergias provee una base científica para la creación de estrategias innovadoras para la prevención y el tratamiento de las mismas, como es el uso de ciertos probióticos. Sin embargo, debido a los factores ya mencionados que intervienen en la conformación de la microbiota, es importante tener en consideración los parámetros etarios, étnicos, geográficos, de estilo de vida y de alimentación para el estudio y caracterización de la microbiota

saludable en una determinada población, ya que su conocimiento será crítico para poder predecir alteraciones relacionadas con ciertas enfermedades.

Si bien algunos ensayos clínicos han demostrado que la manipulación de la microbiota intestinal con probióticos o prebióticos podría ser efectiva en la prevención primaria de la dermatitis atópica, aún no hay evidencias suficientes en otras condiciones alérgicas como las alergias alimentarias.

Por todo lo expuesto, existe un creciente interés en descubrir biomarcadores basados en el microbioma que sean capaces de predecir enfermedades y que puedan ser utilizados a futuro para proponer estrategias terapéuticas y preventivas.

Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer ningún conflicto de interés.

Referencias bibliográficas

- Berg G, Rybakova D, Fisher D, Cernava T, Champonier Verges M, Charles T et al. Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 2020, 8:103-125. DOI: 10.1186/s40168-020-00875-0
- Allaband C, Mc Donald D, Vázquez-Baeza Y, Minich J, Tripathi A, Brenner D et al. Studying, analyzing and interpreting gut microbiome data for clinicians. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019, 17(2): 218-230. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.09.017
- Ley R, Peterson D and Gordon J. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006, 124: 837-854. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.017
- Rutayisire E, Huang K, Liu Y and Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol* 2016, 16: 86-98. DOI: 10.1186/s12876-016-0498-0
- Pascal M, Pérez-Gordo M, Caballero T, Escribese M, López Longo MN, Luengo O et al. Microbiome and allergic diseases. *Front Immunol* 2018, Vol 9; 1584: 1-9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01584
- Bridgman S, Kozyrskij A, Scott J, Becker A and Azad M. Gut microbiota and allergic disease in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016, 116: 99-105. DOI: 10.1016/j.anaai.2015.10.001
- Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J et al. The first colonizers of the human gut: composition, activities and Health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol and Biol Molecular Rev* 2017; 81(4): 1-67. DOI: 10.1128/MMBR.00036-17
- Derrien M, Álvarez As and de Vos W. The gut microbiota in the first decade of life. *Trends in Microbiology* 2019, 27(12): 997-1008. DOI: 10.1016/j.tim.2019.08.001
- Akagawa S, Akagawa Y, Yamanouchi S, Kimata T, Tsuji S and Kaneko K. Development of the gut microbiota and disbiosis in children. *Bioscience of Microbiota* 2021, 40(1): 12-18. DOI: 10.12938/bmfh.2020-034
- Peroni D, Nuzzi G, Trambusti I, Di Cicco ME and Comberiati P. Microbiome composition and its impact on the development of allergic diseases. *Front Immunol* 2020, 11 (700): 1-8. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00700
- Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 2008, 51:270-274. DOI: 10.1016/j.resmic.2007.12.007
- Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, Rodríguez-Baños M, Del Campo R, Fernández L et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Human Lactation* 2012, 28(1): 36-44. DOI: 10.1177/0890334411424729
- Shu SA, Yuen A, Woo E, Chu K, Kwan H, Yang G et al. Microbiota and food allergy. *Clin Rev Allerg and Immunol* 2019, 57(1): 83-97. DOI: 10.1007/s12016-018-8723-y
- Iweala O and Nagler C. The microbiome and food allergy. *Annu Rev Immunol* 2019, 37: 377-403. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041621
- Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, Paparo L, Di Scala C, Cosenza L et al. Gut microbiome composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Scientific reports* 2018, 8; 12500: 1-10. DOI: 10.1038/s41598-018-30428-3
- Sestito S, D'Auria E, Baldassarre ME, Salvatore S, Tallarico V, Stefanelli E et al. The role of prebiotics and probiotics in prevention of allergic diseases in infants. *Front Pediatr* 2020; 8 (583946): 1-28. DOI: 10.3389/fped.2020.583946
- Noce A, Marrone G, Di Daniele F, Ottaviani E, Wilson Jones G, Bernini R et al. Impact of Gut microbiota on onset and progression of chronic non-communicable diseases. *Nutrients* 2019; 11(1073): 1-35. DOI: 10.3390/nu11051073
- Acevedo N, Alhamwe BA, Caraballo L, Ding M, Ferrante A, Gran H et al. Perinatal and Early-Life Nutrition, Epigenetics, and Allergy. *Nutrients* 2021, 13 (724): 1-50. DOI: 10.3390/nu13030724
- Bunyanavich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P et al. Early-life gut microbiome and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol* 2016, 138(4): 1122-1130. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.03.041
- Dong P, Feng JJ, Yan DY, Lyu YJ and Xu X. Early-life gut microbiome and cow's milk allergy- a prospective case-control 6 month follow-up study. *Saudi J of BiolSciences* 2018, 25:875-880. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.11.051
- Mehaudy R, Parisi C, Petriz N, Eymann A, Jauregu MB and Orsi M. Prevalencia de alergia a la proteína de leche de vaca en niños en un hospital universitario de la comunidad. *Arch Arg Ped* 2018, 3:216-233. DOI: 10.5546/aap.2018.eng.219
- Bozzola M, Marchetti P, Cosentino M, Corti M, Petriz N and Parisi C. Alergia a la proteína de la leche de vaca. Evaluación de su resolución espontánea por medio de desafíos doble ciego placebo controlados. *Arch Allerg e Immunol Clin* 2015, 46(2): 44-48. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-916286>
- Díaz M, Guadamuro L, Espinosa-Martos I, Mancabelli L, Jiménez S, Molinos-Norniella C et al. Microbiota and derived parameters in fecal samples of infants with non-IgE cow's milk protein allergy under a restricted diet. *Nutrients* 2018, 10 (1481): 1-11. DOI: 10.3390/nu10101481
- Meninni M, Fierro V, Di Nardo G, Pecora A and Fiocchi A. Microbiota in non-IgE mediated food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2020, 20:323-328. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000644
- Rachid R and Chatila T. The role of the gut microbiota in food allergy. *Curr Opin Pediatr* 2016, 28: 748-753. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000427
- Di Costanzo M, Carucci L, Berni Canani R and Biasucci G. Gut Microbiome Modulation for Preventing and Treating Pediatric Food Allergies. *Int J Mol Sci* 2020; 21 (5275): 1-17. DOI: 10.3390/ijms21155275
- Noval Rivas M, Burton O, Wise P, Zhang Y, Hobson S, García Lloret M et al. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2013, 131:201-212. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.10.026
- Feehley T, Plunkett C, Bao R, Hong SM, Cullen E, Belda-Ferre P et al. Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nature Medicine* 2019, 25: 448-453. DOI: 10.1038/s41591-018-0324-z
- Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna S, von Berg A, Beyer K et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 1-125. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2010.01068.x
- Mitselou N, Hallberg J, Stephansson O, Almqvist C, Melén E, Ludvigsson J et al. Cesarean delivery, preterm birth, and risk of food allergy: Nationwide Swedish Cohort study of more than 1 million children. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142(5): 1510-1516. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.06.044
- Ling Z, Li Z, Cheng Y, Luo Y, Tong X, Yuang L et al. Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl Environ Microbiol* 2014, 80(8): 2546-54. DOI: 10.1128/AEM.00003-14
- Chen CC, Chen KJ, Kong MS, Chang HJ and Huang JL. Alterations in the

- gut microbiota of children with food sensitization in early life. *Pediatr Allergy Immunol* 2016, 27:254-262. DOI: 10.1111/pai.12522
33. Azad MB, Konya T, Guttman DS, Field CJ, Sears MR, Hayglass KT et al. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin Exp Allergy* 2015, 45(3): 632-43. DOI: 10.1111/cea.12487
34. Berni Canani R, Sangwan N, Stefka A, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formulae expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J* 2016, 10:742-750. DOI: 10.1038/ismej.2015.151
35. Inoue R, Sawai T, Sawai C, Nakatani M, Romero-Pérez G, Ozeki M et al. A preliminary study of gut dysbiosis in children with food allergy. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2017, 81(12): 2396-2399. DOI: 10.1080/09168451.2017.1383849
36. Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A, Wood RA, Burks AW, Dawson P et al. Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy* 2018, 73:1515-24. DOI: 10.1111/all.13389
37. Savage et al. A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in childhood. *Allergy* 2018, 73:145-152. DOI: 10.1111/all.13232
38. Thompson-Chagoyan O, Vieites J, Maldonado J, Edwards C and Gil A. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy – a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol* 2010, 21: 394-400. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2009.00961.x



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución-No Comercia- Compartir Igual 4.0 Internacional · Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.

CURSOS ABA

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

CICLO LECTIVO 2024

PROGRAMA DE EDUCACIÓN CONTINUA

Informes e inscripción

Secretaría de la Asociación Bioquímica Argentina

Venezuela 1823 Piso 3 (1096) – Buenos Aires -Argentina

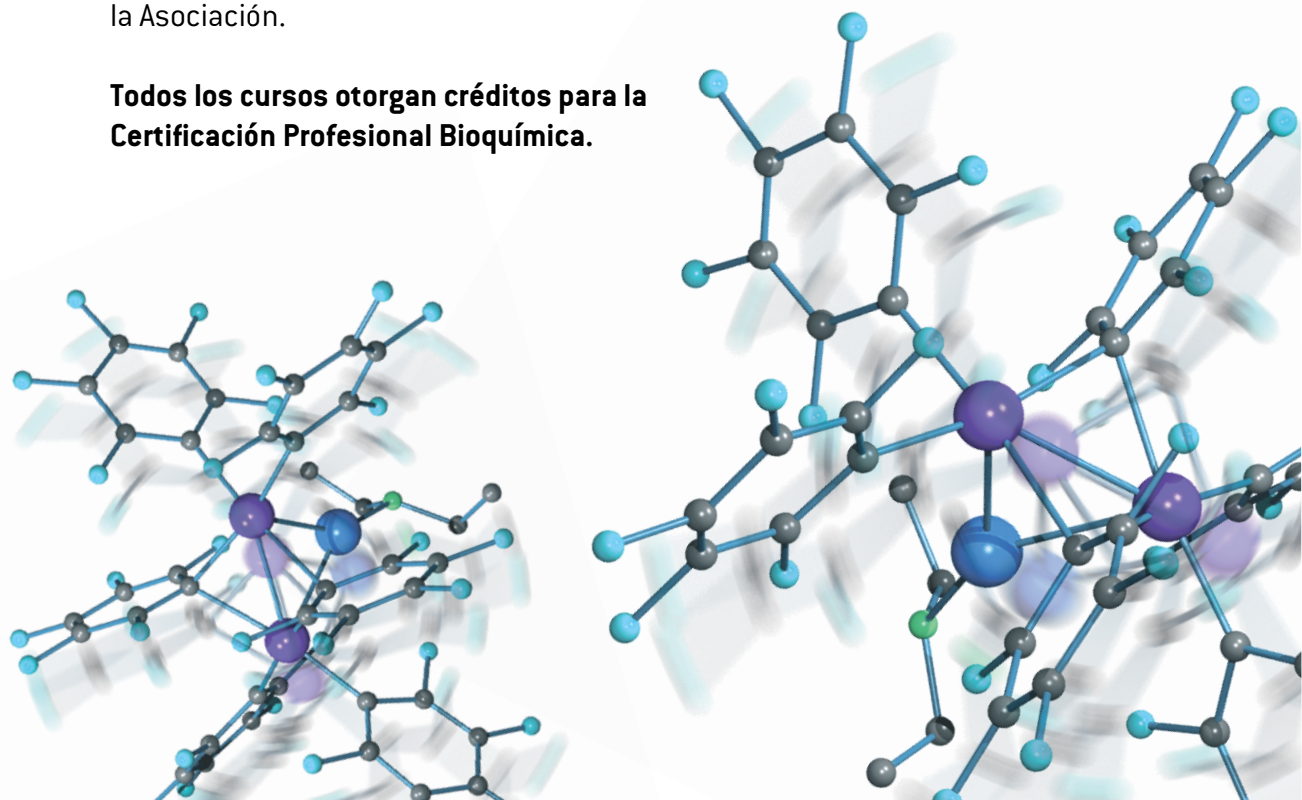
Tel: (011) 4381-2907 Telefax: (011) 4384-7415 - De 15 a 19 Hs.

Consultas administrativas: [cursos@aba-online.org.ar](mailto: cursos@aba-online.org.ar)

Programas completos disponibles en: <http://www.aba-online.org.ar/>

Nota para no socios: abonando la primera cuota social y adhiriendo al débito automático por tarjeta, podrá acceder a los cursos ABA como socio, recibiendo además todos los beneficios de la Asociación.

Todos los cursos otorgan créditos para la Certificación Profesional Bioquímica.



Anuncie en ByPC...

Bioquímica y Patología Clínica



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)
Buenos Aires - Argentina
Tel/ fax: 4384-7415 - Tel: 4381-2907
e-mail: info@aba-online.org.ar
www.aba-online.org.ar

VOL 74 - Nº 1 - 2010
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761

Bioquímica y Patología Clínica

Médula ósea de paciente de 4 meses de edad con Síndrome de Chediak Higashi

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

VOL 75 - Nº 2 - 2011
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761

Bioquímica y Patología Clínica

Congreso Nacional Residentes Bioquímicos
Sociedad Argentina de Hematología y 26 de Agosto 2011

VOL 74 - Nº 2 - 2010
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-9903 Ed. en línea

Bioquímica y Patología Clínica

Personajes destacados:
Eugenia Sacerdote de Lustig

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

VOL 75 - Nº 1 - 2011
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761

Bioquímica y Patología Clínica

69º Congreso Argentino de Bioquímica: Los Grandes Síndromes Clínicos: De la sospecha clínica al diagnóstico bioquímico molecular*

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

PROGRAMA DE EVALUACIÓN CONTÍNUA ABA 2024

PRIMER CUATRIMESTRE

	NOMBRE DEL CURSO	INICIO	DURACION	DIRECTOR/A
1	LA NEFROLOGIA DESDE EL LABORATORIO Y LA CLINICA I: Fisiopatología renal y bioquímica de los líquidos y electrolitos	18-Mar	7 meses	Dr. Alberto Villagra
2	BIOLOGÍA MOLECULAR: APLICACIONES CLÍNICAS	18-Mar	ANUAL	Dr. Luis Bastos Dra. María de la Paz Domínguez
3	ESTADÍSTICA PRACTICA: "Herramientas básicas para la investigación clínica"	18-Mar	ANUAL	Prof. Dra. María de Luján Calcagno
4	CURSO ANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA	25-Mar	ANUAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovensky
5	TOPICOS DE ACTUALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA EN LA PRACTICA DIARIA 2024	25-Mar	ANUAL	Dra. Silvia B. González Dra. Viviana Osta
6	CONTROL DE CALIDAD INTERNO. Fundamentos y estrategias para el laboratorio clínico	25-Mar	ANUAL	Dr. César Collino y otros
7	GASES EN SANGRE, OXIMETRIA, ELECTROLITOS Y METABOLITOS	1-Apr	7 meses	Dra. Silvia Gonzalez
8	DESAFÍOS Y OPORTUNIDADES PARA OPTIMIZAR LA FASE PREANALITICA Y LA ELABORACIÓN DE INFORMES EN BIOQUÍMICA CLÍNICA (NUEVO)	1-Apr	4 meses	Prof. Dr. Fernando Brites Prof. Dr. Leonardo Gómez Rosso
9	GENÓMICA Y BIOINFORMÁTICA APLICADAS A LA MEDICINA DE PRECISIÓN	1-Apr	CUATRIMESTRAL	Dr. Martín Abba Dr. Mariano Golubicki
10	NORMAS ISO Utilidad y Aplicación para el Laboratorio Bioquímico	1-Apr	SEMESTRAL	Dr. César Collino
11	HEMOSTASIA: PRINCIPIOS BASICOS TEORICOS Y PRACTICOS	8-Apr	CUATRIMESTRAL	Dr. Ricardo Forastiero Dra. Cristina Duboscq
12	PATOLOGÍAS ENDOCRINOLÓGICAS: "El laboratorio clínico herramienta indispensable en el diagnóstico"	8-Apr	ANUAL	Dra. Patricia Otero
13	EXÁMEN DE ORINA. ASPECTOS CITOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS	8-Apr	TRIMESTRAL	Dr. Luis Palaoro
14	TOPICOS DE BIOQUÍMICA CLÍNICA Y PATOLOGÍA EN PEDIATRÍA 2024	15-Apr	ANUAL	Dra. Sandra Ayuso Dra. Viviana Osta
15	EL LABORATORIO FRENTE A LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: evaluación de factores de riesgo lipídico, no lipídico y de marcadores del evento agudo	15-Apr	SEMESTRAL	Prof. Dr. Fernando Brites
18	EL MICROSCOPIO COMO ALIADO EN EL DIAGNOSTICO	22-Apr	SEMESTRAL	Dra. Viviana Osta Dra. María de la Paz Domínguez
19	NOMENCLATURA CITOGENÓMICA HUMANA Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenómica Humana (ISCN 2020)	29-Apr	CUATRIMESTRAL	Dras Furforo y Rozental
20	CALIDAD EN LABORATORIOS DE GENETICA FORENSE. (NUEVO)	Abril a definir	SEMESTRAL	Dra. Claudia García Bonelli Dr. Esp. César Collino
21	CALIDAD ANALITICA: Implementación de un Sistema de Gestión de Calidad: Herramientas prácticas para el Laboratorio Bioquímico	6-May	SEMESTRAL	Dres: César Collino, César Yené, Pablo Lujan., Claudio Abiega

	NOMBRE DEL CURSO	INICIO	DURACION	DIRECTOR/A
22	HERRAMIENTAS PARA EL RECONOCIMIENTO CITOMORFOLÓGICO DE LOS LINFOCITOS EN TRASTORNOS BENIGNOS Y MALIGNOS: linfocitos reactivos o sospecha de neoplasia?	6-May	TRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso
23	TOXICOLOGIA LEGAL Y FORENSE	6-May	SEMESTRAL	Dra. Adriana Ridolfi Dra. Gloria Álvarez
24	"PRIMER CURSO INTERNACIONAL: Clínica y Laboratorio de enfermedades autoinmunes". (NUEVO)	Mayo a definir	SEMESTRAL	Dr. Orlando Gabriel Carballo Dr. Carlos von Mühlen
25	ACTUALIZACION EN DIAGNÓSTICO VIRAL	13-May	CUATRIMESTRAL	Dra. María José Rial Dra. Alejandra Svartz
26	BASES MOLECULARES Y CELULARES DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA INMUNE	13-May	SEMESTRAL	Dr. Fernando Chirido
27	DILEMAS EN LA IDENTIFICACION MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS DE LA SERIE MIELOIDE EN SANGRE PERIFERICA (NUEVO)	20-May	TRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso
28	INHIBIDORES ADQUIRIDOS DE LA COAGULACION	27-May	CUATRIMESTRAL	Dr. Ricardo Forastiero Dra. Cristina Duboscq
29	MEDICINA DEL DEPORTE: Relación con la bioquímica: desde el diagnóstico al tratamiento de lesiones deportiva	27-May	CUATRIMESTRAL	Dr. Christian Lassen y otros
30	CLAVES PARA LA INTERPRETACION Y VALIDACION DEL HEMOGRAMA AUTOMATIZADO. DETECCION DE INTERFERENCIAS	3-Jun	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Osta
31	LA BIOQUÍMICA EN EL BANCO DE SANGRE	10-Jun	SEMESTRAL	Dr. Mauro Fernández Toscano
32	ROL DE LA MORFOLOGIA DE LAS CELULAS HEMATICAS EN EL LABORATORIO DE URGENCIAS	10-Jun	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Osta
33	EVALUACIÓN DEL SEMEN HUMANO. TEÓRICO-PRÁCTICO	10-Jun	CUATRIMESTRAL	Dra. Julia Irene Ariagno Dra Chenlo
34	MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS. CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO	17-Jun	TRIMESTRAL	Dra. Silvina Farrando Dra. María Laura Sánchez
35	HERRAMIENTAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	24-Jun	CUATRIMESTRAL	Dr. Luis Bastos Dra. María de la Paz Domínguez
36	EL ROL DEL LABORATORIO EN LA SEGURIDAD DEL PACIENTE. [TOTALMENTE ACTUALIZADO]	2do cuatrimestre	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvana Daverio Dra. Karina Fiezzoni
37	NEFROLOGÍA II. Rol del laboratorio en los criterios diagnósticos. (NUEVO)	2do cuatrimestre	TRIMESTRAL	Dr. Alberto Villagra
38	ACTUALIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE LAS DISPROTEINEMIAS	1-Jul	SEMESTRAL	Dra. Isabel Desimone Dra. Isabel Crispiani
39	CURSO DE NEUROINMUNOLOGIA	1-Jul	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvia G. Ramos Dr. Andres Villa Gabriel Carballo
40	CURSO INTEGRAL SOBRE LÍQUIDOS DE PUNCIÓN con Tópicos de Urgencia	8-Jul	CUATRIMESTRAL	Dr. Luis Palaoro
41	INMUNOLOGIA CELULAR. EL LABORATORIO EN EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE Y SUS PATOLOGÍAS	15-Jul	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Novoa

SOLICITUD DE INSCRIPCION

ASOCIACION
BIOQUIMICA
ARGENTINA



ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA

Fundada el 3 de septiembre de 1934

Miembro Fundador:

Confederación Unificada Bioquímica de la Republica Argentina (CUBRA); Coordinadora de Colegios Bioquímicos de Ley de la República Argentina; Sociedad de Bioquímica y Patología Clínica del MERCOSUR.

Institución Invitada:

Ente Coordinador de Unidades Académicas de Facultades de Farmacia y Bioquímica (ECUAFyB)

Miembro Adherente:

Asociación Latinoamericana Patología Clínica.

Integrante:

Comisión Nacional de Certificación Bioquímica (COCERBIN); Comisión de Elaboración de Normas y Guías de Laboratorio del Ministerio de Salud y Acción Social; Consejo Asesor y del Comité de Auditoría Interna Programa de Acreditación de Laboratorios de la Fundación Bioquímica Argentina.

La ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA es la primera entidad Bioquímica de nuestro país, y la precursora de muchas otras en Latinoamérica.

Los objetivos que llevaron a su creación, siguen vigentes en la actualidad:

- 1 | Promover la educación continua de los bioquímicos.
- 2 | Editar la Revista Bioquímica y Patología Clínica, que es la revista científica de la Asociación, de distribución cuatrimestral.
- 3 | Desarrollar cursos de capacitación y actualización, en la Ciudad de Buenos Aires y el Interior del País.
- 4 | Cada 2 años, organiza en los años pares el Congreso Nacional Bioquímico y en los años impares, las Jornadas de Actualización ABA.
- 5 | En su sede tiene un aula docente de 30 asientos y un moderno laboratorio de trabajos prácticos.
- 6 | Asimismo, la Asociación ha implementado el Programa de Certificación Bioquímica, mediante el cual se puede acceder a los Certificados de Especialista, y de Actualización en una determinada especialidad o en Bioquímica Clínica.
- 7 | En la Asociación funcionan además, diferentes Comisiones Internas y las Divisiones / Secciones, encabezadas por prestigiosos profesionales, para asesorar a la Comisión Directiva y a sus socios.
- 8 | La ABA tiene convenios de cooperación institucional con universidades nacionales, privadas y fundaciones científicas de prestigio.

Los socios de la ABA gozan de aranceles preferenciales en cualquier actividad que desarrolla la Institución y reciben la Revista ByPC sin cargo adicional.

SOLICITUD DE INSCRIPCION

ASOCIACION
BIOQUIMICA
ARGENTINA



Para asociarse, debe hacernos llegar esta solicitud completa en letra clara de imprenta y sin omitir ningún dato. Adjuntar una foto carnet, una fotocopia del título (anverso y reverso, tamaño 10 x 15 cm) y -de elegir este sistema de pago- el formulario de ingreso al sistema de débito automático por tarjeta de crédito VISA o MASTERCARD (\$45/mes). En su defecto deberá abonar un año por adelantado (\$540/año)

En el caso que usted optara por el pago anual, puede hacerlo en efectivo en nuestra secretaría o mediante cheque y/o giro postal a la orden de "Asociación Bioquímica Argentina", completo, sin abreviaturas.

Apellido y Nombre

D.N.I. – L.C. – L.E. – C.I.

Fecha de Nacimiento

Domicilio

Localidad C.P.

Provincia País

Teléfono e-mail

Título profesional Otorgado por

Año Nro. Matrícula

Lugar de trabajo

Domicilio

Teléfono e-mail

INFORMES

Secretaría de la Asociación Bioquímica Argentina Venezuela 1823 Piso 3
1096 – Ciudad de Buenos Aires. e-mail: info@aba-online.org.ar.
TELEFAX (011)4384-7415 - TEL: (011) 4381-2907

Horario: Lunes a Viernes de 15:00 a 19:00 Hs.