



ASOCIACIÓN  
BIOQUÍMICA  
ARGENTINA

# ByPC

Vol. 88 - Nº3  
Sep.- Dic. de 2024

Ciudad de Bs. As. Argentina  
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa  
ISSN 2684-0359 Ed. electrónica

# Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación  
Bioquímica Argentina

**Alexander Fleming** descubre la Penicilina hace 96 años, cuando al regreso de sus vacaciones veraniegas examinó unas placas de Petri inoculadas con *Staphylococcus aureus* y observó que una de ellas se había contaminado con un hongo de color verde y, alrededor de este, se había inhibido el crecimiento de los estafilococos. El hongo en cuestión era el *Penicillium notatum*. Fleming llamó al extracto alcohólico del cultivo del moho: Penicilina.

En el décimo número de "The British Journal of Experimental Pathology", publica el descubrimiento como el primer trabajo científico de la historia sobre un antibiótico de origen natural.



## EDITORIAL

- Pág. 13 **Actualización y cambios de paradigma: Ya no más ayuno de 12 horas ni glucemia de 110 mg/dL.**

*Update and paradigm shifts: No more 12-hour fasting or 110 mg/dL glucose levels.*

Fernando D. Brites.

## ARTÍCULOS ORIGINALES

- Pág. 14 **Prevalencia de casos asintomáticos de COVID-19 en donantes de sangre de CABA.**

*Prevalence of asymptomatic cases of COVID-19 in blood donors from Buenos Aires city.*

Gendler, Silvina Alejandra.

- Pág. 21 **Comparación de dos métodos para la determinación de ceruloplasmina en un hospital pediátrico.**

*Comparison of two methods for the determination of ceruloplasmin in a pediatric hospital.*

Grau, María Emilia; Procopio, Domingo; Collini, Mariana Beatriz.

- Pág. 25 **Estudio de inmunidad específica celular y humoral de memoria en pacientes recuperados de COVID-19 sin vacunar.**

*Study of the specific cellular and humoral memory immunity in unvaccinated patients recovered from COVID-19.*

Libera, Natalia; Lerman, Andrea Susana.

- Pág. 34 **Variación en la expresión de CD20 en leucemias linfoblásticas agudas B en pacientes pediátricos y su impacto en el tratamiento.**

*Variation of CD20 expression in B Acute Lymphoblastic Leukemias in pediatric patients and its impact on treatment.*

Ceres, Verónica Luján; Vázquez, María Paula; Acosta, Daiana Andrea; González, María Isabel; Carrara, Carolina Alejandra; Tamburella, Florencia Raquel; Corominas, Ana; Venegas, María Belén.

- Pág. 39 **Resistencia antirretroviral primaria de HIV-1 en una institución de salud privada de Ciudad Autónoma de Buenos Aires.**

*Primary HIV-1 Antiretroviral Resistance in a Private Health Care Institution in the City of Buenos Aires, Argentina.*

Mecozzi, Rosario; Garbarello, María Florencia; Seoane, Facundo Nahuel; Rolan, Martín Andrés; Martinuzzo, Marta Elba; Medina, Marina Soledad.

- Pág. 46 **Determinación de los niveles de anticuerpos antifosfolípidicos en pacientes con COVID-19**

*Determination of antiphospholipid antibody levels in patients with COVID-19.*

Ramos, Hernan Nicole; Bevan, Thomas Benjamín; Gerván, Natalia Nora; Pedano, Valeria Cristina.

## ARTÍCULOS DE REVISIÓN

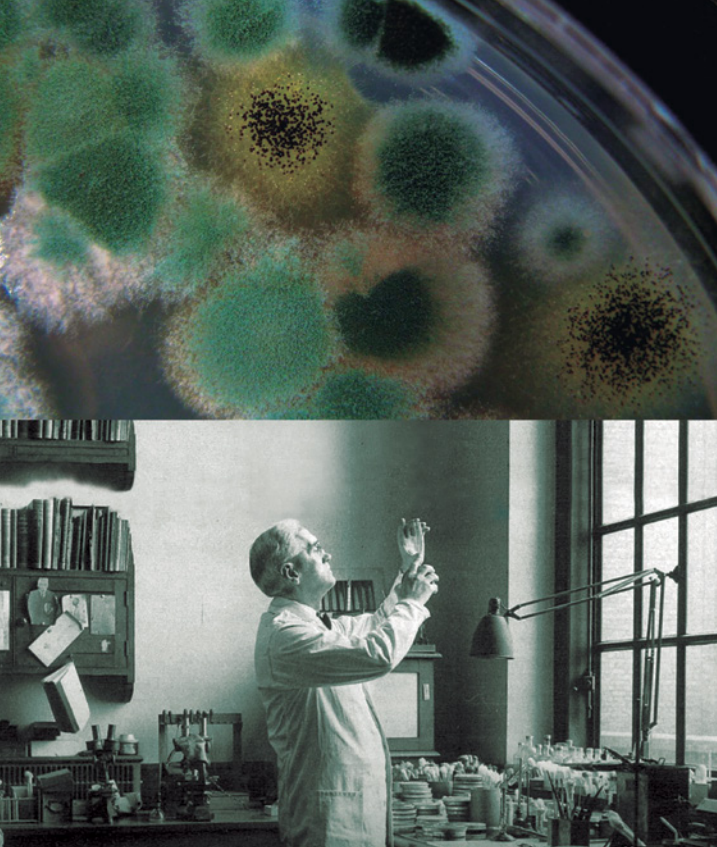
- Pág. 60 **Clasificación de la leucemia mieloide aguda: entre el consenso y la controversia.**

*Classification of acute myeloid leukemia. Between consensus and controversy.*

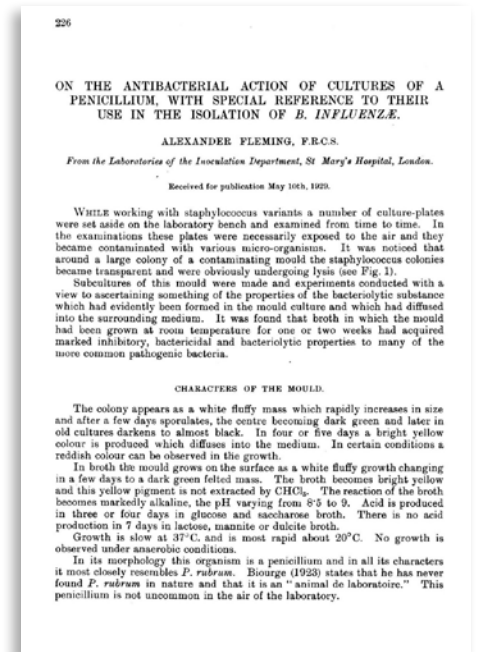
Lazarte, Sandra Stella; Ledesma Achem, Miryam Emilse; Haro, Cecilia.

## PROGRAMA DE EDUCACIÓN CONTINUA

- Pág. 66 **Cursos A.B.A - Ciclo Lectivo 2024.**



Décimo número de "The British Journal of Experimental Pathology", en el que se publica el trabajo de Fleming.



## TAPA **Alexander Fleming (1881 - 1955)** La visión aguda como motor de la investigación

El 3 de setiembre se cumplirán 96 años del descubrimiento de la penicilina, develado por Alexander Fleming. En realidad, este hallazgo no fue el resultado de una investigación cuyo objetivo era la búsqueda de sustancias antimicrobianas producidas por otros microorganismos, sino que fue un caso de serendipia, es decir, de un hallazgo casual o fortuito al momento de estar buscando una cosa diferente a la sucedida.

En esos años, el doctor Fleming profundizaba sus estudios sobre la lisozima, descubierta por él en 1922. Ocurrió que, al regreso de sus vacaciones veraniegas, el Dr. Fleming, mientras realizaba una limpieza en su laboratorio del Hospital St Mary de Londres, examinó unas placas de Petri inoculadas antes de sus vacaciones con *Staphylococcus aureus*, para luego descartarlas en Lysol. Observó que una de ellas se había contaminado con un hongo de color verde y que, alrededor de este, se había inhibido el crecimiento de los estafilococos.

El hongo en cuestión era el *Penicillium notatum* (erróneamente identificado por Fleming como *Penicillium rubrum*). Alexander Fleming no pudo purificar la molécula y llamó al extracto alcohólico del cultivo del moho *penicilina*. Fleming realizó varios experimentos destinados a establecer el grado de susceptibilidad o resistencia de una bacteria al extracto de moho en una amplia gama de bacterias patógenas y observó que muchas de ellas eran rápidamente destruidas.

En el décimo número de "The British Journal of Experimental Pathology", publica el primer trabajo científico de la historia sobre un antibiótico de origen natural. Pero el que haya sido un descubrimiento accidental no resta mérito científico. Ciertamente, solo un investigador avezado e inquieto pudo advertir el efecto del moho sobre las bacterias y luego buscar la causa de este fenómeno en los componentes que contenía el extracto de este hongo.

Sus limitaciones en el conocimiento de la química, dada su formación médica quirúrgica, y el encontrarse en un centro de investigación hospitalario no le permitieron aislar y purificar la penicilina, de modo que solo pudo caracterizar el extracto como no proteico, y, por ende, no enzimático. Sus trabajos, retomados por Howard W. Florey y Ernest B. Chain en Oxford casi diez años después, fueron los que hicieron posibles la purificación y su producción *in vitro*. También probaron tanto la seguridad de la droga en modelos animales como su acción terapéutica en animales infectados. Durante sus experimentos, comprobaron que algunas bacterias contaminantes producían una enzima capaz de destruir la penicilina, la penicilinasas. Con todos estos datos, Alexander Fleming, quien se había unido al grupo de Oxford para trabajar con la penicilina, mostró otra virtud de un gran investigador, la de poder hipotetizar situaciones futuras apoyadas en la evidencia conseguida hasta el momento. Es por ello que su discurso al recibir el premio Nobel de Medicina con que fueron distinguidos él, Florey y Chain en 1945 fue casi profético respecto de la enorme crisis de la resistencia a los antimicrobianos: "Pero me gustaría hacer una advertencia. La penicilina es, para todos los efectos, no tóxica, por lo que no hay necesidad de preocuparse por una sobredosis y envenenar al paciente. Sin embargo, puede haber un peligro en la subdosificación. No es difícil hacer que los microbios sean resistentes a la penicilina en el laboratorio exponiéndolos a concentraciones que no son suficientes para matarlos, y lo mismo ha sucedido ocasionalmente en el organismo.

"Puede que llegue el momento en que la penicilina pueda comprarse en las tiendas. Entonces, existe el riesgo de que una persona ignorante se subdosifique fácilmente y, al exponer sus microbios a cantidades no letales del medicamento, los haga resistentes".

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

#### Dr. 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, Argentina.
- Medicina, Universidad Nacional de la Matanza.  
Provincia de Buenos Aires, Argentina.

#### Dr. Julián Verona

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

### CORRECCIÓN DE ESTILO

Lic. Débora Schmer Miranda (Español)

Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés)

### SECRETARIOS ADMINISTRATIVOS

Sr. Gastón Goldberg

Sr. Jorge Signorelli

### ASESORES\*

\*Las personas integrantes de este cuerpo no forman parte del Comité Editor y por lo tanto no participan en las decisiones editoriales respecto a la aceptación o rechazo de publicación de artículos presentados a la revista. No obstante, eventualmente son consultados por los editores respecto a temas específicos de su campo disciplinar de conocimiento.

**Aresio Plaza Lopez.** Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, España.

**Carlos Alberto von Mühlen.** Hospital Molinos de Viento, Porto Alegre, Brasil.

**Carlos Calvo Monfil.** Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

**Dora Ruchanzky.** Universidad de la República del Uruguay, Uruguay.

**Fernando Antúnez.** Hospital Maciel, Administración de Servicios de Salud del Estado, Montevideo, Uruguay.

**Ignacio García de la Torre.** Hospital General de Occidente y Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.

**Luis García de Guadiana Romualdo.** Hospital Universitario Santa Lucía, Cartagena, España.

**María Montserrat Blanes González.** Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

**Pablo Daniel Lapunzina Badi.** Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.

**Adriana Factorovich.** Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Alejandra Scaziotta.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Alejandra Ginaca.** Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Alberto Lazarowski.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Alberto Villagra.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Alicia Arechabala.** Hospital Francisco J. Muñiz, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Alicia Blanco.** Academia Nacional de Medicina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Angela Famiglietti.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Belén Bouzas.** Hospital Francisco J. Muñiz, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Carlos Vay.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Cesar Collino.** Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

**Claudia Ayuso.** Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Claudia Menghi.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Daniel Bustos.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Eduardo Mormandi.** Hospital Carlos Durand, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Fernando Goldbaum.** Instituto Leloir, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Gabriel Migliarino.** Universidad de Morón, Morón, Argentina.

**Gabriela Mendeluk.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Gabriela Santiso.** Hospital Francisco J. Muñiz, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Gloria Cerrone.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Graciela Ponce.** Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

**Graciela Ramos.** Hospital Carlos G Durand, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Jorge Quarleri.** Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.

**Jorge Rey.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**José Margariños.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Laura Boero.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Leticia Madalena.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Luis Cuniberti.** Universidad Favaloro, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**María José Rial.** Hospital de Niños Pedro de Elizalde, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**María Laura D' Ambrosio.** Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús, Lanús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

**Marta Martinuzzi.** Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Monica Aixalá.** Academia Nacional de Medicina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Nestor Litwin.** Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.

**Nilda Fink.** Fundación Bioquímica Argentina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Nora Slobodianik.** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Patricia Otero.** Hospital Carlos Durand, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Patricia Sorroche.** Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Sara Kauffman.** Hospital General de Agudos Dr. Juan A. Fernández, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Silvia González.** Hospital de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Stella Carchio.** Hospital Prof. Juan P. Garrahan, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Viviana Osta.** Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Fundada el 3 de septiembre de 1934

COMISIÓN DIRECTIVA

PRESIDENTE

**Dra. Silvia B. González**

VICEPRESIDENTE

**Dra. Patricia Otero**

SECRETARIA

**Dra. Viviana Osta**

TESORERA

**Dra. Isabel Desimone**

VOCALES

1° Vocal Titular

**Dra. María José Rial**

2° Vocal Titular

**Dr. Eduardo Mormandi**

3° Vocal Titular

**Dra. María Rugiero**

1° Vocal Suplente

**Dr. Alberto Villagra**

2° Vocal Suplente

**Dra. M. de la Paz Domínguez**

3° Vocal Suplente

**Dra. Alejandra Svartz**

COMISIÓN REVISORA DE CUENTAS

Titular 1°

**Dra. Silvia Morilla**

Titular 2°

**Dra. Estella Meyer**

Titular 3°

**Dra. Silvia Cajiao**

1° Vocal Suplente

**Dra. Florencia Minotti**

2° 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 Colitto**

COMITÉ CIENTÍFICO ASESOR

**Dra. Mónica Aixalá**

**Dr. Gloria Alvarez**

**Dra. Liliana 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**

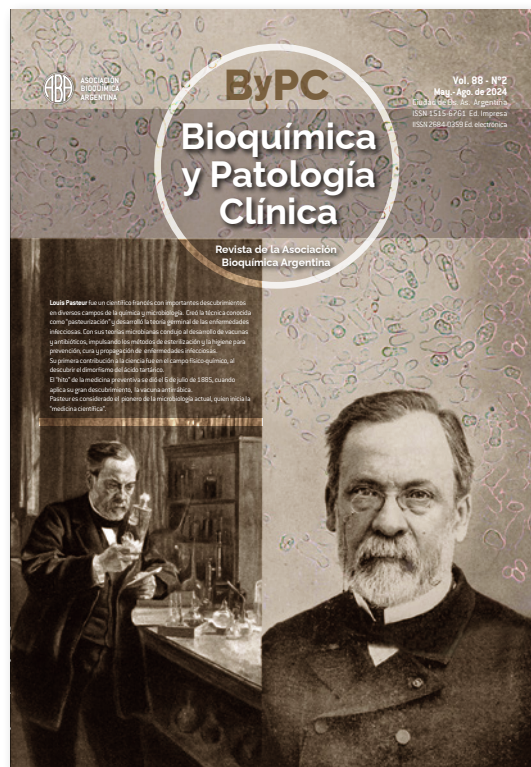
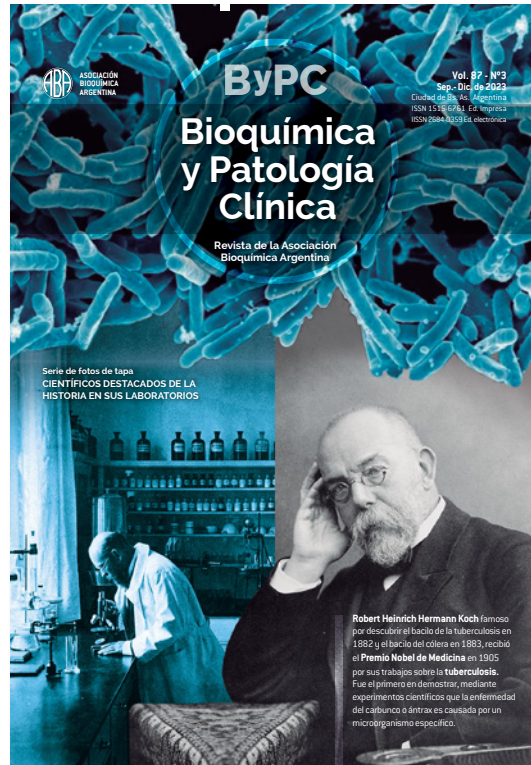
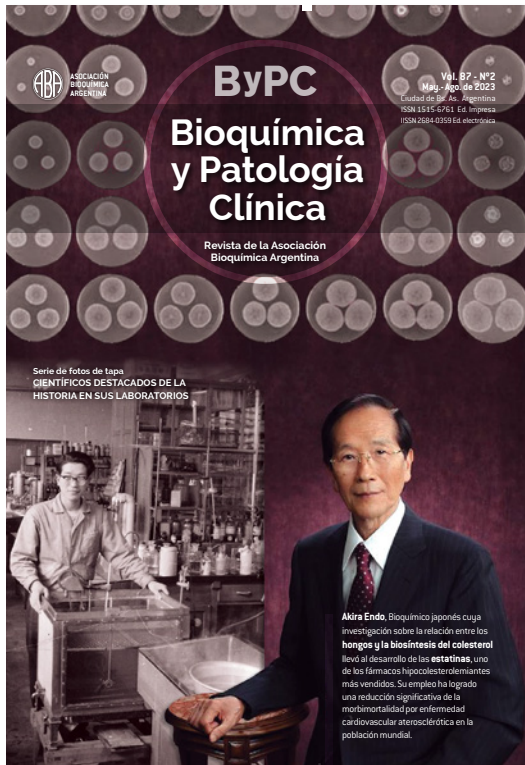
**Dra. Nilda Fink**

**Dr. Néstor Litwin**

**Dr. Miguel Angel De Cristóforo**

# ByPC

Bioquímica y Patología Clínica  
Revista de la Asociación Bioquímica Argentina



# 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](mailto: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<sup>1\*</sup>; Benítez, Laura<sup>2</sup>; Romero, Mario<sup>3</sup>).

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.:  $p < 0,05$ ;  $32 \pm 2$  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].

# Actualización y cambios de paradigma: Ya no más ayuno de 12 horas ni glucemia de 110 mg/dL

El desarrollo profesional del bioquímico debe caracterizarse por una actualización continua y constante. Sin lugar a dudas, la universidad aporta los conocimientos y habilidades básicas que hacen que los bioquímicos argentinos se distingan de los egresados de carreras equivalentes a Bioquímica en muchos países del mundo. Sin embargo, es esencial que, una vez finalizada la carrera de grado durante la cual el alumno se dedica al estudio riguroso de una amplia gama de asignaturas tanto científicas como técnicas, que abarcan desde ciencias básicas, como Biología, Química, Física, y Matemáticas hasta otras aplicadas como Bioquímica Clínica, el egresado continúe con su formación de posgrado. Esta etapa fundamental tiene fecha de inicio, pero no de finalización. A lo largo de toda su carrera profesional, el bioquímico deberá dedicarse a profundizar los conocimientos en áreas específicas de la bioquímica y a ampliar las competencias profesionales, para así acceder a roles más especializados en investigación, extensión, docencia, industria, ambiente o salud.

Específicamente, los profesionales dedicados a la bioquímica clínica constituyen una parte esencial del equipo de salud, teniendo en cuenta que alrededor de un 70% de las decisiones clínicas se basan en los resultados aportados por el laboratorio. En la mayoría de los casos, su labor contribuye de manera significativa a alcanzar un diagnóstico precoz y preciso, a efectuar un seguimiento adecuado del tratamiento instaurado y a prevenir enfermedades mejorando la calidad de la atención médica.

La reciente pandemia de COVID-19 evidenció claramente que los bioquímicos clínicos están a la vanguardia para dar respuesta a nuevas enfermedades y adaptar las pruebas de laboratorio no solo a las tecnologías emergentes, sino también al surgimiento de brotes de nuevas patologías, lo cual implica un reto intelectual y práctico. Los bioquímicos sólidamente formados han demostrado poseer la habilidad para desarrollar nuevos métodos diagnósticos, que mejoran la capacidad del sistema de salud para detectar y tratar enfermedades de manera más efectiva. Más aún, en algunos casos, han podido enfrentar satisfactoriamente el desafío de desarrollar nuevos fármacos y vacunas e incluso diseñar los ensayos clínicos que permiten la evaluación de la eficacia y seguridad de los mismos.

Otro rol importante del bioquímico clínico es participar de programas de cribado y prevención, como, por ejemplo, la evaluación de lípidos y lipoproteínas para prevenir las enfermedades cardiovasculares o de marcadores del metabolismo de los hidratos de carbono para la prevención de la diabetes. Pero, además, es función importante del bioquímico asesorar al resto de los integrantes del equipo de salud e incluso a los propios pacientes. De hecho, en este momento, al actualizarlos, nos encontramos con evidencia científica sólida que nos lleva a un cambio de paradigma en algo tan sencillo y a la vez

tan importante como son las horas de ayuno requeridas para la determinación del perfil lipídico básico (triglicéridos, colesterol total, colesterol de LDL, colesterol de HDL, y colesterol no HDL).

Durante muchos años, nos esforzamos en resaltar que, para un estudio de lípidos, se necesitaba un ayuno de 12 horas, ni más ni menos, y ahora diversos estudios llevados a cabo en un número altísimo de individuos han hecho que distintas organizaciones nacionales e internacionales recomienden que estos estudios se realicen sin ayuno y no solamente porque es más práctico para el paciente, sino también porque la medición principalmente de los niveles plasmáticos de triglicéridos sin ayuno posee mayor valor predictivo para enfermedad cardiovascular que con ayuno, además de evidenciar otras ventajas. Pero, también es cierto que la mayoría de las solicitudes que llegan al laboratorio de análisis clínicos no solo incluyen el perfil lipídico, sino también otros parámetros, de los cuales probablemente el más frecuente sea la glucemia. Como es bien sabido, para la medición de los niveles plasmáticos de glucosa se necesitan 8 horas de ayuno, por lo cual la recomendación actual sería que, cuando la solicitud incluya glucemia, todos los estudios, incluido el perfil lipídico, se realicen con esas horas de ayuno. Y en relación con la glucemia, otro cambio que surge de la evidencia y que avalan la Sociedad Argentina de Diabetes (SAD) y la Asociación Bioquímica Argentina (ABA), entre otras sociedades científicas, es que el valor de referencia ya no es menor de 110 sino menor de 100 mg/dL, por lo que uno de los criterios para efectuar el diagnóstico de prediabetes es la presencia de valores entre 100 y 125 mg/dL.

Es importante difundir estos cambios. Sin embargo, superar la inercia y cambiar paradigmas es un proceso complejo y desafiante. Se debe ser consciente de que el cambio genera incertidumbre, y la incertidumbre a menudo es percibida como una amenaza. Cambiar un paradigma no es solo una cuestión de presentar nuevas ideas, sino de proporcionar una evidencia contundente y consistente que desafie las creencias anteriores. Este proceso puede llevar tiempo, ya que requiere de la capacitación, validación, aceptación, y adopción por parte de la comunidad en su totalidad, incluyendo a todos los integrantes del equipo de salud y a los pacientes.



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-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.

**Dr. Fernando D. Brites**

Profesor Titular, Depto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Investigador Principal, CONICET.

Director de Bioquímica y Patología Clínica.

## ARTÍCULO ORIGINAL

## Prevalencia de casos asintomáticos de COVID-19 en donantes de sangre de CABA

*Prevalence of asymptomatic cases of COVID-19 in blood donors from Buenos Aires city*Gendler, Silvina Alejandra <sup>1</sup><sup>1</sup>Unidad de Hemoterapia e Inmunoematología, Hospital J. A. Fernández. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

\*Contacto: Gendler, Silvina. Hospital J. A. Fernández, Cerveño 3356 PB, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; gendlersa@hotmail.com.

## Resumen

**Introducción:** La infección por SARS-CoV-2 puede presentarse de manera diversa, desde una forma asintomática hasta una causante de un síndrome respiratorio agudo severo con neumonía y muerte. Al inicio de la pandemia, se prohibieron la circulación de personas y las actividades en espacios cerrados para evitar los contagios. A los requisitos para donar sangre, se agregaron criterios de diferimiento para quienes sufrieron COVID-19. **Objetivos:** Conocer la prevalencia de infecciones asintomáticas por SARS-CoV-2 durante el ASPO (aislamiento social preventivo y obligatorio) en donantes de sangre y analizar la distribución por grupos etarios y según domicilio de los casos, a la vez que describir la relación con el grupo ABO. **Materiales y métodos:** Se testeó el nivel de IgG antiproteína S en muestras de suero de donantes de sangre elegidos al azar entre las donaciones realizadas durante el ASPO. Se obtuvieron los datos de sexo, edad, domicilio y ABO del sistema de gestión informático del servicio. **Resultados:** Se estudió un total de 343 donantes (46,6 % hombres) con edad promedio de 34,43 años. Se hallaron veintinueve casos asintomáticos. La prevalencia en menores de 30 años (12,93 %) fue mayor que para los mayores de esa edad ( $p = 0,030$ ), y los títulos de IgG en el grupo de asintomáticos fueron significativamente más altos ( $p < 0,0001$ ) que para los no reactivos. **Conclusión:** Los primeros casos se dieron en donantes de CABA, pero la velocidad de propagación fue mayor fuera de esta ciudad. Dentro de CABA, las prevalencias fueron mayores en comunas de menor nivel socioeconómico. La frecuencia de grupo A resultó menor en los reactivos para IgG anti - SARS-CoV-2 que en el resto.

**Palabras clave:** IgG anti - SARS-CoV-2, asintomáticos, ABO, prevalencia.

## Abstract

**Introduction:** SARS-COV-2 infection can either be asymptomatic or cause severe acute respiratory syndrome with pneumonia and death. At the beginning of the pandemic, the movement of people and activities in closed spaces were prohibited to avoid contagion and the requirements to donate blood added deferral criteria for those who had suffered from COVID-19. **Objectives:** To know the prevalence of asymptomatic infections by SARS-COV-2 during the preventive and mandatory social isolation (ASPO from the term in Spanish) in blood donors and to analyze the distribution by age groups and according to residence of the cases and to describe the relationship with the ABO group. **Materials and methods:** The anti-protein S IgG level was tested in serum samples from blood donors chosen at random among the donations made during the ASPO. Data on sex, age, address and ABO of each blood donor were obtained from the computerized management system of the blood donation service. **Results:** A total of 343 donors (46.6 % men) with a mean age of 34.43 years were studied. Twenty-nine asymptomatic cases were found. The prevalence in people under 30 years of age (12.93%) was higher than that for those older than that age ( $p=0.030$ ) and the IgG titers in the asymptomatic group were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than those in the non-reactive group. **Conclusions:** The first cases occurred in donors from Buenos Aires, but the speed of spread was greater outside this city. Within Buenos Aires, the prevalences were higher in neighborhoods of lower socioeconomic level. The frequency of group A was lower in the reagents for anti-SARS-COV-2 IgG than in the rest.

**Keywords:** IgG anti-SARS COV 2, asymptomatic, ABO, prevalence.

## Introducción

El SARS-CoV-2 es un betacoronavirus cuya infección puede presentarse de una manera diversa, desde una forma asintomática hasta una causante de un síndrome respiratorio agudo severo con neumonía y muerte<sup>1</sup>. Se ha demostrado que el virus posee unas estructuras proteicas llamadas *espículas* o *espigas* que son las responsables del ingreso a células huésped en el paciente infectado por medio de su unión a la enzima convertidora de angiotensina 2<sup>2</sup>. Ante la entrada del virus, el sistema inmune genera anticuerpos. Entre estos, están los anticuerpos contra la proteína S de la espícula, que son neutralizantes<sup>3</sup>. La detección de este tipo de anticuerpos, entre otros, se ha utilizado para diagnóstico y seguimiento<sup>4</sup> de personas infectadas y para tareas epidemiológicas de investigación (prevalencia, incidencia).

Al detectarse los primeros casos de COVID-19 en el país, el gobierno decretó el *aislamiento social preventivo y obligatorio* (ASPO) el 19/3/20<sup>5</sup>; durante el cual se prohibía la circulación de personas y las actividades en espacios cerrados. Este fue prorrogado en varias ocasiones<sup>6-18</sup>, con excepciones a la circulación restringida para quienes realizaban actividades esenciales, las cuales fueron aumentando en número con el paso de los meses, hasta que el ASPO se transformó, progresivamente, en *distanciamiento social preventivo obligatorio* (DISPO)<sup>19</sup> hacia el mes de noviembre.

La norma técnico - administrativa<sup>20</sup> del Ministerio de Salud de la Nación, en su Anexo 2, detalla los requisitos para donar sangre. Al inicio de este período, se establecieron condiciones adicionales relacionadas con la infección por SARS-CoV-2<sup>21</sup>; con diferimientos de entre 60 y 90 días, respectivamente, para casos sospechosos o confirmados. Por lo antes descripto, pudo darse el caso de personas que cursaron la infección en forma asintomática sin haberse detectado esto durante la entrevista, por lo que el donante no fue diferido.

El objetivo del estudio fue estimar la prevalencia de infecciones asintomáticas por SARS-COV-2 durante el ASPO en donantes de sangre del Banco de Sangre del Hospital J. A. Fernández de la Ciudad de Buenos Aires, a la vez que analizar la distribución por grupos etarios y según domicilio de los casos, y describir la relación entre casos reactivos y el grupo ABO.

**Tabla I.** Edad y sexo de los donantes estudiados y de los asintomáticos.

	Asintomáticos IgG anti-SARS-CoV-2 reactivos	Total de muestras estudiadas
Edad Media (DS)	32 años (10,6)	34 años (11,3)
Edad Mediana (IQR)	29 años (12)	32 años (17)
Sexo masculino (N)	12	160
Sexo masculino %	41,38	46,65

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio de diseño observacional transversal. Se llevó a cabo un testeo serológico en donantes de sangre por primera vez que fueron aceptados para donar en el Banco de Sangre del Hospital. Fernández del GCABA en el período comprendido entre 1/4/20 y 15/12/20 y resultaron no reactivos (NR) para infecciones transmisibles por transfusión (ITT).

Se excluyó a los donantes de plasma de convalecientes (PCC) de COVID-19. Se eliminó a aquellos con resultados de IgG anti - SARS-CoV-2 reactiva, con infección previa a la fecha de donación, pero que habían sido aceptados como donantes por haberse cumplido el período de diferimiento.

Para el análisis, se consideraron datos filiatorios como edad, sexo, domicilio declarado y el grupo ABO.

Se utilizó suero conservado a -20°C, obtenido el día de la donación y descongelado el día de la realización del dosaje de IgG anti - SARS-COV-2. Las muestras se seleccionaron al azar.

Detección de IgG anti - SARS-COV-2: Se empleó el método ELISA Covidar IgG (laboratorios Lemos), que detecta anticuerpos anti - proteína S del SARS-COV-2, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron en UI/ml.

Consideraciones éticas: Se solicitó a los participantes un consentimiento informado, incluido en la ficha de donación. Dicha ficha contenía información para el donante, las preguntas que guiaron la entrevista y los datos filiatorios y clínicos del donante. El consentimiento aclaró que la muestra se usaría para estudios epidemiológicos. El estudio fue autorizado por el Comité de Ética del Hospital (expediente Prisaba 9234, aprobado 31/7/2023).

Cálculo de muestreo: Se tomó una muestra al azar de los sueros de donantes NR para ITT, del período aludido, utilizando el cálculo de muestreo para la prevalencia de una proporción (*Medcalc*), suponiendo una confianza del 95 % y error tipo II = 0,1, esperando una prevalencia del 0,8 al 10 %, basándose en la bibliografía<sup>22-25</sup>.

Para comparar las prevalencias en grupos de más y de menos de 30 años de edad, así como las medias de las concentraciones de IgG en pacientes con resultados reactivos y no reactivos, se utilizaron los calculadores gratuitos de *Medcalc*.

Datos de los donantes: Se confeccionó una base de datos en *Microsoft Excel*, a partir del sistema de gestión informático del servicio (Hemotrans). Se incluyeron los datos

**Tabla II.** Casos y prevalencia de casos asintomáticos según edad del donante.

Edad (años)	Casos asintomáticos (N)	Total de donantes estudiados (N)	Prevalencia de asintomáticos (%)
>30	19	147	12,93
<30	10	187	5,35

**Tabla III.** Concentración de IgG anti - SARS-CoV-2.

	Concentración de IgG (UI/ml)	
	Asintomáticos	No reactivos
Media	291,35	8,97
Desvío estándar	180,16	6,27

del número de donante, la fecha de donación y de nacimiento (datos que permitieron calcular la edad), sexo, domicilio declarado por el donante, el resultado del tamizaje de ITT y el ABO. En los casos de IgG reactiva, se chequearon los antecedentes de infección previa en el SNVS 2.0.

**Distribución geográfica:** Los domicilios se convirtieron en número de comuna (según Ley 1777), para los donantes incluidos que viven en CABA, o en partido, para los domiciliados en Provincia de Buenos Aires, clasificándolos en las distintas partes que componen el gran buenos aires (GBA)<sup>26</sup>. El mapa de CABA se realizó utilizando *Paint*, clasificando las comunas en 3 zonas de acuerdo con la división hecha por la *Encuesta Anual de Hogares* (EAH)<sup>27</sup>.

## Resultados

En el período 1/4/20 - 15/12/20 hubo 1333 donaciones efectivas de donantes nuevos o de primera vez, de las cuales 1298 resultaron NR en el tamizaje para ITT en nuestro banco. Estas cifras se obtuvieron luego de excluir a los donantes de PCC.

La muestra estudiada comprende 343 donantes. Treinta y ocho resultaron IgG anti proteína S del SARS-COV2 reactivos. Nueve de ellos fueron eliminados por haber tenido COVID -19 sintomático y quedaron solo 29 casos asintomáticos con IgG reactiva en la muestra, lo que resulta en una prevalencia de 8,68% [IC95% 5,89 - 12,23 %].

En la Tabla 1, se muestra la distribución por sexo y edad de los donantes estudiados y de aquellos que, por cumplir los criterios de aceptación/exclusión, se consideraron como asintomáticos. Se realizó un corte por edad: hasta los 30 años de edad y más de 30. En la Tabla 2, se observa que las prevalencias difieren significativamente ( $p=0,0300$ ) entre estos dos grupos.

Al comparar las UI/ml de IgG obtenidas para los reactivos

asintomáticos respecto de los no reactivos (Tabla 3), vemos que los valores difieren significativamente entre estos 2 grupos ( $p<0,0001$ ).

En la Tabla 4, se muestran las prevalencias por mes (para diciembre, se tomaron solo 15 días) y el número de sueros que resultó reactivo para IgG anti - SARS-COV-2. Allí se observa que hubo prevalencias mensuales entre 0 y 30%. Esto implica una prevalencia mensual media de 9,48% [IC95% +/-1,15%].

En la Figura 1, se observa la variación en la prevalencia según si el donante estaba domiciliado al momento de la donación en CABA o en el GBA. En dicho gráfico, se puede estimar por las pendientes de las rectas de correlación la velocidad de propagación de los casos.

De los 29 donantes reactivos para IgG anti - SARS-COV-2, 21 estaban domiciliados en CABA y el resto, en la Provincia de Buenos Aires. La distribución por comunas de los primeros fue: 7 en comuna 1; 2 en comuna 2; 2 en comuna 3; en las comunas 4, 8 y 10, 1 caso en cada una; 4 en comuna 13 y 3 en la 14. Si se los agrupa siguiendo el modelo establecido por la EAH, se observan las prevalencias que se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 2. En dicha tabla, también se muestran las prevalencias obtenidas en igual período para el tamizaje de ITT, independientemente del marcador estudiado, y para Sífilis en particular. Los 8 casos de la Provincia de Buenos Aires estaban domiciliados en el primer cordón del conurbano (Tabla 6).

Por último, en la Tabla 7, se observa la distribución por grupos del sistema ABO del total de los estudiados para IgG anti - SARS-COV-2, así como los asintomáticos. Al agrupar a los donantes según la presencia de isoaglutininas para cada antígeno integrante del sistema ABO, empezando por A/noA, obtenemos 1,72 y 3,14 para totales y asintomáticos, respectivamente, y si hacemos lo mismo para O/noO, 0,83/0,45, mientras q para B/no B, 7,79/8,67.

## Discusión

Al realizar una comparación de los datos de porcentaje de sexo masculino, promedio de edad entre los de los donantes NR y Rvo., vemos que hay una leve disminución (aunque no sea estadísticamente significativa) en el porcentaje de hombres, hecho contrario a lo informado por OPS<sup>28</sup> para CO-

**Tabla IV.** Prevalencias por mes de asintomáticos.

Mes	abril	mayo	junio	julio	agosto	septiembre	octubre	noviembre	diciembre
Donantes asintomáticos (N)	1	0	0	1	1	7	10	6	3
Donantes totales (N)	37	27	23	29	47	77	52	32	10
Prevalencia de asintomáticos (%)	2,70	0,00	0,00	3,45	2,13	9,09	19,23	18,75	30,00

**Tabla V.** Resultados de IgG y de tamizaje de ITT y sífilis en donantes de CABA según zonas establecidas por la Encuesta Anual de Hogares.

Zona EAH CABA	Comunas	IgG Anti SARS-COV-2		Prevalencia de asintomáticos [%]	ITT N [%]	Sífilis N [%]
		NR (N)	Rvo. (N)			
Norte	2, 13, 14	112	9	7,44	14 (2,75)	1 (0,20)
Centro	1, 3, 5, 7, 11, 12, 15	110	9	7,56	18 (3,88)	2 (0,45)
Sur	4, 8, 9, 10	26	3	10,34	1 (1,52)	1 (1,52)
Sin asignar		1	0	---	---	---
Suma		249	21	8,43	33 (3,16)	4 (0,39)

► EAH, Encuesta Anual de Hogares; CABA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, NR, no reactivo; Rvo., reactivo; ITT, infecciones de transmisión transfusional.

VID -19 entre enero de 2020 y enero de 2021. Este informe incluye casos sintomáticos, independientemente de su gravedad, y reconoce que “las mujeres tienden a producir respuestas inmunitarias más eficaces y mejor adaptadas a los virus, lo cual se traduce en casos menos graves”. En cuanto a la edad, en este estudio se observó una disminución en el grupo asintomático respecto del total tanto en la media como en la mediana, pero al dividirlos en 2 grupos según su edad, observamos que hay una mayor proporción de asintomáticos en personas más jóvenes, lo que coincide con lo reportado por Ruiz Nápoles<sup>29</sup>.

No se contó con reactivos para confirmar la ITT tamizada y, en muchos casos, los resultados son de título o RP bajo. Esto implica un bajo valor predictivo positivo<sup>30</sup>, es decir, una alta probabilidad de que se trate de un falso positivo por reacción cruzada con otra condición infecciosa, o no. Por ello, se decidió excluir a los donantes RR para ITT y así eliminar un posible factor confusor, pese a que el inserto de técnica del reactivo usado<sup>31</sup> para el testeo de IgG anti - SARS-COV-2 indica que no tuvieron reactividad cruzada con 94 sueros

tomados antes de la pandemia. Teniendo en cuenta esto, y pese a que los casos no fueron confirmados por métodos moleculares (PCR), se asumió que los donantes reactivos para IgG anti - SARS-COV-2 son verdaderos positivos, ya que las concentraciones de IgG se diferencian significativamente de las del grupo no reactivo.

La prevalencia total de casos asintomáticos dentro de los donantes estudiados fue de 8,68 %, superior a lo reportado por Fischer y col.<sup>32</sup> para distintos lugares de Alemania. Estas diferencias se podrían relacionar, por un lado, con el hecho de que el período medido por Fisher y col. fue más corto y no habría llegado a incluir el mayor aumento de casos.

Por otra parte, en Europa<sup>33</sup> el porcentaje de donantes voluntarios de repetición es superior al de Latinoamérica<sup>34</sup>, aunque este tipo de donantes suele tener menores tasas de enfermedades infecciosas que los de reposición.

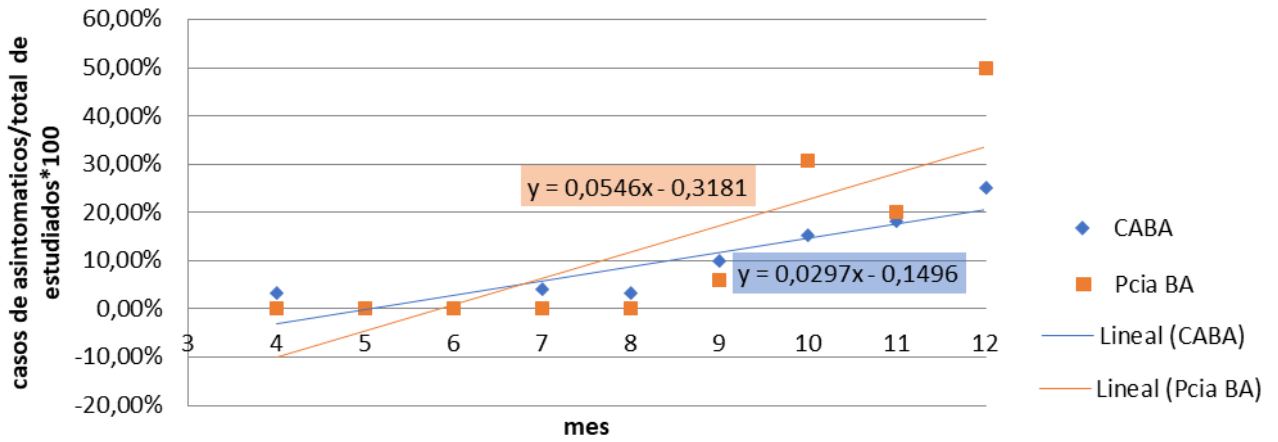
La curva de prevalencia en función del mes se mantuvo relativamente constante hasta el de agosto, en el que se permitieron las reuniones sociales de hasta 10 personas<sup>14</sup>, momento a partir del cual hay un incremento sostenido del

**Tabla VI.** Prevalencia de asintomáticos en donantes de la Provincia de Buenos Aires.

Lugar	IgG Anti SARS COV 2		Prevalencia [%]		
	NR (N)	Rvo (N)			
GBA	Zona Sur	22	3	13,64	
	1° Cordón	Zona Oeste	17	3	17,65
	Zona Norte		38	2	5,26
	2° Cordón	Norte	6	0	0,00
	Resto		0	0	0,00
3° Cordón		0	0	0,00	
La Plata y Gran La Plata		1	0	0,00	
Interior de la Provincia		1	0	0,00	
Suma		85	8	9.41	

► GBA, Gran Buenos Aires; NR, no reactivo; Rvo., reactivo.

**Figura 1.** Prevalencias de casos asintomáticos según domicilio.



número de casos. Si bien en el grupo estudiado los primeros contagios fueron en donantes domiciliados en CABA, la velocidad de propagación fue mayor entre los que no estaban domiciliados en dicha ciudad. Estos eran mayoritariamente del primer cordón del Gran Buenos Aires, donde los índices de pobreza son mayores<sup>35</sup> y las condiciones sanitarias (en términos de cobertura médica disponible), menores.<sup>36</sup>

Respecto de la distribución del número de casos por comuna, se observó que no hubo casos reactivos en las comunas del centro de la ciudad, pese a que en la muestra estudiada se incluyeron donantes de todas ellas. Sin embargo, al dividir la ciudad en 3 partes (según los criterios de la *Encuesta Anual de Hogares de CABA*)<sup>27</sup>, se observó que las mayores prevalencias de casos asintomáticos se acumularon en las zonas de menor calidad o nivel en la situación socioeconómica. Esto podría tener relación con el mayor porcentaje de hacinamiento en esas áreas de la ciudad<sup>37</sup>. Se observa que el patrón de prevalencia de ITT para nuestros donantes domiciliados en CABA difiere del de COVID-19 asintomático. Esta diferencia podría deberse a que se incluyeron diferentes enfermedades. Pero, si se restringe el cálculo solo a los casos de sífilis, usualmente asociada a condiciones de pobreza y hacinamiento, en igual período, se obtuvo igual

patrón de prevalencia.

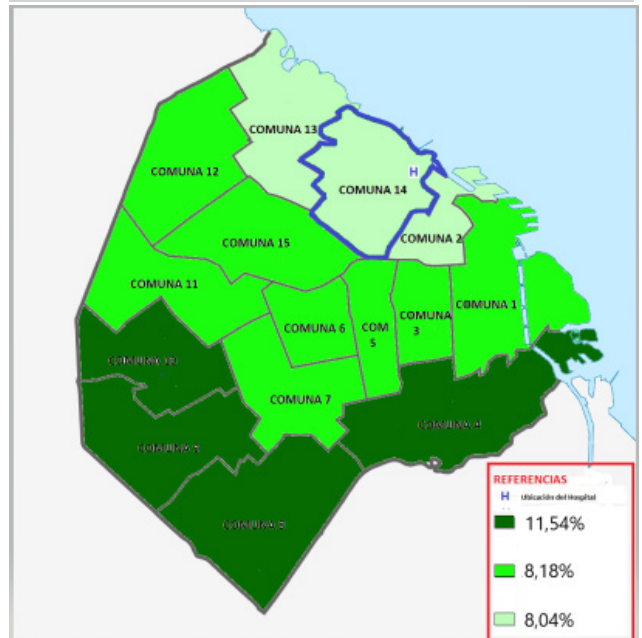
En cuanto a los casos de IgG reactiva en donantes que no se domicilian en CABA, por su bajo número y lo extenso y variado del territorio que ocupa el primer cordón, respecto de sus condiciones socioeconómicas, no se puede hacer el mismo tipo de análisis que se hizo en el caso anterior.

Existe una extensa bibliografía sobre factores predisponentes o protectores en el COVID-19. En algunos casos, se lo ha asociado con el sistema ABO, donde los que tenían grupo A eran más propensos a hacer neumonía<sup>38</sup>. En este estudio, en asintomáticos, se observó que la frecuencia de grupo A

**Tabla VII.** Frecuencia de donantes según el sistema ABO.

Grupo	IgG Anti - SARS-CoV-2	
	Reactivo (N/%)	Total de estudiados (N/%)
O	20 (68,97)	183 (54,79)
A	6 (20,69)	113 (33,83)
AB	1(3,45)	10 (2,99)
B	2 (6,90)	28 (8,38)
Total	29	334

**Figura 2.** Prevalencias de asintomáticos según zonas delimitadas por la Encuesta anual de Hogares de CABA.



► La comuna 14 está rebordeada en azul por ser la comuna en la que está ubicado el servicio hospitalario en que se realizó el presente trabajo. Con un H, se marca la ubicación aproximada del mismo.

es menor en los reactivos para IgG anti - SARS-COV-2 que en el total de los estudiados, mientras que en los que poseen grupo O es a la inversa.

A la isoaglutinina anti- A se le ha atribuido un efecto protector por interferencia en la unión entre el virus y la angiotensina 2<sup>39</sup>. Si tomamos como un todo a los que tienen anti- A vs. los que no lo tienen, vemos que la proporción de casos reactivos con anti- A respecto de los que no la tienen es mayor que en la población total estudiada, mientras que sucede lo inverso entre los no O y los O. Lamentablemente, ni en este caso ni en el del párrafo anterior, los tamaños muestrales eran suficientes como para verificar si estas diferencias resultaban estadísticamente significativas.

### Conflictos de interés

Los autores de este estudio declaran no poseer conflictos de interés.

### Referencias bibliográficas

- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study *Lancet*. 2020;395(10229):1054-1062. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
- Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target *Intensive Care Med*. 2020;46(4):586-590. DOI: 10.1007/s00134-020-05985-9
- Wang C, Li W, Drabek D, Okba NMA, van Haperen R, Osterhaus ADME, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection *Nat Commun*. 2020;11(1):2251. DOI: 10.1038/s41467-020-16256-y
- Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):386-389. DOI: 10.1080/22221751.2020.1729071
- Boletín Oficial de la República Argentina N° 34.334 - Primera Sección Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio DeCNU-2020-297-APN-PTE. [En línea] 19 de Marzo de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/227042/20200320>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.365 Primera Sección Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 408/2020DECNU-2020-408-APN-PTE - Prórroga. [En línea] 26 de abril de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/228261/20200426>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.377 Primera Sección. Aislamiento Social, Preventivo Y Obligatorio Decreto 459/2020 DECNU-2020-459-APN-PTE-Prórroga. [En línea] 10 de mayo de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/228958/20200511>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.388 Primera Sección Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 493/2020 DECNU-2020-493-APN-PTE-Prórroga. [En línea] 24 de mayo de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/229716/20200525>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.399 - Primera Sección Distanciamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 520/2020 DECNU-2020-520-APN-PTE - Aislamiento social, preventivo y obligatorio. Prórroga. [En línea] 6 de julio de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/230245/20200608>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.415 - Primera Sección. Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 576/2020 DECNU-2020-576-APN-PTE - Prórroga. "Distanciamiento social, preventivo y obligatorio". Régimen aplicable [En línea] 29 de junio de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/231291/20200629>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.428 - Primera Sección. Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 605/2020 DECNU-2020-605-APN-PTE - "Distanciamiento social, preventivo y obligatorio". Régimen aplicable. [En línea] 18 de julio de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/232234/20200718>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.439 - Primera Sección. Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 641/2020 DECNU-2020-641-APN-PTE. [En línea] 2 de agosto de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/232919/20200802>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.451 - Primera Sección Distanciamiento Social, Preventivo y Obligatorio Y Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio DECNU-2020-677-APN-PTE. [En línea] 16 de agosto de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/233684/20200816>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.463 - Primera Sección Distanciamiento Social, Preventivo y Obligatorio Y Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 714/2020 DECNU-2020-714-APN-PTE. [En línea] 30 de agosto de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/234257/20200831>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.478 - Primera Sección Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Y Distanciamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 754/2020 DECNU-2020-754-APN-PTE. [En línea] 20 de septiembre de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/235132/20200920>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.494 - Primera Sección Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Y Distanciamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 792/2020 DECNU-2020-792-APN-PTE. [En línea] 11 de octubre de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/235931/20201012>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.505 - Primera Sección Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Y Distanciamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 814/2020 DECNU-2020-814-APN-PTE. [En línea] 25 de octubre de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/236498/20201026>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.516 - Primera Sección Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio Y Distanciamiento Social, Preventivo Y Obligatorio Decreto 875/2020 DECNU-2020-875-APN-PTE. [En línea] 7 de noviembre de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/237062/20201107>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 34.531 - Primera Sección Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio y Distanciamiento Social, Preventivo y Obligatorio Decreto 956/2020 DECNU-2020-956-APN-PTE [En línea] 29 de noviembre de 2020. [Citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/237844/20201130>.
- Boletín Oficial de la República Argentina Boletín Oficial N° 32.677 Ministerio de Salud de la Nación Resolución N° 797/2013 2013 [En línea] 3 de julio de 2013. [Citado 17 de Enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/90503/20130711>.
- Lineamientos para bancos de sangre frente al COVID-19 Ministerio de Salud, Argentina. 15 de Marzo de 2020. [Citado 17 de Enero de 2023]. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/lineamientos\\_para\\_bancos\\_de\\_sangre\\_servicios\\_de\\_transfusion\\_y Centros Regionales sobre colectas externas frente al covid-19\\_15\\_marzo\\_2020\\_1.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/lineamientos_para_bancos_de_sangre_servicios_de_transfusion_y Centros Regionales sobre colectas externas frente al covid-19_15_marzo_2020_1.pdf).

22. Machalek DA, Vette KM, Downes M, Carlin JB, Nicholson S, Hirani R, et al. Serological testing of blood donors to characterise the impact of COVID-19 in Melbourne, Australia, 2020 PLoS One. 2022;17(7):e0265858 DOI: 10.1371/journal.pone.0265858
23. Saeed S, Drews SJ, Pambrun C, Yi QL, Osmond L, O'Brien SF. SARS-CoV-2 seroprevalence among blood donors after the first COVID-19 wave in Canada Transfusion. 2021;61(3):862-872. DOI: 10.1111/trf.16296
24. Amorim Filho L, Landmann Szwarcwald C, de Oliveira Garcia Mateos S. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. Rev Saude Publica 2020;54:69. DOI: 10.11606/s1518-8787.2020054002643
25. Comparison of proportions calculator MedCalc Software Ltd. . [En línea] Versión 22.009, 06 de agosto de 2023. Disponible en: [https://www.medcalc.org/calc/comparison\\_of\\_proportions.php](https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php) .
26. Kozel A, Martinez LE, Taraborrelli D, Carvalho N. El sistema agroalimentario del Área Metropolitana de Buenos Aires al 2030/2050. Ejercicio exploratorio de prospectiva. Argentina, INTA, 2017, colección investigación, desarrollo e innovación, Vol. 1º ed, pág. 11. [Citado 17 de enero de 23]. Disponible en: [https://www.academia.edu/37183586/El\\_sistema\\_agroalimentario\\_del\\_%C3%81rea](https://www.academia.edu/37183586/El_sistema_agroalimentario_del_%C3%81rea) . ISBN 978-987-521-869-7.
27. GCABA, EAH. Dirección Gral de Estadísticas y Censos, GCABA. [En línea] 2012. [Citado el: 17 de 1 de 23.] <https://www.estadisticaciudad.gob.ar/eyc/?p=52535> .
28. Sistema de Gestión de Incidentes y por la Oficina de Equidad, Género y Diversidad Cultural, ambos de la OPS. en la Región de las Américas Resultados de salud desglosados por sexo en relación con la pandemia de COVID-19. De enero del 2020 a enero del 2021. [En línea] 2021. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53603> .
29. Ruiz-Nápoles J, Ruiz-Nápoles K. Comparación de las características clínicas y epidemiológicas entre pacientes asintomáticos y sintomáticos con la COVID-19. Revista Cubana de Medicina Militar [Internet]. 2021 [citado 14 Sep 2023]; 50 (2) Disponible en: <https://revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/919> .
30. Acar A, Kemahli S, Altunay H, Kosan E, Oncul O, Gorenek L, et al. The significance of repeat testing in Turkish blood donors screened with HBV, HCV and HIV immunoassays and the importance of S/CO ratios in the interpretation of HCV/HIV screening test results and as a determinant for further confirmatory testing Transfus Med. 2010;20(3):152-9. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2009.00987.x
31. Covidar IgG Laboratorios Lemos. [En línea] 2020. [Citado 8 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.lab-lemos.com/files/ugd/?c705f27bd494df9104d73a8677e7c87eb6b17.pdf> .
32. Fischer B, Knabbe C, Vollmer T. SARS-CoV-2 IgG seroprevalence in blood donors located in three different federal states, Germany March to June 2020. Euro Surveill. 2020;25(28):2001285 DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.28.2001285
33. Global Status Report on Blood Safety and Availability World Health Organization. [En línea] 2017. ISBN 978-92-4-156543-1. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254987/9789241565431-eng.pdf> .
34. Suministro de sangre para transfusiones en los países de América Latina y el Caribe 2016-2017. Organización Panamericana de la Salud. [En línea] 2020. ISBN: 978-92-75-32171-3. [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52150/9789275321720\\_spa.pdf?sequence=5](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52150/9789275321720_spa.pdf?sequence=5) .
35. Informes técnicos Instituto Nacional de Estadística y Censos . [En línea]. Vol. 4, nº 181, primer semestre de 2020. [Citado 8 de agosto de 2023]. Disponible en: [https://www.indec.gob.ar/uploads/informes-de-prensa/eph\\_pobreza\\_01\\_200703093514.pdf](https://www.indec.gob.ar/uploads/informes-de-prensa/eph_pobreza_01_200703093514.pdf). ISSN 2545-6636 .
36. Cuadros regulares EPH Continua instituto nacional de estadísticas y censos. [En línea] 2020. [Citado 8 de agosto de 2023]. Disponible en: [https://www.indec.gob.ar/indec/web/Institucional-Indec-bases\\_EPH\\_tabulado\\_continua](https://www.indec.gob.ar/indec/web/Institucional-Indec-bases_EPH_tabulado_continua) .
37. Encuesta Anual de Hogares de la Ciudad de Buenos Aires 2021. Dirección General de Estadística y Censos. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Dirección General de Estadística y Censos. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. [En línea] 2021. [Citado 9 de agosto de 2023].

Disponible en: [https://www.estadisticaciudad.gob.ar/eyc/wp-content/uploads/2021/06/sintesis\\_resultados\\_EAH\\_2020.pdf](https://www.estadisticaciudad.gob.ar/eyc/wp-content/uploads/2021/06/sintesis_resultados_EAH_2020.pdf) .

38. Al-Youha SA, Alduaij W, Al-Serri A, Almazeedi S M, Al-Haddad M, Jamal M H, et al. The impact of ABO blood groups on clinical outcomes and susceptibility to COVID-19: A retrospective study in an unselected population. Transfusion. 2021;61(5):1631-1641 DOI: 10.1111/trf.16365
39. Goel R, Bloch EM, Pirenne F, Al-Riyami AZ, Crowe E, Dau L, et al. ABO blood group and COVID-19: a review on behalf of the ISBT COVID-19 working group. Vox Sang. 2021;116(8):849-861. DOI: 10.1111/vox.1307



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución - No Comercio - 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 para la determinación de ceruloplasmina en un hospital pediátrico

## *Comparison of two methods for the determination of ceruloplasmin in a pediatric hospital*

Grau, María Emilia<sup>1\*</sup>; Procopio, Domingo<sup>1</sup>; Collini, Mariana Beatriz<sup>1</sup>

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

\*Contacto: Grau, María Emilia. Laboratorio Central, Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Sor María Ludovica", Calle 14 n°1651, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina; emigrau28@gmail.com.

### Resumen

**Introducción:** La ceruloplasmina es una enzima que usa cobre como cofactor. La utilidad de su determinación es diagnosticar las enfermedades de Wilson y Menkes en las cuales se encuentra principalmente como forma inactiva por el bajo cobre circulante. Sin embargo, dicha determinación puede considerar solo la porción activa o la medición de su concentración proteica. Esto hace que los métodos que miden concentración puedan sobreestimarla y perder sensibilidad diagnóstica. **Objetivo:** Evaluar la correlación y concordancia entre un método enzimático y un método inmunoturbidimétrico para medir ceruloplasmina. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio observacional, analítico comparando el método enzimático de Henry y col. y el método inmunoturbidimétrico CERU® (Roche, Cobas c311) para la determinación de ceruloplasmina, utilizando muestras de suero de pacientes pediátricos con solicitud médica para esta determinación, en el período de abril de 2018 – marzo de 2021. El análisis estadístico (IBM SPSS Statistics versión 21) consistió en un estudio de correlación (Pearson) y un estudio de concordancia (Bland - Altman). **Resultados:** Se analizaron 51 muestras y se obtuvo un  $r = 0,916$  en la correlación de Pearson ( $p < 0,0001$ ) y una gráfica de Bland - Altman con sesgo positivo. **Conclusión:** Se evidenció buena correlación, aunque el análisis de concordancia muestra sesgo positivo. Debido a que en la zona de decisión médica la concordancia es buena, se concluye que ambas metodologías pueden ser intercambiables.

**Palabras clave:** ceruloplasmina, comparación de métodos, actividad enzimática, concentración proteica, correlación, concordancia, cobre.

### Abstract

**Introduction:** Ceruloplasmin is an enzyme that uses copper as a cofactor. It can be determined in the laboratory by determining its enzymatic activity, which considers only the active portion, or by measuring its protein concentration, which considers both the active and inactive portion. Ceruloplasmin is useful in diagnosing Wilson's and Menkes' diseases, in which it is found mainly as an inactive form due to low circulating copper. This means that methods that measure concentration can overestimate it and lose diagnostic sensitivity. **Objective:** To evaluate the correlation and concordance between an enzymatic method and an immunoturbidimetric method to measure Ceruloplasmin. **Materials and methods:** An analytical observational study was carried out to compare the enzymatic method of Henry et al. and the CERU® immunoturbidimetric method (Roche, Cobas c311) for the determination of Ceruloplasmin, using serum samples from pediatric patients, with medical request for this determination, in the period April 2018 - March 2021. The statistical analysis performed (IBM SPSS Statistics version 21) consisted of a correlation study (Pearson) and a concordance study (Bland Altman). **Results:** 51 samples were analyzed, obtaining  $r=0.916$  in the Pearson correlation ( $p < 0.0001$ ) and a Bland Altman graph with positive bias. **Conclusion:** A good correlation was found, although the concordance analysis showed a positive bias. Since the agreement is good in the medical decision area, it is concluded that both methodologies can be interchangeable.

**Key words:** Ceruloplasmin, comparison of methods, enzymatic activity, protein concentration, correlation, concordance, copper.

## Introducción

La ceruloplasmina (ferroxidasa - I, EC 1.16.3.1.) es una proteína de fase aguda y de transporte que se sintetiza en el hígado.<sup>1,2</sup> A pesar de que se ha contemplado por mucho tiempo como un transportador de cobre, su principal función es la actividad ferroxidasa, que, oxidando el hierro ferroso, lo transforma en férrico, utilizando el cobre como cofactor enzimático.<sup>1,2,3</sup>

Entre las patologías en las cuales se ve alterada la ceruloplasmina, se encuentran la enfermedad de Wilson (degeneración hepatolenticular) y la enfermedad de Menkes (defecto congénito en la absorción de cobre).<sup>1,3</sup> Los pacientes con enfermedad de Menkes tienen una supervivencia de 2 a 3 años, sin embargo, la supervivencia en la enfermedad de Wilson depende de un diagnóstico oportuno.<sup>1,4</sup> Es por esto que resulta crucial contar con un ensayo de calidad para determinar la ceruloplasmina.

Existen diversos métodos para la determinación en el laboratorio de la ceruloplasmina. El método más recomendado, que data de la década de los 60, es la determinación de la actividad enzimática.<sup>5-7</sup> Este método mide la holoceruloplasmina (porción biológicamente activa, cargada de cobre).<sup>6,8,9</sup> El mismo tiene buena sensibilidad y especificidad, pero, al tratarse de una técnica manual, demanda mucho tiempo y requiere de un operador entrenado.

En la actualidad, el desarrollo y la aplicación de ensayos inmunológicos disponibles comercialmente es cada vez mayor en los laboratorios clínicos. Generalmente, para detectar ceruloplasmina en suero, se utiliza nefelometría automatizada o inmunoturbidimetría.<sup>10</sup> A diferencia del método recomendado (actividad enzimática), estos ensayos inmunológicos miden tanto la holoceruloplasmina como la apoceruloplasmina (porción no funcional).<sup>9,11</sup>

Tanto en los pacientes con enfermedad de Wilson como en aquellos con enfermedad de Menkes, la concentración de cobre circulante es baja. Esto aumentaría la proporción de apoceruloplasmina, por lo que podrían obtenerse resultados no comparables entre ambas metodologías.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la correlación y concordancia entre el método enzimático recomendado y un método inmunoturbidimétrico para la determinación de ceruloplasmina. La importancia radica en conocer si este nuevo método inmunoturbidimétrico puede reemplazar al método de referencia brindando al médico y paciente información clínica de calidad para arribar al diagnóstico de forma temprana, evitando complicaciones y, al mismo tiempo, disminuir los tiempos de procesamiento de las muestras.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional, analítico para el cual se utilizaron muestras de suero de niños con solicitud de ceruloplasmina que concurren al Laboratorio Central del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría (HIAEP) "Sor María Ludovica" de La Plata en el período de abril de 2018 - marzo de 2021. Se excluyeron las muestras

con volumen insuficiente para ser procesadas por ambas metodologías y, de aquellas que pertenecían al mismo paciente, se incluyó solo la muestra más actual.

Las muestras fueron analizadas por el método enzimático de Henry y col.<sup>5</sup> modificado y el método inmunoturbidimétrico CERU® (Roche, Cobas c311). El método enzimático modificado consistió en la utilización de p-fenilendiamina en HCl al 0,25% como sustrato en tampón de acetato 0,1 M. Se utilizó como blanco de reactivo azida de sodio al 0,1% en el mismo tampón de acetato. Se trabajó a 25°C con lecturas a 546 nm, utilizando espectrofotómetro de simple haz.

Se utilizó como control de calidad para ambos métodos el PreciControl ClinChem Multi2 (Roche) con valor medio de 25,7 mg%.

Los datos demográficos de la población se obtuvieron a través del Sistema Informático de Laboratorio (LIS) de Wiener® y de planillas de trabajo del Sector Metabopatías del Laboratorio Central. Los mismos se volcaron en planillas de Microsoft Excel®.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa IBM SPSS Statistics versión 21 ( $p < 0,05$ ).<sup>12</sup> En una primera instancia, se realizó la búsqueda y eliminación de los *outliers*. Para esto, se usó la distancia de Mahalanobis para análisis multivariado y se convirtió a probabilidad ( $p < 0,05$ ).

Se utilizó la prueba de Kolmogorov - Smirnov para una muestra ( $p < 0,05$ ), para conocer la distribución de datos. La correlación se realizó a través del estudio de Pearson ( $p < 0,05$ )<sup>13</sup> entre el método considerado como referencia [actividad enzimática] y el inmunoturbidimétrico [método de estudio]. Además, se representó gráficamente la dispersión de datos.

El análisis de concordancia se llevó a cabo mediante la gráfica de Bland - Altman aplicando línea de tendencia central.

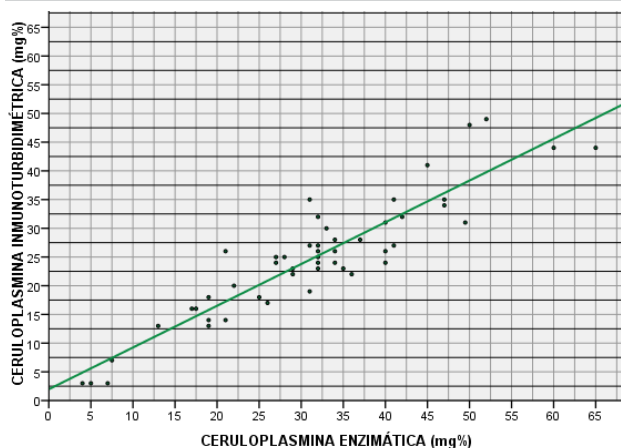
Por último, se calculó el coeficiente de variación porcentual (CV%) obtenido por cada método para comparar *performance*.

## Resultados

Se analizaron un total de 51 resultados de ceruloplasmina determinados tanto por el método enzimático como por el inmunoturbidimétrico en el período de abril de 2018 - marzo de 2021. El 22 % de las muestras (12) corresponde a pacientes de género femenino y el 78 % (39), a pacientes de género masculino. Respecto de la localización, el 25 % de los niños (13) se hallaba hospitalizado al momento de la toma de muestra, el 69 % (35) concurre de manera ambulatoria al Laboratorio Central y el 6 % restante (3) corresponde a muestras derivadas de un centro de menor complejidad. La mediana de edad de los pacientes incluidos fue de 4 años (0 - 13 años). La población estudiada consistió en pacientes con sospecha de enfermedad de Wilson o Menkes, o familiares de primer grado de pacientes ya diagnosticados, aunque no se contó con el diagnóstico de toda la población por lo que no se pudo realizar un análisis estadístico de dichos datos. No se estudiaron pacientes potencialmente sanos.

La distancia de Mahalanobis evidenció la presencia de

**Figura 1.** Representación de la dispersión de datos con línea de tendencia central.



un *outlier*, el cual fue eliminado, por lo que se utilizaron 50 resultados para el análisis estadístico. Se usó la prueba de Kolmogorov - Smirnov para una muestra ( $p < 0,05$ ) para conocer la distribución de datos, y se obtuvo una distribución normal, por lo que se pudo utilizar para la correlación el coeficiente de Pearson, que dio un valor  $r = 0,915$ . Además, se graficó la dispersión de datos, que muestra tendencia recta (Figura 1). De forma previa a realizar el análisis estadístico, se convirtió la actividad enzimática obtenida por el método de Hery y col. a concentración utilizando la base de datos de enzimas BRENDA.<sup>14</sup> Luego, con los datos obtenidos, se realizó un gráfico de Bland - Altman,<sup>15</sup> para conocer la correlación a distintos rangos de concentración y evaluar así si existe concordancia (Figura 2).

Se aplicó tendencia lineal al gráfico de Bland - Altman y se obtuvo una recta con pendiente positiva, con un  $R^2 = 0,290$ .

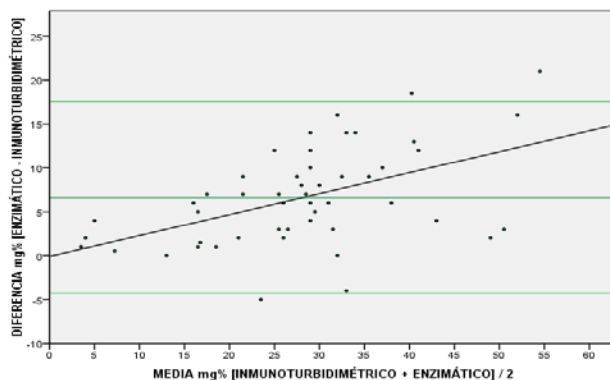
Se alcanzó un CV% del 12 % para el método manual y del 5,9 % para el método automatizado.

## Discusión

En el presente trabajo, se evidenció una correlación estadísticamente significativa entre el método inmunoturbidimétrico y el enzimático para la determinación de ceruloplasmina. Esto no se evidencia en los estudios publicados, que establecen la sobreestimación de los valores obtenidos con el método inmunoturbidimétrico (especialmente en los grupos con enfermedad de Wilson y Menkes), ya que mide también holoceruloplasmina.<sup>16,17</sup>

Es importante contemplar que la diferencia en correlación obtenida entre los distintos trabajos y el presente está influenciada por la *performance* de la metodología utilizada. Es decir, existen distintos tipos de técnicas inmunoturbidimétricas y enzimáticas que cuentan con sensibilidad, especificidad, límite de detección e interferencias diferentes. Además, al ser el método enzimático manual, hay que considerar el error propio del operador y de la metodología por su reproducibilidad. Esto último se evidencia comparando el

**Figura 2.** Representación de Bland - Altman con línea de sesgo.



► La recta horizontal central marca la media de las diferencias, mientras que las rectas horizontales que se encuentran a ambos lados representan  $\pm 1.96$  DS. DS, desvío estándar.

coeficiente de variación obtenido por el método manual (12 %) y el automatizado (5,9 %).

Al contrario de lo esperado, al analizar los datos, se puede observar que el valor obtenido por el método inmunoturbidimétrico fue menor que el del enzimático. Esto se evidencia en la gráfica de Bland - Altman, la cual presenta un sesgo positivo que señala una diferencia positiva entre los valores obtenidos por el método de referencia (enzimático) y el inmunoturbidimétrico (Figura 2). Además, este sesgo es menor a concentraciones más bajas (el análisis de sesgo da una recta con pendiente positiva), lo cual no afecta la utilidad clínica, ya que los valores de toma de decisión médica son aquellos en los que la concentración está por debajo del límite de referencia (19 - 39 mg%).<sup>13</sup> Una posible explicación a la diferencia observada podría deberse al instrumental utilizado, ya que se cuenta con un espectrofotómetro de simple haz, por lo que no existe blanco de reacción: debido a que el sustrato se oxida lentamente con la luz, además de la oxidación propia de la muestra, podría ser una causa de la sobreestimación de los valores obtenidos por el método enzimático. Esto podría corregirse utilizando un espectrofotómetro de doble haz.

A pesar de que el análisis estadístico indica que hay correlación entre ambos métodos y que el sesgo positivo evidenciado tiene escaso efecto en los rangos de decisión clínica, resulta importante señalar algunas de las limitaciones del presente estudio.

Una de las limitaciones de este estudio radica en que no se pudo evaluar el método sobre una población potencialmente sana, por lo que, aun considerando solo aquellos resultados dentro del rango de referencia utilizado en el Laboratorio Central del HIAEP "Sor María Ludovica", no es suficiente para evaluar cómo correlacionan ambos métodos en dichos pacientes. Tampoco es suficiente el número de pacientes afectados con estas enfermedades (Wilson y Menkes) incluidos en este trabajo para evaluar si la correlación se ve modificada en los distintos grupos de patologías,

como se evidencia en los estudios previamente publicados.<sup>16,17</sup>

Otra de las limitaciones observadas es que, aunque el número de muestras utilizado es suficiente para realizar un análisis estadístico, el mismo sigue siendo pequeño, y existe la posibilidad de considerar que un nuevo método es adecuado aun cuando no lo sea. Se recomienda que los estudios de correlación y concordancia tengan al menos 100 individuos/muestras.<sup>15</sup>

Por todo lo mencionado anteriormente, resultaría interesante realizar más estudios que involucren un número de muestras mayor y que cuenten con pacientes potencialmente sanos y enfermos (especialmente con Wilson y Menkes).

Sin embargo, debido a la rapidez, precisión y fácil automatización y a los resultados estadísticos obtenidos en este trabajo, que avalan su utilización, el método inmuno-turbidimétrico podría ser usado con carácter diagnóstico y, consecuentemente, reemplazar al método enzimático de referencia.

### Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. María Victoria Fasano por su colaboración en la revisión del diseño metodológico y el análisis estadístico del presente trabajo.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses.

### Referencias bibliográficas

- Cormenzana JC. Hemocromatosis, Alteraciones del metabolismo del cobre y déficit del cofactor de molibdeno. En: Sanjurjo P, Baldellou A. Diagnóstico y tratamiento de enfermedades metabólicas hereditarias. 3era Edición. Madrid: Ergon; 2010, p 1039-1052. DOI: 10.1157/13124906.
- Zena Leah H. Ceruloplasmin. En: Kerker N, Roberts EA. Clinical and Translational Perspectives on Wilson Disease. California: Academic Press; 2019. p 77-84. ISBN: 9780128105320.
- Servin R, Bay L, Eiroa H, Avalo M, Braverman A, Zappa J, et al. Enfermedad de Menkes: Presentación de un caso y revisión bibliográfica. Arch. argent. Pediatr. 1991; 89 (6): 274-281. LILACS: lil-560320.
- Yapur VM, Bustos MF, González AS, Negri GA. Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa. ABCLDL. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2007; 41(3): 347-351. ISSN: 0325-2957.
- Henry RJ, Chiamori SL, Segalove JM. Determination of Ceruloplasmin Oxidase in Serum. Exp Biol Med. [Maywood] 1960; 104 (4): 300-312.
- Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. Gut. 2000; 46(3): 415-419. DOI: 10.1136/gut.46.3.415.
- Schosinsky KH, Lehmann P, Beeler M. Measurement of Ceruloplasmin from Its Oxidase Activity in Serum by Use of o-Dianisidine Dihydrochloride. Clinical Chemistry. 1974; 20(12): 1556-1563. PMID: 4214636.
- Carpio Meléndez P. Estudio de la Ceruloplasmina en sujetos de nuestro medio. An Fac med. 1968; 51(2): 56-67. ISSN: 1025-5583.
- Ravin M, Herbert A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1961; 58: 161-168. PMID: 13739892.
- Walshe JM, et al. Wilson's disease: the importance of measuring serum ceruloplasmin non-immunologically. Annals of clinical biochemistry. 2003; 40(2): 115-121. DOI: 10.1258/000456303763046021.
- Buffone GJ, Brett EM, Lewis SA, Losefsohn M. Limitations of immunochemical measurement of ceruloplasmin. Clinical chemistry. 1979; 25(5): 749-751. PMID: 436245.
- Pérez de Algaba I, Battikhi Vilar, B. Estadística básica aplicada al laboratorio clínico. Málaga: Ed Cont Lab Clín; 2016: p 71 – 76.
- Fernández SP, Díaz SP. Relación entre variables cuantitativas. En: Cad Aten Primaria Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. España: Coruña; 1997. P 141-144.
- Institute of Biochemistry and Bioinformatics at the Technical University. BRENDA [sede web]. Braunschweig: Technical University of Braunschweig; 1987 [actualizada Enero 2023; acceso Mayo 2022]. Disponible en: <https://brenda-enzymes.org/>.
- Catey, B. Correlation, agreement, and Bland-Altman analysis: statistical analysis of method comparison studies. American journal of ophthalmology. 2008; 148(1): 4-6. DOI: 10.1016/j.ajo.2008.09.032.
- Merle U, Eisenbach C, Weiss KH, Tuma S, Stremmel W. Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease. Journal of hepatology vol. 2009; 51(5): 925-930. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.06.022.
- Macintyre G, Gutfreund KS, Martin WR, Camicioli R, Cox DW. Value of an enzymatic assay for the determination of serum ceruloplasmin. The Journal of laboratory and clinical medicine. 2004; 144(6): 294-301. DOI: 10.1016/j.lab.2004.08.005



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución-No Comercio. 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

# Estudio de inmunidad específica celular y humoral de memoria en pacientes recuperados de COVID-19 sin vacunar

*Study of the specific cellular and humoral memory immunity in unvaccinated patients recovered from COVID-19*

Libera, Natalia<sup>1</sup>; Lerman, Andrea Susana<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>Servicio de Virología, Departamento Laboratorio, Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos Malbrán". Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

\*Contacto: Lerman, Andrea Susana. Servicio de Virología, Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara", ANLIS-Malbrán. Ituzaingó 3520 (C.P. 7600), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina; alerman@anlis.gob.ar; lermanandreas@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** A más de tres años del inicio de la pandemia por el nuevo coronavirus, las tasas de mortalidad e internación disminuyeron gracias a la vacunación; sin embargo, nuevas variantes más transmisibles y resistentes a la inmunidad previa podrían ser responsables de nuevos contagios y reinfecciones. **Objetivo:** Investigar la presencia de inmunidad específica celular y humoral de memoria en personas recuperadas de COVID-19 y sin vacunar al momento del estudio. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal entre julio y agosto del 2021 en 27 voluntarios recuperados de COVID-19 sin vacunar. La inmunidad celular se estudió por citometría de flujo mediante la presencia de marcadores de memoria y activación inmunológica en linfocitos TCD4, TCD8 y linfocitos B; luego, se compararon la respuesta basal y la estimulada con SARS-CoV-2 inactivado (Test de Wilcoxon para muestras pareadas, programa *R - Studio*). Se dosaron anticuerpos IgG anti - proteína *spike*. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación institucional. **Resultados:** La respuesta celular de memoria en linfocitos CD4, CD8 y CD19 fue significativamente mayor en estado estimulado con SARS-CoV-2 que en estado basal ( $p < 0,05$ ). El 74,07% de los voluntarios (20/27) tuvo una IgG reactiva para SARS-CoV-2. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico de COVID-19 hasta el estudio inmunológico fue de 6 a 13 meses. **Conclusiones:** Se detecta inmunidad específica de memoria celular y humoral anti - SARS-CoV-2 luego de aproximadamente un año de la infección natural en individuos no vacunados. Estos resultados nos permiten comprender mejor la respuesta inmune natural anti - SARS-CoV-2 y contribuyen a la planificación de nuevas estrategias de inmunización.

**Palabras clave:** COVID-19, inmunidad celular, inmunidad humoral, memoria inmunológica, inmunización.

## Abstract

**Background:** More than three years after the beginning of the COVID-19 pandemic, mortality and hospitalization rates decreased thanks to vaccination; however, new variants, more transmissible and resistant to previous immunity, could be responsible for new and re-infections. **Objective:** To investigate the presence of specific cellular and humoral-mediated memory immunity in people recovered from COVID-19 who were not vaccinated at the time of this study. **Materials and methods:** A descriptive cross-sectional study was carried out between July and August 2021 in 27 unvaccinated volunteers recovered from COVID-19. Cellular immunity was studied by flow cytometry through the presence of memory and immunological activation markers on TCD4, TCD8 and B lymphocytes, and then comparing basal and stimulated response with inactivated SARS-CoV-2 (Wilcoxon test for paired samples, R study program). Anti-Spike protein IgG antibodies were measured. The study was approved by the institutional Ethics Committee. **Results:** The memory cell response on CD4, CD8 and CD19 lymphocytes was significantly higher in the SARS-CoV-2 stimulated state than in the basal state ( $p < 0.05$ ). The 74.07% of volunteers (20/27) were IgG reactive anti-SARS-CoV-2. The time between the diagnosis of COVID-19 and this immunological study was 6 to 13 months. **Conclusions:** Unvaccinated individuals showed specific cellular and humoral memory immunity against SARS-CoV-2 approximately one year after natural infection. These results allow us to better understand the anti-SARS-CoV-2 immune response and can contribute to the planning of new immunization strategies.

**Keywords:** COVID-19, cellular immunity, humoral immunity, immunological memory, immunization.

## Introducción

El nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés, o síndrome respiratorio agudo y grave por coronavirus 2 emergió a fines de diciembre del 2019 en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, y rápidamente se expandió por todo el mundo.<sup>1</sup> El 11 de marzo del 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la pandemia.<sup>2</sup> El período de incubación de hasta 14 días, el alto porcentaje de contagiados sintomáticos leves o asintomáticos, sobre todo en población pediátrica<sup>3</sup>, y la ausencia de inmunidad previa anti - SARS-CoV-2<sup>4,5</sup> contribuyeron a la expansión del virus y dificultaron el control de la pandemia.

En nuestro país, desde el inicio de la pandemia hasta el 29 de abril del 2023, se notificaron 10.052.810 de casos confirmados de COVID-19 y 130.502 fallecidos.<sup>6</sup> La vacunación anti-COVID-19 se inició el 29 de diciembre de 2020<sup>7</sup>, y los primeros en recibirla fueron los adultos mayores, personas con comorbilidades y personal de salud. Según datos del Ministerio de Salud de la Nación, hasta mayo del 2023 en Argentina, se aplicaron 115.539.419 dosis.<sup>8</sup> Gracias a la vacunación, la pandemia por COVID-19 pudo controlarse, y disminuyó notoriamente el número de muertes e internaciones por esta causa.

La mayoría de las personas con inmunidad previa, ya sea por reinfección o vacunación, experimentarán una enfermedad respiratoria leve o moderada; esto significa que la inmunidad anti - SARS-CoV-2 no es esterilizante y, por lo tanto, no evitará ni la reinfección ni la transmisión.<sup>9,10</sup> Como consecuencia, se han documentado nuevos picos de contagios sin una clara estacionalidad, y han aparecido nuevas variantes virales asociadas a mayor contagiosidad que escapan principalmente la inmunidad humoral<sup>11,12</sup>, como ocurrió con la variante ómicron, considerada como variante de preocupación (VOC) por la OMS en noviembre del 2021.<sup>13,14</sup>

Debido a la emergencia sanitaria global, diferentes plataformas vacunales se aprobaron en tiempo récord<sup>15</sup> sin comprender completamente la respuesta inmunológica generada por la infección natural.

La respuesta inmune a las vacunas se ha estudiado *in vitro*. Algunos autores analizaron la capacidad de neutralización de anticuerpos (Ac), otros, la funcionalidad celular.<sup>16-19</sup>

También es sabido que la inmunidad ideal sería aquella que genere una respuesta de memoria sistémica y de mucosas<sup>17</sup> no solo contra la proteína *spike*, sino contra otras proteínas virales, para lo cual es fundamental una respuesta equilibrada Th1/Th2. A fin de que esto ocurra, son imprescindibles los linfocitos T (LT).<sup>18, 20-22</sup> Estudios previos con SARS-CoV-1, descubierto en China a finales del año 2002 y de la misma familia que SARS-CoV-2, demostraron que los Ac generados después de la infección fueron protectores, pero de corta vida media<sup>23,24</sup>, mientras que la respuesta de LT perduró por años.<sup>21,24,25</sup>

Durante el transcurso de la pandemia por SARS-CoV-2, otros autores detectaron respuesta de LT anti - SARS-CoV-2 meses después del diagnóstico, incluso en personas sin Ac

detectables y en contactos estrechos asintomáticos.<sup>16,26</sup>

Sabiendo que el título de anticuerpos disminuye fisiológicamente con el tiempo, es necesario comprender qué sucede con la inmunidad adaptativa de memoria celular. El objetivo principal de este trabajo fue investigar la presencia de inmunidad específica celular y humoral de memoria en personas recuperadas de COVID-19 y sin vacunar al momento del estudio.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal entre julio y agosto del 2021.

### Población y muestra

Se seleccionaron 27 voluntarios que cumplieron los siguientes criterios de inclusión: ser mayor de 18 años de edad; tener un informe de laboratorio con resultado positivo para SARS-CoV-2 por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR), junto con registros clínicos o ficha clínico - epidemiológica de la fecha del diagnóstico; tener el alta médica según criterio del Ministerio de Salud de la Nación; no haber recibido ninguna vacuna contra SARS-CoV-2 al momento de este estudio; no presentar sintomatología compatible con la definición de caso sospechoso de COVID-19.<sup>27</sup> Las 27 personas aceptadas fueron citadas, respetando los protocolos de distanciamiento social y preventivo, para realizar la extracción de sangre; firmaron un consentimiento informado y completaron una encuesta sobre su recuperación y estado de salud actual.

Quedaron excluidas de la preselección personas inmunocomprometidas (por enfermedad oncológica, trasplante de órgano sólido o médula ósea, infección por virus de inmunodeficiencia humana [VIH], drogas inmunosupresoras o modificadores de respuesta biológica), institucionalizadas en centros de cuidados crónicos, hospital de día o hemodiálisis y/o que tuvieran esperanza de vida menor de 6 meses.

Se analizaron datos clínico - epidemiológicos y de laboratorio de los 27 voluntarios.

### Muestras biológicas

Sangre entera periférica heparinizada (heparina sódica Rivero, Riveparin, Uruguay, REG: 33024) para el aislamiento de células mononucleares (CMN) y recuento celular: una gota de sangre entera para la fórmula leucocitaria y suero para serología.

### Purificación de células mononucleares (CMN)

Siguiendo protocolos ya descritos por otros autores<sup>28,29</sup>, en cabina de flujo laminar (LabGard® Gabinete de Bioseguridad Clase II Tipo A2, NuAire™), se realizó un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Lymphoprep™, NYCOMED PHARMA AS, Oslo, Norway, No. 10068032) a partir de sangre entera heparinizada, diluida al 50 % con solución fisiológica estéril; luego de centrifugar durante 20 minutos a 1800 revoluciones por minuto (r.p.m), se obtuvo una interfase opaca, rica en CMN. Las CMN

**Tabla I.** Características clínico - epidemiológicas de los voluntarios INE-ANLIS, Mar del Plata; julio - agosto 2021 (N=27).

	Media	Rango	Desvío Estándar
Edad (años)	37	21 - 64	10,85
	Frecuencia	Porcentaje (%)	IC 95%
Sexo			
Femenino	17	62,96	42,37-80,60
Masculino	10	37,04	19,40-57,63
Nivel educativo			
Primario completo	1	3,70	0,09-18,97
Secundario completo	6	22,22	8,62-42,26
Terciario incompleto	6	22,22	8,62-42,26
Terciario completo	3	11,11	2,35-29,16
Universitario incompleto	7	25,93	11,11-46,28
Universitario completo	4	14,81	4,19-33,73
Aislamiento			
Domiciliario	26	96,30	81,03-99,91
Hotel	1	3,70	0,09-18,97
Viaje previo a COVID-19	3	11,11	2,35-29,16
Signos y síntomas al momento del diagnóstico de COVID-19			
Fiebre	16	59,26	38,80-77,61
Dolor de garganta	17	62,96	42,37-80,60
Dolor de cabeza	16	59,26	38,80-77,61
Fatiga	9	33,33	16,52-53,96
Agitación	5	18,52	6,30-38,08
Tos	9	33,33	16,52-53,96
Nauseas/Vómitos	2	7,41	0,91-24,29
Dolores musculares	12	44,44	13,75-50,18
Pérdida del gusto	14	51,85	31,95-71,33
Pérdida del olfato	16	59,26	38,80-77,61
Dificultad respiratoria	6	22,22	8,62-42,26
Diarrea	2	7,41	0,91-24,29
Adenomegalia	1	3,70	0,09-18,97
Temblores	1	3,70	0,09-18,97
Petequias	1	3,70	0,09-18,97
Rinitis	2	7,41	0,91-24,29
Síntomas pos-COVID-19 (n=26)			
Anosmia	2	7,69	0,95-25,13
Fatiga	1	3,85	0,10-19,64
Migraña	1	3,85	0,10-19,64
Trombosis venosa	1	3,85	0,10-19,64
Autopercepción de la recuperación			
Buena	20	74,07	53,72-88,89
Regular	7	25,93	11,11-46,28
Comorbilidades	2	11,11	2,35-29,16
Serología previa al estudio*	12	44,44	25,48-64,67

\*De las 12 personas que se realizaron serología previa, diez tuvieron resultados positivos. Fuente: datos recopilados con base en la encuesta personal y la ficha clínico - epidemiológica, al momento del diagnóstico de COVID-19.

se lavaron dos veces con solución fisiológica y una vez con Medio Roswell Park Memorial Institute con glutatión y vitaminas [RPMI 1640 [Gibco®, Life Technology Corporation, N°:31800014]], suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomocina al 1%).

### Ensayos funcionales

Los cultivos se realizaron durante 5 días con CMN frescas, obtenidas en el día, en placa estéril de 96 pocillos de fondo plano (Orange Scientific: *Cat.* 5530 100), en estufa gaseada de dióxido de carbono al 5 % (Excella ECO-170). Se ajustó el número de CMN a 2.000.000/mL en RPMI suplementado con penicilina/estreptomocina al 1 %. Se sembraron 200.000 CMN por pocillo (volumen final: 200 uL). La viabilidad celular se confirmó por exclusión de coloración vital con azul de tripán (Biopack Cod. 9662.01).

A cada voluntario, se le realizaron tres tipos de estímulos por triplicado: basal: CMN con RPMI completo; control positivo: CMN con fitohemaglutinina (PHA 20 ug/mL) como control positivo de activación celular; estímulo específico: CMN con 1000 dosis infectantes de SARS-CoV-2 inactivado con beta-propiolactona. (Laboratorio de Virosis Respiratorias INE-ANLIS, Malbrán). Tanto los estímulos como el cultivo basal se prepararon en el día con RPMI completo, suplementado con suero bovino fetal al 20 % [SBF Gibco® by Life Technologies, Ref 16000-036]. Al quinto día, las CMN se cosecharon, se lavaron con solución fisiológica tres veces, se resuspendieron en 100 uL de *buffer* BD FACSFlow™ (ref. 342003) y se marcaron para citometría de flujo (CMF).

### Citometría de Flujo

Se utilizó un panel de anticuerpos monoclonales (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San José, CA 95131 USA) que permitiera identificar subpoblaciones linfocitarias B, TCD4 y TCD8, además de marcadores de activación y memoria, en un único tubo: CD19 con isotiocianato de fluoresceína (CD19-FITC), CD3 con alofocianina (CD3-APC), CD4 con *Peridinin chlorophyll protein-Cyanine5.5* (CD4-PerCP-Cy™5.5), CD8 con alofocianina

**Tabla II.** Resultados basales de inmunidad humoral y poblaciones celulares pos-COVID-19. INE-ANLIS, Mar del Plata; julio-agosto 2021. N=27.

Voluntario	Tiempo desde el diagnóstico al estudio inmunológico (meses)	Recuento de leucocitos (n/mm <sup>3</sup> )	Recuento de CMN inicial (n/mm <sup>3</sup> )	Viabilidad inicial (%)	Serología	CD3+ Totales (%)	CD4+ Totales (%)	CD8+ Totales (%)	CD19+ Totales (%)
	x=10 DS=1,18 (6-13)	x=6400 DS=1705,18 (4300-11000)	x=2300 DS=1144,16 (850-4900)	x=98 DS= 2,05 (93-100)	Reactivos 74,07% (20/27)	x=32 DS=8,38 (12,7-46,9)	x=77,7 DS=9,99 (58,7-95,4)	x= 21,6 DS=9,69 (4,6-41,3)	x=9,6 DS= 3,73 (4,4-18,9)
1	12	7500	4800	100	R	32,0	86,5	13,5	12,7
2	10	7450	3950	100	R	35,0	85,5	14,5	11,0
3	10	4350	2000	100	R	30,0	63,7	36,3	5,5
4	10	6800	2100	100	R	33,0	83,0	17,0	9,6
5	11	4650	3300	95	R	27,0	69,5	30,5	7,8
6	10	5300	2150	98	R	32,0	85,9	14,1	8,2
7	8	6200	4900	99	R	23,0	71,9	28,1	8,0
8	12	7300	3600	99	R	32,0	89,2	10,8	6,9
9	7	6400	2500	96	R	26,5	77,2	22,8	6,7
10	12	5400	2300	99	R	30,0	72,9	27,1	11,7
11	12	5000	2300	98	R	35,5	78,4	21,6	7,7
12	8	5800	4100	96	R	33,6	77,7	22,3	11,8
13	10	11000	4050	99	R	34,8	59,2	40,8	8,5
14	12	8800	4350	97	R	46,2	76,7	23,3	18,9
15	13	8900	2200	100	NR	20,8	89,9	10,1	12,7
16	11	7900	2300	95	R	29,0	86,4	13,6	12,7
17	11	4300	1250	98	R	22,5	84,3	15,7	14,1
18	11	8900	1450	99	NR	36,0	89,9	20,1	14,0
19	9	5300	850	94	NR	12,7	62,0	38,0	4,4
20	13	10000	1450	93	R	23,0	81,9	18,9	13,4
21	8	6600	3150	98	R	17,0	73,2	18,1	6,6
22	7	6200	1300	99	R	31,6	70,5	29,5	4,8
23	11	6400	3100	100	NR	43,4	95,4	4,6	14,5
24	10	7300	3050	96	NR	39,3	58,7	41,3	16,9
25	9	5700	1200	98	R	40,4	82,1	17,9	8,5
26	11	7300	2300	96	NR	46,9	74,6	25,4	11,5
27	6	5300	3050	100	NR	39,5	67,2	32,8	7,2

► x, mediana; DS, desvío estándar; R, reactivo; NR, no reactivo

na - análogo de cianina? (CD8-APC-H7), CD25 con ficoeritrina (CD25-PE) y CD45Ro con ficoeritrina-cianina? (CD45Ro-PE-Cy7). Se adquirieron 10.000 eventos en un CMF de 6 colores (BD FACSCanto™ Flow Cytometer).

La estrategia para el análisis por citometría de flujo se describe en "Anexo I".

#### Serología

Se realizó un enzoinmunoensayo (ELISA COVIDAR IgG®). Siguiendo indicaciones del fabricante, se obtuvo el título de anticuerpos de tipo IgG anti – proteína spike de SARS-CoV-2 en muestras de suero.

## Recolección de datos

Se utilizó un cuestionario autoadministrado que incluía datos clínico-epidemiológicos al momento del diagnóstico, corroborados con la ficha de notificación obligatoria de caso sospechoso de COVID-19 del Ministerio de Salud de la Nación. Se incluyeron datos de la recuperación autopercebida posterior al COVID.

- Variable dependiente: presencia de linfocitos de memoria que responden específicamente a SARS-CoV-2
- Variables independientes. Al momento del diagnóstico viral: edad (años); género (varón/mujer/trans); sexo (masculino/femenino/otro); fecha de inicio de síntomas (día/mes/año); fecha de toma de muestra (día/mes/año); muestra biológica [esputo/aspirado endotraqueal/lavado broncoalveolar [BAL]/mini BAL/líquido pleural/hisopado nasal y faríngeo/biopsia de pulmón/otras]; signos y síntomas (dolor de garganta/náuseas/vómitos/pérdida del olfato/agitación/fatiga/dificultad respiratoria/dolor de cabeza/dolores musculares/otros aclarando que cada signo y síntoma se valoraría con sí/no); tratamiento (sí/no, especificar); requiere internación (sí/no, n° de días); complicaciones: insuficiencia respiratoria/ventilación mecánica [VM] - días de VM -; cardiovasculares: infarto agudo de miocardio/arritmias/pericarditis/otras; coagulación vascular diseminada, tormenta de citoquinas, infección secundaria); requiere ingreso a UTI (sí/no); enfermedad de base/comorbilidad (sí/no, ¿cuál?); Ascendencia (padres/abuelos/bisabuelos); nivel de educación (ninguno/primario: completo/incompleto, secundario: completo/incompleto, terciario: completo/incompleto, universitario: completo/incompleto); ocupación (especificar); número de convivientes (especificar); número de contagios secundarios entre sus convivientes (especificar); número de ambientes en vivienda (especificar); viaje previo (sí/no). Al momento del estudio inmunológico: Se relevaron serología [IgG reactiva/no reactiva]; serología previa (información complementaria que aportaron algunos de los voluntarios acompañándola con su comprobante de diagnóstico molecular de SARS-CoV-2: sí/no); recuento de leucocitos totales (n°/mm<sup>3</sup>) y fórmula leucocitaria; viabilidad celular [porcentaje (%)] de células vivas después de Ficoll-Paque); % de CMN positivas (+) para los marcadores de membrana estudiados por CMF (% de LB CD19+, % de LT CD4+ y % de LT CD8+, % de células activadas CD25+ y de memoria CD45Ro+) en estado basal y estimulado específicamente con SARS-CoV-2.

## Análisis estadístico

Se presentaron estadísticas descriptivas para las variables demográficas y clínicas. Para las variables continuas, se calcularon medias, rango y desvío estándar; para las variables categóricas, frecuencias absolutas, porcentajes y sus intervalos de confianza de 95% [IC95%]. Las asociaciones entre variables se realizaron mediante el test del chi

cuadrado ( $\chi^2$ ) o prueba exacta de Fisher, según correspondiera. La asociación entre las variables y la presencia de respuesta inmune celular se estimó calculando el *odds ratio* [OR]. Se usaron los programas de soporte: *Epi Info 7*, *EpiDat 4.1*. La respuesta inmune celular global se analizó con el test de Wilcoxon para muestras pareadas con el programa R-Studio; esto se hizo para cada una de las subpoblaciones celulares: LB y LT CD4 y CD8.

## Ética

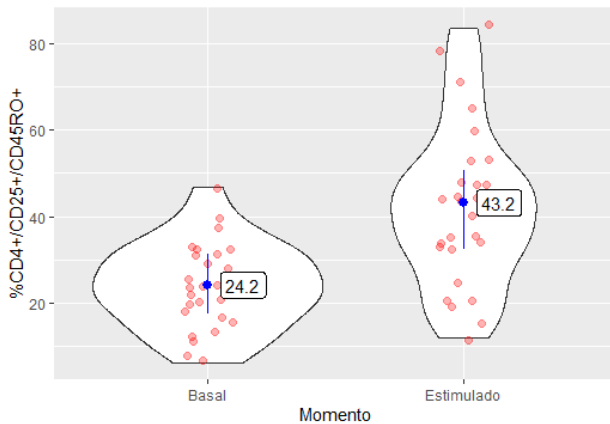
El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del INE, "Juan H. Jara", con sede en la calle Ituzaingo 3520 de Mar del Plata, que cumple con el reglamento de Registro y Acreditación de Comités Institucionales de Ética en Investigación, Registro N° 059/2016, FOLIO 107 DEL Libro de Actas N°2, con fecha 02/09/2016 (Código: LERMAN 02/2020). Cada participante proporcionó su consentimiento informado por escrito antes de cualquier actividad del estudio. Se mantiene la confidencialidad de los participantes.

## Resultados

De un registro de más de 20.000 diagnósticos de COVID-19 por RT-qPCR, se preseleccionaron 158 personas, de las cuales solo se estudiaron 27 (17,1 %). El resto (n=131) no se incluyó por las siguientes causas: no pudo ser ubicado (n=38), había recibido la vacuna (n=83), fue citado y no se presentó al estudio (n=7) o había fallecido (n=3). De los 27 voluntarios, 26 fueron diagnosticados con COVID-19 en 2020: 1 en enero del 2021; 17 (62 %) eran de ascendencia europea, 2, mestizos y 8 no respondieron a esa pregunta. Datos de la encuesta revelaron que 15 de las 27 personas (55,55 %) sabían de quiénes se habían contagiado; el resto lo desconocía. Ocho (29,63 %) afirmaron haber contagiado a algún conviviente, y 4 (14,81 %) contagiaron a su vez a algún contacto estrecho no conviviente. No se halló asociación estadísticamente significativa entre el número de contagios secundarios entre convivientes y el número de ambientes en la vivienda (p > 0,05).

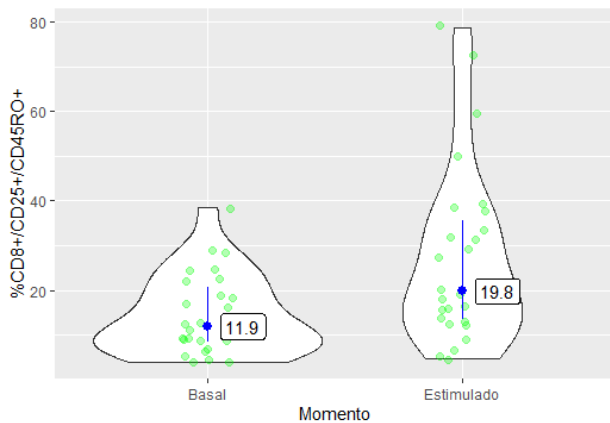
Las características clínico-epidemiológicas de las personas estudiadas se detallan en la Tabla I. Solo dos personas presentaron alguna comorbilidad o factor de riesgo al diagnóstico de COVID-19: una de ellas cursaba embarazo avanzado y diabetes, otro era fumador. Ninguno de los voluntarios requirió internación, pero uno desarrolló una trombosis venosa posterior al COVID-19. Ninguno presentó leucopenia, leucocitosis, linfopenia o linfocitosis al momento del estudio. Los resultados basales del estudio inmunológico humoral y de poblaciones celulares se presentan en la Tabla II. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico de COVID-19 hasta la fecha del estudio inmunológico fue, en promedio, 10 meses (6 a 13 meses). El 74,07 % (20 / 27) resultó IgG anti-SARS-CoV-2 reactivo. No se halló asociación estadísticamente significativa entre la presencia o no de Ac anti-SARS-CoV-2 y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de COVID-19 (p=0,0627); tampoco, con el porcentaje

**Figura 1.** LT CD4+ en estado basal y estimulado específicamente con SARS-CoV-2.



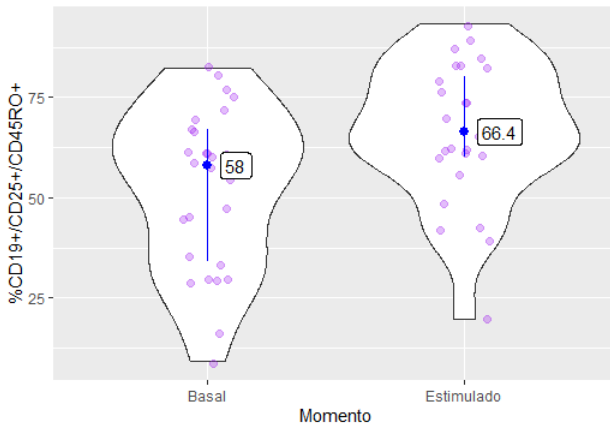
► Test de Wilcoxon para muestras pareadas. Programa R-Studio (p=0,00000131).

**Figura 2.** LT CD8+ en estado basal y estimulado específicamente con SARS-CoV-2.



► Test de Wilcoxon para muestras pareadas. Programa R-Studio (p=0,0000221).

**Figura 3.** LB CD19+ en estado basal y estimulado específicamente con SARS-CoV-2.



► Test de Wilcoxon para muestras pareadas. Programa R-Studio (p=0,000598).

de CD19 total (p=0,4148). Al comparar las CMN en estado basal con las estimuladas específicamente durante 5 días con SARS-CoV-2 inactivado, se observó una respuesta celular de memoria significativa (p < 0,05) en las 3 subpoblaciones linfocitarias estudiadas, aunque con mayor dispersión en los LB (Figuras 1, 2 y 3).

**Discusión**

Este estudio es uno de los pocos publicados en Argentina que documenta la inmunidad de memoria posterior al COVID-19 *in vitro* mediante ensayos funcionales luego de aproximadamente un año de la primoinfección, en individuos no vacunados.

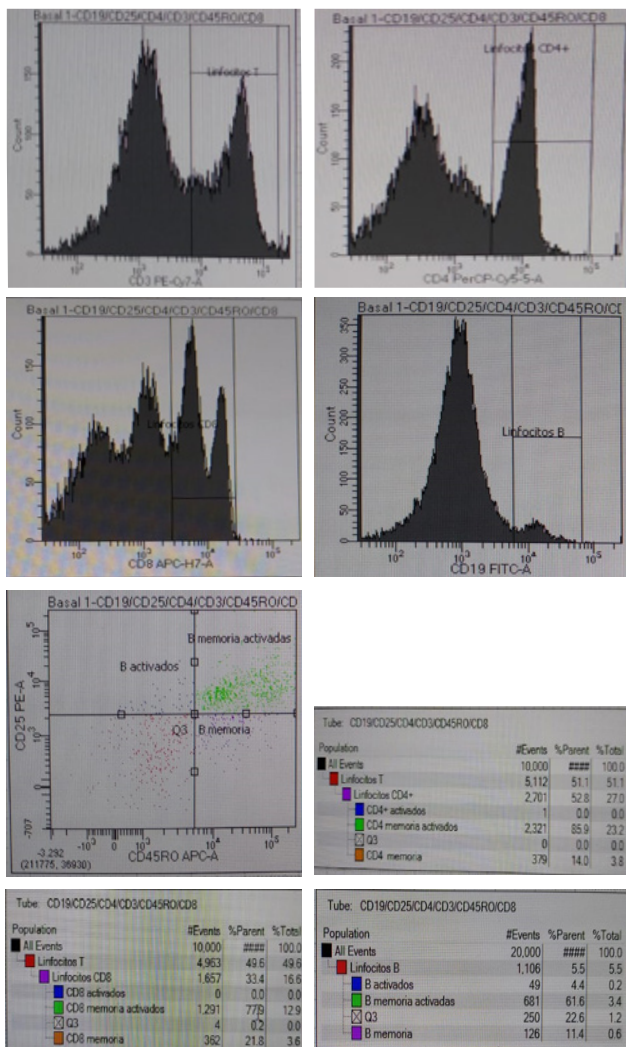
Existe consenso respecto de que tanto la infección natural como la vacunación generan una respuesta inmune de memoria celular y humoral anti - SARS-CoV-2<sup>30-34</sup>. Esta inmunidad, aunque efectiva para mitigar las manifestaciones clínicas y disminuir las hospitalizaciones, no siempre nos protege contra una reinfección ni evita la transmisión. Otros autores reportaron que personas con esquema completo de vacunación transmiten el virus con cargas virales similares a las de aquellas sin vacunar<sup>35</sup>, que la inmunidad generada por vacunas como Pfizer-BioNTech disminuye más rápidamente que en convalecientes<sup>36</sup> y que la eficacia de las vacunas decrece más rápidamente en adultos mayores y adultos con comorbilidades que en inmunocompetentes.<sup>37</sup>

Nuevas variantes del coronavirus-2, como ómicron, nos recuerdan que la epidemiología de los virus respiratorios cambió y que el sistema de salud debe estar atento a la posible aparición de otras variantes más transmisibles y resistentes a inmunización previa.

Entre las limitaciones del estudio, se identificaron la imposibilidad de estudiar un mayor número de individuos y de representar todos los rangos etarios, especialmente, el de los adultos mayores; tampoco se incluyeron personas con comorbilidades significativas o que hayan cursado la enfermedad con parámetros de gravedad, como requerimiento de internación o asistencia respiratoria, entre otras. El motivo fue que, en Argentina, la campaña de vacunación anti COVID-19 se inició antes de realizar este estudio, y los primeros en acceder a las vacunas fueron los grupos de riesgo: personal de salud, mayores de 65 años y personas con comorbilidades. En septiembre del 2021, la vacunación comenzó a ser libre y voluntaria para mayores de 18 años.

Otro punto a mencionar es que, al momento del ensayo, todas las personas habían decidido voluntariamente no vacunarse, se encontraban en perfecto estado de salud y declararon no haber tenido síntomas compatibles con COVID-19 en el periodo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad y este estudio; sin embargo, no podemos garantizar que la respuesta inmune específica anti-SARS-CoV-2 aquí estudiada se deba exclusivamente a la memoria inmunológica generada por la primoinfección natural, ya que existe la posibilidad de haber incluido también la respuesta asintomática a una o más exposiciones al virus,

**Anexo I. Estrategia para el análisis por citometría de flujo.**



► En el caso de los LT, se realizó un gate inicial en las CMN CD3+; sobre ellas, se discriminaron las subpoblaciones CD4+ o CD8+; finalmente, se analizaron en un plot los clusters de doble positivas para los marcadores de activación y memoria celular (CD25+ y CD45Ro+, respectivamente). Para los LB, se realizó un gate inicial en las CMN CD19+; luego, se analizó en un plot el cluster CD25+ y CD45Ro+. La misma estrategia se aplicó tanto para el estadio basal como para el estimulado.

como describen otros autores.<sup>38</sup>

En este estudio, solo se evaluó la inmunidad sistémica, pero sería interesante estudiar también la inmunidad de mucosas dosando IgA sérica y secretoria, indispensables como primer mecanismo de defensa contra virus respiratorios.

Si bien la vacunación redujo la morbimortalidad asociada al SARS-CoV-2, se necesitan más investigaciones para caracterizar su durabilidad y efecto protector. Se han reportado varios casos de efectos adversos potencialmente asociados con las vacunas, como miocarditis<sup>39,40</sup>, hipertensión<sup>41</sup>, enfermedad glomerular<sup>42</sup>, efectos oculares<sup>43</sup> y enfermedades autoinmunes.<sup>44,45</sup> La incidencia de estos efectos adversos podría ser mayor en personas que han

cursado COVID-19 antes de la vacunación.<sup>46,47</sup>

Este estudio, junto con otros abordajes de naturaleza similar, llevan a revisar las estrategias de vacunación y adaptarlas a poblaciones específicas, tal como comunicó la OMS en enero del 2022 respecto de la necesidad de desarrollar vacunas alternativas, como las nasales<sup>48</sup>, aplicando conocimientos básicos de inmunología.<sup>21</sup>

Habiendo detectado inmunidad específica de memoria en convalecientes sin vacunar, después de un año de la infección natural, consideramos que, para personas ya expuestas al virus o vacunadas que no pertenezcan a ningún grupo de riesgo, podría implementarse un nuevo esquema de inmunización anual de única dosis.

**Agradecimientos**

Al Servicio Virosis Respiratorias, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” por facilitarnos el virus inactivado; a la Dra. Florencia Quiroga del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (UBA-CONICET), quien nos facilitó PHA y azul tripano; a Lorena Keller y Diego Rodríguez del Laboratorio del Hospital Interzonal Especializado Materno Infantil “Don Victorio Tetamanti” de Mar del Plata por el uso del CMF y a todo el personal del laboratorio del Instituto Nacional de Epidemiología “Dr. Juan H. Jara”, ANLIS-Malbrán, especialmente, a la Mg. Andrea Silva por el análisis de datos y a la Lic. Silvina Lavayen.

**Fuentes de financiación**

Beca “Salud Investiga” para proyectos de Investigación 2020 - 2021, otorgada por el Ministerio de Salud de la Nación a Natalia Libera.

**Conflictos de interés**

Las autoras declaran no poseer conflictos de interés.

**Referencias bibliográficas**

1. World Health Organization (WHO). Coronavirus. [Internet] Geneva. WHO; 2023. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). COVID-19: cronología de la actuación de la OMS. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>
3. Yonker LM, Neilan AM, Bartsch Y, Patel AB, Regan J, Arya P, et al. Pediatric severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): clinical presentation, infectivity, and immune responses. J Pediatr. 2020;227:45. DOI: 10.1016/j.jpeds.2020.08.037.
4. Lee S, Meyler P, Mozel M, Tauh T, Merchant R. Asymptomatic carriage and transmission of SARS-CoV-2: What do we know? Can J Anaesth. 2020; 67(10):1424-1430. DOI: 10.1007/s12630-020-01729-x.
5. Salzberger B, Buder F, Lampl B, Ehrenstein B, Hitzenbichler F, Holzmann T, et al. Epidemiology of SARS-CoV-2. Infection. 2021;49(2):233-239. DOI: 10.1007/s15010-020-01531-3.
6. Ministerio de Salud Argentina. Boletín Epidemiológico Nacional N° 651 SE 17. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-epidemiologico-nacional-651-se-17>
7. Ministerio de Salud. Intermedo de la campaña de vacunación contra COVID-19 en Argentina. [Internet]; 2023. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/comenzo-la-campana-de-vacunacion-contra-covid-19-en-argentina>
8. Ministerio de Salud. Monitor Público de vacunación. [Internet]. 2023. Dis-

- ponible en: <https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/vacuna/aplicadas>
9. Organización Mundial de la Salud. Coronavirus. [Internet]. 2023. Disponible en: [https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab_1)
  10. Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *N Engl J Med.* 2021;384(6):533-540. DOI: 10.1056/NEJMoa2034545.
  11. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19 Vaccine Effectiveness Research. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/effectiveness-research/protocols.html>
  12. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell.* 2021;184(9):2372-2383. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.013.
  13. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. [Internet]. 2023. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variantclassifications.html>
  14. Gao SJ, Guo H, Luo G. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert! *J Med Virol.* 2022;94(4):1255-1256. DOI: 10.1002/jmv.27491.
  15. Ministerio de Salud. ¿Cuáles vacunas estamos aplicando en el país? [Internet]. 2023. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/vacuna/cuales?gad=1&gclid=EAlaQobChMIncCAxejp\\_gIV-4CytBhO0ctgCTEAAYASAAEgJ85fD\\_BwE](https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/vacuna/cuales?gad=1&gclid=EAlaQobChMIncCAxejp_gIV-4CytBhO0ctgCTEAAYASAAEgJ85fD_BwE)
  16. Gallais F, Velay A, Nazon C, Wendling MJ, Partisani M, Sibilia J, et al. Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Associated with Cellular Immune Response without Seroconversion, France. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(1):113-21. DOI: 10.3201/eid2701.203611.
  17. Smith N, Goncalves P, Charbit B, Grzelak L, Beretta M, Planchais C, et al. Distinct systemic and mucosal immune responses during acute SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.* 2021;22(11):1428-1439. DOI: 10.1038/s41590-021-01028-7.
  18. Vibholm LK, Nielsen SSF, Pahus MH, Frattari GS, Olesen R, Andersen R, et al. SARS-CoV-2 persistence is associated with antigen-specific CD8 T-cell responses. *EBioMedicine.* 2021;64:103230. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103230.
  19. Karlsson AC, Humbert M, Buggert M. The known unknowns of T cell immunity to COVID-19. *Sci Immunol.* 2020;18;5(53). DOI: 10.1126/sciimmunol.abe8063.
  20. DiPiazza AT, Graham BS, Ruckwardt TJ. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;538:211-217. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.10.060.
  21. Primorac D, Vrdoljak K, Brlek P, Paveli E, Molnar V, Matiši V, et al. Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Front Immunol.* 2022;13:848582. DOI: 10.3389/fimmu.2022.848582.
  22. ordan SC. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. *Clin Exp Immunol.* 2021;204(3):310-320. DOI: 10.1111/cei.13582.
  23. Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrarmert J, Ma MJ, Lv H, et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J Immunol.* 2011;186(12):7264-8. DOI: 10.4049/jimmunol.0903490.
  24. Channappanavar R, Fett C, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol.* 2014;88(19):11034-11044. DOI: 10.1128/JVI.01505-14.
  25. Shah VK, Fimal P, Alam A, Ganguly D, Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Front Immunol.* 2020;11:1949. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01949.
  26. Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, Chemaly RF, Moschopoulos CD, Skevaki C; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for Respiratory Viruses (ESGREV). How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(7):981-986. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.05.001.
  27. Ministerio de Salud. COVID-19. Definiciones y clasificaciones de caso. Caso sospechoso de Covid-19. [Internet]. 2021. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus/definicion-de-caso#:ff:text=Todo%20caso%20sospechoso%20de%20COVID,reversa%20\(RT%20PCR\)](https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus/definicion-de-caso#:ff:text=Todo%20caso%20sospechoso%20de%20COVID,reversa%20(RT%20PCR))
  28. Yewdell JW. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity.* 2006;25(4):533-43. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.09.005.
  29. Chen H, Schürch CM, Noble K, Kim K, Krutzik PO, O'Donnell E, et al. Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. *BMC Immunol.* 2020;21(1):15. DOI: 10.1186/s12865-020-00345-0.
  30. De Giorgi V, West KA, Henning AN, Chen LN, Holbrook MR, Gross R, et al. Naturally Acquired SARS-CoV-2 Immunity Persists for Up to 11 Months Following Infection. *J Infect Dis.* 2021;224(8):1294-1304. DOI: 10.1093/infdis/jiab295.
  31. Radbruch A, Chang HD. A long-term perspective on immunity to COVID-19. *Nature.* 2021;595(7867):359-360. DOI: 10.1038/d41586-021-01557-z.
  32. Yao L, Wang GL, Shen Y, Wang ZY, Zhan BD, Duan LJ, et al. Persistence of Antibody and Cellular Immune Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients Over Nine Months After Infection. *J Infect Dis.* 2021;224(4):586-594. DOI: 10.1093/infdis/jiab255.
  33. Sherina N, Piralla A, Du L, Wan H, Kumagai-Braesch M, Andréll J, et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6-8 months after the infection. *Med.* 2021;2(3):281-295. DOI: 10.1016/j.medj.2021.02.001.
  34. Vitiello A, Ferrara F, Troiano V, La Porta R. COVID-19 vaccines and decreased transmission of SARS-CoV-2. *Inflammopharmacology.* 2021;29(5):1357-1360. DOI: 10.1007/s10787-021-00847-2.
  35. Riemersma K.K., Grogan B.E., Kita-Yarbro A., Minor N., Eickhoff J., Grogan B.E., et al. Shedding of Infectious SARS-CoV-2 Despite Vaccination. *PLoS Pathog.* 2021;18:e1010876. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010876.
  36. Israel A, Shenhar Y, Green I, Merzon E, Golan-Cohen A, Schäffer AA, et al. Large-Scale Study of Antibody Titer Decay following BNT162b2 mRNA Vaccine or SARS-CoV-2 Infection. *Vaccines (Basel).* 2021;10(1):64. DOI: 10.1101/2021.08.19.21262111.
  37. Andrews N., Tessier E., Stowe J., Gower C., Kirsebom F., Simmons R., et al. Duration of Protection against Mild and Severe Disease by Covid-19 Vaccines. *J. Med.* 2022;386:340-350. DOI: 10.1056/NEJMoa2115481.
  38. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell.* 2020;183(1):158-168. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.017.
  39. Simone A, Herald J, Chen A, Gulati N, Shen AY, Lewin B, et al. Acute Myocarditis Following COVID-19 mRNA Vaccination in Adults Aged 18 Years or Older. *JAMA Intern Med.* 2021;181(12):1668-1670. DOI: 10.1001/jamainternmed.2021.5511.
  40. Kim HW, Jenista ER, Wendell DC, Azevedo CF, Campbell MJ, Darty SN, et al. Patients With Acute Myocarditis Following mRNA COVID-19 Vaccination. *JAMA Cardiol.* 2021;6(10):1196-1201. DOI: 10.1001/jamacardio.2021.2828.
  41. Zappa M, Verdecchia P, Spanevello A, Visca D, Angeli F. Blood pressure increase after Pfizer/BioNTech SARS-CoV-2 vaccine. *Eur J Intern Med.* 2021;90:111-113. DOI: 10.1016/j.ejim.2021.06.013.
  42. Caza TN, Cassol CA, Messias N, Hannoudi A, Haun RS, Walker PD, et al. Glomerular Disease in Temporal Association with SARS-CoV-2 Vaccination: A Series of 29 Cases. *Kidney360.* 2021;2(11):1770-1780. DOI: 10.34067/KID.0005372021.
  43. Ng XL, Betzler BK, Testi I, Ho SL, Tien M, Ngo WK, et al. Ocular Adverse Events After COVID-19 Vaccination. *Ocul Immunol Inflamm.* 2021;29(6):1216-1224. DOI: 10.1080/09273948.2021.1976221.
  44. Lui DTW, Lee KK, Lee CH, Lee ACH, Hung IFN, Tan KCB. Development of Graves' Disease After SARS-CoV-2 mRNA Vaccination: A Case Report and Literature Review. *Front Public Health.* 2021;9:778964. DOI: 10.3389/fpubh.2021.778964.

45. Chen Y, Xu Z, Wang P, Li XM, Shuai ZW, Ye DQ, et al. New-onset autoimmune phenomena post-COVID-19 vaccination. *Immunology*. 2022;165(4):386-401. DOI: 10.1111/imm.13443.
46. Mathioudakis AG, Ghrew M, Ustianowski A, Ahmad S, Borrow R, Papa-vasileiou LP, et al. Self-Reported Real-World Safety and Reactogenicity of COVID-19 Vaccines: A Vaccine Recipient Survey. *Life (Basel)*. 2021;11(3):249. DOI: 10.3390/life11030249.
47. Tré-Hardy M, Cupaiolo R, Papeux E, Wilmet A, Horeanga A, Antoine-Moussiaux T, et al. Reactogenicity, safety and antibody response, after one and two doses of mRNA-1273 in seronegative and seropositive health care workers. *J Infect*. 2021;83(2):237-279. DOI: 10.1016/j.jinf.2021.03.025.
48. WHO Interim Statement on COVID-19 Vaccines in the Context of the Circulation of the Omicron SARS-CoV-2 Variant from the WHO Technical Advisory Group on COVID-19 Vaccine Composition [TAG-CO-VAC, 2022] [Internet] 2022. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/11-01-2022-interim-statement-on-covid-19-vaccines-in-the-context-of-the-circulation-of-the-omicron-sars-cov-2-variant-from-the-who-technical-advisory-group-on-covid-19-vaccine-composition>.










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

# Variación en la expresión de CD20 en leucemias linfoblásticas agudas B en pacientes pediátricos y su impacto en el tratamiento

*Variation of CD20 expression in B Acute Lymphoblastic Leukemias in pediatric patients and its impact on treatment*

Ceres, Verónica Luján<sup>1</sup> \*; Vázquez, María Paula<sup>1</sup> ; Acosta, Daiana Andrea<sup>1</sup> ; González, María Isabel<sup>1</sup> ; Carrara, Carolina Alejandra<sup>1</sup> ; Tamburella, Florencia Raquel<sup>1</sup> ; Corominas, Ana<sup>1</sup> ; Venegas, María Belén<sup>1</sup> .

<sup>1</sup>Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. El Palomar, Buenos Aires, Argentina.

\*Contacto: Ceres, Verónica Luján. Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. Av. Presidente Arturo U. Illia s/n y Marconi Morón 386, B1684. El Palomar, Buenos Aires, Argentina; veronica\_ceres@hotmail.com

## Resumen

Introducción: El inmunofenotipo por citometría de flujo es útil al momento del diagnóstico de las leucemias linfoblásticas agudas, ya que permite definir la estirpe celular. La respuesta al tratamiento se monitorea al día 15 (D15) basándose en la cuantificación de blastos por citometría de flujo. Es importante evaluar la expresión de antígenos celulares, como el CD20, ya que su presencia permite la utilización de inmunoterapias en pacientes con leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B). Objetivo: Evaluar el efecto de la utilización de corticoides en la fase de inducción sobre la expresión del antígeno de superficie CD20 en pacientes con LLA-B al momento del diagnóstico y en el día 15 de su tratamiento. Materiales y métodos: Se reanalizaron los archivos al momento del diagnóstico y el día 15 del inmunofenotipo por citometría de flujo de 78 pacientes pediátricos. Se registraron los valores de expresión de CD20 en los blastos y en los linfocitos B normales. Se emplearon como pruebas estadísticas t de Student para distribuciones normales y test Mann-Whitney como método no paramétrico. Resultados: El 78 % de pacientes presentó aumento significativo del porcentaje de expresión de CD20 en blastos presentes al día 15 respecto del diagnóstico. El 37 % cambió su estatus de negativo a positivo para CD20 al día 15. Tanto la comparación de los parámetros *media* y *mediana de intensidad de fluorescencia* al diagnóstico y día 15 como sus valores normalizados demostraron diferencias estadísticamente significativas. Conclusión: Se observó que la expresión del CD20 al día 15 de tratamiento en los pacientes con LLA-B aumentó con respecto al diagnóstico, por lo que podrían convertirse en candidatos a inmunoterapia.

**Palabras clave:** citometría de flujo, leucemia, pediatría, oncohematología.

## Abstract

Introduction: Immunophenotyping by flow cytometry is useful to assign lineage to pathological cells in B acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). Monitoring of the therapeutic response on day 15 is based on the quantification of blasts by flow cytometry. The expression of cellular antigens, such as CD20, allows the possible use of immunotherapies in B-ALL patients. Objectives: To assess the effect of corticosteroids on the expression of CD20 surface antigen in B-ALL patients at diagnosis and on day 15 of the induction phase. Materials and methods: The immunophenotypic study by multiparametric flow cytometry was reanalyzed in 78 pediatric patients at diagnosis and on day 15. The expression of CD20 values were recorded both in blasts and normal B lymphocytes. A descriptive statistical approach was used and the comparisons were made using the Student's t test for normal distributions and the Mann-Whitney test as a non-parametric method. Results: In 78% of the patients, an increase in the percentage of expression in CD20 was observed in the blast cells present on day 15 compared to diagnosis. Besides, 37% of the patients changed their status from negative to positive for CD20 on day 15. Conclusions: The expression of CD20 on day 15 of the treatment in patients with B-ALL was increased versus its value at the moment of diagnosis and could thus become candidates for immunotherapy.

**Keywords:** flow cytometry, leukemia, pediatric, oncohematology.

## Introducción

Las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) son un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas que resultan de la proliferación clonal de linfoblastos que pueden infiltrar médula ósea (MO), diferentes órganos y/o sistemas<sup>1</sup>. El diagnóstico de LLA se basa en la examinación citomorfológica de la MO, la sangre periférica (SP) y el líquido cefalorraquídeo (LCR), complementada con las técnicas de citometría de flujo y citogenética/biología molecular<sup>2</sup>.

El inmunofenotipo realizado por citometría de flujo multiparamétrica permite asignar linaje B o T a las células patológicas mediante el estudio de la expresión de antígenos de superficie e intracitosplasmáticos en el momento del diagnóstico.

El monitoreo de la respuesta al tratamiento se realiza al día 15 del inicio de la inducción y se basa en la cuantificación de los blastos por citometría de flujo<sup>2</sup>. A pesar de la mejora en los regímenes terapéuticos de niños y adolescentes con LLA-B, que han permitido alcanzar una sobrevida libre de eventos mayor del 90 %, aquellos pacientes que recaen o resultan refractarios a la quimioterapia constituyen un verdadero desafío<sup>3</sup>.

El avance en el conocimiento tanto de la biología de las neoplasias hematológicas como del rol que cumple el sistema inmune en el control de las mismas ha llevado al desarrollo y aprobación de terapias biológicas<sup>4</sup>. Probablemente, el ejemplo más destacable de éxito en el uso de inmunoterapias es el monoclonal anti-CD20 (rituximab) para el tratamiento de neoplasias linfoides B<sup>4</sup>.

El rituximab es un anticuerpo monoclonal humano/murino quimérico anti-CD20 que se une con alta afinidad y especificidad a dicha proteína transmembrana de los linfocitos B tanto normales como patológicos<sup>5</sup>.

El rituximab se une al CD20 expresado en las células B neoplásicas a través de la porción Fc e induce la eliminación de dichas células mediante cuatro mecanismos: citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente

de anticuerpos, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y efectos antitumorales directos mediante apoptosis u otra vía de muerte celular<sup>5</sup>. El CD20 se expresa en casi el 45 % de los blastos en el momento del diagnóstico y aumenta su expresión en aproximadamente el 74 % en el día 15<sup>6</sup>.

Las inmunoterapias tienen la ventaja de ser altamente específicas, ya que reducen la toxicidad producida a los tejidos normales, comparadas con las drogas quimioterápicas tradicionales<sup>4</sup>. Desde su aprobación hace 20 años, la administración intravenosa de rituximab ha revolucionado el tratamiento de las neoplasias linfoides B. Diversos ensayos clínicos han demostrado que el uso de inmunoterapias anti-CD20 no solo prolonga el tiempo de progresión de la enfermedad, sino también extiende la sobrevida global<sup>5</sup>.

Según el protocolo internacional de tratamiento ALLIC-BFM 2022, todos los pacientes pediátricos con LLA-B, independientemente de la categoría de riesgo a la que pertenezcan, reciben corticoides (prednisona/prednisolona) en la fase de inducción<sup>6</sup>. Marks y col. demostraron que la exposición *in vitro* de los blastos linfoides B a dexametasona generaba un incremento en la expresión de CD20 en 6 de 8 pacientes estudiados<sup>7</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar cómo la utilización de corticoides en la fase de inducción influye en la expresión del antígeno de superficie CD20 en pacientes con LLA-B al momento del diagnóstico (Dx) y en el día 15 (D15) de su tratamiento.

## Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio de tipo retrospectivo, observacional.

## Análisis de casos

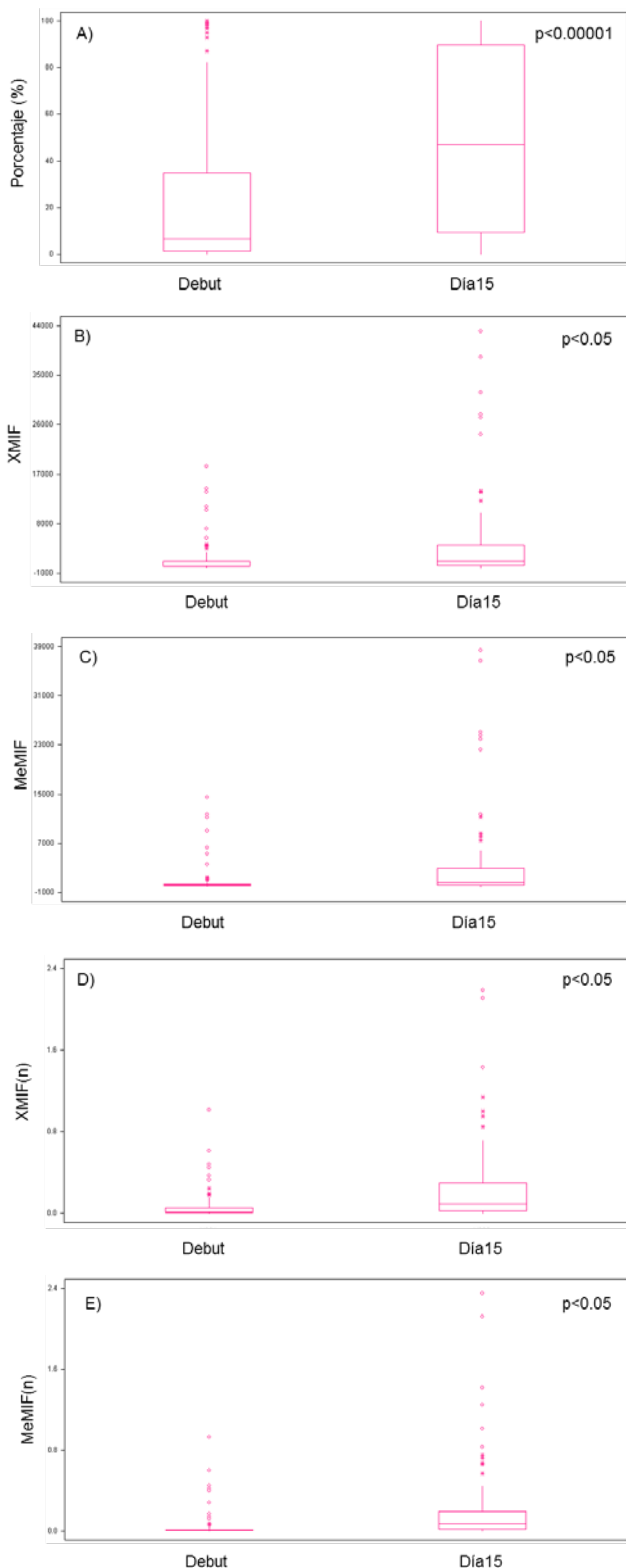
El estudio inmunofenotípico se realizó mediante la técnica de citometría de flujo multiparamétrica en médula ósea anticoagulada con EDTA de 78 pacientes pediátricos de en-

**Tabla I.** Panel de 8 colores para la inmunofenotipificación de leucemias linfoblásticas agudas B.

Leucemia linfoblástica aguda B					
Fluorocromo	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
FITC	CD81	CD58	cyIgM	nuTdT	CD15+CD65
PE	CD66c+CD123	CD73+CD304	CD33	CD13	NG2
PerCPCy5.5	CD34	CD34	CD34	CD34	CD34
PE-Cy7	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19
APC	CD10	CD10	IgM/CD117	CD22	CD123
APC-H7	CD38	CD71	Lambda	CD24	CD81
Horizon V450	CD20	CD20	Kappa		CD21
Horizon V500c	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45

► FITC, *fluorescein isothiocyanate*; PE, *phycoerythrin*; PerCPCy5.5, *peridinin-chlorophyll-protein.cyanin5.5*; PE-Cy7, *phycoerythrin-cyanin7*; APC, *Allophycocyanin*; APC-H7, *allophycocyanin H7*.

**Figura 1.** Variación en la expresión de CD20 en células patológicas al debut y D15.



► A) Porcentaje de positividad para CD20; B) Media de intensidad de fluorescencia de CD20; C) Mediana de intensidad de fluorescencia CD20; D) Media normalizada de intensidad de fluorescencia CD20; E) Mediana normalizada de intensidad de fluorescencia de CD20.

tre 0 y 19 años, (47 niños y 31 niñas) recibidos desde enero de 2017 a noviembre de 2022, tratados según pautas de ALLIC BFM/GATLA 2010.

Se utilizaron protocolos internacionales estandarizados con paneles de ocho fluorescencias (EuroFlow)<sup>8</sup>. En todos los casos, el clon utilizado para evaluar el antígeno CD20 fue L27 conjugado con fluorocromo V450 (Tabla 1). La adquisición y análisis de los resultados se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto II haciendo uso de los *softwares* FACSDi-va™ (Becton Dickinson) e Infinicyt™ (Cytognos).

Se reanalizaron los archivos del Dx y D15, se registraron los valores de expresión de CD20 en porcentaje (%), media de la intensidad de fluorescencia (xMIF) y mediana de la intensidad de fluorescencia (MeMIF) tanto en los blastos como en los linfocitos B normales (LB). Además, se calculó la relación entre MeMIF de blastos y LB y se estableció la MeMIF normalizada.

Se realizó un abordaje estadístico- descriptivo. Las comparaciones fueron realizadas utilizando t de Student para distribuciones normales y test de Mann-Whitney como método no paramétrico, estableciendo significancia estadística con  $p < 0.05$ , utilizando el programa SPSS Statistics 7.

**Resultados**

Se compararon los resultados obtenidos al reanalizar los archivos del inmunofenotipo por citometría de flujo de 78 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA-B, en tratamiento bajo las pautas de ALLIC BFM/GATLA 2010, tanto al debut como al D15 de inicio del tratamiento. El 83 % de los casos correspondía a LLA-B común, 6 %, a LLA-B pro B y 9 %, a LLA-B pre B.

De los 78 pacientes evaluados, 11 fueron excluidos del análisis debido a la ausencia de células patológicas al D15. Por otra parte, 15 de los pacientes no tuvieron expresión de CD20 al momento del Dx ni al D15.

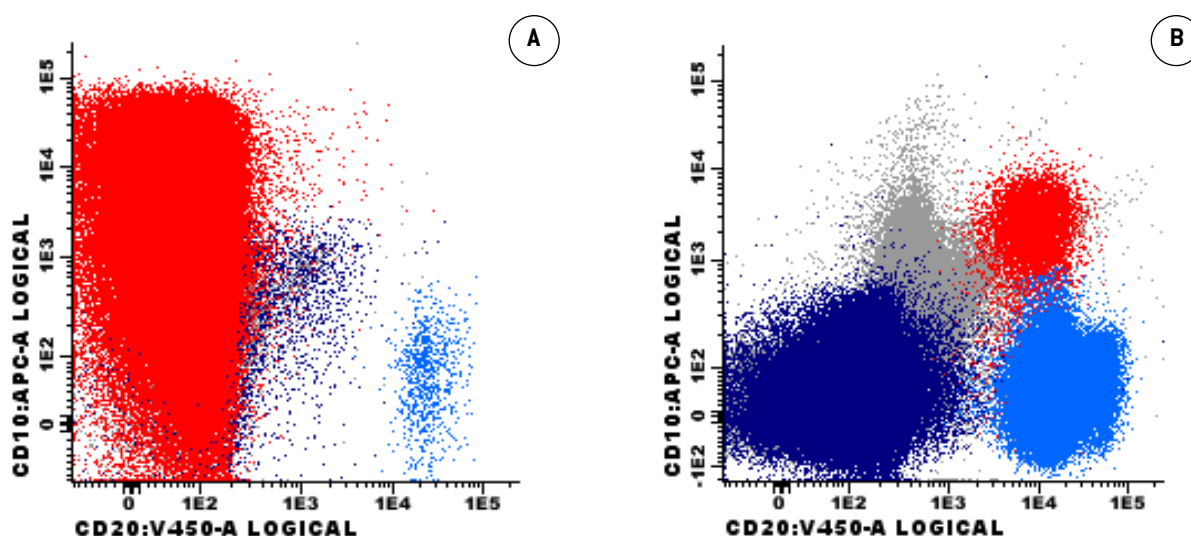
En el 75 % de los pacientes (39/52), se observó un aumento del porcentaje de expresión de CD20 en los blastos presentes en el D15 respecto del Dx, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,00001$ ) (Figura 1A).

Además, se realizó la comparación de los parámetros xMIF y MeMIF en ambos momentos de la enfermedad, así

**Tabla II.** Promedio de XMIF, MeMIF, XMIF (n) y MeMIF (n) de expresión de CD20 en las células patológicas al debut y día 15.

	XMIF	MeMIF	XMIF (n)	MeMIF (n)
Debut	1733	1040	0,07	0,06
D15	4721	3747	0,26	0,24
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

► XMIF, media de intensidad de fluorescencia; MeMIF, mediana de intensidad de fluorescencia; XMIF (n), media de intensidad de fluorescencia normalizada; MeMIF (n), mediana de intensidad de fluorescencia normalizada; D15, día 15.

**Figura 2.** Expresión de CD20 al Dx y D15 en LLA-B en blastos [rojo] y linfocitos B normales [celeste].

► A) Expresión de CD20+ al Dx: 0,2 % (IMF blastos: 83, IMF linfocitos B: 26700); B) Expresión de CD20+ D15: 98 %, (IMF blastos: 9911, IMF linfocitos B: 17071).

como también, la de sus valores normalizados, que demostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (Tabla II) (Figura 1 B-E).

Entre los pacientes que mostraron un incremento en el porcentaje de expresión de CD20 al D15, el 40% (21/52) cambió su estatus de negativo al momento del Dx (<10%) a positivo para CD20 al D15. En la figura 2, se muestra como ejemplo el cambio en el porcentaje de expresión de CD20 al Dx y al D15 de tratamiento observado en uno de los pacientes evaluados. (Figura 2 A-B).

### Discusión

En este estudio, se observó que la expresión de CD20 al D15 de tratamiento en los pacientes con LLA-B aumentó en un 75% de los casos con respecto al Dx. Esto se vio reflejado tanto en los valores de porcentaje de expresión como en la comparación de medias y medianas de intensidad de fluorescencia y en la relación normalizada de fluorescencia del CD20. No se observaron diferencias en la información obtenida al utilizar los distintos parámetros.

Además, se evidenció en la mencionada población que el 40% de los pacientes cuya expresión de CD20 al D15 se había incrementado respecto del porcentaje hallado al momento del diagnóstico modificó su estatus de negativo a positivo para CD20. Dicho cambio les permite a los pacientes convertirse en candidatos a inmunoterapia, como lo es el tratamiento con rituximab<sup>6</sup>.

Los ensayos clínicos que se han llevado a cabo durante los últimos 20 años han demostrado que el uso de rituximab no solo prolonga el tiempo de progresión de la enfermedad, sino también el de la supervivencia general del paciente

con neoplasias hematológicas de células B. Debido al éxito y eficacia de su uso, se han estado desarrollando otros anticuerpos monoclonales anti-CD20 (obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab y ocrelizumab)<sup>5</sup>.

Dworzak y col. estudiaron 306 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA-B tratados según el protocolo internacional AIEOP-BFM-ALL 2000, los cuales recibieron durante el período de inducción prednisolona oral durante los 7 días que dura dicha fase. Observaron un incremento en la expresión de CD20 al D15 respecto del Dx del 25% al 47%, respectivamente. Al evaluar la intensidad de fluorescencia de CD20 en las células patológicas, demostraron un aumento de 14 a 45 MFI posterior a la inducción<sup>9</sup>.

Por lo anteriormente descrito, es de suma importancia la evaluación de la intensidad de expresión de CD20 en las células patológicas y el reporte del porcentaje de expresión de CD20 al D15, ya que se ha demostrado que la utilización de corticoides durante el período de inducción incrementa la expresión de dicho antígeno en aproximadamente la mitad de los pacientes convirtiéndolos en candidatos para la utilización de inmunoterapia y mejorando su pronóstico.

Según el protocolo internacional de tratamiento ALLIC-BFM 2022, se considera positivo un valor de expresión de  $CD20 \geq 10\%$  en los blastos residuales en una muestra de M0 al D15 con 300000 células nucleadas/eventos adquiridos. Aquellos pacientes que presenten un valor positivo de expresión para CD20 al D15 podrían convertirse en candidatos para el uso de rituximab<sup>6</sup>.

### Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

## Referencias bibliográficas

1. Sociedad Argentina de Hematología. Guías de diagnóstico y tratamiento. Buenos Aires: SAH; 2021.
2. Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda (G.A.T.L.A.). Estudio del I-BFM-SG para el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda sin tratamiento previo. Buenos Aires. 2010.
3. Bonifant CL, Tasian SK. The future of cellular immunotherapy for childhood leukemia. *Curr Opin Pediatr* 2020;32(1):13-25. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000866
4. Boyiadzis M, Bishop MR, Abonour R, Anderson KC, Ansell SM, Avigan D, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of hematologic malignancies: multiple myeloma, lymphoma, and acute leukemia. *J Immunother Cancer*. 2016;4:90. DOI: 10.1186/s40425-016-0188-z
5. Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, et al. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv. Ther.* 2017; 34(10): 2232-73. DOI: 10.1007/s12325-017-0612-x
6. ALLIC-BFM 2022. Estudio Aleatorizado del I-BFM-SG para el Manejo y Tratamiento de Niños con Leucemia Linfoblástica Aguda no B-madura.
7. Marks DI, Kirkwood AA, Rowntree CJ, Aguiar M, Bailey KE, Beaton B, et al. Addition of four doses of rituximab to standard induction chemotherapy in adult patients with precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia (UKALL14): a phase 3, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Haematol.* 2022;9(4):e-262.75. DOI: 10.1016/S2352-3026(22)00038-2
8. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017;129(3):347-57. DOI: 10.1182/blood-2016-07-726307
9. Dworzak MN, Schumich A, Printz D, Pötschger U, Husak Z, Attarbaschi A, et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood* 2008;112(10):3982-8. DOI: 10.1182/blood-2008-06-164129



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.

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Resistencia antirretroviral primaria de HIV-1 en una institución de salud privada de Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Primary HIV-1 Antiretroviral Resistance in a Private Health Care Institution in the City of Buenos Aires, Argentina

Mecozzi, Rosario<sup>1</sup>; Garbarello, María Florencia<sup>1</sup>; Seoane, Facundo Nahuel<sup>1</sup>; Rolan, Martín Andrés<sup>1</sup>; Martinuzzo, Marta Elba<sup>1</sup>; Medina, Marina Soledad<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio Central, Departamento de Patología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

\*Contacto: Mecozzi, Rosario. Laboratorio Central, Departamento de Patología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires, (C.P.1199). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; mecozzi.rosario@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** Las mutaciones se encuentran dentro de las principales causas de falla terapéutica en la infección por HIV-1. Las que están asociadas a resistencia al tratamiento antirretroviral (TARV) pueden aparecer como consecuencia de la presión farmacológica (secundaria) o por infección con virus resistentes (primaria). La prevalencia de resistencia primaria puede clasificarse como alta, moderada o baja según el porcentaje de presencia de mutaciones asociadas a resistencia en la población en estudio. **Objetivos:** Determinar la prevalencia de resistencia antirretroviral primaria (RAVP) para HIV-1 en nuestra institución y evaluar los perfiles de resistencia y mutaciones asociadas. **Materiales y métodos:** se analizaron retrospectivamente estudios genotípicos de resistencia al TARV para HIV-1 del período 2015 - 2022 que pertenecían a pacientes *naïve*. Las mutaciones se encontraban definidas según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (2015-2017) y de la Universidad de Stanford (2018-2022). **Resultados:** Se incluyeron 368 pacientes *naïve*. La RAVP total fue de 19,8%. La tasa de RAVP (mutaciones más frecuentes): a inhibidores no nucleosídicos de la retrotranscriptasa, 15,6% (K103N); a inhibidores nucleosídicos de la retrotranscriptasa, 4,9% (M41L y M184V) y a inhibidores de proteasa, 4,1% (M46L, M46I, V82A, I54V y K43T). Un 21,9% de los pacientes presentó resistencia a más de un grupo farmacológico. **Conclusiones:** En nuestro país, la información sobre RAVP es limitada. Los niveles de RAVP registrados fueron elevados (19,8%). Los resultados obtenidos permitirían optimizar el TARV contribuyendo al desarrollo de nuevas guías clínicas.

**Palabras clave:** HIV-1, resistencia antirretroviral, pacientes *naïve*, tratamiento antirretroviral, perfiles de resistencia, mutaciones asociadas.

## Abstract

**Introduction:** HIV genome mutations are the leading cause of therapeutic failure in HIV-1 infections. Mutations associated with resistance to the antiretroviral treatment are either a consequence of an infection with resistant viruses (primary resistance) or a consequence of pharmacological pressure (secondary resistance). Primary resistance prevalence can be classified as high, moderate or low according to the percentage of patients with resistance-associated mutations. **Objective:** The aim of this investigation was to study the prevalence of HIV-1 primary antiretroviral resistance (PAR) at our institution, and to evaluate the resistance profiles and the associated mutations. **Materials and methods:** HIV-1 genotypic resistance studies in naive patients from 2015-2022 were retrospectively analyzed. Mutations were defined according to the criteria of the World Health Organization (2015-2017) and Stanford University (2018-2022). **Results:** A total of 368 naive patients were included. Total PAR was 19.8%. The PAR rate (most frequent mutations) to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors was 15.6% (K103N), that to nucleoside reverse transcriptase inhibitors was 4.9% (M41L and M184V), and that to protease inhibitors was 4.1% (M46L, M46I, V82A, I54V and K43T). Besides, 21.9% of the patients presented resistance to more than one pharmacological group. **Conclusion:** PAR information in Argentina is limited. The PAR levels recorded were high (19.8%). These results could contribute to the development of new clinical guidelines, which would make antiretroviral treatment optimization possible.

**Keywords:** HIV-1, antiretroviral resistance, naive patients, antiretroviral treatment, resistance profiles, associated mutations.

## Introducción

El HIV es el virus que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Es un retrovirus humano que pertenece al género de los lentivirus; tiene la característica de infectar y replicarse en una amplia variedad de células humanas del sistema inmunológico dentro de las que se encuentran los linfocitos T CD4+, el sistema monocito/macrófago y las microglías del sistema nervioso central. Sin embargo, es la infección del linfocito T CD4 la que produce los efectos más nocivos en la respuesta inmunológica.<sup>1</sup>

Hasta la fecha, se conocen dos tipos de HIV, de los cuales el HIV-1 es el más extendido en el mundo, mientras que el HIV-2 está más limitado a zonas de África occidental.<sup>2</sup>

Estudios epidemiológicos realizados en los últimos años en Argentina muestran que la epidemia del HIV-1 presenta un comportamiento similar al de la mayoría de los países de la región, con baja prevalencia en la población general, pero con grupos de la población altamente afectados debido a diversos factores de vulnerabilidad. Según datos del año 2018, se estima que 139 mil personas se encuentran infectadas con este virus en Argentina, de las cuales el 17% desconoce su diagnóstico. Cada año se registran 5800 casos nuevos que presentan una razón hombre/mujer de 2,1:1 y una mediana de edad de 32 años para los hombres y 33 para las mujeres.<sup>2</sup>

La terapia antirretroviral de gran actividad (HAART), definida como “la combinación de al menos tres fármacos antirretrovirales con actividad contra el HIV”, es considerada uno de los avances médicos más importantes en los últimos 12 años.<sup>3</sup>

Dentro de la HAART, existen seis grandes grupos de antirretrovirales para el tratamiento de la infección por HIV: inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa (INTR); inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa reversa (INNTR); inhibidores de proteasa (IP); inhibidores de fusión; antagonistas de CCR5 e inhibidores de integrasa.<sup>3</sup>

En los países desarrollados, se han logrado grandes progresos en el manejo de la infección por HIV con la aparición de la HAART, lo que se reflejó en una reducción notable de las tasas de morbilidad y mortalidad, y por lo tanto, en una mejor calidad de vida de los pacientes con HIV. Lamentablemente, una de las principales causas de fracaso en el tratamiento antirretroviral es la aparición de resistencias.<sup>4</sup>

El desarrollo de resistencia se asocia con mayor frecuencia al fracaso del tratamiento antirretroviral (TARV) impidiendo la supresión de la replicación viral y aumentando la mortalidad. La resistencia se considera secundaria (o adquirida) cuando la aparición de mutaciones ocurre bajo la presión de selección ejercida en el transcurso del tratamiento con drogas antirretrovirales, y primaria (o transmitida) cuando es debida a la presencia de mutaciones relevantes en un paciente que no ha sido expuesto a drogas previamente. La resistencia primaria se origina principalmente por transmisión de cepas resistentes de un paciente con resistencia secundaria a pacientes *naïve* de exposición a antirretrovirales.<sup>5</sup>

La prevalencia de resistencia antirretroviral primaria (RAVP) en una determinada población depende de numerosos factores, entre ellos, el grado de exposición a antirretrovirales de la misma familia, la prevalencia de resistencia secundaria en pacientes con conductas de riesgo y el grado de transmisión y estabilidad de las variantes resistentes.<sup>5</sup>

La estimación de frecuencia de RAVP puede variar entre estudios debido a diferencias en la población estudiada y la base de datos de mutaciones de referencia utilizada. Se considera que la prevalencia de resistencia primaria es alta cuando más del 15 % de las muestras estudiadas presentan mutaciones, moderada cuando este valor oscila entre 5-15 % y baja cuando es menor del 5 %. La realización del estudio genotípico de resistencia basal se recomienda cuando los niveles superan el 5 % en una determinada población.<sup>5</sup>

La prevalencia de resistencia antirretroviral transmitida en individuos de países de altos ingresos se encuentra en un rango de 7 % a 14 %.<sup>6</sup> En países de medianos y bajos ingresos, a medida que aumenta la cobertura de tratamiento antirretroviral, se observan incrementos de los niveles de resistencia primaria de bajos a moderados. En nuestro país, la información sobre RAVP es limitada. Considerando que dicha resistencia se asocia con fracaso del tratamiento antirretroviral, es de interés la vigilancia epidemiológica de la misma en diferentes poblaciones (y con diferentes coberturas de salud) con el fin de optimizar la elección de los esquemas de tratamiento de primera línea.<sup>5</sup>

En Estados Unidos y Europa, se llevan a cabo de forma rutinaria testeos para evaluar la RAVP, sin embargo, en la mayoría de los países de recursos limitados, esto no sucede.<sup>7</sup>

Las mutaciones genéticas del virus del HIV que generan resistencia a drogas no solo limitan severamente las opciones de tratamiento para nuevos pacientes, sino que también aceleran el fracaso del tratamiento a causa de un uso inadecuado de recursos médicos. La evaluación rutinaria de la resistencia primaria es necesaria para determinar la aparición y propagación de las mutaciones genéticas que generan resistencia.<sup>7</sup>

El objetivo de este estudio fue estimar la frecuencia de resistencia antirretroviral primaria en pacientes de nuestra institución y evaluar los perfiles de resistencia y mutaciones asociadas, con el fin de proporcionar información sobre las pautas de la terapia para el HIV-1.

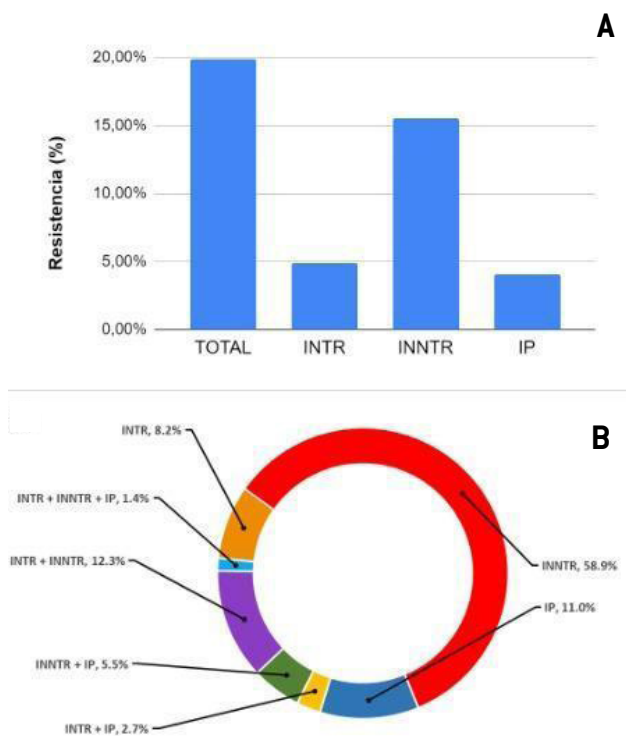
## Materiales y métodos

### Diseño del estudio

Se realizó un estudio retrospectivo, descriptivo en una institución de salud privada de CABA. Se analizaron estudios de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales para el tratamiento de HIV-1 comprendidos entre 2015 y 2022.

Los criterios de inclusión fueron ser pacientes con infección por HIV confirmada cuyo estudio genotípico de resistencia se hubiera realizado previamente a la exposición a drogas antirretrovirales (pacientes *naïve*). Los criterios de exclusión fueron ser pacientes que: hubieran recibido trata-

**Figura 1.** Prevalencia y distribución de resistencia antirretroviral primaria.



► A) Prevalencia de RAVP global e individualizada por grupo farmacológico; B) Distribución de RAVP; RAVP, resistencia antirretroviral primaria; INTR, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa; IP, inhibidores de proteasa.

miento previo; hubieran sido derivados de otras instituciones; no hubieran presentado datos suficientes para poder evaluar la administración previa de terapia antirretroviral en los registros clínicos informatizados; hubieran presentado problemas en la toma o procesamiento de la muestra.

La caracterización de la exposición o no del paciente a tratamiento previo se realizó por medio de los registros clínicos informatizados de la institución.

Este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación (CEPI) del Hospital Italiano de Buenos Aires y autorizado por la Dirección Médica de dicha institución (Protocolo CEPI N° 6667 / Plataforma de Registro Informatizado de Investigaciones en Salud de Buenos Aires (PRIISA BA) N° 9254).

#### Toma de las muestras y determinación de mutaciones asociadas a resistencia al TARV

Se recolectaron 10 ml de sangre periférica con anticoagulante EDTA al 10 %. Las muestras se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos para separar el plasma, el cual fue almacenado en freezer a -70°C hasta su procesamiento.

Para el estudio genotípico, se extrajo el ARN viral a partir de 1 ml de muestra de plasma con EDTA mediante el empleo

de MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), según las especificaciones del fabricante. El ARN extraído fue conservado a -70°C hasta la amplificación.

A partir de los ácidos nucleicos extraídos, se procedió a realizar la transcripción reversa, seguida de la primera reacción de la PCR anidada con los cebadores específicos HI Fext-1 y HI Rext-1 (diseñados por el Servicio de Biología Molecular del Laboratorio Central del HIBA) mediante una mezcla de enzimas capaces de llevar a cabo ambos procesos en una misma reacción (Qiagen® One step RT-PCR Kit, Qiagen®, Hilden, Alemania). La secuencia y localización del sitio de hibridación de los cebadores utilizados en la primera reacción es la siguiente: HI Fext-1: 5'- CCT AGR AAA AAG GGC TGT TGG AAA TGT G -3' y HI Rext-1: 5'- TCT GTT AAT TGT TTT ACA TCA TTA GTG TGG GCA -3'.

Luego, se realizó una segunda reacción de amplificación con los cebadores internos HI Fint-1 y HI Rint-1 (diseñados por el Servicio de Biología Molecular del Laboratorio Central del HIBA), cuya secuencia es la siguiente: HI Fint-1: 5'- AGA CAG GCT AAT TTT TTA GGG AAA RT -3' y HI Rint-1: 5'- TGG CTC TTG ATA AAT TTG ATA TGT CCA -3'.

El tamaño esperado del producto de PCR es de 1514 pares de bases (pb) y abarca el extremo 3' del gen gag, la región viral codificante completa de la proteasa viral y las primeras 345 pb del gen de la transcriptasa reversa.

Los productos de amplificación se visualizaron con luz ultravioleta luego de una corrida electroforética en gel de agarosa al 2,0%, y fueron purificados mediante el empleo del equipo comercial ExoSAP-IT® (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), según especificaciones del fabricante. Finalmente, los productos obtenidos tras la amplificación de ácidos nucleicos se sometieron a una secuenciación nucleotídica bidireccional mediante el empleo del secuenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) disponible en el Laboratorio de Secuenciación del Hospital Italiano de Buenos Aires.

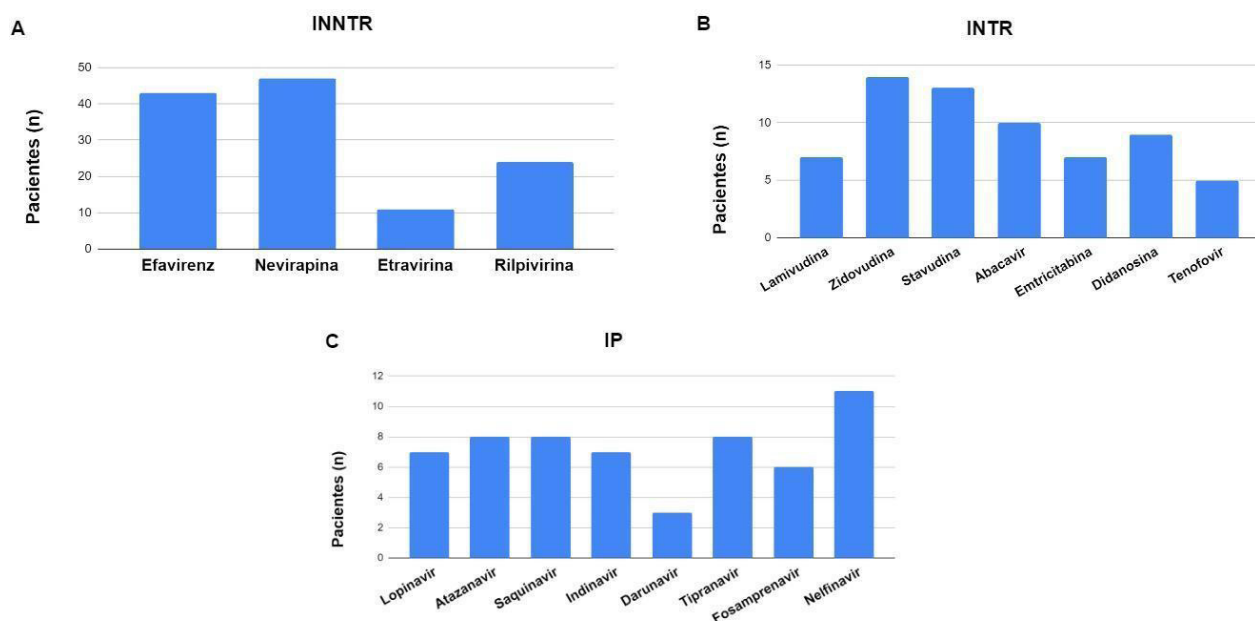
Las secuencias se analizaron utilizando el software Chromas PRO para la visualización y determinación de la calidad de las mismas. Una vez analizadas las secuencias se compararon con la base de datos de la Organización Mundial de la Salud (estudios realizados desde 2015 a 2017) o con la base de datos de la Universidad de Stanford (estudios realizados desde 2018 a 2022) para determinar si las variantes de secuencia halladas en las muestras coincidían con variantes reportadas como causantes de resistencia natural a la HAART.

Los datos de perfiles de resistencia y mutaciones asociadas se analizaron confeccionando una base de datos, utilizando Oracle Express 12 y consultando la misma mediante Oracle Developer versión 19.2.1.247.

#### Resultados

Se incluyeron 368 estudios de pacientes *naive*, de los cuales el 14,9% correspondía a mujeres (de entre 18 y 69 años

**Figura 2.** Perfil de resistencia antirretroviral primaria en pacientes: inhibidores de retrotranscriptasa e inhibidores de proteasa.



► A) Pacientes que presentan RAVP a los distintos fármacos que componen el grupo de los INNTR; B) Pacientes que presentan RAVP a los distintos fármacos que componen el grupo de los INTR; C) Pacientes que presentan RAVP a los distintos fármacos que componen el grupo de los IP, RAVP, resistencia antirretroviral primaria; INNTR, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa; INTR, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa; IP, inhibidores de proteasa.

de edad) y el 85,1 %, a hombres (de entre 16 y 73 años de edad). Del total de pacientes incluidos, 73 (19,8 %) presentaron resistencia a al menos uno de los grupos de antirretrovirales evaluados (Figura 1A). Del total de pacientes, 18 (4,9 %) presentaron resistencia a INTR, 57 (15,5 %) presentaron resistencia a INNTR y 15 (4,1 %) pacientes, a IP. No se evaluaron resistencias a los inhibidores de integrasa por no contar con estudios genotípicos que permitieran detectarlas.

De los 73 pacientes con resistencia *naive*, 21,9 % presentaron resistencia a más de un grupo farmacológico evaluado. La distribución de las resistencias obtenidas por grupo farmacológico se muestra en la Figura 1B. La distribución obtenida para INNTR se muestra en la Figura 2A. Las mutaciones más frecuentemente halladas para resistencia a INNTR fueron K103N (31,3 %), V106I (8,3 %) y E138A (4,2). La totalidad y frecuencia de las mutaciones asociadas a disminución de la sensibilidad para este grupo farmacológico se encuentran en la Figura 3A.

En cuanto a los fármacos de primera generación del grupo de los INNTR, 43 pacientes presentaron resistencia a efavirenz, de los cuales el 100 % presentó resistencia de forma conjunta con nevirapina. Todos los pacientes mostraron al menos una mutación descrita como asociada a resistencia en bloque; las más frecuentes fueron K103N, Y181C y P225H.

En relación con los fármacos de segunda generación de este grupo, se contabilizaron 11 pacientes con resistencia a etravirina, de los cuales 10 presentaron resistencia con-

junto con rilpivirina. Todos los pacientes presentaron al menos una mutación descrita como asociada a resistencia en bloque, de las cuales las más frecuentes fueron Y181C y K101E.

En aquellos pacientes que presentaron resistencia a INNTR de primera generación, el 91,5 % desarrolló resistencia en bloque, mientras que en el caso de los fármacos de segunda generación la resistencia en bloque hallada fue de un 40,0 %.

Se encontraron 9 pacientes (15,8 %) con resistencia a todos los fármacos que integran el grupo farmacológico de los INNTR. Ocho pacientes presentaron 1 única mutación que generaba resistencia en bloque a los 4 fármacos, aunque para todos ellos no fue la misma. Las mutaciones halladas en este grupo de pacientes con resistencia a multidroga fueron las 4 ya mencionadas: Y181V, L100I, K101E y Y181C. Un paciente presentó las mutaciones E138K y V179VD, las cuales, en combinación, otorgan resistencia a efavirenz, nevirapina, etravirina y rilpivirina.

La resistencia hallada para los fármacos del grupo de los INTR se muestra en la Figura 2B. Cabe resaltar que, de 18 pacientes que presentaron resistencia a INTR, solo 5 (27,8 %) de ellos presentaron resistencia a tenofovir.

Las mutaciones más frecuentes halladas para resistencia a INTR fueron M41L (20,8 %), M184V (20,8 %) y T215E (16,7 %). La totalidad y frecuencia de las mutaciones asociadas a resistencia de este grupo se encuentran en la Figura 3B. De los 18 pacientes que presentaron resistencia a INTR, 2 de

ellos mostraron resistencia a multidrogas. Uno de ellos presentó 2 mutaciones asociadas a timidina de tipo 1 (M41L y T215Y) junto con la mutación M184V y el otro paciente presentó la mutación Q151M. La frecuencia hallada para esta última mutación fue de un 0,3% en la población evaluada.

En cuanto a los fármacos de primera generación de este grupo, 14 pacientes presentaron resistencia a zidovudina, de los cuales el 92,9 % evidenció resistencia de forma conjunta con estavudina. La mayoría de los pacientes presentaron alguna mutación que genera resistencia en bloque, siendo la más prevalente la M41L, mientras que otros presentaron mutaciones que no generan resistencia en bloque. En estos casos, la disminución de la susceptibilidad a ambas drogas mencionadas estaba dada por combinación de mutaciones que, individualmente, confieren resistencia a solo una de las dos drogas.

La distribución de la resistencia hallada para cada fármaco de la familia IP se muestra en la Figura 2C, mientras que las mutaciones principales y accesorias asociadas a la resistencia se muestra en las Figuras 3C y 3D.

**Discusión**

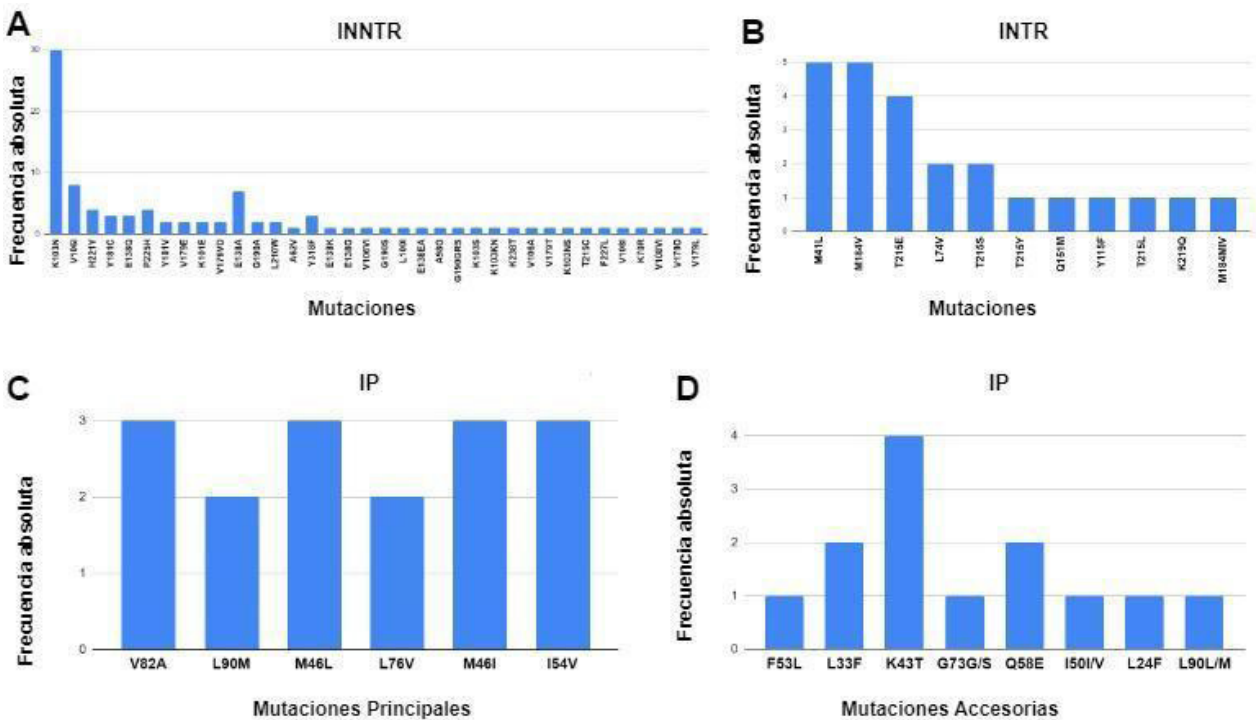
Es muy importante poder realizar un reporte epidemiológico actualizado que permita conocer los niveles de RAVP en la región, dado que posibilita evaluar pautas terapéuticas.

En el presente estudio, del total de pacientes incluidos, 19,8 % presentó resistencia primaria a alguno de los grupos farmacológicos evaluados. Según estos resultados, los niveles de resistencia primaria son considerados elevados en nuestra población, según los criterios de la OMS, lo que refuerza la conveniencia de solicitar el test de resistencia genotípico al inicio del tratamiento antirretroviral.

En la búsqueda bibliográfica realizada no se encontraron estudios regionales actualizados, con población comparable a la de este estudio, que posibiliten cotejar los niveles obtenidos de RAVP total e individual para cada uno de los grupos farmacológicos evaluados. En un estudio de Cecchini y col. realizado con datos de 91 pacientes de un centro privado de Ciudad Autónoma de Buenos Aires en el período de 2011 a 2013, se comunicó un porcentaje de RAVP de 12,1%, lo cual corresponde a un nivel de resistencia moderada, según los criterios de las OMS.<sup>5</sup>

El estudio de McClung y col., publicado por la Universidad de Oxford en el año 2021 incluyó a 747 pacientes de 28 jurisdicciones de Estados Unidos con diagnóstico reciente de HIV entre 2014 y 2018 y reveló un porcentaje de RAVP de 18,9; lo cual corresponde a un nivel de resistencia elevado.<sup>8</sup> Hace más de diez años, los estudios revelaban que la prevalencia de RAVP registrada en países desarrollados era mayor que en países en vías de desarrollo.<sup>9</sup> Sin embargo,

**Figura 3.** Frecuencia absoluta de mutaciones asociadas a la resistencia a inhibidores de retrotranscriptasa e inhibidores de proteasa.



► A) Frecuencia absoluta de mutaciones asociadas a resistencia a INNTR; B) Frecuencia absoluta de mutaciones asociadas a resistencia en INTR; C) Frecuencia absoluta de mutaciones principales asociadas a resistencia en IP; D) Frecuencia absoluta de mutaciones accesorias asociadas a resistencia en IP; INNTR, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa; INTR, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa; IP, inhibidores de proteasa.

los resultados obtenidos en este estudio revelan niveles de resistencia semejantes a los hallados en un país desarrollado. Esto podría ser explicado por el aumento en el acceso al TARV, con un consecuente incremento de los niveles de RAVP en nuestra región.

En este estudio, el grupo farmacológico que presentó mayores niveles de RAVP fue el de los INNTR, lo cual puede justificarse con base en la baja barrera genética de este grupo. El grupo farmacológico con menores niveles de resistencia primaria obtenida fue el de los IP, cuya barrera genética es más elevada que la de los INNTR y los INTR.<sup>10</sup>

A pesar de que la barrera genética para INTR e INNTR es baja, los niveles de resistencia para el primer grupo farmacológico fueron muy inferiores a los de los registrados para el segundo grupo.

En el estudio de McClung y col., el grupo farmacológico que presentó mayores niveles de resistencia antirretroviral primaria fue el de los INNTR (12,0%), mientras que los niveles de resistencia para los INTR e IP fueron inferiores (6,9% y 4,2%, respectivamente).<sup>8</sup> En un metaanálisis de Guo y col., que incluyó literatura publicada entre 2008 y 2021, el grupo farmacológico que presentó mayores niveles de RAVP también fue el de los INNTR (5,7%), mientras que los niveles de resistencia para los INTR e IP también fueron menores (3,4% y 3,3%, respectivamente).<sup>7</sup>

Las mutaciones asociadas a resistencia para INTR, especialmente aquellas que reducen el *fitness* viral (como la M184V), tienden a desaparecer gradualmente. En un estudio de cohortes realizado en el marco de la Federación Suiza de SIDA, se halló que las variantes minoritarias que poseían la mutación M184V se encontraban en un 2,5% para pacientes con infección crónica y en un 8,2% en pacientes con infección aguda y/o reciente.<sup>11</sup> El método de secuenciación por Sanger empleado en este estudio no detecta aquellas variantes presentes en menos de un 20,0% de la población viral, con lo cual, los niveles de resistencia a INTR, podrían encontrarse subestimados. Esta información se considera sumamente relevante, ya que los consensos actuales de HAART en nuestro país recomiendan el uso de dos INTR asociados a otro inhibidor de alta barrera genética, lo cual podría llevar al fracaso terapéutico, si las variantes minoritarias no son detectadas.<sup>12</sup>

En este estudio se empleó la base de datos de la OMS para la evaluación de las secuencias genotípicas entre 2015 y 2017 y la base de datos de la Universidad de Stanford para la evaluación de las secuencias genotípicas entre 2018 y 2022. Previo al empleo de la base de datos de la Universidad de Stanford, se realizó un estudio de correlación donde se compararon las dos bases de datos con el fin de evaluar las discrepancias entre ellas. El resultado de la evaluación arrojó un 98,2% de concordancia clínica con lo cual se considera que el empleo de las dos bases de datos es apto para el análisis de las secuencias genotípicas. Por otro lado, es importante mencionar que las bases de datos se actualizan constantemente, lo cual se considera una li-

mitación en estudios de tipo retrospectivo.

En este estudio, hallamos un 21,9% de pacientes que presentaron resistencia a más de un grupo, siendo la resistencia conjunta a INNTR e INTR la más prevalente.

El grupo de drogas que evidenció mayor disminución de la susceptibilidad fue el de los INNTR. Nevirapina fue la droga que mostró niveles más elevados de resistencia, mayoritariamente combinada con resistencia a efavirenz, debido a la presencia de mutaciones que confieren resistencia en grupo, siendo las más prevalente la K103N. Por otro lado, un 15,8% de los pacientes con mutaciones asociadas a resistencia a INNTR presentó disminución de la susceptibilidad a todas las drogas evaluadas de este grupo farmacológico. Es importante mencionar que la mutación K103N no fue hallada en ninguno de estos 9 pacientes, a pesar de haber sido la mutación más frecuente en pacientes de nuestra población con resistencia al grupo de los INNTR.

En el caso de los INTR, el 77,8% de los pacientes presentó resistencia a la zidovudina, la droga con mayores niveles de resistencia en este grupo farmacológico, seguida por la estavudina, la cual presentó resistencia en el 72,2% de los pacientes. Lo anterior resulta esperable teniendo en cuenta que la zidovudina fue una de las drogas más ampliamente empleadas en nuestro país en los esquemas de tratamiento de primera línea hace más de diez años.<sup>13</sup> El empleo de zidovudina induce mutaciones (como la M41L) que provocan la pérdida de susceptibilidad a otros fármacos.<sup>10</sup> Teniendo en cuenta que, en nuestra población, la mutación M41L es una de las principales mutaciones asociadas a pérdida de la susceptibilidad a INTR, resulta esperable que los niveles de resistencia para estavudina sean similares a los hallados para zidovudina.

El análisis de mutaciones mostró que siete pacientes poseían mutaciones asociadas a timidina (TAM). Cinco pacientes presentaron la mutación M41L (tipo TAM1), un paciente presentó la mutación T215Y (tipo TAM1) y uno, la mutación K70R (tipo TAM2). Por otro lado, dos pacientes presentaron mutaciones que pueden generar multiresistencia. Uno de ellos presentó la mutación K219Q y el otro, la Q151M. En este último caso, el paciente también presentaba una mutación de tipo TAM 1 con lo cual tenía susceptibilidad disminuida a todas las drogas del grupo.

La RAVP a tenofovir fue muy baja (1,4%) en la población evaluada, por lo que se destaca esta droga como alternativa dentro del grupo de los INTR. Por otro lado, resulta interesante resaltar que ninguno de los pacientes con resistencia a tenofovir presentó la mutación K65R.

En el caso de los IP, el fármaco que presentó mayores niveles de resistencia fue el nelfinavir. La disminución de la susceptibilidad a esta droga puede darse por acumulación de mutaciones o por la sola presencia de la mutación D30N, por lo que los niveles de resistencia suelen ser mayores con respecto a las otras drogas que conforman el grupo.<sup>14</sup> Sin embargo, en este estudio, ninguno de los pacientes con resistencia a nelfinavir presentó dicha mutación.

La droga con menores niveles de RAVP dentro del grupo fue darunavir, lo cual resulta lógico, ya que es el fármaco con mayor barrera genética dentro del grupo.<sup>15</sup>

En una encuesta realizada al Servicio de Infectología de nuestra institución, identificamos los fármacos analizados en este estudio, que son habitualmente empleados como terapia de primera línea, los cuales corresponden a lamivudina, tenofovir, emtricitabina y darunavir. Dentro del grupo de pacientes incluidos en este estudio, un 3,5 % presentó RAVP a alguno de estos fármacos, lo cual corresponde a un nivel de resistencia bajo. Debido a lo anterior, consideramos que las guías de práctica clínica empleadas actualmente en nuestra institución son adecuadas para los niveles de resistencia que se registraron.

Finalmente, este estudio ha permitido conocer el perfil de RAVP en pacientes *naive* en nuestra institución identificando las mutaciones más frecuentes y su probable impacto en la aparición de resistencia. Estos resultados permitirían optimizar y contribuir al desarrollo de futuras nuevas guías clínicas para el HAART en nuestro establecimiento.

### Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer ningún conflicto de interés.

### Referencias Bibliográficas

- Fanale-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(1):5–6. doi: 10.1590/s0021-25712010000100002
- Boletín sobre el VIH, sida e ITS en Argentina N° 36, 2019. Dirección de SIDA, ETS, Hepatitis y TBC. Ministerio de Salud de la Nación. [Internet]. [Consultado abr 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-sobre-el-vih-sida-e-its-en-la-argentina-ndeg-36>
- Ryom L, Boesecke C, Bracchi M, Ambrosioni J, Pozniak A, Arribas J, et al. Highlights of the 2017 European AIDS Clinical Society (EACS) Guidelines for the treatment of adult HIV-positive persons version 9.0. *HIV Med*. 2018;19(5):309–15. doi: 10.1111/hiv.12600
- Yerly S, Calmy A. Time to overcome pretreatment HIV drug resistance. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):239–40. doi: 10.1016/s1473-3099(17)30709-0
- Cecchini D, Castillo S, Vecchio C, Sandoval C, Cabral L, Rodríguez Iantorno P, et al. Primary HIV resistance in Buenos Aires metropolitan area. *Medicina (B Aires)*. 2015;75(3):163–8.
- Lodi S, Günthard HF, Gill J, Phillips AN, Dunn D, Vu Q, et al. Effectiveness of transmitted drug resistance testing before initiation of antiretroviral therapy in HIV-positive individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019;82(3):314–20. doi: 10.1097/QAI.0000000000002135
- Guo C, Wu Y, Zhang Y, Liu X, Li A, Gao M, et al. Transmitted drug resistance in antiretroviral therapy-naïve persons with acute/early/primary HIV infection: A systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol*. 2021;12:718763. doi: 10.3389/fphar.2021.718763
- McClung RP, Oster AM, Ocfemia MCB, Saduvala N, Heneine W, Johnson JA, et al. Transmitted drug resistance among human immunodeficiency virus (HIV)-1 diagnoses in the United States, 2014-2018. *Clin Infect Dis*. 2022;74(6):1055–62. doi: 10.1093/cid/ciab583
- Jordan MR, Bennett DE, Wainberg MA, Havlir D, Hammer S, Yang C, et al. Update on World Health Organization HIV drug resistance prevention and assessment strategy: 2004-2011. *Clin Infect Dis*. 2012;54 Suppl 4(suppl 4):S245-9. doi: 10.1093/cid/cis206
- Afani S Alejandro, Gallardo O Ana M. Resistencia a la terapia antirretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana. *Rev. chil. infectol*. 2011;28(5): 461-469. doi: 10.4067/S0716-10182011000600011
- Ambrosioni J, Sued O, Nicolas D, Parera M, López-Diéguez M, Romero A, et al. Trends in transmission of Drug Resistance and prevalence of non-B subtypes in patients with acute or recent HIV-1 infection in Barcelona in the last 16 years (1997-2012). *PLoS One*. 2015;10(6):e0125837. doi: 10.1371/journal.pone.0125837
- Sociedad Argentina de Infectología. Actualización 2021 del VII Consenso Argentino de Terapia Antirretroviral. [Internet]. [Consultado feb 2023]. Disponible en: <https://www.sadi.org.ar/publicaciones/item/1512-actualizacion-2021-del-vii-consenso-argentino-de-terapia-antirretroviral>.
- Bissio E. Análisis de la utilización de fármacos antirretrovirales en el ámbito público en Argentina. *Actualizaciones en SIDA*. 2011;19(72):52-64.
- Afani S A, Orellana R L, Duarte J P, Acevedo M W, Morales B O, Wolff R M, et al. Resistance to anti-retroviral therapy in Chilean patients with HIV-1 from 2002 to 2005. *Rev Med Chil*. 2007;135(10):1237–44. doi: S0034-98872007001000002
- Libre JM. Desarrollo de darunavir en todo el espectro de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018; 36:3–9. doi: 10.1016/s0213-005x(18)30391-4



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

# Determinación de los niveles de anticuerpos antifosfolipídicos en pacientes con COVID-19

*Determination of antiphospholipid antibody levels in patients with COVID-19*

Ramos, Hernan Nicole <sup>1\*</sup>; Bevan, Thomas Benjamín <sup>1</sup>; Gerván, Natalia Nora <sup>1</sup>; Pedano, Valeria Cristina <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio Bioquímico, Nuevo Hospital San Roque. Córdoba, Argentina.

\*Contacto: Ramos, Hernan Nicole, Servicio Bioquímico, Nuevo Hospital San Roque. Lima 773 (5900), Córdoba, Argentina; hernanramos79@gmail.com

## Resumen

Introducción: El síndrome es una entidad caracterizada por trombosis y abortos recurrentes, asociada a títulos altos de anticuerpos antifosfolipídicos. Estos pueden surgir de manera transitoria en pacientes con enfermedad crítica e infecciones, incluyendo la COVID-19. Objetivos: Determinar los niveles de anticuerpos antifosfolipídicos y su asociación con parámetros de laboratorio en pacientes internados con diagnóstico de COVID-19. Materiales y métodos: Se realizó en el Nuevo Hospital San Roque un estudio analítico, prospectivo, correlacional y transversal de pacientes de género masculino y femenino mayores de 18 años, internados con diagnóstico de COVID-19 entre agosto de 2021 y agosto de 2022. Los niveles de anticuerpos antifosfolipídicos se determinaron con un kit comercial. Resultados: Para IgM anticardiolipinas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes control y caso, pero sí, para IgM anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I e IgG anticardiolipinas y anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I. En cuanto al análisis de los anticuerpos antifosfolipídicos “no-criterio”, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a IgM e IgG anticardiolipinas e IgM anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I, pero no, para IgG anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I. Al analizar el comportamiento a distintos intervalos de tiempo, se observaron diferencias estadísticamente significativas para IgM anticardiolipinas e IgM anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I. Conclusiones: Los pacientes con COVID-19 presentan mayores niveles de anticuerpos antifosfolipídicos respecto de pacientes sin la afección.

**Palabras clave:** COVID-19; SARS-CoV-2; síndrome antifosfolipídico; anticuerpos antifosfolipídicos “no-criterio”.

## Abstract

Introduction: Antiphospholipid Syndrome is a condition characterized by thrombosis and recurrent abortions associated with high titers of antiphospholipid antibodies. These may arise transiently in patients with critical illness and infections, including COVID-19. Objectives: To determine the levels of antiphospholipid antibodies and their association with laboratory parameters in hospitalized patients with COVID-19 diagnosis. Materials and methods: Analytical, prospective, correlational, and cross-sectional study of male and female patients over 18 years of age, hospitalized with COVID-19 diagnosis at Nuevo Hospital San Roque (Córdoba, Argentina) between August 2021 and August 2022. Antiphospholipid antibody levels were determined with a commercial kit. Results: No statistically significant differences were observed between the control and case patients for anti-cardiolipin IgM, whereas significant differences were observed for anti- $\beta$ 2-glycoprotein-I IgM, and anti-cardiolipin and anti- $\beta$ 2-glycoprotein-I IgG. Regarding the analysis of “non-criteria” antiphospholipid antibodies, statistically significant differences were observed for anti-cardiolipin IgM and IgG, and anti- $\beta$ 2-glycoprotein-I IgM, but not for anti- $\beta$ 2-glycoprotein-I IgG. When analyzing the behavior at different time intervals, statistically significant differences were observed for anti-cardiolipin and anti- $\beta$ 2-glycoprotein-I IgM. Conclusions: Patients with COVID-19 have higher levels of antiphospholipid antibodies than patients without the condition.

**Key words:** COVID-19; SARS-CoV-2; Antiphospholipid syndrome; “Non-criteria” antiphospholipid antibodies.

## Introducción

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida, que es el resultado de la interacción entre factores ambientales, hormonales y genéticos. Actualmente, el SAF se define como la entidad clínica que se asocia con la presencia de eventos tromboticos (arteriales y/o venosos), abortos recurrentes, *livedo reticularis*, trombocitopenia, anemia hemolítica y alteraciones neurológicas con títulos altos de anticuerpos antifosfolípidicos (aFL) circulantes<sup>1</sup>.

Los aFL son una familia heterogénea de inmunoglobulinas que reconocen diferentes factores o componentes proteicos (por ejemplo, aneXina V, protrombina, proteína C, proteína S, entre otros). De acuerdo con los nuevos criterios de clasificación desarrollados por el Colegio Americano de Reumatología junto con la Alianza Europea de Asociaciones de Reumatología en el año 2023, la clasificación de SAF requiere una puntuación mínima de 3 respecto de dominios clínicos (macrovascular venoso, macrovascular arterial, microvascular, obstétrico, cardíaco y hematológico) junto con una puntuación mínima de 3 respecto de dominios de laboratorio. Estos últimos incluyen la presencia de anticoagulante lúpico (AL) positivo y/o la presencia de títulos moderados (40 a 79 unidades) a altos (>80 unidades) de anticuerpos IgM/IgG anticardiolipinas (aCL) y/o anticuerpos IgM/IgG anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I (a $\beta$ 2GPI), en dos o más ocasiones, luego de 12 semanas entre cada determinación<sup>1,2</sup>. Al día de hoy, en la práctica clínica, existe una proporción de pacientes con manifestaciones clínicas típicas, altamente sugestivas de SAF, pero que permanecen persistentemente negativos para aFL, incluidos en los criterios actuales.

Estos pacientes han sido denominados SAF seronegativos (SAFSN)<sup>3,4</sup>.

Los pacientes SAFSN, al igual que aquellos pacientes clásicos, presentan un mayor riesgo de eventos tromboticos y de complicaciones obstétricas. Estos eventos pueden ocurrir durante el curso natural de la enfermedad y, en casos raros, pueden resultar en un estado trombotico que conduce a una disfunción multiorgánica conocida como *síndrome antifosfolípido catastrófico* (SAFC). La identificación de estos pacientes, manteniendo un seguimiento regular y proporcionando medicación terapéutica o preventiva, sigue siendo un desafío<sup>5</sup>.

La identificación, detección y la comprensión de los mecanismos del SAF han evolucionado con el desarrollo de ensayos que permiten la detección de aFL "no-criterio". Dentro de estos, se incluyen los anticuerpos IgM/IgG antifosfatidilserina (aFS), anticuerpos IgM/IgG antifosfatidilinositol (aFI) y anticuerpos IgM/IgG anti-ácido fosfatídico (aAF), entre otros<sup>5</sup>.

El SAF puede manifestarse de manera aislada, sin ninguna otra condición asociada (SAF primario) o en el contexto de otra enfermedad de base, particularmente autoinmune, siendo la principal asociación con lupus eritematoso sistémico (LES) (SAF secundario). Las diferencias entre SAF primario y secundario fueron consideradas en diversos reportes e involucran características clínicas y de laboratorio, y aspectos genéticos e histológicos. A pesar de que las principales manifestaciones clínicas y las características biológicas son similares en ambos tipos, corresponden a dos entidades diferentes con características específicas para cada uno<sup>6,7</sup>.

**Tabla I.** Resultados de IgM/IgG aCL e IgM/IgG a $\beta$ 2GPI según tipo de paciente.

Variable	Categorías	Control		Caso	
		N	%	N	%
IgM aCL	Negativo (<10 MPL-U/mL)	21	100%	46	96%
	Positivo ( $\geq$ 10 MPL-U/mL)	0	0%	2	4%
IgG aCL	Negativo (<10 GPL-U/mL)	21	100%	43	90%
	Positivo ( $\geq$ 10 GPL-U/mL)	0	0%	5	10%
IgM a $\beta$ 2GPI	Negativo (<5 U/mL)	21	100%	33	69%
	Borderline (5-8 U/mL)	0	0%	12	25%
	Positivo (>8 U/mL)	0	0%	3	6%
IgG a $\beta$ 2GPI	Negativo (<5 U/mL)	20	95%	41	85%
	Borderline (5-8 U/mL)	1	5%	5	10%
	Positivo (>8 U/mL)	0	0%	2	5%

► a $\beta$ 2GPI: anticuerpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína I; aCL: anticuerpos anticardiolipinas; GPL: fosfolípidos IgG; IgG: inmunoglobulina G; IgM: inmunoglobulina M; MPL: fosfolípidos IgM.

En años recientes, los aFL y su cuadro clínico asociado han sido reconocidos gradualmente en diversas enfermedades autoinmunes y no autoinmunes. El vínculo entre los aFL y las trombosis venosas y/o arteriales recurrentes se ha analizado en numerosos estudios retrospectivos y prospectivos y, al parecer, tienen una función importante y directa en la patogénesis del estado trombofílico en el mencionado síndrome<sup>8</sup>. Estos anticuerpos pueden surgir de manera transitoria en pacientes con enfermedad crítica y en diversas infecciones. Su presencia de rara vez conduce a eventos que son difíciles de diferenciar de otras causas de trombosis multifocal en pacientes críticos, como la coagulación intravascular diseminada (CID), la trombocitopenia inducida por heparina y la microangiopatía trombótica<sup>9</sup>. Está bien documentado que diversos virus pueden gatillar una respuesta autoinmune, fenómeno que incluye tanto la producción de autoanticuerpos como el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Entre ellos, la infección por el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo (SARS-CoV-2) podría actuar de manera similar, dada la tendencia de los pacientes con COVID-19 a desarrollar diversos tipos de autoanticuerpos<sup>10</sup>. Los pacientes con COVID-19 presentan alteraciones en diversos parámetros de coagulación, que se correlacionan con la severidad de la enfermedad. Las primeras descripciones de la coagulopatía de esta enfermedad la identificaban como una CID. Sin embargo, la mayoría de los pacientes presentan niveles normales de factores de coagulación, fibrinógeno, y plaquetas, lo que sugiere que la COVID-19 induce un estado protrombótico único que difiere de las descripciones tradicionales de una coagulopatía inducida por sepsis<sup>11</sup>. Actualmente, hay un incremento en el reporte de aFL en pacientes con COVID-19 y su posible asociación con las manifestaciones trombóticas (arteriales y/o venosas)<sup>12</sup>. La correlación entre los aFL y los eventos trombóticos en pacientes con coronavirus es con-

trovertida, lo que indica una clara necesidad de caracterizar la relevancia clínica de estos anticuerpos y la asociación a una respuesta autoinmune ligada a la generación de estos.

El objetivo general del estudio fue determinar los niveles de aFL y su asociación con parámetros de laboratorio en pacientes con COVID-19 internados en el Nuevo Hospital San Roque en el período comprendido entre agosto de 2021 y agosto de 2022; y los objetivos específicos: describir los parámetros de laboratorio de rutina en pacientes con COVID-19 y analizar la relación entre los niveles de aFL y parámetros de laboratorio de rutina.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio analítico, prospectivo, correlacional y de corte transversal en el Servicio Bioquímico del Nuevo Hospital San Roque de la ciudad de Córdoba.

## Universo

Pacientes internados con diagnóstico de COVID-19 confirmado por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o test rápido de antígeno SARS-CoV-2.

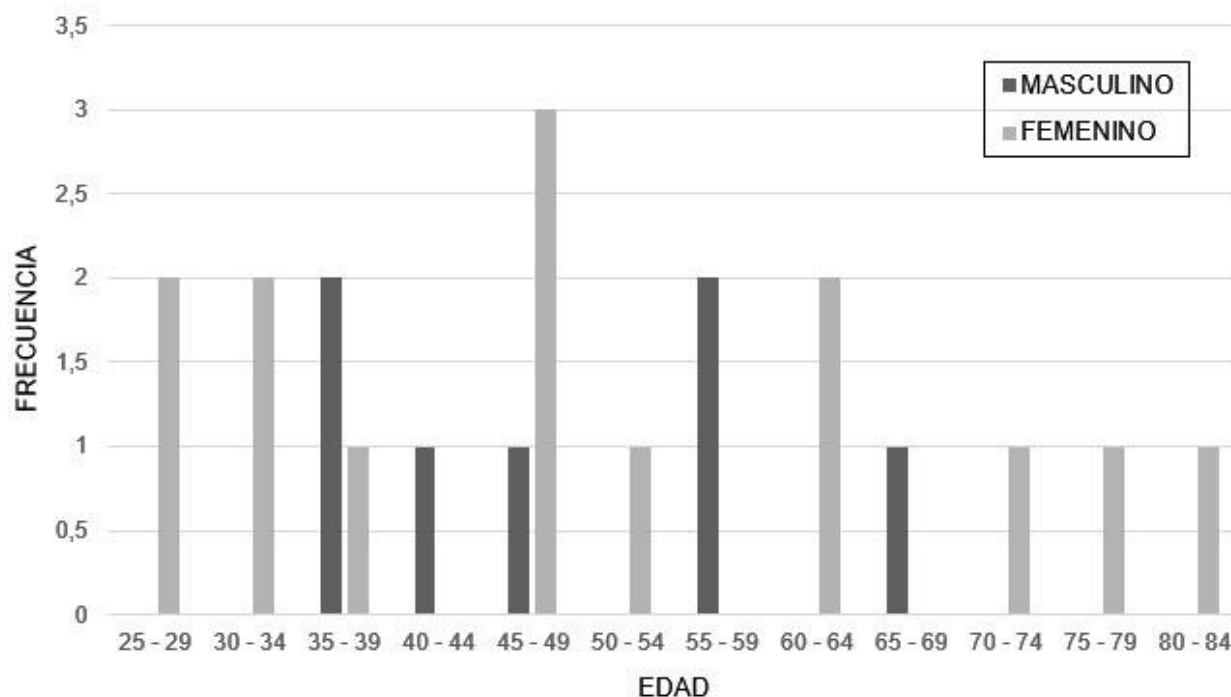
## Muestra

Se estudiaron pacientes con diagnóstico de COVID-19, hospitalizados en el período comprendido entre agosto de 2021 y agosto de 2022 en el Nuevo Hospital San Roque. Se recolectaron 2 muestras de suero por paciente en distintos intervalos de tiempo: día 0-1 y entre el día 5-7 de internación, obtenidas por venopunción y conservadas a -20 C° hasta el momento de su utilización. Se incluyeron pacientes sin diagnóstico de COVID-19, hospitalizados en el nosocomio durante el mismo período y seleccionados como población normal, de los cuales se recolectó 1 muestra de suero al día 0-1 de internación bajo las mismas condiciones.

**Tabla II.** Valores de IgM/IgG aCL e IgM/IgG a $\beta$ 2GPI de 9 pacientes caso positivos.

Pacientes caso	IgM aCL (MPL-U/mL)	IgG aCL (GPL-U/mL)	IgM a $\beta$ 2GPI (U/mL)	IgG a $\beta$ 2GPI (U/mL)
1	11	7	12	5
2	2	3	2	15
3	1	14	2	24
4	3	11	2	4
5	2	13	3	3
6	4	14	5	2
7	3	11	4	3
8	11	3	11	2
9	9	4	12	4

► a $\beta$ 2GPI: anticuerpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína I; aCL: anticuerpos anticardiolipinas; GPL: fosfolípidos IgG; IgG: inmunoglobulina G; IgM: inmunoglobulina M; MPL: fosfolípidos IgM.

**Figura 1.** Distribución por edad y género para pacientes “control”.**Criterios de inclusión**

Pacientes de género masculino y femenino, mayores de 18 años, internados en Sala Común (SC) y Unidad de Terapia Intensiva (UTI) en el Nuevo Hospital San Roque, con diagnóstico de COVID-19 confirmado por PCR o test rápido de antígeno SARS-CoV-2, que firmaron el formulario de consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética.

**Criterios de exclusión**

Pacientes con enfermedad autoinmune de base, sin COVID-19 y menores de 18 años.

**Variables**

Edad, género, concentración de aFL, recuento de leucocitos, plaquetas, y medición de tiempo de protrombina (APP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (KPTT).

**Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

El estudio se llevó a cabo en el Servicio Bioquímico, Sección Inmunología del Nuevo Hospital San Roque de la ciudad de Córdoba. Del total de pacientes que ingresaron al nosocomio, se seleccionaron aquellos que cumplían con los criterios de inclusión propuestos.

Para la recolección de datos de los pacientes se utilizaron los programas THARSIS-IT® y Nobilis Wiener Lab®. Se recabó información de resultados de parámetros de laboratorio de interés asociados a la infección por SARS-CoV-2 y, en cuanto a datos sociodemográficos, solo se recabaron edad y sexo biológico. Una vez obtenida toda la información, la misma se registró en una planilla de Microsoft Excel versión 365. Posteriormente, los datos se procesaron en tablas y se realizaron los gráficos pertinentes empleando el programa estadístico InfoStat®.

saron en tablas y se realizaron los gráficos pertinentes empleando el programa estadístico InfoStat®.

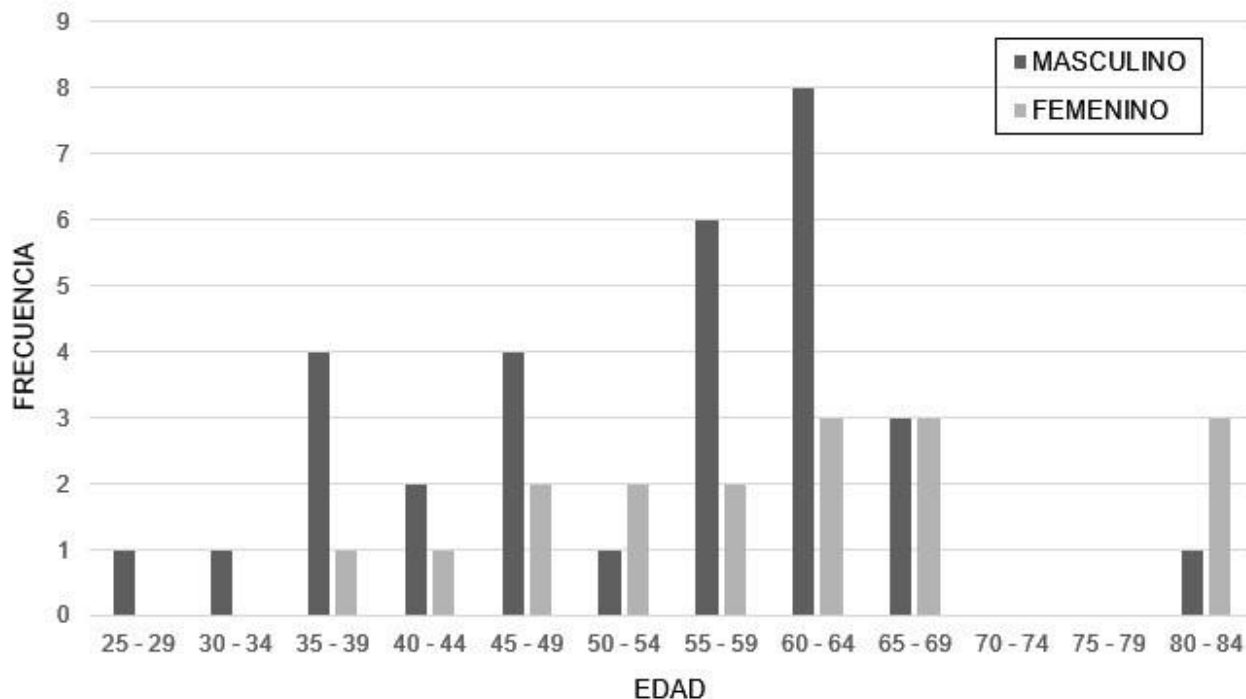
**Plan de análisis de datos**

Los datos cualitativos se describieron utilizando frecuencias absolutas (n) y relativas (%).

Para la asociación entre las variables, se realizaron test de Chi cuadrado. Para las variables cuantitativas, se analizó la distribución de las mismas mediante pruebas de Shapiro - Wilk y prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov. Se utilizaron como medidas descriptivas media y desvío estándar. Para comparar entre grupos, se utilizaron test de Wilcoxon.

Para analizar asociaciones entre variables cuantitativas, se realizaron test de correlación de Spearman. Se utilizaron gráficos de dispersión y gráficos *box-plot* para las variables cuantitativas. En los gráficos de dispersión, se incluyeron los resultados de rho de Spearman y p-valor para la correlación graficada. En los gráficos *de box-plot*, el borde superior de la caja representa el tercer cuartil (percentil 0,75), y el borde inferior, el primer cuartil (percentil 0,25); la línea dentro de la caja es la mediana y el punto dentro de la caja representa la media. Los bigotes representan los percentiles 0,05 y 0,95. Los valores considerados como extremos se muestran como puntos por fuera de los extremos de los bigotes.

Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05. En los gráficos de *box-plot*, estas diferencias se presentaron con asteriscos (en caso de que hubiese diferencias entre dos grupos). Se utilizó Excel e InfoStat como *softwares* estadísticos para la carga y el análisis de los datos.

**Figura 2.** Distribución por edad y género para pacientes “caso”.

#### Procedimientos del estudio

Se obtuvieron por venopunción muestras de 5 mL de sangre, en tubos BD Vacutainer®, a las que se dejó coagular a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 3500 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos. En el suero obtenido, se determinaron los aFL por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Se realizó la determinación de los aFL (IgG/IgM aCL, IgG/IgM aβ2GPI, IgG/IgM aFS, IgG/IgM aFI, IgG/IgM aAF) con un kit comercial (Orgentec®), basado en antígenos adsorbidos en la superficie de los pocillos de una microplaca. Se incubaron las muestras diluidas (dilución 1/100) de los pacientes, el control Positivo (+), el control Negativo (-) y los calibradores en los pocillos correspondientes. A continuación, se incubaron con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añadió el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que, al ser degradado por la peroxidasa, dio lugar a un producto de color azul. Luego, la reacción enzimática se detuvo con una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y la formación de producto amarillo se midió a 450nm en un lector de ELISA (Mindray MR-96A – Bioars®). La concentración de anticuerpos en la muestra fue proporcional a la absorbancia del producto de la reacción.

Los resultados de laboratorio de rutina que acompañan este trabajo se obtuvieron de las áreas de Hematología y Hemostasia de nuestra institución. Para el recuento de leucocitos, se utilizó el contador hematológico Sysmex® XN-1000 y, en el caso de las pruebas de coagulación, se utilizó el analizador STA Compact Max de STAGO®.

#### Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por la Comisión de Investigación de Capacitación y Docencia del Nuevo Hospital San Roque. El mismo cuenta con un procedimiento de consentimiento informado, aprobado por el CIEIS “Comité Institucional de Ética de la Investigación del Niño y el Adulto, Polo Hospitalario”.

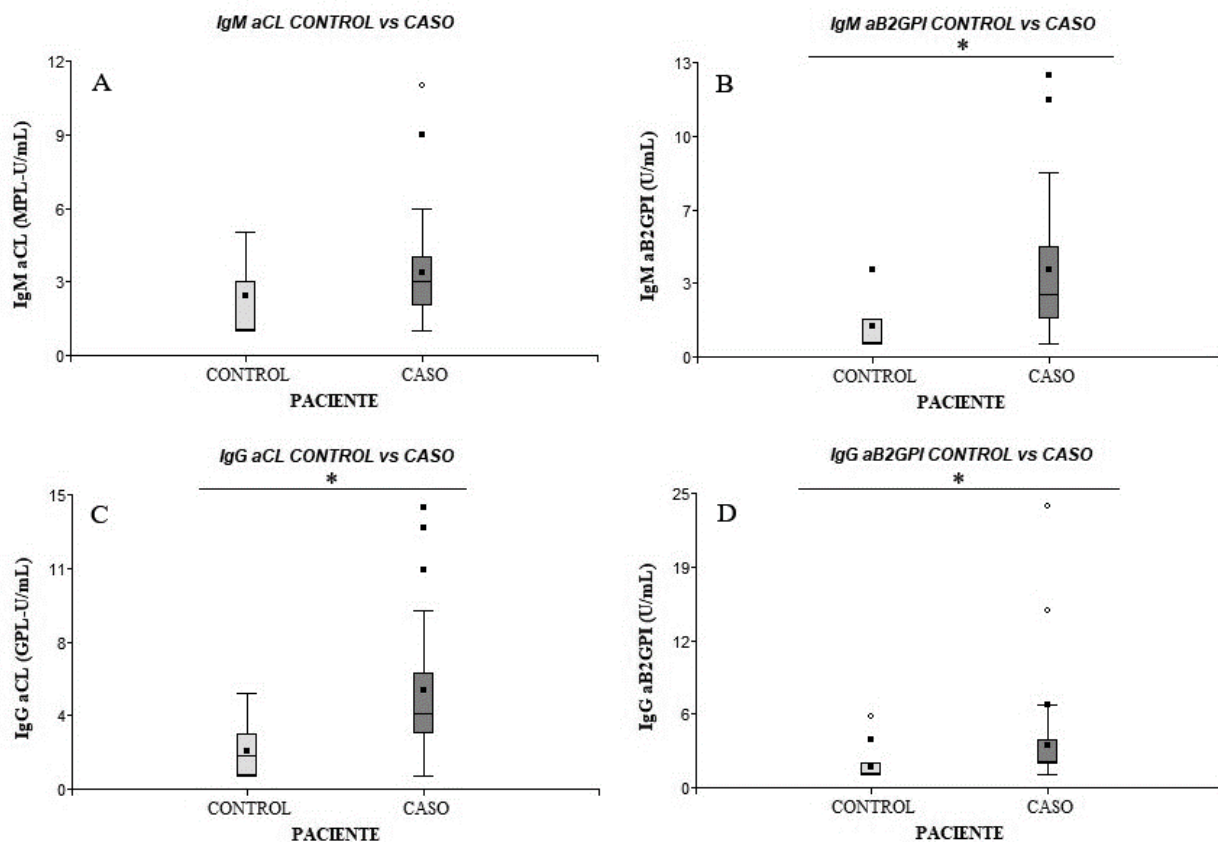
#### Recursos materiales

Kit comercial Orgentec® para la determinación de IgM/IgG aCL, IgM/IgG aβ2GPI, IgM/IgG aFS, IgM/IgG aFI, e IgM/IgG aAF, provisto por el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba; lector de ELISA Mindray MR-96A – Bioars®, provisto por el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba; contador hematológico Sysmex® XN-1000, provisto por el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba; coagulómetro STA Compact Max de STAGO®, provisto por el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba y computadora portátil, propiedad del investigador.

#### Resultados

##### Comparación de los niveles de aFL entre pacientes con COVID-19 y pacientes control

Se analizaron los datos de 48 pacientes internados con diagnóstico de COVID-19 (pacientes caso) y de 21 pacientes considerados como controles sanos (pacientes control). La edad media y desviación estándar de los pacientes caso y control fue de 55,75 ± 13,37 y 49,62 ± 16,36 años, respectivamente. En las Figuras 1 y 2, se puede observar la distribución por edad y género para los pacientes caso

**Figura 3.** Diagrama de cajas según valores observados para pacientes caso y control .

► A) IgM aCL; B) IgM a $\beta$ 2GPI; C) IgG aCL; D) IgG a $\beta$ 2GPI; a $\beta$ 2GPI: anticuerpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I; aCL: anticuerpos anticardiolipinas; GPL: fosfolípidos IgG; IgG: inmunoglobulina G; IgM: inmunoglobulina M; MPL: fosfolípidos IgM.

y control, respectivamente. En los pacientes control, se midieron los niveles de IgM e IgG tanto para aCL como para a $\beta$ 2GPI y se compararon con los valores obtenidos de los pacientes caso. En la Figura 3, se pueden observar los resultados de estas comparaciones.

Para IgM aCL (Figura 3A), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, a pesar de que los pacientes caso tuvieron un promedio de concentración más elevado que los controles ( $3,35 \pm 2,25$  MPL-U/mL y  $2,43 \pm 1,16$  MPL-U/mL, respectivamente) (p-valor: 0,1335).

IgM a $\beta$ 2GPI e IgG (tanto aCL como a $\beta$ 2GPI) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes casos y controles (Figuras 3B, 3C y 3D) (p-valor < 0,0001 para las tres comparaciones). IgM a $\beta$ 2GPI, en pacientes control, tuvo una concentración promedio de  $1,71 \pm 0,90$  U/mL, mientras que, en los pacientes caso, el promedio fue de  $4,00 \pm 2,57$  U/mL (con valores máximos de 4 U/mL y 12 U/mL, respectivamente).

Al medir IgG aCL, en pacientes control, el promedio observado fue de  $2,19 \pm 1,25$  GPL-U/mL (máximo = 5 GPL-U/mL) y, en los pacientes caso, el promedio fue de  $5,17 \pm 3,26$  GPL-U/mL (máximo = 14 GPL-U/mL). En IgG a $\beta$ 2GPI, los pro-

medios fueron de  $1,62 \pm 1,24$  U/mL (máximo = 6 U/mL) y de  $3,50 \pm 3,75$  U/mL (máximo = 24 U/mL) para pacientes control y pacientes caso, respectivamente.

De acuerdo con los puntos de corte determinados por el fabricante, de cada uno de los kits de detección, se clasificaron los valores observados para las cuatro variables analizadas en positivo, negativo o valores *borderline*, y se observó cuáles fueron los resultados para pacientes control y pacientes caso (Tabla I). Del total de 48 pacientes caso, solo 9 (18,8%) arrojaron resultados positivos, con una tasa de simple positivo de 66,7% (6 pacientes) y una tasa de doble positivo de 33,3% (3 pacientes). Sin embargo, ninguno de ellos superó los valores diagnósticos ( $\geq 40$  títulos) tanto para IgM/IgG aCL como para IgM/IgG a $\beta$ 2GPI. En la Tabla II, se puede observar el valor de los resultados de los 9 pacientes caso positivos. En los pacientes control, los resultados para los cuatro parámetros fueron en el 100% de los casos negativos (excepto para IgG a $\beta$ 2GPI, en donde se observó un paciente con resultado *borderline*). En los pacientes caso, para IgM aCL, se detectó un 4% de pacientes positivos; en IgG aCL, un 10% de positivos; en IgM a $\beta$ 2GPI, un 6% de positivos y un 25% *borderline*, y en IgG a $\beta$ 2GPI, un 4% de positivos y un 10% de resultados *borderline*. Las diferencias solo

**Tabla III.** Valores promedio de IgM/IgG aCL e IgM/IgG a $\beta$ 2GPI según el tiempo de medición en los pacientes.

Variable	Media	D.E	Min	Máx	p-valor
IgM aCL (0 – 1) (MPL-U/mL)	3,31	2,04	1	11	0,0156
IgM aCL (5 – 7) (MPL-U/mL)	4,43	3,12	2	16	
IgG aCL (0 – 1) (GPL-U/mL)	5,51	3,55	1	14	0,7252
IgG aCL (5 – 7) (GPL-U/mL)	4,77	2,57	2	13	
IgM a $\beta$ 2GPI (0 – 1) (U/mL)	3,94	2,35	2	12	0,0150
IgM a $\beta$ 2GPI (5 – 7) (U/mL)	3,26	2,98	1	17	
IgG a $\beta$ 2GPI (0 – 1) (U/mL)	3,74	4,30	1	24	0,0556
IgG a $\beta$ 2GPI (5 – 7) (U/mL)	3,91	7,68	1	39	

► a $\beta$ 2GPI: anticuerpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína; aCL: anticuerpos anticardiolipinas; D.E.: desviación estándar; GPL: fosfolípidos IgG; IgG: inmunoglobulina G; IgM: inmunoglobulina M; Min: valor mínimo; Máx: valor máximo; MPL: fosfolípidos IgM.

fueron estadísticamente significativas para IgM a $\beta$ 2GPI; los restantes tres parámetros no tuvieron asociaciones significativas entre el tipo de paciente y el resultado categorizado observado.

#### Relación entre los niveles de aFL y parámetros de laboratorio de rutina

Se analizó la correlación entre los aFL y los valores de hemostasia -hematología. En la Figura 4 se pueden observar las correlaciones entre los valores de IgM aCL y las cinco variables de hemostasia - hematología. Las asociaciones entre todos los parámetros fueron no significativas, y los datos tuvieron una alta dispersión que no permitió detectar una relación entre las distintas duplas analizadas.

Al igual que con las correlaciones anteriores, las asociaciones entre IgG aCL y las variables de hemostasia - hematología (Figura 5) tampoco fueron estadísticamente significativas, y se observó una gran dispersión de datos. Estos patrones se repitieron para IgM a $\beta$ 2GPI (Figura 6) e IgG a $\beta$ 2GPI (Figura 7).

#### Relación entre aFL convencionales y aFL “no-criterio”

Para establecer la asociación entre los aFL incluidos dentro de los criterios de clasificación actuales y los aFL “no-criterio” se analizaron los datos de 40 de los 48 pacientes internados con COVID-19 y se compararon los valores de IgM/IgG aCL e IgM/IgG a $\beta$ 2GPI con cada uno de los valores obtenidos para IgM/IgG aAF, IgM/IgG aFS e IgM/IgG aFI. En la Figura 8, se pueden observar los resultados de estas comparaciones. De acuerdo con los puntos de corte determinados por el fabricante, solo 1 paciente presentó valores de IgM aAF por encima del corte (11 MPL-U/mL), 2 presentaron valores de IgM aFI por encima del corte (11 MPL-U/mL y 12 MPL-U/mL, respectivamente) y 2, valores de IgG aFI por encima del corte (10 GPL-U/mL y 58 GPL-U/mL, respectivamente). El resto de los pacientes presentó valores por debajo del corte.

Para IgM e IgG aCL, las diferencias fueron estadística-

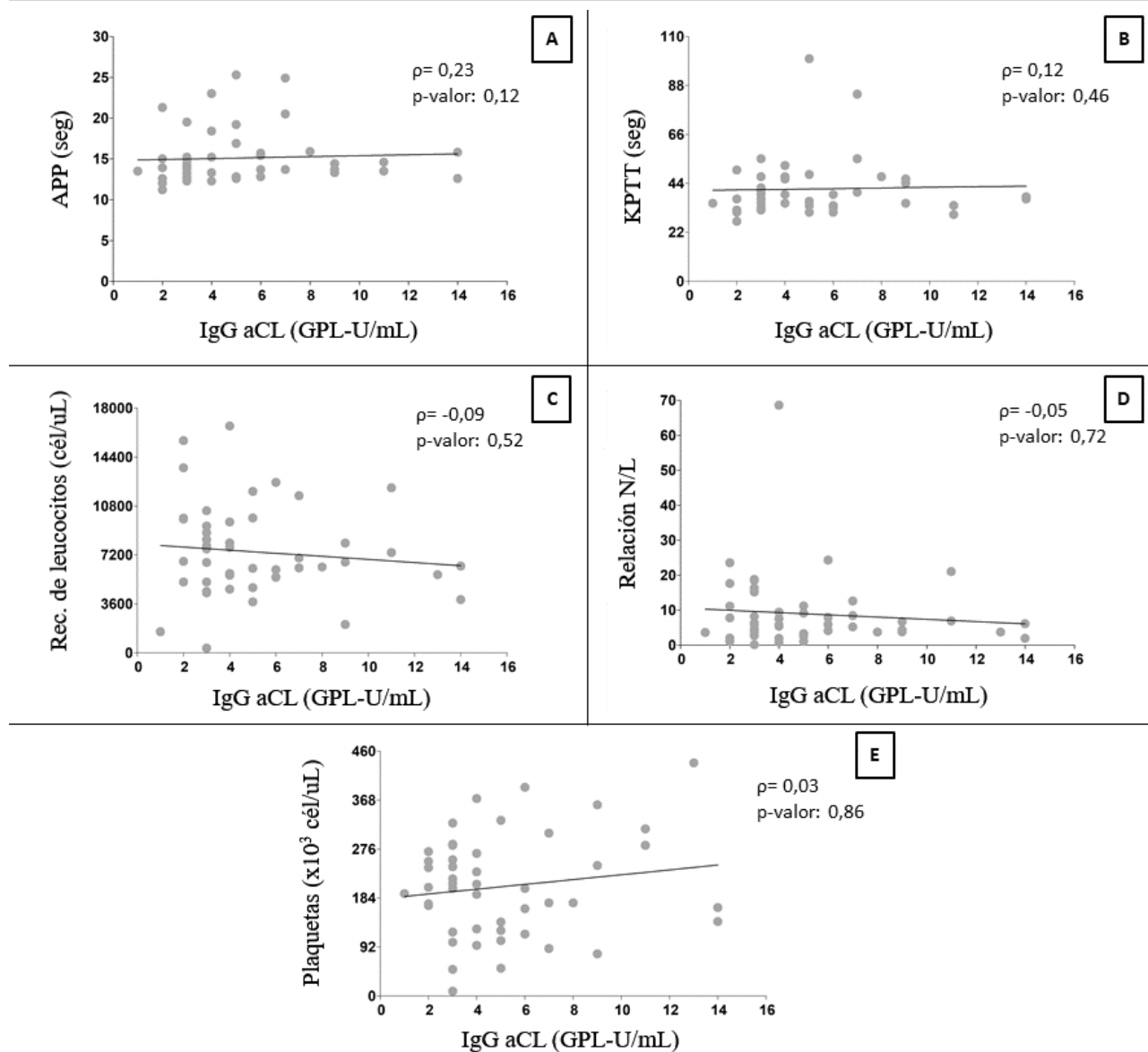
mente significativas con respecto a IgM aAF (Figura 8A) (p-valor: 0,0002); IgG aAF (Figura 8B) (p-valor < 0,0001); IgM aFS (Figura 8C) (p-valor: 0,0001); IgG aFS (Figura 8D) (p-valor: 0,0001); IgM aFI (Figura 8E) (p-valor: 0,015) e IgG aFI (Figura 8F) (p-valor < 0,0001), con un promedio más elevado que los aFL “no-criterio” (3,58  $\pm$  2,40 MPL-U/mL y 5,73  $\pm$  3,28 GPL-U/mL vs. 2,18  $\pm$  1,89 MPL-U/mL y 2,88  $\pm$  2,02 GPL-U/mL; 2,08  $\pm$  1,72 MPL-U/mL y 3,33  $\pm$  1,85 GPL-U/mL, y 2,53  $\pm$  2,57 MPL-U/mL y 4,45  $\pm$  8,96 GPL-U/mL, respectivamente).

En cuanto a IgM a $\beta$ 2GPI, las diferencias también fueron estadísticamente significativas con respecto a IgM aAF, IgM aFS, e IgM aFI (Figuras 8G-I) (p-valor < 0,0001 para todos los casos). Los valores promedio (4,18  $\pm$  2,76 U/mL) también fueron mayores en comparación con los aFL “no-criterio”. Por otro lado, al medir IgG a $\beta$ 2GPI, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a IgG aAF (Figura 8J) (p-valor: 0,2326), IgG aFS (Figura 8K) (p-valor: 0,6519) e IgG aFI (Figura 8L) (p-valor: 0,4673).

#### Comportamiento de los aFL a distintos intervalos de tiempo

Se compararon los valores de los parámetros de inmunoglobulinas en 35 pacientes, a quienes se les pudo realizar el seguimiento, para analizar cómo evolucionaron los valores de laboratorio. En la Tabla II, se pueden observar los valores promedio y valores de dispersión asociados a cada uno en los distintos tiempos. Los valores de IgM aCL presentaron diferencias estadísticamente significativas (p-valor: 0,0156). Se observó una media de 3,31  $\pm$  2,04 MPL-U/mL en la primera medición, y ese valor promedio aumentó a 4,43  $\pm$  3,12 MPL-U/mL en la segunda medición. Por el contrario, en los valores de IgM a $\beta$ 2GPI, se observó un descenso estadísticamente significativo en el promedio al comparar las dos mediciones: de 3,94  $\pm$  2,35 U/mL, los pacientes pasaron a un promedio de 3,26  $\pm$  2,98 U/mL en la segunda medición (p-valor: 0,0150).

Para los valores de IgG aCL, también se observó un des-

**Figura 4.** Correlaciones de anticuerpos IgM anticardiolipinas .

► Correlación de IgM aCL con: A) APP; B) KPTT; C) Recuento de leucocitos; D) Relación N/L; y E) Recuento de plaquetas; aCL, anticuerpos anticardiolipinas; APP, tiempo de Protrombina; GPL, fosfolípidos IgG; IgG, inmunoglobulina G; IgM, inmunoglobulina M; KPTT, tiempo de tromboplastina parcial activada; MPL, fosfolípidos IgM; N/L, neutrófilo/linfocito.

censo en el valor promedio ( $5,51 \pm 3,55$  GPL-U/mL y  $4,77 \pm 2,57$  GPL-U/mL respectivamente), mientras que los valores de IgG  $\alpha\beta$ 2GPI aumentaron en la segunda medición [de  $3,74 \pm 4,30$  U/mL a  $3,91 \pm 7,68$  U/mL, respectivamente]. En estos casos, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

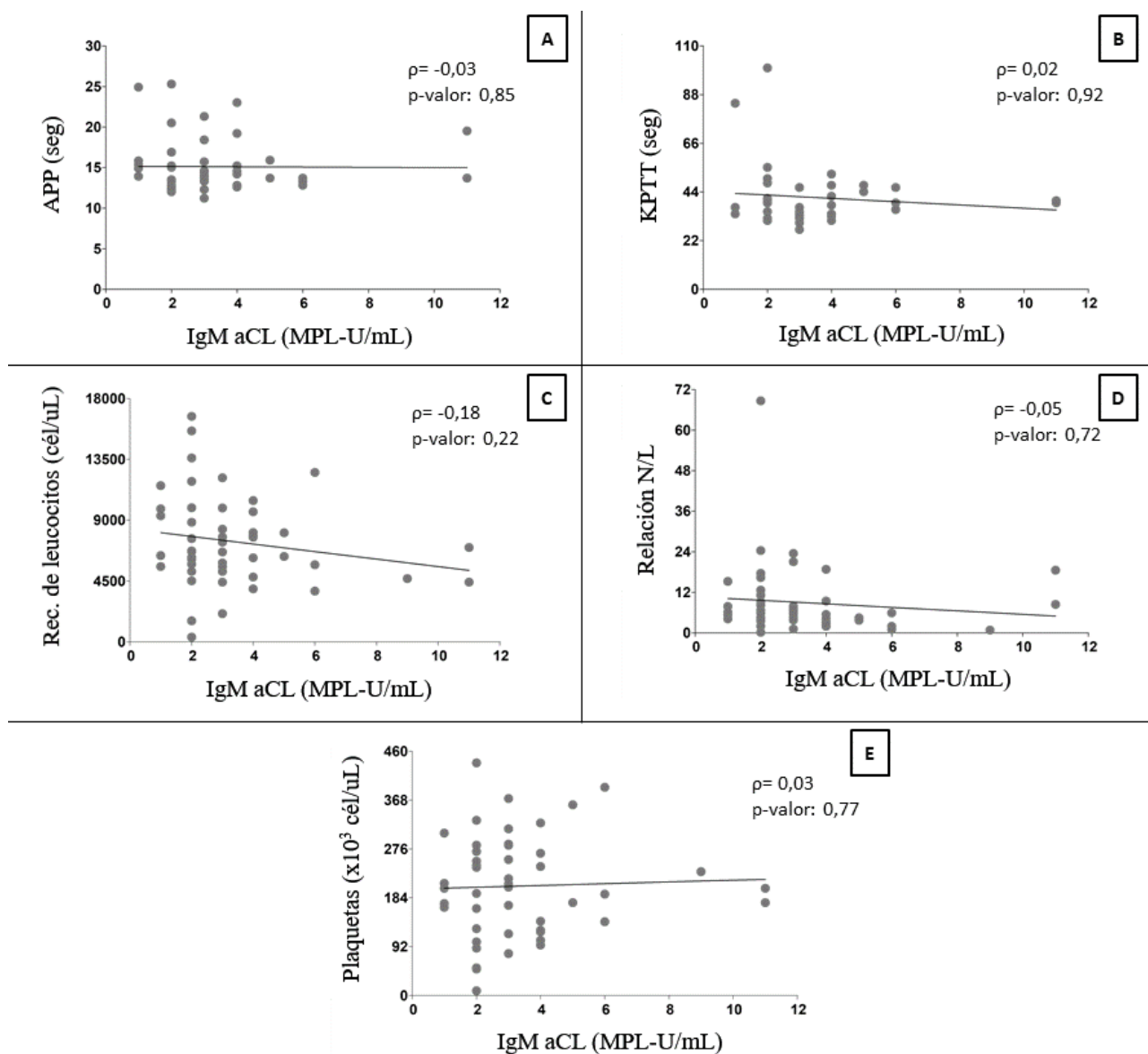
### Discusión

Está documentado que la presencia de aFL en el contexto de la COVID-19 puede ser un fenómeno secundario a la infección. La presencia de estos anticuerpos por sí solos no es suficiente para provocar un evento trombótico, sino que se necesita de una actividad inflamatoria intensa como la

de la COVID-19<sup>9</sup>.

De acuerdo con el trabajo de Espinoza y colaboradores<sup>13</sup>, los posibles mecanismos patogénicos de los aFL se pueden agrupar de manera general en los que causan: 1) efecto sobre los mecanismos procoagulantes y anticoagulantes que se llevan a cabo en las membranas de algunas células y 2) activación de células blanco e inducción de la expresión y secreción de diversas moléculas. Sin embargo, dada la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, es probable que más de un mecanismo fisiopatológico participe en el desarrollo de la enfermedad<sup>1</sup>.

Se ha observado una prevalencia inusualmente elevada de eventos tromboembólicos durante el curso de la CO-

**Figura 5.** Correlaciones de anticuerpos IgG anticardiolipinas.

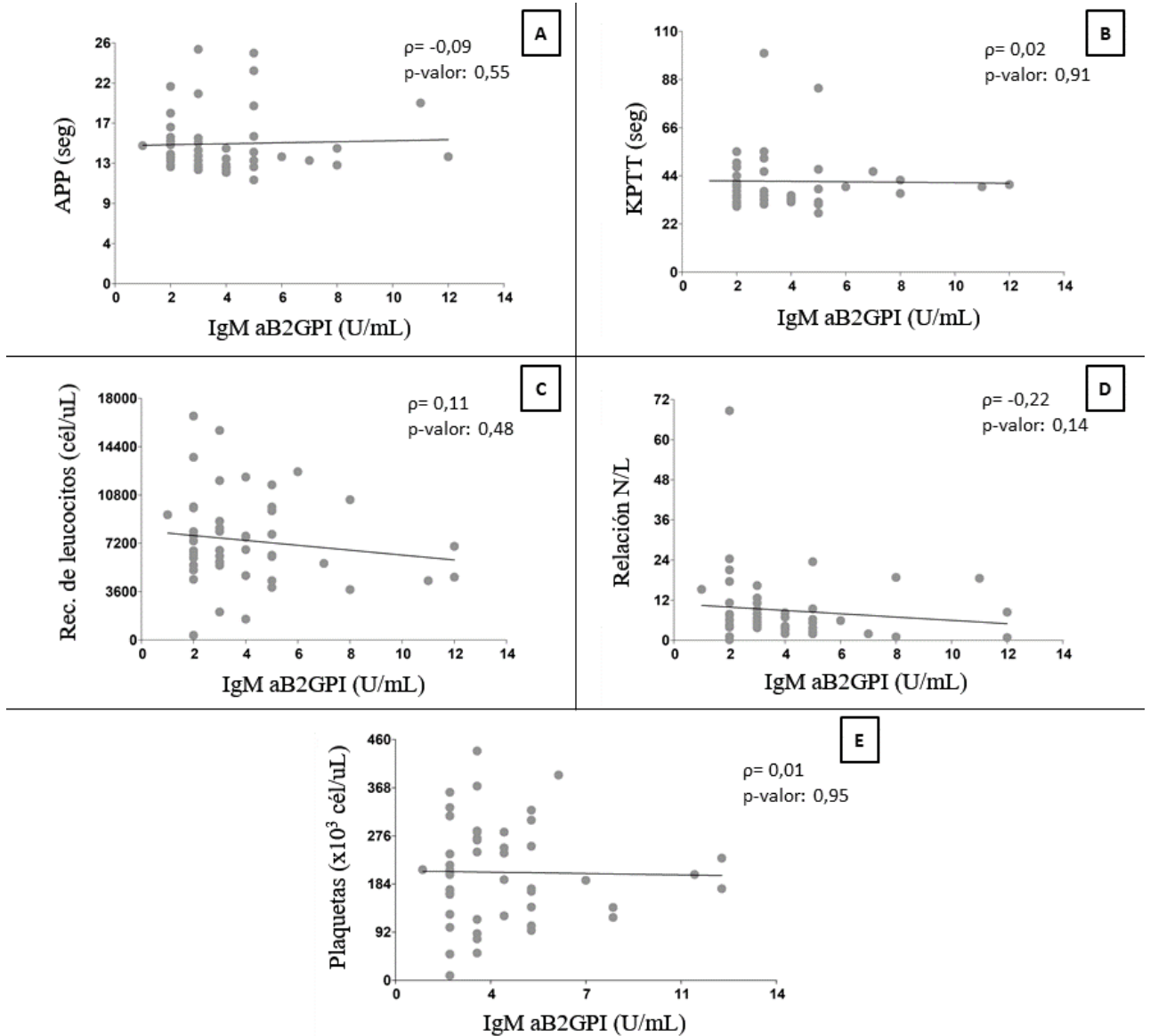
► Correlación de IgG aCL con: A) APP; B) KPTT; C) Recuento de leucocitos; D) Relación N/L; y E) Recuento de plaquetas; aCL, anticuerpos anticardiolipinas; APP, tiempo de Protrombina; GPL, fosfolípidos IgG; IgG, inmunoglobulina G; IgM, inmunoglobulina M; KPTT, tiempo de tromboplastina parcial activada; MPL, fosfolípidos IgM; N/L, neutrófilo/linfocito.

VID-19. Mientras que los mecanismos involucrados en el estado hipercoagulable que pueden llevar a una coagulopatía en pacientes con COVID-19 permanecen sin ser del todo claros, ha sido reportado un incremento en la prevalencia de aFL en estos pacientes por diversos grupos de investigación. Esto es importante dado que la presencia de aFL puede resultar en anomalías que incluyen prolongación de los tiempos de coagulación y/o manifestaciones clínicas que van desde trombocitopenia hasta un SAF, en donde el estado protrombótico adquirido generado por los aFL es el responsable de un incremento significativo en el riesgo de trombosis venosa, arterial, y microvascular<sup>14</sup>.

En el caso de la infección por SARS-CoV-2, los primeros es-

tudios identificaron de manera inesperada una alta incidencia de aFL en pacientes con COVID-19<sup>15-17</sup> internados en UTI<sup>18</sup>, con una tasa acumulada de 27,6% dentro de las primeras 24 horas de admisión al nosocomio<sup>19</sup>. Además, las autopsias revelaron trombosis venosas profundas hasta en un 58% de pacientes con COVID-19 severa en los que no se sospechaba previamente de tromboembolismo venoso<sup>20</sup>.

En una serie de 21 pacientes hospitalizados en UTI con COVID-19 severa o crítico, 67% de ellos presentaba positividad para al menos uno de los aFL: 25% presentaba doble positividad y 8%, triple positividad (AL, aCL, y  $\alpha\beta 2\text{GPI}$ ). IgM aCL estaba presente en el 14% de los pacientes e IgG aCL, en el 10%<sup>21</sup>. En otra investigación con 31 pacientes con COVID-19 en UTI,

**Figura 6.** Correlaciones de anticuerpos IgM anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I.

► Correlación de IgM a $\beta$ 2GPI con: A) APP; B) KPTT; C) Recuento de leucocitos; D) Relación N/L; y E) Recuento de plaquetas; aCL, anticuerpos anticardiolipinas; APP, tiempo de Protrombina; GPL, fosfolípidos IgG; IgG, inmunoglobulina G; IgM, inmunoglobulina M; KPTT, tiempo de tromboplastina parcial activada; MPL, fosfolípidos IgM; N/L, neutrófilo/linfocito.

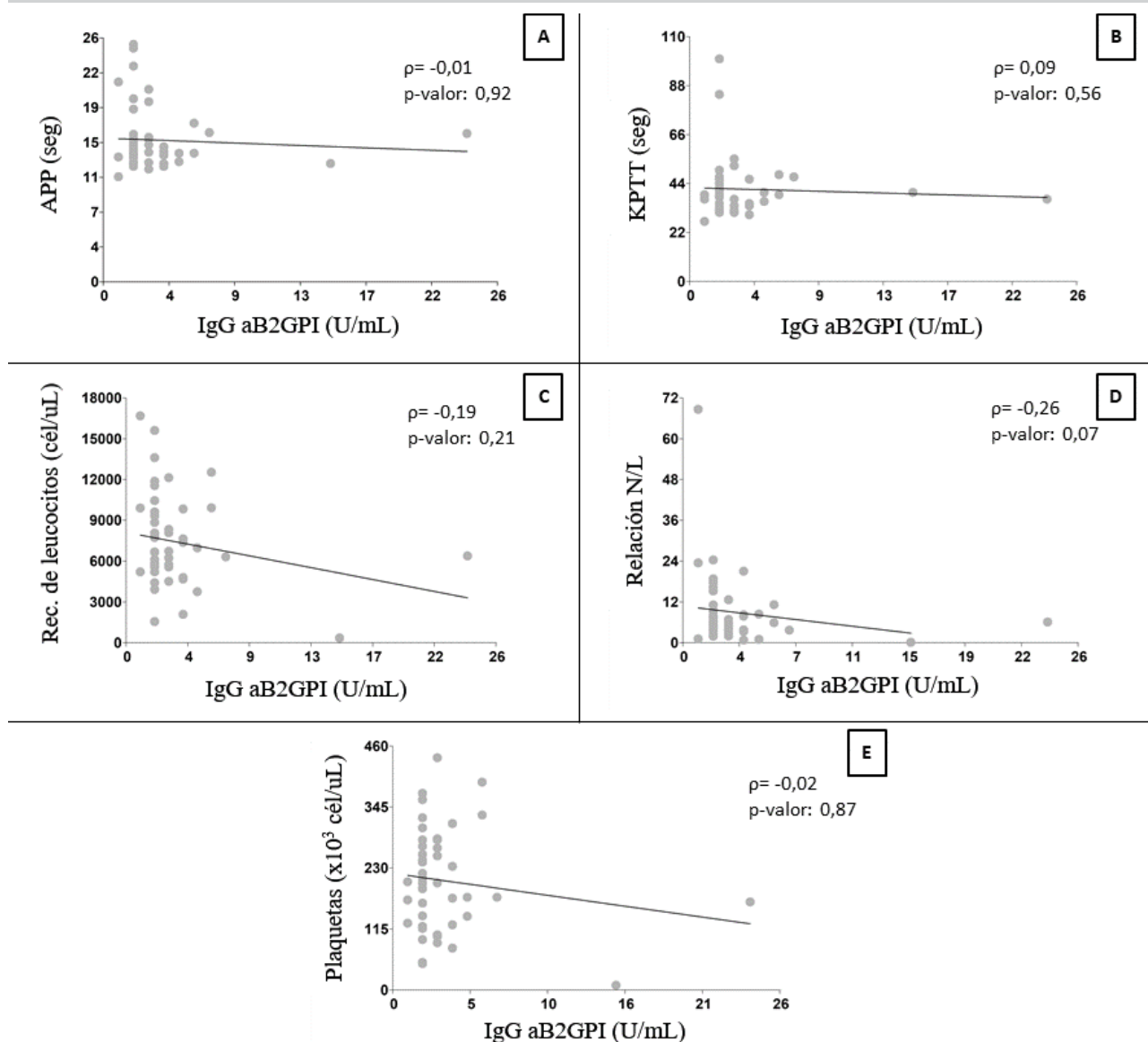
7 de 9 pacientes con manifestaciones tromboticas presentaban al menos 1 aFL, y 16 de 22 pacientes sin trombosis también presentaban positividad para estos<sup>22</sup>. Otro estudio demostró la presencia de aFL en el 52% de 172 pacientes hospitalizados con COVID-19 e incluyó 23% de IgM aCL, 24% de IgM antifosfatidilserina/protrombina (aFS/PT), y 18% de IgG aFS/PT<sup>13</sup>. El hallazgo de que otro trabajo encontró alrededor del 12% de prevalencia de IgM/IgG aCL e IgG a $\beta$ 2GPI<sup>23</sup> indica la variabilidad que existe entre cohortes de pacientes y lugares donde se realiza la determinación.

Con base en los resultados de este estudio, encontramos una baja prevalencia de aFL en la cohorte de pacientes estudiados (4% IgM aCL, 5% IgG aCL, 6% IgM a $\beta$ 2GPI y 4% IgG a $\beta$ 2GPI), lo que condice con la gran variabilidad existente

entre la población de estudio y el lugar donde se lleva a cabo el análisis. La principal diferencia puede deberse a que la mayoría de los casos estudiados en la literatura corresponden a pacientes críticos o con enfermedad muy severa, mientras que los pacientes analizados en nuestro trabajo son, en su mayoría, pacientes con enfermedad leve a moderada.

En otro estudio con pacientes con COVID-19 sin enfermedad crítica (por ejemplo, sin ingreso a UTI), la presencia de aFL fue un hallazgo común, con una prevalencia de IgM e IgG a $\beta$ 2GPI de 8,7% y 2,9%, respectivamente<sup>24</sup>. Esto corresponde a resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo con una población similar.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observamos

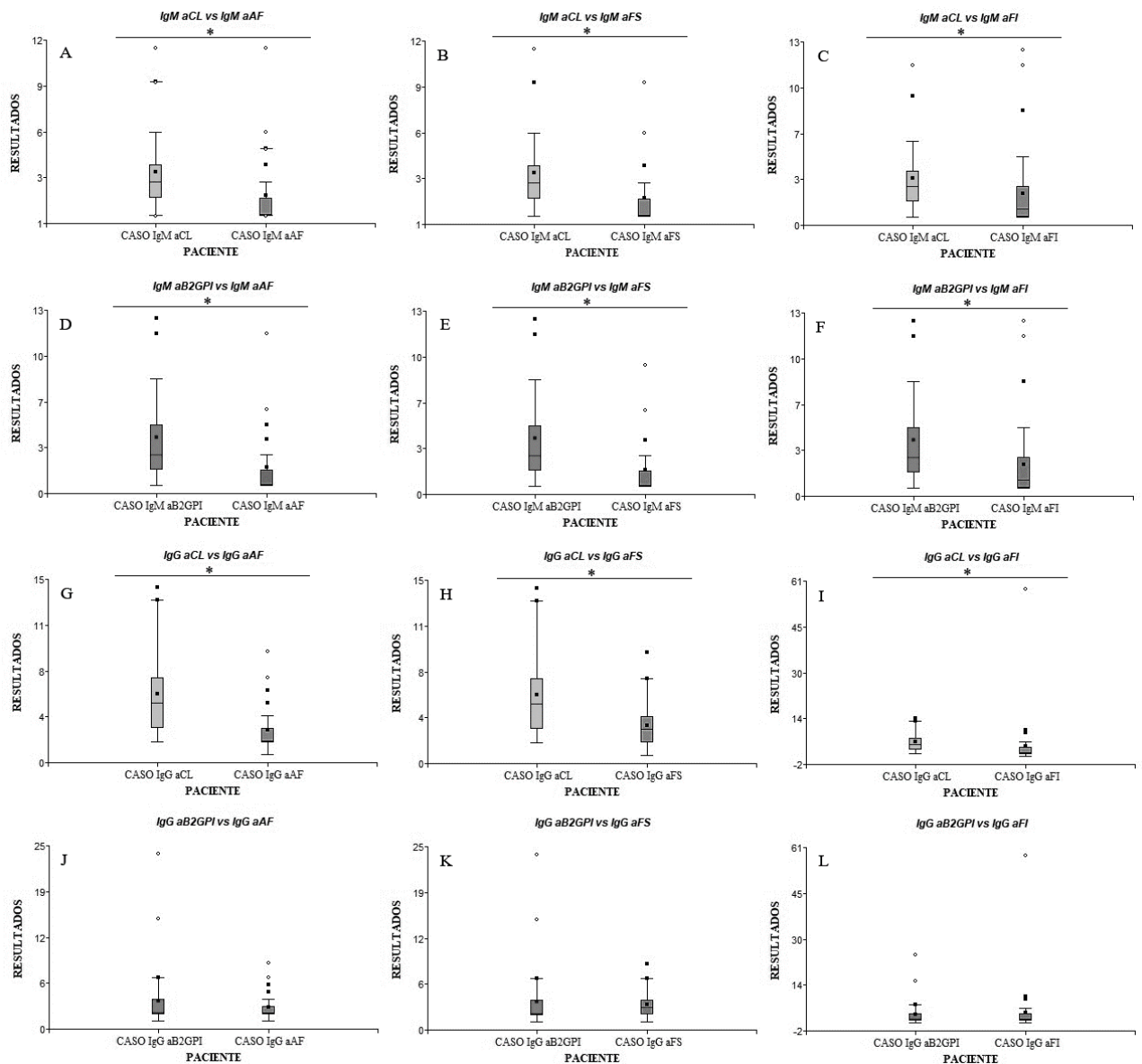
**Figura 7.** Correlaciones de anticuerpos IgG anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I.

► Correlación de IgG a $\beta$ 2GPI con: A) APP; B) KPTT; C) Recuento de leucocitos; D) Relación N/L; y E) Recuento de plaquetas; aCL, anticuerpos anticardiolipinas; APP, tiempo de Protrombina; GPL, fosfolípidos IgG; IgG, inmunoglobulina G; IgM, inmunoglobulina M; KPTT, tiempo de tromboplastina parcial activada; MPL, fosfolípidos IgM; N/L, neutrófilo/linfocito.

que no existe relación entre los aFL convencionales (IgM/IgG aCL e IgM/IgG a $\beta$ 2GPI) y parámetros de laboratorio de rutina, tales como tiempo de protrombina (APP), tiempo de tromboplastina parcial activada (KPTT), recuento de leucocitos, recuento de plaquetas y relación neutrófilo/linfocito (R N/L). Si bien la principal alteración observada en estos pacientes es el aumento de la R N/L, propia de la neutrofilia característica de la enfermedad, esta es independiente de la presencia o ausencia de los aFL.

En cuanto al análisis de los aFL “no-criterio”, la literatura acerca de su comportamiento en pacientes internados con COVID-19 es escasa. Sin embargo, su utilidad en el diagnóstico de SAF en pacientes seronegativos ha sido ampliamente estudiada<sup>5,13,25</sup>.

Con base en nuestros resultados, encontramos que la determinación de IgG tanto para aAF como para aFS y aFI respecto de IgG aCL y a $\beta$ 2GPI no representa ventaja alguna en la identificación de pacientes de riesgo para manifestaciones trombóticas o SAF. La misma situación se replica para la determinación de IgM, en donde encontramos valores aún más bajos con respecto a los aFL convencionales. Un estudio longitudinal llevado a cabo durante 15 años demostró que el riesgo de sufrir alguna manifestación trombótica se incrementa progresivamente con el número de aFL positivos<sup>26</sup>. Los pacientes que desarrollan SAF presentan el mayor número de aFL “no-criterio”, por lo tanto, el perfil de aFL es más importante que la determinación aislada de ellos tanto para el diagnóstico como para la estratificación

**Figura 8.** Comparación entre aFL convencionales y aFL “no-criterio”.

► A) IgM aCL vs. IgM aAF; B) IgM aCL vs. IgM aFS; C) IgM aCL vs. IgM aFI; D) IgM aβ2GPI vs. IgM aAF; E) IgM aβ2GPI vs. IgM aFS; F) IgM aβ2GPI vs. IgM aFI; G) IgG aCL vs. IgG aAF; H) IgG aCL vs. IgG aFS; I) IgG aCL vs. IgG aFI; J) IgG aβ2GPI vs. IgG aAF; K) IgG aβ2GPI vs. IgG aFS; L) IgG aβ2GPI vs. IgG aFI; aCL, anticuerpos anticardiolipinas; aAF, anticuerpos anti-ácido fosfatídico; aFS, anticuerpos antifosfatidilserina; aFI, anticuerpos antifosfatidilinositol; IgG, inmunoglobulina G; IgM, inmunoglobulina M.

de riesgo de SAF<sup>25,27</sup>. En este estudio, la ausencia de aFL convencionales y “no-criterio” en títulos moderados o altos ( $\geq 40$  títulos) se correlaciona con la ausencia de desarrollo de SAF o SAFc en la población de estudio.

Para cumplir con los criterios de clasificación de SAF, la positividad de los aFL debe confirmarse en 2 oportunidades con al menos 12 semanas de diferencia entre cada determinación, dado que estos pueden aparecer de manera transitoria y no específica durante episodios infecciosos agudos<sup>28</sup>. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados solo han llevado a cabo una única determinación, y aquellos que realizaron una segunda lo hicieron en un tiempo menor

que el de las 12 semanas. Solo dos estudios confirmaron de manera sistemática la positividad de los aFL de acuerdo con los criterios de clasificación<sup>29,30</sup>.

Los aFL pueden negativizarse en la segunda determinación. Este fenómeno es más común para el AL<sup>22, 29-32</sup>, pero también se ha observado lo mismo para el resto de los aFL<sup>32</sup>. Según la literatura, los niveles de aCL y aβ2GPI no presentan variaciones significativas en la segunda medición<sup>22,29</sup>.

Con base en los resultados obtenidos, no observamos cambios significativos en la segunda determinación (antes de la semana 12) de IgG aCL e IgG aβ2GPI respecto de la primera, lo que coincide con la bibliografía. Sin embargo, sí

observamos variaciones significativas para IgM aCL e IgG  $\alpha\beta$ 2GPI, aunque esta variación no permitió diferenciar a aquellos pacientes con riesgo de SAF, dado que no se obtuvieron valores que cumplieran con los criterios de clasificación actuales.

Los pacientes con COVID-19 presentan mayores niveles de aFL con respecto a pacientes sin la afección (pero siempre dentro de los valores de referencia), lo que sugiere que, en aquellos individuos genéticamente susceptibles, ciertas infecciones, así como también procesos inflamatorios, podrían inducir una respuesta autoinmune. Sin embargo, este aumento no es suficiente para clasificar a estos pacientes con SAF, ya que no se cumple con los criterios de clasificación actuales. Los resultados del presente estudio no muestran correlación entre la infección por SARS-CoV-2 y el desarrollo del síndrome, dada la falta de asociación entre resultados positivos de aFL (por encima del valor de corte, pero por debajo del valor diagnóstico) y parámetros de laboratorio de rutina. También observamos que la determinación de aFL “no-criterio” no aporta información adicional al diagnóstico de SAF, por lo que no se justifica su medición.

Será necesario realizar un estudio a gran escala, con una mayor cohorte de pacientes con COVID-19 donde la composición de los aFL sea puesta en contexto con el curso de la enfermedad y, esencialmente, con los eventos tromboticos, así como también sería ideal realizar una mayor cantidad de determinaciones en el tiempo para llegar a conclusiones más determinantes.

### Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

### Referencias bibliográficas

- Núñez-Álvarez CA, Cabiedes J. Mecanismos patogénicos de los anticuerpos antifosfolípidos. *Reumatol Clin*. 2011; 7(1):72–76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2009.10.005>
- Funke A, Staub HL, Monticeli OA, Balbi GGM, Danowski A, Santiago MB, et al. Non-criteria Antiphospholipid Antibodies: a narrative review. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1992; 66(11):1595–1601, <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.66.11.1595>
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheumatol*. 1999;42(7):1309–11, [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199907\)42:7<1309::AID-ANR1>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199907)42:7<1309::AID-ANR1>3.0.CO;2-F)
- Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(12):1127, <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2003.006163>
- Liu T, Gu J, Wan L et al. “Non-criteria” antiphospholipid antibodies add value to antiphospholipid syndrome diagnoses in a large Chinese cohort. *Arthritis Res Ther*. 2020; 22(33), <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-020-2131-4>
- Piette JC, Wechsler B, Frances C, Papo T, Godeau P. Exclusion criteria for primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1993; 20:1802–4.
- Belizna C, Stojanovich L, Cohen-Tervaert JW, Fassot C, Henrion D, Loufrani L, et al. Primary antiphospholipid syndrome and antiphospholipid syndrome associated to systemic lupus: Are they different entities? *Autoimmunity Reviews* 2020; 17(8):739–745, <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2018.01.027>
- Pouymiró Pubillones PO, Pouymiró Brooks Y, Pouymiró Brooks I. Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. *Medisan*. 2012; 16(3):429–44.
- Zhang Y, Xiao M, Zhang S, Xia P, Cao W, et al. Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 382(17):e38, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc2007575>
- Dotan A, Muller S, Kanduc D, David P, Halpert G, et al. The SARS-CoV-2 as an instrumental trigger of autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2021; 20(4), <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102792>
- Iba T, Di Nisio M, Thachil J, Wada H, Asakura H, et al. A Proposal of the Modification of Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis (JSTH) Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) Diagnostic Criteria for Sepsis-Associated DIC. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018; 24(3):439–445, <http://dx.doi.org/10.1177/1076029617720069>
- Zuo Y, Estes SK, Gandhi AA, Yalavarthi S, Ali RA, et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Science Translational Medicine*. 2020; 12(570), <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3876>
- Espinoza G, Cervera R, Font J, Shoenfeld Y. Antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanism. *Autoimmunity Rev*. 2003;2:86–93, [http://dx.doi.org/10.1016/s1568-9972\(02\)00144-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1568-9972(02)00144-1)
- Chock YP, Moulinet T, Dufrost V, Erkan D, Wahl D, et al. Antiphospholipid antibodies and the risk of thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2019; 18(11):102395, <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102395>
- Tvito A, Zimmerman FS, Asher E, Helviz Y. Lupus anticoagulant in patients with COVID-19. *Int J Lab Hematol*. 2021; 43(1):17–18, <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.13334>
- Harzallah I, Debliquis A, Drénou B. Lupus anticoagulant is frequent in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(8):2064–2065, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14867>
- Pineton de Chambrun M, Frere C, Miyara M, Amoura Z, Martin-Toutain I, et al. High frequency of antiphospholipid antibodies in critically ill COVID-19 patients: a link with hypercoagulability? *J Intern Med*. 2021; 289(3):422–424, <http://dx.doi.org/10.1111/joim.13126>
- Middelcorp S, Coppens M, van Haaps TF, Foppen M, Vlaar AP, et al. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(8):1995–2002, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14888>
- Lodigiani C, Iapichino G, Carenzo L, Cecconi M, Ferrazzi P, et al. Venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19 patients admitted to an academic hospital in Milan, Italy. *Thromb Res*. 2020; 191:9–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.024>
- Wichmann D, Sperhake J-P, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19. *Ann Intern Med* 2020; 173(4):268–277, <http://dx.doi.org/10.7326/M20-2003>
- Amezcu-Guerra LM, Rojas-Velasco G, Brianza-Padilla M, Vázquez-Rangé A, Márquez-Velasco R, et al. Presence of antiphospholipid antibodies in COVID-19: case series study. *Ann Rheum Dis*. 2021; 80(5):e73, <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218100>
- Devreese KMJ, Linskens EA, Benoit D, Peperstraete H. Antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19: a relevant observation? *J Thromb Haemost*. 2020; 18(9):2191–2201, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14994>
- Siguret V, Voicu S, Neuwirth M, Delrue M, Gayat E, et al. Are antiphospholipid antibodies associated with thrombotic complications in critically ill COVID-19 patients? *Thromb Res* 2020; 195:74–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2020.07.016>
- Le Joncour A, Frere C, Martin-Toutain I, Gougis P, Ghillani-Dalbin P, et al. Antiphospholipid antibodies and thrombotic events in COVID-19 patients hospitalized in medicine ward. *Autoimmun Rev* 2021; 20(2):102729, <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102729>
- Liu X, Zhu L, Liu H, Cai Q, Yun Z, et al. Non-criteria antiphospholipid antibodies in antiphospholipid syndrome: Diagnostic value added. *Front Immunol*. 2022; 13:972012, <http://dx.doi.org/10.3389/fimm.2022.972012>

[fimmu.2022.972012](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.972012)

26. Bizzaro N, Ghirardello A, Zampieri S, Iaccarino L, Tozzoli R, et al. Antithrombin antibodies predict thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus: A 15-year longitudinal study. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(6):1158–1164, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02532.x>
27. Litvinova E, Darnige L, Kirilovsky A, Burnel Y, de Luna G, et al. Prevalence and significance of non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical APS criteria. *Front Immunol.* 2018; 9:2971, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02971>
28. Male C, Foulon D, Hoogendoorn H, Vegh P, Silverman E, et al. Predictive value of persistent versus transient antiphospholipid antibody subtypes for the risk of thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 2005;106(13):4152–4158, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-05-2048>
29. Vollmer O, Tacquard C, Dieudonne Y, Nespola B, Sattler L, et al. Follow-up of COVID-19 patients: LA is transient but other aPLs are persistent. *Autoimmun Rev.* 2021; 20(6):102822, <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102822>
30. Espinosa G, Zamora-Martinez C, Perez-Isidro A, Neto D, Bravo-Gallego LY, et al. Persistent antiphospholipid antibodies are not associated with worse clinical outcomes in a prospective cohort of hospitalised patients with SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol.* 2022; 13:911979, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.911979>
31. Xiao M, Zhang Y, Zhang S, Qin X, Xia P, et al. Antiphospholipid antibodies in critically ill patients with COVID-19. *Arthritis Rheumatol.* 2020; 72(12):1998–2004, <http://dx.doi.org/10.1002/art.41425>
32. Sciascia S, Radin M, Bazzan M, Montaruli B, Cosseddu D, et al. Antiphospholipid antibodies and infection: non Nova Sed Nove. *Front Immunol.* 2021; 12:687534, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.687534>



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.

## REVISIÓN

# Clasificación de la leucemia mieloide aguda: entre el consenso y la controversia

*Classification of acute myeloid leukemia. Between consensus and controversy*Lazarte, Sandra Stella<sup>1,2\*</sup>; Ledesma Achem, Miryam Emilse<sup>1,3</sup>; Haro, Cecilia<sup>1,4</sup><sup>1</sup>Instituto de Bioquímica Aplicada, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán, Argentina<sup>2</sup>Instituto de Maternidad y Ginecología Nuestra Señora de las Mercedes. San Miguel de Tucumán, Argentina<sup>3</sup>Laboratorio de Citometría de Flujo, Hospital Néstor Kirchner. San Miguel de Tucumán, Argentina<sup>4</sup>Centro Científico Tecnológico/ CONICET NOA Sur. San Miguel de Tucumán, Argentina

\*Contacto: Sandra Stella Lazarte. Instituto de Bioquímica Aplicada, Balcarce 747 [C.P 4000]. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina; sandra.lazarte@fbqf.unt.edu.ar.

**Resumen**

**Introducción:** La leucemia mieloide aguda (LMA) es el resultado de una mutación somática en un precursor mieloide que desencadena una proliferación clonal de células leucémicas inmaduras. El propósito de esta revisión fue describir las clasificaciones de LMA propuestas a través del tiempo destacando la integración de nuevas características biológicas. **Materiales y Métodos:** Se realizó una búsqueda bibliográfica de los trabajos publicados hasta 2023 en PubMed y en Google. **Desarrollo:** Se han propuesto varias clasificaciones de la LMA: a) Clasificación del Grupo Francés - Americano - Británico (FAB) en 1976; b) Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética (MIC) en 1988; c) Clasificación inmunológica de las leucemias agudas del Grupo Europeo (EGIL) en 1995; d) Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1997, 2001, 2008, 2016 y 2022; e) Clasificación del Consenso Internacional (CCI) en 2022. Las nuevas clasificaciones de 2022 (OMS y CCI) amplían las anomalías genéticas que definen grupos específicos de LMA. Sin embargo, la Sociedad Argentina de Hematología advierte que existen puntos de controversia entre ambas clasificaciones. **Conclusiones:** Lograr el consenso internacional de los expertos sería beneficioso para los profesionales de la salud que participan del manejo de la LMA y, sobre todo, para el paciente que la padece.

**Palabras clave:** leucemia; leucemia mieloide aguda; clasificación.**Abstract**

**Introduction:** Acute myeloid leukemia (AML) is the result of a somatic mutation in a myeloid precursor, which triggers a clonal proliferation of immature leukemia cells. The purpose of this review is to describe the proposed AML classifications over time, highlighting the integration of new biological characteristics. **Materials and Methods:** A bibliographic search of papers published up to 2023 was carried out in PubMed and Google. **Development:** Several AML classifications have been proposed: a) Classification of the French-American-British group (FAB) in 1976; b) Morphological, Immunological and Cytogenetic Classification (MIC) in 1988; c) Immunological Classification of Acute Leukemias of the European Group (EGIL) in 1995; d) Classification of the World Health Organization (WHO) in 1997, 2001, 2008, 2016 and 2022; and e) International Consensus Classification (ICC) in 2022. The new 2022 classifications (WHO and ICC) expand the genetic anomalies that define specific AML groups. However, the Argentine Society of Hematology warns that there are points of controversy between both classifications. **Conclusions:** Achieving international expert consensus would be beneficial for health professionals involved in the management of AML, and especially for the patient who suffers from it.

**Keywords:** Leukemia; acute myeloid leukemia; classification.

## Introducción

### Definición de leucemia mieloide aguda

La palabra leucemia (Leukämie) significa *sangre blanca*, (del griego *leukos*, λευκός: “blanco” y *haima*, αἷμα: “sangre”) o *Weisses Blut*, término que fue propuesto por Rudolf Virchow en 1847<sup>1</sup>.

Las leucemias agudas (LA) son el resultado de una mutación somática en una única célula madre hematopoyética que desencadena una proliferación clonal de células leucémicas inmaduras. La célula en la que se produce la transformación leucémica es un precursor que pierde la capacidad de seguir su proceso normal de maduración. Cuando este precursor es de origen mieloide, se desarrolla una leucemia aguda mieloide (LMA)<sup>2</sup>. La LMA se caracteriza por la infiltración de la médula ósea, la sangre y otros tejidos por células proliferativas clonales del sistema hematopoyético, anormalmente diferenciadas<sup>3</sup>. Las grandes translocaciones cromosómicas, así como las mutaciones en los genes implicados en la proliferación y diferenciación hematopoyética, dan como resultado la acumulación de células mieloides pobremente diferenciadas. La LMA puede surgir en pacientes con un trastorno hematológico subyacente o como consecuencia de una terapia previa (por ejemplo, exposición a topoisomerasas II, agentes alquilantes o radiación). Sin embargo, en la mayoría de los casos, aparece como una neoplasia maligna *de novo* en individuos previamente sanos<sup>4</sup>.

### Breve reseña histórica

Los pioneros en la historia temprana de la leucemia fueron destacados médicos del siglo XIX. El médico francés Alfred Armand Louis Marie Velpeau fue el primero en describir la leucemia y sus síntomas en 1825, mientras que Alfred François Donné, también francés, describió las células leucémicas en un atlas publicado en 1845. En el mismo año, el médico inglés John Hughes Bennett describió y denominó *leucocitemia* a la enfermedad, pero fue el patólogo alemán Rudolf Ludwig Karl Virchow quien la nombró *leukämie* en 1847 y estableció que las células blancas no eran de origen purulento. Reconoció que la leucemia es una entidad patológica en sí misma, con un balance invertido entre glóbulos rojos y blancos, donde los últimos parecían suprimir a los primeros<sup>1</sup>. En 1857, en la ciudad de Würzburg (Alemania), el patólogo Nikolaus Friedreich describió el primer caso de leucemia aguda debido al corto tiempo transcurrido entre la presentación y la muerte del paciente. Un descubrimiento vital se produjo en 1868, cuando el patólogo alemán Ernst Neumann informó cambios en la médula ósea en la leucemia y reconoció el vínculo entre el origen de la sangre y la médula ósea. En 1872, estableció que la leucemia era una enfermedad de la médula ósea<sup>5</sup>. El médico alemán Paul Ehrlich, en 1877, desarrolló diversos métodos para teñir células, y pudo por primera vez, demostrar las características nucleares y citoplasmáticas de las células de la sangre e hizo énfasis en los numerosos gránulos citoplasmáticos que algunas de las células sanguíneas poseen. Este nuevo avance simplificó la clasificación de la leucemia en dos

variedades: las que se originaban de células granulares (de granulocitos/leucemias mieloides) y las que surgían de células sin gránulos (hoy conocidas como leucemias linfoides)<sup>6</sup>. Esta fue una de las primeras clasificaciones de la leucemia.

La clasificación es un acto fundamental para el estudio cuantitativo de todo fenómeno; se la reconoce como la base de toda generalización científica y representa, por lo tanto, un elemento de carácter esencial desde el punto de vista de la metodología estadística. Una clasificación estadística de las enfermedades debe limitarse a un número restringido de categorías que puedan abarcar la totalidad de las afecciones morbosas; las categorías deben ser elegidas de tal manera que faciliten el estudio estadístico de los fenómenos patológicos<sup>7</sup>.

Actualmente, los procedimientos de diagnóstico utilizados para clasificar la LMA son: la evaluación morfológica de muestras de médula ósea y frotis de sangre, el análisis de la expresión de marcadores citoplasmáticos o de superficie celular mediante citometría de flujo, la identificación de hallazgos cromosómicos mediante pruebas citogenéticas convencionales y, más recientemente, la detección de lesiones genéticas moleculares seleccionadas<sup>3</sup>. Antes de contar con todas estas tecnologías, hubo otras clasificaciones que fueron relevantes y que aún permanecen vigentes en ciertos aspectos, como la clasificación del Grupo Francés – Americano – Británico (FAB)<sup>8</sup>.

El propósito de esta revisión es proporcionar una descripción exhaustiva de las clasificaciones de LMA a lo largo del tiempo destacando la evolución de las mismas y su integración con características biológicas identificadas mediante nuevas herramientas tecnológicas.

### Materiales y Métodos

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los trabajos publicados hasta 2023 en PubMed, que comprende más de 36 millones de citas de la literatura biomédica de MEDLINE, revistas de ciencias biológicas y libros en línea. El término general utilizado, “*Acute myeloid leukemia classification*”, sirvió para detectar las clasificaciones más recientes, correspondientes al período 2016 - 2023. Otras, como la clasificación FAB, fueron buscadas con su título específico: “*Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*”, basándose en las referencias de los artículos seleccionados con el primer término. Para referirse a las categorías incorporadas posteriormente por el grupo FAB, se usaron los siguientes términos: “*myeloid leukemia M0*” y “*leukemia of megakaryocyte lineage*”, acotando el período de búsqueda al lapso entre 1985 y 1991. Para detectar publicaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) previas a la clasificación FAB, se indagó en Google Académico usando la expresión “clasificación de leucemia, OMS”, en el intervalo específico comprendido entre los años 1960 y 1976. La actualización sobre leucemias agudas en Argentina se detectó mediante la locución “clasificación de leucemia mieloide aguda” en el motor de búsqueda Google.

## Desarrollo

### Clasificación FAB

En el año 1976, el grupo cooperativo FAB de estudio de leucemia introdujo cierta objetividad en lo que tradicionalmente se consideraba, hasta ese momento, un ejercicio esencialmente subjetivo y tuvo un efecto beneficioso en la mejora del grado de uniformidad del registro de diagnósticos. El objetivo del grupo fue formular pautas diagnósticas a partir de material citológico que pudiera estar fácilmente disponible en la mayoría de los laboratorios hematológicos, a saber, frotis de sangre periférica y aspirado de médula ósea teñidos con Romanovsky, y algunas reacciones citoquímicas esenciales<sup>9</sup>. En esa primera clasificación, se describieron seis tipos de leucemias mieloides agudas: M1, M2, M3, M4, M5 y M6<sup>8</sup>. Para realizarla, tuvieron en cuenta: a) la dirección de la diferenciación a lo largo de una o más líneas celulares y b) el grado de maduración de las células. Dicha clasificación fue rápidamente adoptada, pero surgieron controversias al definir algunos subtipos y, sobre todo, al intentar diferenciarlos de los síndromes mielodisplásicos (SMD). Por ello, se hizo una revisión en 1985 donde se introdujo un elemento cuantitativo mediante el cual los límites entre diferentes categorías se especificaron arbitrariamente, definiendo valores para los porcentajes de los tipos de células predominantes en cada categoría<sup>9</sup>. Así, se estipuló que 30% o más de blastos determinaba la presencia de leucemia aguda.

En 1985, el grupo FAB agregó otra categoría de leucemia aguda no linfocítica a su clasificación: la LMA de linaje megacariocítico o LMA M7<sup>10</sup>. Hasta ese momento, la clasificación FAB se basaba solo en la microscopía común como herramienta diagnóstica. El uso de la citoquímica ultraestructural y de los anticuerpos monoclonales como ayuda en el diagnóstico de LMA resultó en el reconocimiento de casos de LMA M7 y de una forma de LMA mínimamente diferenciada (LMA M0). Así, en 1991, se publicaron los criterios para el reconocimiento de esta última<sup>11</sup>. De esta manera, finalmente, la clasificación FAB incluyó ocho tipos de LMA, designadas partiendo de M0 a M7. Sin embargo, los datos citogenéticos indicaban la existencia de anomalías cariotípicas específicas dentro de los subtipos morfológicos de leucemias definidos hasta ese momento. Así, los desarrollos simultáneos en la caracterización inmunocitoquímica de las leucemias y nueva información citogenética en estas enfermedades como la estrecha asociación entre la LMA M2 y la t(8;21), así como la de LMA M3 con la t(15;17), condujeron a una decisión casi simultánea de los profesionales de diversas disciplinas de integrarse y coordinar la información para introducir la "Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética (MIC) de las leucemias mieloides agudas"<sup>12</sup>.

### Clasificación MIC

La clasificación MIC estableció diez subtipos de LMA, que se caracterizaron por criterios citogenéticos, morfológicos e inmunológicos únicos. Los criterios morfológicos adoptados

fueron los recomendados por el grupo FAB en publicaciones previas<sup>8-10</sup>. En la nomenclatura MIC, la clasificación FAB de la leucemia se colocaba antes de la barra oblicua y el cambio cromosómico que caracterizaba a la leucemia, después de la marca, por ejemplo: M2/t(8;21), M3/t(15;17), etc.. En ese momento, los expertos habían evaluado y establecido un total de 20 aberraciones cromosómicas características. Con respecto al uso de los anticuerpos monoclonales antimieloides, su mayor valor era establecer o confirmar el diagnóstico de LMA. El grupo de trabajo recomendó realizar este análisis cuando la morfología o la citoquímica no identificaban claramente el linaje de las células leucémicas y cuando se sospechaba que podía haber más de un linaje de células leucémicas. Usando una combinación de anticuerpos monoclonales, podían distinguir las LMA de las leucemias linfoblásticas agudas en un 90 - 99% de los casos. Los fenotipos más específicos reconocidos fueron la asociación de LMA M4/M5 con la expresión del antígeno gp55 (CD14), y la ausencia de expresión de antígenos HLA de clase II (HLA-DR) en LMA M3<sup>12</sup>.

La rápida evolución de la aplicación de los anticuerpos monoclonales en el reconocimiento del inmunofenotipo generó las "Propuestas para la clasificación inmunológica de las leucemias agudas" del Grupo Europeo para la Caracterización Inmunológica de las Leucemias (EGIL) en el año 1995<sup>13</sup>.

### Clasificación EGIL

La clasificación inmunológica estaba compuesta por las siguientes categorías: leucemias linfoblásticas agudas, leucemias mieloides agudas, leucemias agudas bifenotípicas, leucemias agudas indiferenciadas.

Las LMA fueron definidas inmunológicamente por la expresión de 2 o más de los siguientes marcadores mielomonocíticos: anti-MPO (mieloperoxidasa), CD13, CD33, CDw65 y/o CD117 (c-Kit). Los expertos europeos acordaron que anti-MPO era el marcador más específico de la línea mieloide. Asimismo, el grupo intentó correlacionar los perfiles inmunológicos con los subtipos de LMA, de acuerdo con la clasificación FAB. Sin embargo, solo 3 subtipos, M0, M6 y M7, pudieron ser definidos inequívocamente mediante el inmunofenotipo. Por último, recomendaron emprender estudios que correlacionen la clasificación inmunológica con las características citogenéticas y moleculares más que con las morfológicas y citoquímicas<sup>13</sup>.

### Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Un principio básico del sistema de la OMS es que la clasificación de las neoplasias hematopoyéticas y linfoides debe utilizar no solo los hallazgos morfológicos, sino también toda la información disponible, incluidas las características genéticas, inmunofenotípicas, biológicas y clínicas para definir entidades patológicas específicas. Esencialmente, la clasificación de la OMS intenta incorporar aquellas características de la enfermedad que han demostrado tener relevancia clínica y biológica en una nomenclatura de trabajo útil<sup>14</sup>.

La búsqueda bibliográfica arrojó un documento de la OMS publicado en 1968, donde se enumeran las siguientes leucemias: leucemia linfática [aguda y crónica], leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia monocítica [aguda y crónica] y otras leucemias no especificadas [de células indiferenciadas, megacariocítica y eritemia aguda]<sup>7</sup>.

Más adelante, la OMS publicó un reporte elaborado en 1997 en el cual se propuso una clasificación de las neoplasias hematológicas malignas que las clasificó principalmente según su linaje en neoplasias mieloides, neoplasias linfoides, trastornos de mastocitos y neoplasias histiocíticas<sup>15</sup>. Dentro de las neoplasias mieloides, se incluyó el grupo LMA, el cual contenía las siguientes categorías: LMA con translocaciones citogenéticas recurrentes, LMA con displasia multilínea, LMA y SMD, relacionados con terapia y LMA no categorizadas de otra manera.

Según el estándar FAB, la LMA se definía por la presencia de 30% o más de blastos. Sin embargo, varios estudios habían indicado que los pacientes con 20% a 29% de blastos (clasificados como enfermos con anemia refractaria con exceso de blastos en transformación) tenían un pronóstico similar al de los pacientes con más de 30% de blastos. Por lo tanto, hubo consenso en que el recuento de blastos para el diagnóstico de LMA debía ser del 20%. No obstante, los casos con anomalías citogenéticas específicas con recuentos bajos de blastos, que en el pasado se diagnosticaban como SMD, desde ese momento, se clasificaron como LMA. Una de las características más significativa de esta clasificación es que las categorías citogenéticas/moleculares fueron reconocidas como enfermedades distintas<sup>15</sup>.

En 2001, la OMS en conjunto con la Sociedad de Hematopatología (SH) y la Asociación Europea de Hematopatología (AEH) publicó una nueva clasificación para las neoplasias hematopoyéticas y linfoides donde se reafirma lo expuesto anteriormente: el umbral de blastos para el diagnóstico de LMA se reduce del 30% al 20% de blastos en la sangre periférica (SP) o en la médula ósea (MO). Además, para los pacientes con anomalías citogenéticas recurrentes clonales  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13q22)$  o  $t(16;16)(p13;q22)$  y  $t(15;17)(q22;q12)$  debe considerarse que tienen LMA, independientemente del porcentaje de blastos<sup>16</sup>. Se reconocen tres subgrupos únicos de LMA: (1) LMA con anomalías genéticas recurrentes, (2) LMA con displasia multilínea y (3) LMA y SMD relacionados con la terapia. Los casos que no satisfagan los criterios para ninguno de estos subgrupos o para los cuales no se puedan obtener datos genéticos deben clasificarse como una de las entidades en un cuarto subgrupo: LMA no clasificada de otra manera. En la mayoría de los aspectos, las entidades incluidas en este grupo se definen de manera casi idéntica a la entidad correspondiente en la clasificación FAB, y los criterios para su reconocimiento se basan principalmente en la identificación de los principales linajes celulares involucrados y el grado de maduración<sup>14</sup>. En esta categoría, se incluyeron<sup>16</sup>: LMA mínimamente diferenciada; LMA sin maduración; LMA con maduración; leucemia mielomonocítica aguda; Leucemia monoblástica/monocítica aguda; leucemia eritroide aguda

[eritroleucemia pura y eritroide/mieloide]; leucemia megacarioblástica aguda; leucemia basófila aguda; panmielosis aguda con mielofibrosis y sarcoma mieloide. Este último no estaba incluido en la primera clasificación OMS. Además, se reconocen 2 tipos de leucemia eritroide aguda, basados en la presencia/ausencia de componente mieloblástico<sup>14</sup>.

La revisión de la clasificación OMS de las neoplasias mieloides y leucemias agudas realizada en 2008 incorporó una serie de recomendaciones para asegurar que esta fuera clínicamente útil. Para acomodar la información reciente, se incorporaron "entidades provisionales" dentro de los principales grupos de enfermedades. Se aclaró que el término *mieloide* incluye todas las células pertenecientes a los linajes granulocítico (neutrófilo, eosinófilo, basófilo), monocítico/macrófago, eritroide, megacariocítico y mastocitos. El porcentaje de blastos debe derivarse, cuando sea posible, de recuentos diferenciales de 200 células del frotis de sangre periférica y de recuentos diferenciales de 500 células nucleadas en frotis de aspirados de médula celular teñidos con Wright-Giemsa. La determinación del porcentaje de blastos mediante citometría de flujo no es recomendada como sustituto de la inspección visual. En cambio, la citometría de flujo multiparamétrica es el método de elección para determinar el linaje de los blastos. Por otro lado, un análisis citogenético completo de las células de MO se consideró esencial durante la evaluación inicial para establecer un cariotipo de referencia; se recomendó repetir los análisis según fuera necesario para juzgar la respuesta a la terapia o para detectar evolución genética. Además, las mutaciones genéticas se reconocieron como marcadores de diagnóstico y pronóstico cada vez más importantes en las neoplasias mieloides<sup>17</sup>.

Las categorías propuestas fueron las siguientes: 1) LMA con anomalías genéticas recurrentes: incluyó 7 entidades bien definidas más 2 provisionales. Solo para LMA con  $t(8;21)(q22;q22)$ , LMA con  $inv(16)(p13;q22)$  o  $t(16;16)(p13;q22)$  y leucemia promielocítica aguda (LPA) con  $t(15;17)(q22;q12)$ , la anomalía genética es suficiente para el diagnóstico de LMA, independientemente del porcentaje de blastos en la SP o en la MO; 2) LMA con cambios relacionados con mielodisplasia; 3) Neoplasias mieloides relacionadas con terapia; 4) LMA no especificada de otro modo: contiene las mismas que la clasificación del 2001, excepto por el sarcoma mieloide y la panmielosis aguda con mielofibrosis, que fueron eliminados de esta categoría; 5) Sarcoma mieloide; 6) Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down; 7) Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas. Las dos últimas son nuevas categorías.

A partir de la publicación de esta edición de la clasificación, se ha apreciado más ampliamente que múltiples lesiones genéticas, que incluyen no solo reordenamientos cromosómicos detectables microscópicamente o anomalías numéricas, sino también mutaciones genéticas submicroscópicas, cooperan para establecer el proceso leucémico e influyen en sus características morfológicas y clínicas<sup>17</sup>.

La revisión del 2016 de la clasificación OMS de las neoplasias mieloides y leucemias agudas agregó nuevas entidades,

ya que hubo numerosos avances en la identificación de biomarcadores únicos, asociados con estas patologías, en gran parte derivados del análisis de la expresión génica y de la secuenciación de nueva generación, los cuales también podían mejorar significativamente los criterios de diagnóstico, así como el pronóstico de las entidades incluidas hasta ese momento en la clasificación OMS. Esta revisión reflejó, según sus autores, un consenso de opinión de hematopatólogos, hematólogos, oncólogos y genetistas<sup>18</sup>. Esta edición contiene básicamente las mismas categorías de la clasificación del 2008. Define seis entidades patológicas principales: LMA con anomalías genéticas recurrentes; LMA con características relacionadas con la mielodisplasia; LMA relacionada con la terapia; LMA no especificada de otro modo; sarcoma mieloide y proliferación mieloide relacionada con el síndrome de Down, y excluyó del grupo LMA a la neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas. Entre los casos de LMA con anomalías genéticas recurrentes, se describieron 11 subtipos, según distintas translocaciones cromosómicas, entre los cuales se incluyeron dos nuevas categorías provisionales: LMA con *BCR-ABL1*, y LMA con *RUNX1* mutado. Para enfatizar la importancia de la fusión *PML-RARA*, que puede ser críptica o resultar de reordenamientos citogenéticos complejos distintos de la  $t(15;17)(q24.1;q21.2)$ , la LPA con esta fusión se renombró como *LPA con PML-RARA*<sup>18</sup>.

Con respecto a la LMA no especificada de otro modo, se mantienen las subcategorías con un solo cambio, ya que la leucemia eritroide aguda tipo eritroide/mieloide se eliminó definitivamente. En la nueva clasificación, los mieloblastos siempre se cuentan como un porcentaje del total de células de la MO, y la mayoría de esos casos tenía menos del 20% de blastos. De esta manera, desde la revisión del 2016, se clasificaron como SMD (generalmente SMD con exceso de blastos)<sup>18</sup>.

Las proliferaciones mieloides del síndrome de Down incluyen la mielopoyesis anormal transitoria (MAT) y la leucemia mieloide asociada con el síndrome de Down. Ambas suelen ser proliferaciones megacarioblásticas; la MAT ocurre al nacer o dentro de los días posteriores al nacimiento y se resuelve en el lapso de 1 a 2 meses, mientras que la leucemia mieloide ocurre más tarde, generalmente en los primeros 3 años de vida con o sin MAT previa y será persistente, si no se trata. Ambas patologías se caracterizan por mutaciones en *GATA1* y mutaciones de la vía *JAK-STAT*<sup>19</sup>.

En la quinta edición de la clasificación OMS, publicada en el año 2022, siempre que fue posible, se aplicó sistemáticamente una tríada de atributos que incluyó: linaje + atributo clínico dominante + atributo biológico dominante. La atribución del linaje se basa en el inmunofenotipo obtenido con citometría de flujo y/o inmunohistoquímica. Los atributos clínicos dominantes son características generales de la enfermedad no tratada e incluyen descriptores como *aguda*, *crónico*, *citopenia(s)* (mielodisplasia) y *citosis* (mieloproliferación). La mayoría de los atributos biológicos incluyen fusiones de genes, reordenamientos y mutaciones. Las entidades emergentes se enumeraron como subtipos de enfermedades bajo la nueva rúbrica de *otras alteraciones*

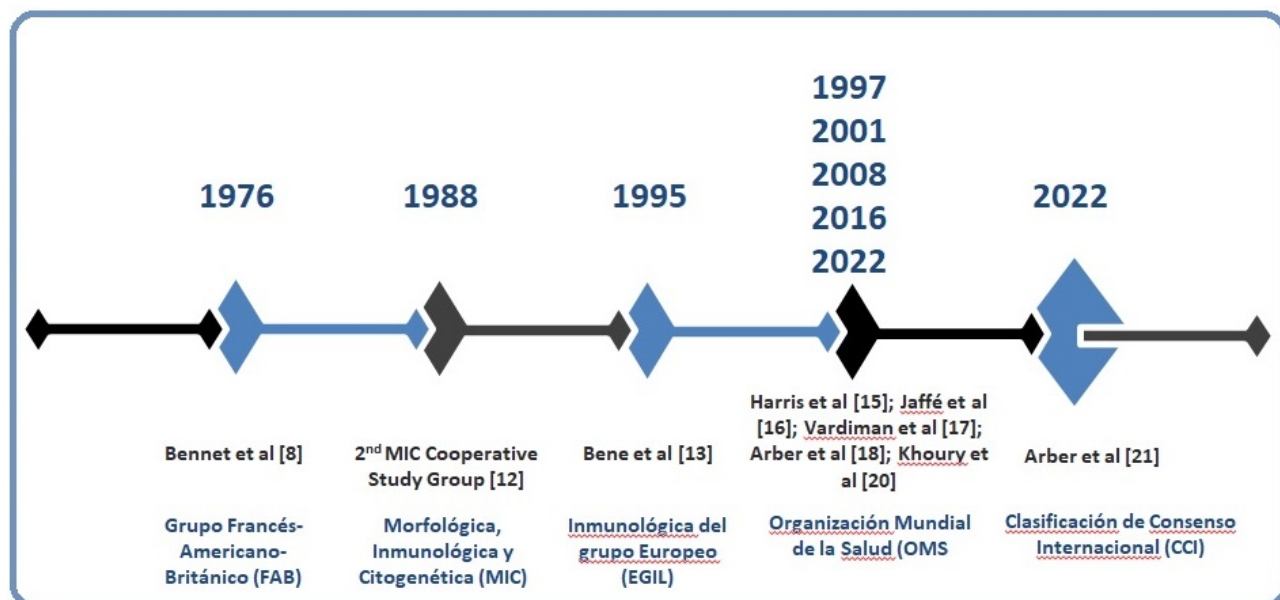
*genéticas definidas*. Lo más importante es la separación de la LMA en 2 familias: LMA con anomalías genéticas que las definen o definitorias y LMA definidas por diferenciación. La última reemplaza a la categoría *LMA no especificada de otro modo*, e incluye las ocho LMA previamente contenidas en este grupo. La categoría LMA con anomalías genéticas definitorias incluyó 12 entidades bien definidas, entre las que se encuentra la LMA relacionada con mielodisplasia, y una categoría LMA con otras alteraciones genéticas definidas para subtipos de LMA nuevos y/o poco comunes, que pueden (o no) convertirse en tipos definidos en futuras ediciones de la clasificación. En este grupo, se eliminó el requerimiento de 20% o más de blastos, excepto para LMA con fusión *BCR::ABL1* y LMA con mutación en el gen *CEBPA*. El sarcoma mieloide se mantiene como una entidad separada y representa una manifestación tisular única de LMA<sup>20</sup>.

A pesar de que la OMS siempre ha buscado el consenso de expertos, al momento de revisar la clasificación, se observa que este objetivo no se ha logrado en esta oportunidad, ya que otro grupo de especialistas publicó, también en el año 2022, una clasificación de consenso. Sus autores manifiestan que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer careció de supervisión por parte de la Sociedad de Hematopatología y la Asociación Europea de Hematopatología, y que no siguió un proceso de asesoramiento con los comités de asesoramiento clínico (CAC) compuestos por patólogos, hematólogos, oncólogos y genetistas. Esta nueva clasificación representa una revisión importante de las clasificaciones anteriores e incluye a numerosos autores de las ediciones anteriores de la OMS, pero ya no está afiliada a la OMS<sup>21</sup>.

### Clasificación del Consenso Internacional (CCI) de Neoplasias Mieloides y Leucemias Agudas

La CCI es una revisión de las clasificaciones del 2008 y 2016 de la OMS. Según los autores, el objetivo principal del proceso de consenso fue la definición de entidades de enfermedades reales, incluida la introducción de nuevas entidades y de criterios refinados para las categorías de diagnóstico existentes, con base en los datos acumulados. La CCI tiene el propósito de facilitar el diagnóstico y pronóstico de estas neoplasias, mejorar el tratamiento de los pacientes afectados y permitir el diseño de ensayos clínicos innovadores.

La CCI propone un requisito de 10% o más de blastos para el diagnóstico de 12 LMA con anomalías genéticas bien definidas, mientras que mantiene el límite de 20% o más de blastos para LMA con  $t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL$ ; LMA con *TP53* mutado; LMA con anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia; LMA con mutaciones genéticas relacionadas con mielodisplasia y LMA no especificada de otro modo. Se eliminaron 2 de las categorías anteriores: neoplasias mieloides relacionadas con la terapia y LMA con cambios relacionados con mielodisplasia. Los casos de SMD con 10% a 19% de blastos ahora se diagnostican como SMD/LMA. El sarcoma mieloide, las proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down y la neoplasia de células dendríticas plasmocitoides

**Figura 1.** Clasificaciones de la leucemia mieloide aguda a través del tiempo.

blásticas permanecen como tales en la CCI<sup>21</sup>.

El grupo European LeukemiaNet (ELN) publicó en 2022 recomendaciones sobre el diagnóstico y manejo de la LMA en adultos basándose en la CCI. El documento afirma que, debido al impacto primordial sobre el fenotipo y el resultado de la enfermedad, se dio prioridad a las aberraciones genéticas al definir la clasificación de la LMA con características predisponentes adicionales (relacionadas con la terapia, SMD previo o SMD/neoplasia mieloproliferativa (NMP), predisposición de la línea germinal) que fueron anexadas como calificadores del diagnóstico primario.

La descripción de la CCI resulta mucho más comprensible, ya que define 2 grupos de LMA<sup>22</sup>: 1) LMA con anomalías genéticas recurrentes (que requieren  $\geq 10\%$  de blastos en MO o SP): incluye 10 entidades; 2) Categorías designadas LMA (si tienen  $\geq 20\%$  de blastos en MO o SP) o SMD/LMA (si tienen 10 - 19% de blastos en MO o SP): LMA con TP53 mutado, LMA con mutaciones genéticas relacionadas con mielodisplasia, LMA con anomalías genéticas relacionadas con mielodisplasia y LMA no especificada de otro modo.

#### Las nuevas clasificaciones de la LMA: un desafío para la toma de decisiones en la práctica clínica

Varias clasificaciones de la LMA se han sucedido a lo largo del tiempo y todas ellas han usado los recursos diagnósticos disponibles en el momento de formularlas (Figura 1). A medida que la tecnología fue evolucionando, también lo hizo el modo de clasificar las LMA considerando cada vez más importantes los estudios citogenéticos y moleculares. Las nuevas clasificaciones de 2022 (OMS y CCI) amplían las anomalías genéticas que definen grupos específicos de LMA. NPM1 ahora es reconocida por la OMS y la CCI como una mutación definitoria de LMA, y la LMA con *BCR::ABL1* fue agregada formalmente como una le-

sión definitoria de LMA. La diferencia fundamental entre ambas clasificaciones es que emplean distintos límites de porcentaje de blastos para definir la LMA en ciertas situaciones.

La estructura de la clasificación OMS contiene 2 grupos, mientras que la CCI propone un diagnóstico en orden jerárquico. La definición de LMA con cambios relacionados con mielodisplasia no se incluyó en ninguno de los sistemas de clasificación, pero tanto la OMS como la CCI introdujeron categorías con anomalías moleculares y citogenéticas que definen la ontogenia secundaria funcional y están asociadas con un mal pronóstico<sup>23</sup>.

La Subcomisión de Leucemias Agudas de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH) anexó ambas clasificaciones a las guías de la SAH. En el anexo, se advierte que existen puntos de controversia entre las clasificaciones de la OMS y CCI. Sin embargo, se destaca que ambas resaltan la importancia del estudio molecular incluyendo paneles multigénicos para el diagnóstico y pronóstico de esta patología<sup>24</sup>.

Si bien los avances en el diagnóstico de la LMA podrían ayudar a optimizar la mejor terapia para cada subgrupo, estos dos nuevos sistemas de clasificación desafían a los profesionales de la salud que se ven en la encrucijada de adoptar una de ellas. No obstante, seguirá siendo responsabilidad del médico tratante integrar todos los datos para llegar a una decisión terapéutica<sup>23</sup>.

#### Conclusiones

Casi doscientos años después de la primera descripción de la leucemia, la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas sigue siendo necesaria para mejorar la supervivencia de los pacientes que la padecen. Durante la última década, el avance significativo en el perfilado genómico de la LMA ha resultado en oportunidades interesantes para crear terapias dirigidas, defi-

nidas genómicamente para pacientes con LMA. Algunas de las terapias, como los inhibidores de *FLT3* y los inhibidores de isocitrato deshidrogenasa (IDH) 1 y 2, se han probado en ensayos clínicos y ahora son el estándar de atención en pacientes que albergan estas mutaciones<sup>25</sup>.

Es necesario reflexionar sobre el hecho de que, a medida que el diagnóstico y la clasificación de la leucemia dependen cada vez más de investigaciones sofisticadas y costosas, existe el riesgo de que algunos países con menos recursos se queden atrás. En un artículo reciente, el análisis citogenético estuvo disponible solo en un 30% de los pacientes<sup>26</sup>. La Dra. Bárbara Bain, consciente de este problema, incorporó como apéndice algunas sugerencias sobre cómo se puede diagnosticar la leucemia en laboratorios de escasos recursos. Entre sus recomendaciones, señaló que puede resultar útil la asociación entre centros especializados y centros periféricos dentro del mismo país o países limítrofes. En ausencia de técnicas citogenéticas y moleculares, como no es posible aplicar completamente cualquiera de las clasificaciones actuales de LMA, con el uso de la citomorfología y la citoquímica, los casos aún podrán ser diagnosticados y clasificados según la clasificación FAB<sup>27</sup>.

Sin duda alguna, para la elección de la mejor terapia, se necesita el mejor y más rápido diagnóstico, así como una correcta clasificación que permita definir el tratamiento y estratificar el riesgo. El hecho de que, en el ámbito internacional, los especialistas no hayan logrado un consenso atenta contra este objetivo. Por lo tanto, alcanzar el acuerdo internacional de los expertos sería beneficioso para los profesionales de salud que participan del manejo de la LMA y, sobre todo, para el paciente que la padece.

## Referencias bibliográficas

- Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res* 2012; 36(1): 6-13. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.09.028.
- Merino A. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Rev Lab Clin* 2010; 3(3): 139-47. DOI: 10.1016/j.labcli.2010.05.002.
- Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015; 373(12): 1136-52. DOI: 10.1056/NEJMra1406184.
- De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J* 2016; 6(7): e441. DOI: 10.1038/bcj.2016.50.
- Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol* 2001; 112(2): 282-92. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02411.x.
- Ortiz-Hidalgo C. Notas sobre la historia de la leucemia. *Patología Rev latinoamericana* 2013; 51(1): 58-69.
- Organización Mundial de la Salud. Clasificación internacional de enfermedades. Manual de la clasificación estadística internacional de enfermedades, traumatismos y causas de defunción. Volumen 1. Ginebra, 1968.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33(4): 451-8. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103(4): 620-5. DOI: 10.7326/0003-4819-103-4-620.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103(3): 460-2. DOI: 10.7326/0003-4819-103-3-460.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol* 1991; 78(3): 325-9. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1991.tb04444.x.
- Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, September 15-17, 1986. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 30(1): 1-15.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9(10): 1783-6.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100(7): 2292-302. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1199.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17(12): 3835-49. DOI: 10.1200/JCO.1999.17.12.3835.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114(5): 937-51. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127(20): 2391-405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet* 2013; 45(11): 1293-9. DOI: 10.1038/ng.2759.
- Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7): 1703-19. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022; 140(11): 1200-28. DOI: 10.1182/blood.2022015850.
- Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022; 140(12): 1345-77. DOI: 10.1182/blood.2022016867.
- Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2023; 98(3): 502-26. DOI: 10.1002/ajh.26822.
- Sociedad Argentina de Hematología. Leucemias agudas. Anexo Leucemia mieloide aguda. Actualización a noviembre 2022. Disponible en: <http://www.sah.org.ar/docs/guias/2022/Leucemias-agudas.pdf> [Consultado el 27/05/2023]
- Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013) 2020; 103(3): 38-40.
- Haro C, Casas Silva MJ, Agüero Aguilera AC, Terán MM, Ledesma Achem ME, Mónaco ME, et al. Expresión de genes involucrados en el estrés oxidativo e inflamación en neoplasias hematológicas. *Bioq y Patol Clin* 2020; 84(1): 31-8.
- Bain B. *Leukaemia Diagnosis*. 4th edition. Singapur: John Wiley & Sons, Ltd., Publication; 2010.



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY NC SA). Permite compartir 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

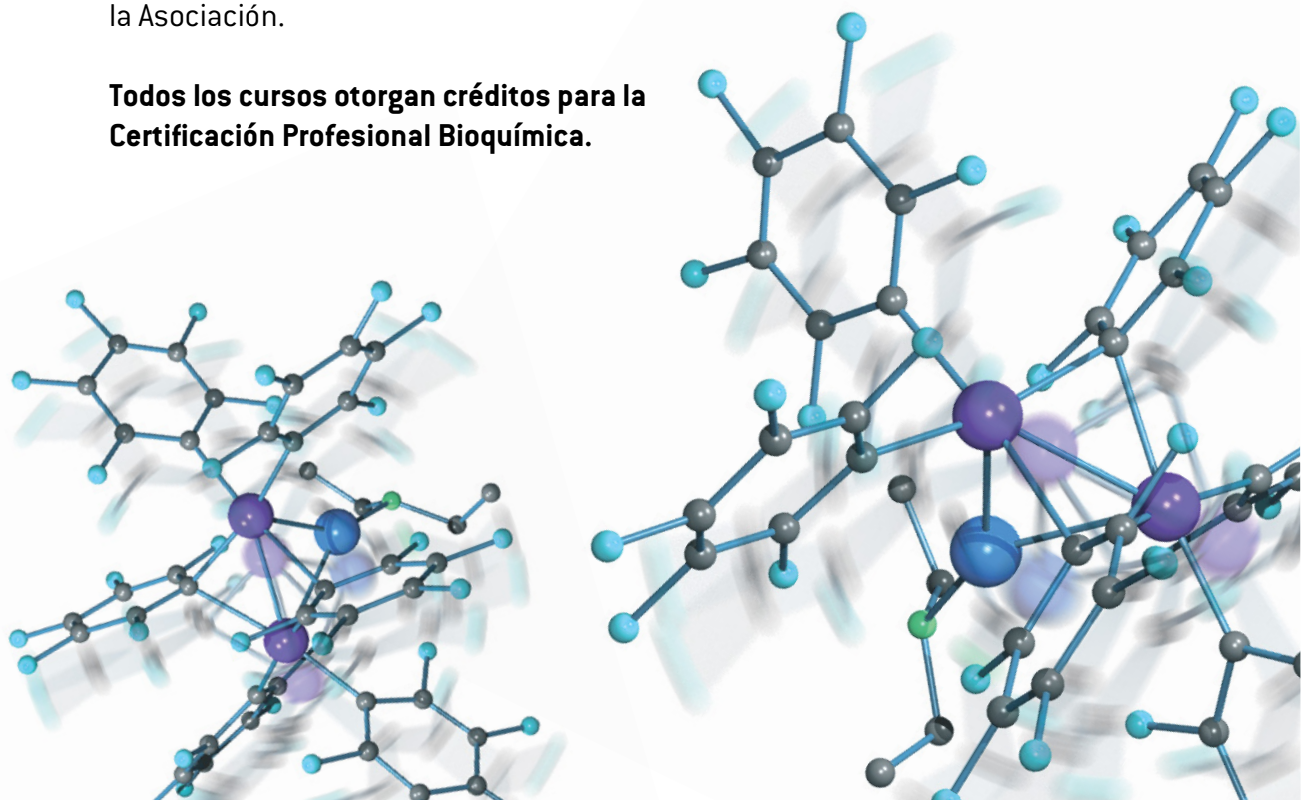
Tel: (011) 4381-2907 Telefax: (011) 4384-7415 - De 15 a 19 Hs.

**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.**



**PROGRAMA DE EVALUACIÓN CONTÍNUA  
ABA 2024**

**SEGUNDO CUATRIMESTRE**

	NOMBRE DEL CURSO	DURACIÓN	DIRECTOR/A
1	ACTUALIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE LAS DISPROTEINEMIAS	SEMESTRAL	Dra. Isabel Desimone Dra. Isabel Crispiani
2	CURSO DE NEUROINMUNOLOGÍA	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvia G. Ramos Dr. Andrés Villa Dr. Gabriel Carballo
3	APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA	CUATRIMESTRAL	Dra. Emilse Bermejo Dra. Viviana Novoa
4	CURSO INTEGRAL SOBRE LÍQUIDOS DE PUNCIÓN con Tópicos de Urgencia	CUATRIMESTRAL	Dr. Luis Palaoro
5	INMUNOLOGIA CELULAR EL LABORATORIO EN EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE Y SUS PATOLOGÍAS	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Novoa
6	“CALIDAD EN LABORATORIOS DE GENÉTICA FORENSE” (NUEVO)	CUATRIMESTRAL	Bioq. Claudia García Bonelli Bioq. Esp. César Collino
7	EL ROL DEL LABORATORIO EN LA SEGURIDAD DEL PACIENTE (ACTUALIZADO)	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvana Daverio Dra. Karina Fiezzoni

## 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.