

Revista

bi**análisis**

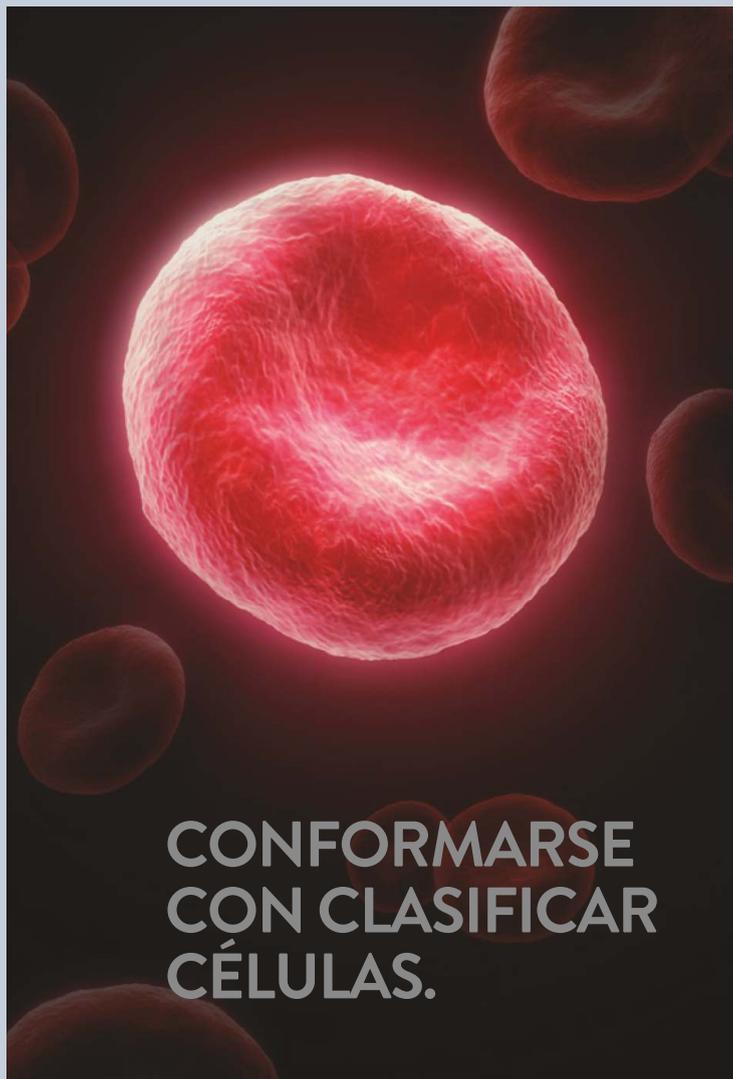
Año 14 - Número 81

Mayo - Junio 2018

www.revistabioanalisis.com

**Bases moleculares
de la resistencia a meticilina
en *Staphylococcus aureus***





CONFORMARSE
CON CLASIFICAR
CÉLULAS.



O VER LA
INSPIRACIÓN
EN ACCIÓN.

Simplemente con un proveedor, su diagnóstico no podrá entregar más que resultados de examen. En Abbott Diagnostics, le ayudamos a cumplir con los compromisos clínicos y financieros que ha realizado a toda su institución. Analizamos todo el sistema hospitalario desde la recepción de la muestra hasta los resultados clínicos de los pacientes – conduciendo a la toma de decisiones médicas y económicas más inteligentes a través de la continuidad de la atención. Por eso, esta es una elección que puede transformar las decisiones que Usted toma con cada médico y cada paciente en su institución.

CHOOSE TRANSFORMATION

Abbott Laboratories Argentina S.A.

Ing. Butty 240 P.12

011-5776-7200

CORE LAB TRANSFUSION MOLECULAR POINT OF CARE INFORMATICS

Abbott

Analizadores de hemostasia

Confianza, conveniencia, y eficiencia en costos

Soluciones para cada laboratorio.



Sistema BFT II



Sysmex® CA-600 series



Sysmex® CS-2500



Sistema BCS® XP

La línea completa de analizadores de hemostasia de Siemens Healthineers cubre con las necesidades de todo tipo de laboratorio, permitiendo automatizar los procesos y obteniendo una mayor calidad y productividad al minimizar el margen de error.

Simplicidad. Control. Mejores resultados.

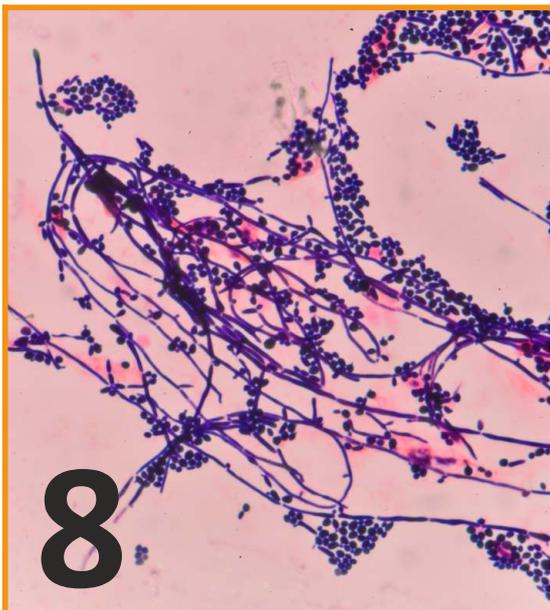
Editorial

En esta nueva edición de la Revista Bioanálisis les compartimos información de interés y actualizada sobre diferentes temas del área de la Bioquímica.

En primer lugar, les traemos una revisión de los aspectos más importantes del *S. aureus*, entre ellos podemos destacar los mecanismos moleculares más relevantes que determinan la resistencia a meticilina, las distintas estructuras genéticas en las que puede residir el gen responsable y su mecanismo de regulación. También incluimos un trabajo de la Bioq. Mónica Guinzburg del Área Endocrinología de laboratorios MANLAB que nos presenta un estudio en el que destacan la importancia de la Hormona Antimülleriana como biomarcador testicular. Además incluimos un artículo donde evalúan una prueba de biología molecular para la identificación del *Mycobacterium tuberculosis* y la sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea. Asimismo les hacemos llegar una revisión con nuevas determinaciones de laboratorio y los estudios necesarios para un correcto diagnóstico del paciente con anemia macrocítica. También le presentamos un trabajo donde evalúan los métodos que se utilizan para el diagnóstico de la Toxoplasmosis congénita en los neonatos nacidos de madres que cursaron una infección aguda durante el embarazo. Además incluimos un artículo sobre biotecnología, en el cual describen la producción heteróloga y la caracterización bioquímica del procoagulante humano Factor VIII y su uso en los trastornos cardiovasculares. Por último les acercamos una editorial del Dr. Gamba - Bernal sobre los nuevos paradigmas de la edición de genes y los problemas bioéticos que pueden traer las nuevas tecnologías.

Dr. Gerardo De Blas
Director de Contenidos
gdeblas@revistabioanalisis.com

Sumario



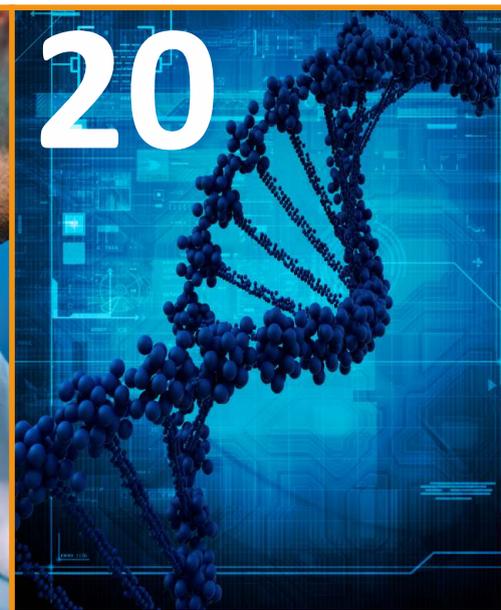
Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*

Desde hace mucho tiempo *Staphylococcus aureus* ha sido relevante en una amplia variedad de cuadros clínicos. Con el uso masivo de las penicilinas se fueron seleccionando gradualmente cepas resistentes a los distintos antimicrobianos con actividad antiestafilocócica. En el siguiente artículo revisan además de los aspectos históricos más importantes del *S. aureus*, los mecanismos moleculares más relevantes que determinan la resistencia a meticilina, las distintas estructuras genéticas en las que puede residir el gen responsable de ésta y, finalmente, su mecanismo...



Hormona Antimülleriana: Biomarcador Testicular

La hormona antimülleriana es una glicoproteína homodimérica que pertenece a la familia de los factores de crecimiento transformantes beta (TGF β). La encontramos en altas concentraciones en el feto masculino, durante la infancia y va disminuyendo cuando el niño llega a la pubertad. Se denominó así porque su función principal es inducir la regresión de los conductos de Müller durante la diferenciación sexual en las semanas 8-10 del desarrollo embrionario. A continuación, el Área de Endocrinología de MANLAB nos presenta un estudio en el que destacan la importancia de esta hormona como biomarcador testicular.



Evaluación de una prueba de biología molecular para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea en un hospital de alta complejidad

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tuberculosis es una enfermedad infecciosa con alta morbilidad y mortalidad, se estima que un tercio de la población mundial está infectada. El proceso de diagnóstico de la tuberculosis requiere de una evaluación clínica y ayudas diagnósticas complementarias. En el siguiente trabajo evalúan una prueba de biología molecular...

Además...

Pág. 54: La edición de genes a estudio:

Los problemas bioéticos que puede tener esta nueva tecnología

Pág. 58: Agenda de Cursos y Congresos

Pág. 62: Bioagenda de Empresas por rubro



Pruebas bioquímicas para el diagnóstico de anemia megaloblástica*

Las anemias macrocíticas se pueden clasificar en dos subtipos: las megaloblásticas y las no megaloblásticas. Entre las causas comunes de la anemia macrocítica megaloblástica se encuentra la deficiencia de Vitamina B12 y Folato, mientras que para la anemia macrocítica no megaloblástica, la causa más frecuente es la presencia de cuadros hemolíticos, hemorragias abundantes o el consumo crónico de alcohol. A continuación le presentamos una revisión con las nuevas determinaciones de laboratorio y cuales son los estudios necesarios para un correcto diagnóstico del paciente con anemia...

Toxoplasmosis congénita: Diagnóstico serológico, RPC, aislamiento y caracterización molecular de *Toxoplasma gondii*

El diagnóstico de la toxoplasmosis congénita (TC) en el recién nacido es muy importante para aminorar las secuelas de la enfermedad. En el siguiente estudio evalúan los métodos utilizados para el diagnóstico de TC en los neonatos nacidos de madres que cursaron una infección aguda durante el embarazo.

Producción heteróloga y caracterización bioquímica del procoagulante humano Factor VIII para ensayos de cristalización de macromoléculas proteicas

Las enfermedades cardiovasculares son la causa principal de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y en vías de desarrollo. Entre las manifestaciones clínicas más frecuente y dañinas podemos destacar la isquemia cardíaca y la enfermedad cerebrovascular, destacando la formación de coágulos sanguíneos (trombos) como el evento más común.



NUEVAS TECNOLOGÍAS

COBAS 6800 / MISEQ / SECUENCIADOR ABI3500
CENTAUR XPT / COBAS 502-602 / VICTOR 2D



20 MÓVILES
PROPIOS



ISO 9001:2015

ETAPA PREANALÍTICA /
ANALÍTICA / POSTANALÍTICA



SEGUIMIENTO EN TIEMPO REAL

EL ESTADO DE SUS
MUESTRAS EN CADA ETAPA

- Solicitado ●
- En proceso ●
- Finalizado ●



18 RECORRIDAS

VISITAS DIARIAS Y SEMANALES



CONVENIOS INTERNACIONALES

MAYO CLINIC, BAYLOR
MYRIAD, CENTOGENE



ASESORAMIENTO

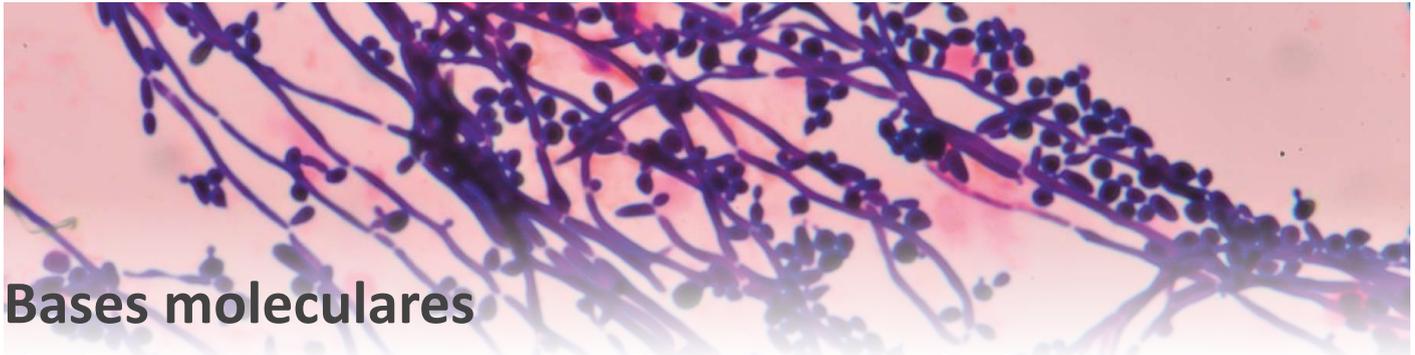
BIOQUÍMICO PERSONALIZADO / CALL CENTER

45 AÑOS TRABAJANDO JUNTOS



MANLAB[®]

Diagnóstico Bioquímico y Genómico



Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*

 25 min.



Desde hace mucho tiempo *Staphylococcus aureus* ha sido relevante en una amplia variedad de cuadros clínicos. Con el uso masivo de las penicilinas se fueron seleccionando gradualmente cepas resistentes a los distintos antimicrobianos con actividad antiestafilocócica. En el siguiente artículo revisan además de los aspectos históricos más importantes del *S. aureus*, los mecanismos moleculares más relevantes que determinan la resistencia a meticilina, las distintas estructuras genéticas en las que puede residir el gen responsable de ésta y, finalmente, su mecanismo de regulación.



8Alejandro Aguayo-Reyes, Mario Quezada-Aguiluz, Sergio Mella, Gisela Riedel, Andrés Opazo-Capurro, Helia Bello-Toledo, Mariana Domínguez y Gerardo González-Rocha

Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (AA-R, MQ-A, AO-C, HB-T, MD, GG-R).

Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna (AA-R, SM, GR) y Unidad de Infectología, Hospital Regional "Dr. Guillermo Grant Benavente", Concepción, Chile (SM, GR).

Sergio Mella M. ha recibido honorarios como conferencista de Laboratorios Pfizer y MSD. Los otros autores no tienen conflictos de interés. Parte del trabajo fue financiado por el Proyecto Postdoctorado FONDECYT N° 3150286.

Recibido: 24 de julio de 2017 Aceptado: 18 de diciembre de 2017

Correspondencia a: Gerardo González-Rocha: ggonzal@udec.cl



Resumen

Desde el inicio de la era antimicrobiana se han ido seleccionando gradualmente cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos de amplio uso clínico. Es así como en 1960 se describen en Inglaterra las primeras cepas resistentes a meticilina, y algunos años después son informadas en hospitales de Chile. Actualmente, *S. aureus* resistente a penicilinas antiestafilocócicas es endémico en los hospitales de nuestro país y del mundo, siendo responsable de una alta morbimortalidad. La resistencia es mediada habitualmente por la síntesis de una nueva transpeptidasa, denominada PBP2a o PBP2' que posee menos afinidad por el β -lactámico, y es la que mantiene la síntesis de peptidoglicano en presencia del antimicrobiano. Esta nueva enzima se encuentra codificada en el gen *mecA*, a su vez inserto en una *cassette* cromosomal con estructura de isla genómica, de los cuales existen varios tipos y subtipos. La resistencia a meticilina se encuentra regulada, principalmente, por un mecanismo de inducción de la expresión del gen en presencia del β -lactámico, a través de un receptor de membrana y un represor de la expresión. Si bien se han descrito mecanismos generadores de resistencia a meticilina *mec* independientes, son categóricamente menos frecuentes.

Introducción

Históricamente, *Staphylococcus aureus* ha tenido un rol protagónico en una amplia variedad de cuadros clínicos, tales como infecciones de piel y tejidos blandos, neumonías, endocarditis, infecciones del torrente sanguíneo y osteomielitis, entre otros (1). Tras la masificación del uso de penicilina se fueron seleccionando progresivamente cepas resistentes a antimicrobianos con actividad antiestafilocócica (2), lo que ha complejizado el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno.

En 1960 en Guildford (Inglaterra) se describió el primer aislado de *S. aureus* resistente a meticilina (3) (SARM), que correspondía a la primera penicilina resistente a penicilinas que, por lo demás, había sido recientemente introducida al arsenal terapéutico. Esto marcó el inicio de la descripción de este patógeno a nivel global (4), siendo responsable, gradualmente de una gran carga de morbimortalidad en todo el mundo. En Chile, Ledermann (1970) (5) objetivó la progresiva disminución de la susceptibilidad a meticilina de *S. aureus* en la década de 1960, además de identificar una cepa aislada en 1967 con concentración inhibitoria mínima (CIM) de meticilina mayor a 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y catalogada como resistente. Sin embargo, no es hasta la década de 1980 en que realmente SARM comenzó a cobrar mayor relevancia en nuestro país (6).

Si bien en Chile se han descrito otras cepas estafilocócicas relevantes desde un punto de vista epidemiológico, tal como fue el primer aislado de *S. aureus* heteroresistente a vancomicina en 2015 (7), es

SARM el verdadero protagonista de nuestra práctica clínica habitual. Por otro lado, las cefalosporinas de 5ª generación han surgido como una nueva alternativa terapéutica aprobada por las agencias reguladoras correspondientes, contra algunas infecciones por SARM, y conocer los mecanismos moleculares que determinan la resistencia a metilina ayuda a comprender mejor el funcionamiento de esta clase de antimicrobianos, que esperamos, estén pronto a disposición de los médicos clínicos.

En este artículo de revisión se abordarán los aspectos históricos más importantes de *S. aureus* en la era antimicrobiana, los mecanismos moleculares más relevantes que determinan la resistencia a metilina, las distintas estructuras genéticas en las que puede residir el gen responsable de ésta y, finalmente, su mecanismo de regulación.

Staphylococcus aureus en la era antimicrobiana

Desde la introducción de la penicilina en 1928, y principalmente tras la masificación de su uso en la década de 1940, se fueron seleccionando gradualmente cepas resistentes a los distintos antibacterianos con actividad antiestafilocócica (2). En 1944 ya se describía resistencia a penicilina, mediada por un mecanismo enzimático, específicamente una β -lactamasa con actividad de penicilinasas codificada en el gen *bla₂* y ubicado en un plásmido, capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico y con esto inactivar el antimicrobiano (8). En un comienzo, la resistencia a penicilina estuvo limitada a los hospitales, pero en la década de 1950 ya había evidencia de diseminación global (2).

En este contexto, en 1959 surge la primera penicilina sintética resistente a la penicilinasas producida por *S. aureus*, metilina. Esta molécula se convirtió en la precursora del conocido grupo de las

penicilinas antiestafilocócicas, cuyas modificaciones químicas permitieron resistir la acción de esta β -lactamasa. Específicamente, metilina posee un mayor tamaño molecular que penicilina, a expensas del grupo dimetoxibenzoil añadido al ácido 6-aminopenicilánico (como radical R1), lo que confiere resistencia a la acción hidrolítica de la penicilinasas por impedimento estérico (9). La penicilina antiestafilocócica más usada en Chile es cloxacilina, que si bien químicamente es una isoxazolil-penicilina, es comparable a metilina al ser una molécula químicamente más voluminosa a expensas, en este caso, del radical isoxazolil (10)(Figura 1).

Transcurrido apenas un año desde la introducción de metilina al uso clínico, se describió en Inglaterra, en 1960, el primer *S. aureus* resistente a dicho antimicrobiano, mediado por un mecanismo independiente de la hidrólisis enzimática y que confería resistencia a todos los β -lactámicos (3). Sólo con el paso de los años se pudo dilucidar el gen responsable y la estructura genética que lo



Análisis Multidisciplinarios de Alta Complejidad de Bahía Blanca para todo el país

- Clínico Humano
- Bromatológico
- Veterinario
- Agronómico
- Bioanalítica
- Industrial y Medio Ambiente



FUN. BIOQUÍM. ARGENTINA
Acreditado Mat. N° 00021

Asociación Laboratorios
de Alta Complejidad

portaba. Esta nueva ventaja evolutiva permitió a SARM diseminarse por todo el mundo (4), en un principio eminentemente a nivel hospitalario, en pacientes que compartían algunos factores de riesgo, tales como estadía en unidades de cuidados intensivos, haber sido sometidos a procedimientos invasores, ser pacientes en diálisis o portadores de dispositivos médicos (11).

No obstante, en la década de 1990 comienza la descripción de casos genuinos de infecciones por SARM, pero de adquisición comunitaria y sin los factores de riesgo anteriormente descritos. La alarma se dio en Australia occidental, específicamente en población aborigen que no tenía contacto estrecho con centros médicos y que vivía en zonas relativamente aisladas (12). Posteriormente, el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) de Atlanta, Estados Unidos de América (E.U.A.), comunicó la muerte de cuatro niños sanos a causa de sepsis o neumonía necrosante por SARM adquiridos en la comunidad, ocurridas en el período 1997-99 (13). Esto marcó el inicio de la diseminación de este patógeno comunitario a nivel global (14). De hecho, en 2005 se publicó el primer caso en Sudamérica (15) y en 2008 en Chile (16). Es necesario aclarar en este punto que, si bien la resistencia a meticilina se ha informado en infecciones comunitarias en nuestro país, estos casos representan una minoría en comparación a los causados por cepas susceptibles a penicilinas antiestafilocócicas (habitualmente cloxacilina como ya se mencionó), por lo que el problema de la resistencia en Chile se concentra de forma prevalente a nivel hospitalario.

Sin lugar a duda, *S. aureus* es la bacteria patógena grampositiva más relevante al que los médicos clínicos se enfrentan en la práctica infectológica habitual. Es así como el Ministerio de Salud, en su último informe de vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), cataloga a la etiología estafilocócica como la más frecuente en una diversidad de entidades, tales como infección de sitio quirúrgico (de distintas localizaciones anatómicas), infección del torrente sanguíneo y neumonía asociada a ventilación mecánica, entre otros (17). Por otro lado, el Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana de la Sociedad Chilena de Infectología, en su último informe de susceptibilidad antimicrobiana de nuestro país, informa susceptibilidad a cloxacilina en apenas 51% de los aislados en población adulta (18), lo que convierte a SARM en un microorganismo muy frecuente en los hospitales de Chile.



Figura 1. Estructura química de penicilina, meticilina y cloxacilina. Meticilina y cloxacilina son moléculas más voluminosas a expensas del radical R1 y, por lo tanto, resistentes a la penicilinasa producida por

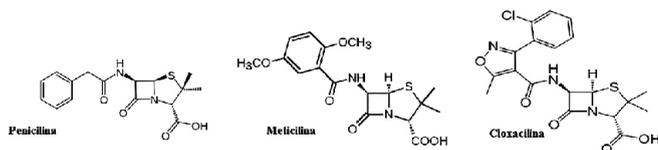
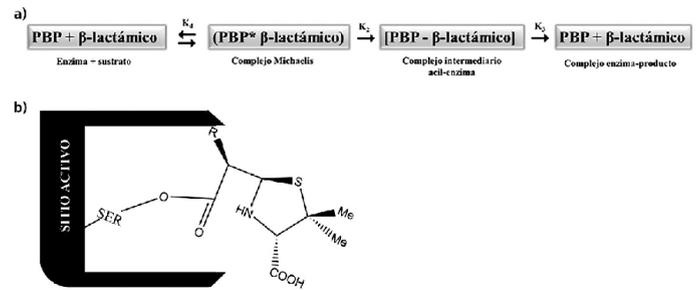


Figura 2. a) Esquema de la cinética de inactivación de la PBP por el β -

lactámico. **b)** Formación del complejo acil-enzima entre la serina nucleofílica del sitio activo de la PBP y el β -lactámico. En cepas susceptibles el antimicrobiano se une en forma irreversible a la PBP.



Proteínas fijadoras de penicilina en *S. aureus* resistente a meticilina

Es necesario recordar que la proteína blanco de acción de los β -lactámicos se conoce universalmente como PBP (del inglés *penicillin-binding protein*). Las PBPs corresponden a enzimas, principalmente con función transpeptidasa, que participan en el entrecruzamiento de las hebras de peptidoglicano (PG), específicamente entre las cadenas laterales de naturaleza aminoacídica que están unidas al ácido N-acetilmurámico (19). Con este entrecruzamiento de hebras de PG la bacteria logra resistencia frente a la lisis osmótica. Es precisamente esta etapa de síntesis la que inhibe el β -lactámico (la etapa extracelular), aprovechándose de su homología estructural con el sustrato natural de las PBPs, el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina (20). En otras palabras, la PBP (transpeptidasa) forma un complejo acil-enzima con el β -lactámico y no con el dipéptido (su sustrato natural), intermediario que, por lo demás, es sumamente estable, lo que determina una inhibición irreversible de la PBP (Figura 2a). La estabilidad del complejo acil-enzima entre la PBP y el antimicrobiano viene determinado molecularmente, ya que el anillo β -lactámico ocupa el sitio activo de la enzima e impide que se acomode en éste una molécula aceptora del grupo acilo o una potencial molécula de agua que permita la hidrólisis del complejo (21) (Figura 2b).

Todas las cepas de *S. aureus* poseen cuatro tipos de PBPs: PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4. Las primeras tres tienen función transpeptidasa y corresponden a PBPs de alto peso molecular, siendo PBP2 la única bifuncional, es decir, además posee función transglucosilasa. PBP4 es la única de bajo peso molecular y participa en procesos de división, remodelado y reciclado de PG. Ninguna de estas PBPs nativas tiene regulación alostérica (22).

El mecanismo más importante y frecuente que determina la resistencia a meticilina es la adquisición de una nueva PBP, denominada PBP2a o PBP2' (23), de la cual queremos resaltar dos propiedades distintivas. La primera es la baja afinidad que tiene esta nueva transpeptidasa por el antimicrobiano β -lactámico, lo que está determinado por la configuración de su sitio activo que es menos accesible al antimicrobiano al tener la hendidura más estrecha (24) (Figura 3). Lo anterior determina que con las concentraciones que alcanza el β -lactámico *in vivo* no se forma el intermediario acilenzima entre el antimicrobiano y la PBP2a, por lo que la función de



PORQUE UN DIAGNÓSTICO PRECISO NECESITA RESULTADOS CONFIABLES.

Nuestro laboratorio integral está al servicio del profesional, brindando resultados confiables y asesoramiento en su interpretación, facilitando información precisa para colaborar en el diagnóstico, seguimiento y prevención de las enfermedades.

Nuestro compromiso: brindar un servicio personalizado a través de un equipo de especialistas, cumplir con los más exigentes estándares de calidad, y garantizar confiabilidad y exactitud en los resultados.

/ Biología Molecular / Hematología y Hemostasia / Microbiología / Endocrinología
/ Citometría de Flujo / Inmunoserología / Química Clínica / Virología



Consultar alcance en
www.oaa.org.ar



RIQAS



STAMBOULIAN
LABORATORIO

PLANTA DE LABORATORIO
Av. Scalabrini Ortiz 676

DPTO. COMERCIAL
4858-7061 al 63
laboratorio@stamboulian.com.ar

Centro de Atención Telefónica
2206-6000

www.stamboulian.com.ar

STAMBOULIAN
SERVICIOS DE SALUD

transpeptidación de la enzima se mantiene, permitiendo el entrecruzamiento de hebras de PG (21).

La segunda característica distintiva de la PBP2a es su sitio de regulación alostérico, al que podría unirse PG en formación, lo que favorecería la apertura del sitio activo para dejar mejor posicionado el residuo de serina nucleofílico que participa en la formación del enlace peptídico. Lo anterior tiene bastante lógica, ya que el sitio activo de la PBP sería más accesible sólo en presencia de PG naciente que debe ser transpeptidado (22).

En suma, si una cepa de SARM es expuesta a meticilina o cloxacilina, el antimicrobiano es capaz de inhibir *in vivo* las PBPs nativas de la bacteria (PBP 1-4), pero no logra inhibir a la PBP2a, manteniendo el entrecruzamiento del PG en presencia de cualquier β -lactámico, exceptuando por supuesto, las cefalosporinas de 5^a generación (25).



Figura 3. Esquema comparativo de los dominios transpeptidasa de PBP2 y PBP2a. Destaca la configuración más estrecha del sitio activo de la PBP2a, responsable de la menor afinidad por el β -lactámico.

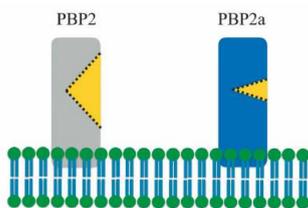


Figura 4. Estructura general del *cassette* cromosomal estafilocócico SCCmec II y IV. Adaptado de Nat Rev Microbiol 2009; 7 (9): 629-41.

SCCmec II



SCCmec IV



La PBP2a se encuentra codificada en el gen *mecA*

Staphylococcus aureus resistente a meticilina posee el gen *mecA*, que codifica la PBP2a, responsable de la resistencia a meticilina. A su vez, este gen se encuentra inserto en una isla genómica, denominada SCCmec, del inglés *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*, un elemento genético móvil (26). Se ha propuesto que este gen podría haber residido inicialmente en especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa, como *S. sciuri* o *S. fleuretti* (ambos relacionados con animales) y desde éstos haberse transferido a *S. aureus* (27).

Existen varios tipos y subtipos de SCCmec, pero todos comparten algunas características (28) que se esquematizan en la Figura 4. Estos

cassettes se integran en el cromosoma junto al gen *orfX*, que codifica para una metiltransferasa ribosomal, y todos poseen un complejo de genes *mec*, compuesto por *mecA* (que codifica la PBP2a) y los genes *mecI* y *mecR* cuyos productos regulan la expresión de la resistencia a meticilina. Adicionalmente, los SCCmec poseen un complejo de genes *ccr*, compuesto por uno o dos genes que codifican recombinasas sitio específicas responsables de la movilidad del *cassette* cromosomal. Otra región importante son las denominadas regiones J (del inglés *joining regions*) que corresponden a componentes no esenciales del *cassette* y que pueden contener genes de resistencia para otras familias de antimicrobianos (macrólidos, lincosamidas y aminoglucósido-aminociclitolos) y para metales pesados. Finalmente, forman parte de esta estructura genética las secuencias repetidas en los extremos, que son reconocidas por las recombinasas para la inserción/ escisión del elemento genético móvil.

Las distintas estructuras genéticas del complejo de genes *mec* y del complejo de genes *ccr* determinan el tipo de SCCmec y, por otro lado, las diferencias en las regiones J determinan los subtipos dentro de un mismo *cassette* cromosomal (29). Tal como se muestra en la Tabla 1, SCCmec I y IV poseen el mismo complejo de genes *mec* clase B (IS1272- Δ *mecR1-mecA-IS431*), pero diferente complejo de genes *ccr*, siendo tipo 1 para SCCmec I y tipo 2 para el SCCmec IV, lo que se basa en la distinta identidad de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las recombinasas. A la fecha se han descrito 11 tipos de *cassettes* cromosomales estafilocócicos (28), los que quedan resumidos en la Tabla 1.

De acuerdo a la epidemiología molecular de SARM, se ha podido determinar que en distintas localizaciones geográficas existe predominancia de distintos SCCmec (28). Es así como el primer SARM descrito en Inglaterra (clon arcaico) poseía el SCCmec I, pero fue desplazado a partir de la década de 1980 por un clon de SARM que poseía el *cassette* cromosomal tipo II (30). Por su parte, en E.U.A. predomina el *cassette* II y IV (2). En Chile, un estudio realizado en Valdivia muestra un claro predominio del SCCmec I a nivel hospitalario (31), lo que es compatible con resultados obtenidos en nuestro laboratorio (32), aunque también identifica cepas portadoras del SCCmec IV. El clon chileno/cordobés ha demostrado gran estabilidad en nuestro país, y es por amplio margen el predominante en los aislados clínicos de pacientes hospitalizados en nuestro territorio. Característicamente posee el SCCmec I, pertenece al ST5 y es susceptible a glucopéptidos, oxazolidinonas, tetraciclinas, rifampicina y cotrimoxazol. Es más, su éxito biológico le había permitido diseminarse por gran parte de Sudamérica; no obstante, el surgimiento de nuevos clones biológicamente más exitosos ha favorecido la predominancia de nuevos linajes en otros países latinoamericanos, tales como el USA 300-LV en Colombia, Ecuador y Venezuela y el ST30-SCCmec IVc, además del ST5-SCCmec IVa en Argentina (33).

El programa de vigilancia de SARM con fenotipo comunitario del Instituto de Salud Pública, si bien incluye la detección de los genes *mecA*, *pvl* (toxina de Pantón-Valentine) y su tipificación por metodologías de macrorestricción, Spa *typing* y MLST, no incluye la identificación del tipo de *cassette* cromosoma.

Es interesante analizar las diferencias en las estructuras genéticas de una *cassette* cromosomal estafilocócico clásicamente hospitalario versus uno comunitario. El primero cuenta con determinantes adicionales de resistencia a otras familias de antibacterianos, configurando un clásico fenotipo de multi-resistencia. Es así como el SCCmec II es una *cassette* más grande que posee el transposón Tn554 en la región J2, el que es responsable de la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B, y además, contiene el plásmido pUB110 integrado en la región J3, que determina resistencia a tobramicina (2). Por otro lado, SCCmec IV es una estructura más simple y que sólo porta el gen de resistencia *mecA*, por lo que habitualmente las cepas que tienen este *cassette* sólo son resistentes a β -lactámicos (34). Es importante mencionar, que la separación entre SARM hospitalarios y comunitarios está poco a poco perdiendo validez, al menos en países con alta prevalencia de ambos patógenos. Lo anterior se debe a la creciente descripción de cepas de SARM clásicamente comunitarias en los hospitales, desplazando a otros clones nosocomiales menos exitosos (35). No obstante, en países con baja prevalencia de SARM de la comunidad la distinción aún podría ser útil. Cabe destacar, que la determinación del SCCmec como único blanco para la detección de resistencia a meticilina no se recomienda, ya que se han descrito elementos que no portan el gen *mecA*, pero contiene otros genes que codifican factores de virulencia o resistencia a otros antimicrobianos y metales pesados (36)



Tabla 1. Estructura genética de los diferentes tipos de *cassettes* cromosomales descritos en *Staphylococcus aureus*

SCCmec	Complejo de genes <i>mec</i>	Estructura del complejo de genes <i>mec</i>	Complejo de genes <i>ccr</i>	Genes <i>ccr</i>
I	Clase B	IS1272- Δ mecR1-mecA-IS431	Tipo 1	<i>ccrA1</i> , <i>ccrB1</i>
II	Clase A	<i>mecI</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> -IS431	Tipo 2	<i>ccrA2</i> , <i>ccrB2</i>
III	Clase A	<i>mecI</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> -IS431	Tipo 3	<i>ccrA3</i> , <i>ccrB3</i>
IV	Clase B	IS1272- Δ mecR1-mecA-IS431	Tipo 2	<i>ccrA2</i> , <i>ccrB2</i>
V	Clase C2	IS431-mecA- Δ mecR1-IS431	Tipo 5	<i>ccrC1</i>
VI	Clase B	IS1272- Δ mecR1-mecA-IS431	Tipo 4	<i>ccrA4</i> , <i>ccrB4</i>
VII	Clase C1	IS431-mecA- Δ mecR1-IS431	Tipo 5	<i>ccrC1</i>
VIII	Clase A	<i>mecI</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecA</i> -IS431	Tipo 4	<i>ccrA4</i> , <i>ccrB4</i>
IX	Clase C2	IS431-mecA- Δ mecR1-IS431	Tipo 1	<i>ccrA1</i> , <i>ccrB1</i>
X	Clase C1	IS431-mecA- Δ mecR1-IS431	Tipo 7	<i>ccrA1</i> , <i>ccrB6</i>
XI	Clase E	<i>blaZ</i> - <i>mecC</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	Tipo 8	<i>ccrA1</i> , <i>ccrB3</i>

Adaptado de Liu et al. 2016. Microb Pathog 2016;101:56-67.

Figura 5. Regulación de la resistencia a meticilina. En ausencia del antimicrobiano, Mecl actúa como represor del complejo de genes *mec* tras unirse en forma de homodímero a la región operadora. En presencia del β -lactámico, éste se une al dominio PBP de MecR1 el que se activa y gatilla la ruptura de Mecl, liberando la represión y

MicroScan



Microbiología Automatizada

Identificación y Sensibilidad

Microscan responde a las necesidades de atención eficaz de los pacientes mediante resultados automatizados rápidos de ID/AST sin reducir la exactitud.



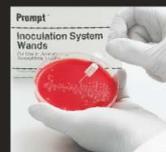
WalkAway 40 Plus



WalkAway 96 Plus

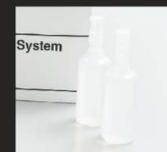


autoSCAN4



Selección de colonias con PROMPT

Estandarización de inóculos sin pérdida de tiempo por turbidez gracias al sistema de inoculación PROMPT™.



Preparación de inóculos con PROMPT

La estabilidad del inóculo de hasta cuatro horas flexibiliza el flujo de trabajo.



Inoculación de panel con RENOK

La inoculación simultánea de los 96 pocillos del panel simplifica el flujo de trabajo.

Sistemas MicroScan

La línea se completa con múltiples opciones de paneles que han sido adaptados a la epidemiología local, de tipo Combo (ID/AST), solo CIM y solo identificación. También Paneles para identificación de levaduras, anaerobios y fastidiosos y Paneles especiales para sensibilidad de Microorganismos exigentes.

LabPro Software Suite

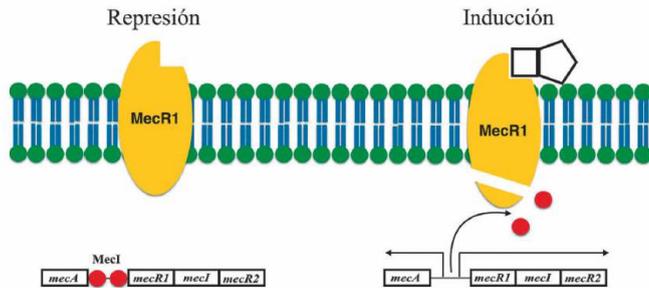
La mejora de la gestión de datos con el conjunto de aplicaciones de LabPro promueve la eficacia en el laboratorio al agilizar al flujo de trabajo y facilitar el acceso a la información del paciente. LabPro Manager, LabPro Alert y LabPro Connect en forma conjunta, le ayudan a estandarizar y consolidar las pruebas, adaptar la creación versátil de informes de resultados y aumentar su capacidad para identificar la emergencia de nuevas resistencias.

BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

permitiendo de esta forma la expresión de los genes del complejo *mec*.



Regulación de la resistencia a meticilina

Esta regulación es homóloga a la descrita para la penicilinas estafilocócica y se basa eminentemente en un receptor de membrana (sensor del β -lactámico) y un represor de la expresión del gen (37). Cuando nos referimos previamente al complejo de genes *mec*, aparte de *mecA*, nombramos a sus genes reguladores: *mecR* y *mecI*, y en este ítem ambos cobran relevancia. Tanto *mecA* como sus genes reguladores se encuentran adyacentes, pero se transcriben en forma divergente (21).

En ausencia del β -lactámico, Mecl actúa como homodímero y reconoce una secuencia palindrómica de 30 pb (15 pb en diada simétrica), abarcando las secuencias promotoras -10 de *mecA* y -35 de *mecR1*, lo que interfiere con la unión de la ARN polimerasa y, por lo tanto, con la expresión de la resistencia a meticilina (21).

En presencia del β -lactámico, éste se une al dominio PBP de la proteína de membrana MecR1, lo que desencadena la activación autolítica de su dominio metaloproteína. Luego, no se sabe si en forma directa o indirecta, MecR1 rompe el homodímero Mecl (el represor) entre sus residuos asparragina 101 y fenilalanina 102, lo que desestabiliza la dimerización de esta proteína represora y libera la represión del complejo de genes *mec*, favoreciendo por lo tanto la expresión de *mecA* y de la transpeptidasa PBP2a, determinante de la resistencia a meticilina (38). La desrepresión de los genes regulatorios favorece también la síntesis de la proteína MecR2, con función antirrepresora, ya que es capaz de unirse a Mecl e impedir que se una al promotor de *mecA*, además de favorecer su degradación por proteasas citoplasmáticas (39). En la Figura 5 se resumen los aspectos más relevantes de la regulación de la resistencia a meticilina en *S. aureus*.

Por último, existen genes no codificados en el *cassette* cromosomal, es decir, que están localizados en otros lugares del cromosoma bacteriano, pero de igual forma influyen en la resistencia a meticilina. A estos genes se les llamó inicialmente *fem* (del inglés *factors essential for methicillin resistance*) y están asociados a la síntesis del PG (40).

Otros mecanismos de resistencia a meticilina

En el año 2011 fue informado en la cepa de *S. aureus* LGA251 el último de los *cassettes* cromosomales descritos a la fecha (41), SCC*mec* XI, el que tiene algunas particularidades dignas de resaltar. En

primer lugar, el complejo de genes *mec* incluye el gen *bla_z* (penicilinas), configurando una nueva clase denominada E. Además, el gen *mecA*_{LGA251} tiene una homología de sólo 70% en la secuencia nucleotídica con el gen *mecA*. Por esto la PBP que se sintetiza a partir de este gen, si bien es la responsable de la resistencia a meticilina, sólo tiene 63% de homología con la PBP2a. Posteriormente, el gen que codificaba para esta nueva transpeptidasa se renombró como *mecC* (42). Las cepas portadoras de este determinante genético de resistencia se han asociado, principalmente, a la actividad veterinaria; no obstante, también ha sido descrito en cepas aisladas de seres humanos. En algunos países como Dinamarca, cepas de *S. aureus* portadoras de *mecC* pueden ser responsables de hasta 2% de los casos de infecciones causadas por cepas resistentes a meticilina en humanos (43). Es importante resaltar que la detección fenotípica y genotípica de la resistencia en *S. aureus* mediada por *mecC* tiene algunas particularidades. Los métodos automatizados, habitualmente usados en laboratorios clínicos tienen sensibilidades que oscilan entre 65-97%, dependiendo del sistema utilizado. Por otro lado, el uso de discos de cefoxitina ha demostrado ser efectivo, simple y económico si lo comparamos con ensayos que utilizan oxacilina, al cual se le han atribuido un gran porcentaje de falsos negativos, invalidando la utilización de este último antimicrobiano como método único. Desde un punto de vista genotípico, la baja homología nucleotídica entre *mecA* y *mecC* obliga a usar partidores específicos para este último al utilizar reacción de polimerasa en cadena. Asimismo, los ensayos antigénicos específicos para detectar PBP2a no detectan la transpeptidasa codificada por *mecC* (44). En suma, debemos estar atentos a los métodos utilizados en nuestros centros, para así evitar la posibilidad de obtener falsos negativos en la desafiante tarea de detectar resistencia a meticilina mediada por *mecC*.

Existen, además, cepas de *S. aureus* denominadas BORSA (del inglés *Borderline oxacillin-resistant S. aureus*), cuyo mecanismo de resistencia se asocia a un aumento en la actividad β -lactamasa, llegando a CIM frente a oxacilina cercanas al punto de corte, es decir, presentan un bajo nivel de resistencia (45).

Otra variedad de *S. aureus* que expresa bajo nivel de resistencia a meticilina, a través de un mecanismo independiente de *mec*, son las cepas MOD-SA (del inglés *modified PBP*), denominadas así por tener modificaciones en sus PBPs nativas, aparentemente por acumulación de mutaciones en los dominios transpeptidasa (46).

Si bien los aislados que presentan estos últimos mecanismos pueden ser buenos ejemplos de la diversidad genética bacteriana que condiciona diferentes mecanismos de resistencia a un mismo antimicrobiano, es necesario recalcar que representan una minoría de los aislados en comparación a la amplia prevalencia, principalmente en medicina humana, de la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*.

Conclusión

La resistencia bacteriana a antimicrobianos es un fenómeno natural y la inmensa plasticidad genética de estos microorganismos es difícil de dimensionar en su totalidad. Con la masificación del uso de los



PRECISIÓN

clave para lograr resultados.

ANÁLISIS GENÉTICOS, MEDICINA DE PRECISIÓN.

El desafío de la medicina actual es brindar diagnósticos precisos e individualizados. LabMedicina ofrece estudios de diagnóstico molecular que permiten identificar y actuar ante numerosas enfermedades de origen genético.

EL SABER, ES PREVENCIÓN.

Labmedicina
ANÁLISIS CLÍNICOS

www.labmedicina.com

OAA

CALIDAD ACREDITADA ISO15189

Alcances de acreditación en www.oaa.org.ar

antimicrobianos no hacemos más que seleccionar cepas resistentes, las que consecuentemente se convierten en la población predominante. Esto es exactamente lo que ha pasado con *S. aureus*, primero con penicilina y luego con meticilina. El mecanismo de resistencia de este patógeno a las penicilinas antiestafilocócicas, tal como ocurre habitualmente en las bacterias grampositivas, tiene que ver con el sitio blanco de acción, en este caso a través de la síntesis de una nueva PBP que tiene baja afinidad por los β -lactámicos. El gen que codifica esta nueva transpeptidasa y sus genes reguladores se encuentran insertos dentro de una estructura versátil y móvil denominada *cassette* cromosomal estafilocócico, del que existen varios tipos de acuerdo a su estructura genética. El predominio de SCCmec implica fenotipos de resistencia característicos, como el presente en SARM comunitarios donde el *cassette* sólo codifica resistencia a meticilina y carece de otros determinantes de resistencia. La epidemiología molecular sobre SARM en nuestro país es incipiente y, en general, se limita a la evidencia del predominio del denominado clon chileno/ cordobés, cuya estructura y características están en creciente descripción junto con el aislamiento de variantes comunitarias resistentes a meticilina.



Referencias bibliográficas

- Lowy F D. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med 1998; 339: 520-32.
- Chambers H F, Deleo F R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol 2009; 7 (9): 629-41.
- Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol 1961; 14: 385-93.
- Ayliffe G A. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis 1997; 24 Suppl 1: S74-9.
- Ledermann G W. Sensibilidad in vitro del *S. aureus* a meticilina y cloxacilina en los últimos ocho años (1961-1968). Rev Chil Pediatr 1970; 41: 213-5.
- Gil M. Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Rev Chilena Infectol 2000; 17 (2): 145-52.
- Vega F, Alarcón P, Domínguez M, Bello H, Riedel G, Mella S, et al. Aislamiento de Staphylococcus aureus hetero-resistente a vancomicina en Hospital Clínico Regional de Concepción, Chile. Rev Chilena Infectol 2015; 32 (5): 588-90.
- Kirby W M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. Science 1944; 99 (2579): 452-3.
- Mitscher L A, Lemke T L, Gentry E J. Chapter 38: Antibiotics and antimicrobial agents. Lemke T L, Williams D A, Roche V F and Zito S W's Foyes's Principles of Medicinal Chemistry, 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008, p. 1028-82.
- Zemelman R, Norambuena R, Vergara L, Gacitua R. Los antibióticos β -lactámicos: agrupación según su estructura química y sus propiedades bacteriológicas. Rev Med Chile 1987; 115: 983-91.
- Deresinski S. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 2005; 40 (4): 562-73.
- Udo E E, Pearman J W, Grubb W B. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Western Australia. J Hosp Infect 1993; 25 (2): 97-108.
- Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus-Minnesota and North Dakota, 1997-1999. JAMA 1999; 282 (12): 1123.
- DeLeo F R, Otto M, Kreiswirth B N, Chambers H F. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet 2010; 375 (9725): 1557-68.
- Ribeiro A, Dias C, Cícera Silva-Carvalho M, Berquó L, Ferreira F A, Neves R, et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in South America. J Clin Microbiol 2005; 43 (4): 1985-8.
- Noriega L M, González P, Hormazábal J C, Pinto C, Canals M, Munita J M, et al. Staphylococcus aureus comunitario resistente a cloxacilina: Comunicación de los primeros cinco casos descritos en Chile. Rev Med Chile 2008; 136 (7): 886-91.
- Informe de vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud 2014, web.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/10/informe-IAAS-2014.pdf (fecha acceso el 01 de julio de 2017).
- Cifuentes M, Silva F, García P, Bello H, Briceño I, Calvo M, et al. Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012. Rev Chilena Infectol 2014; 31 (2): 123-30.
- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62 (4): 1371-414.
- Tipper D J, Strominger J L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc Natl Acad Sci U S A 1965; 54 (4): 1133-41.
- Peacock S J, Paterson G K. Mechanisms of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Annu Rev Biochem 2015; 84: 577-601.
- Acebrón I, Chang M, Mobashery S, Hermoso J A. The allosteric site for the nascent cell wall in penicillin-binding protein 2a: an Achilles' heel of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Curr Med Chem 2015; 22 (14): 1678-86.
- Chambers H F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10 (4): 781-91.
- Lim D, Strynadka N C. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Nat Struct Biol 2002; 9 (11): 870-6.
- Rodvold K A, McConeghy K W. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus therapy: Past, present, and future. Clin Infect Dis 2014; 58 (SUPPL. 1): 20-7.
- Aires De Sousa M, De Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: Genetic portraits of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 40 (2): 101-11.
- Couto I, de Lencastre H, Severina E, Kloos W, Webster J A, Hubner R J, et al. Ubiquitous presence of a mecA homologue in natural isolates of Staphylococcus sciuri. Microb Drug Resist 1996; 2 (4): 377-91.
- Liu J, Chen D, Peters B M, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Microb Pathog 2016; 101: 56-67.
- International Working Group on the Staphylococcal Cassettes Chromosome elements, <http://www.sccmec.org> (fecha de acceso el 01 de julio de 2017).
- Deurenberg R H, Vink C, Kalenic S, Friedrich A W, Bruggeman C A, Stobberingh E E. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (3): 222-35.
- Medina G, Egea A L, Otth C, Otth L, Fernández H, Bocco J L, et al. Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Southern Chile. Eur J Clin Microbiol Dis 2013; 32 (12): 1533-40.
- Vega F. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) aisladas en el Hospital "Dr. Guillermo Grant Benavente" de Concepción. Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 2015. Tesis de Magister en Ciencias mención Microbiología 71 pp.
- Arias C A, Reyes J, Carvajal L P, Rincón S, Díaz L, Panesso D, et al. A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of Staphylococcus aureus bacteremia in nine latin american countries. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61 (10): 1-12.
- David M Z, Daum R S. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 2010; 23 (3): 616-87.
- Kale P, Dhawan B. The changing face of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Indian J Med Microbiol 2016; 34 (3): 275-85.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53 (12): 4961-7.
- Lowy F D. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest 2003; 111 (9): 1265-73.
- Arêde P, Oliveira D C. Proteolysis of mecA repressor is essential for expression of methicillin resistance by Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57 (4): 2001-2.
- Arêde P, Milheirico C, de Lencastre H, Oliveira D C, Coll M. The anti-repressor mecR2 promotes the proteolysis of the mecA repressor and enables optimal expression of β -lactam resistance in MRSA. PLoS Pathog 2012; 8 (7): e1002816.
- Berger-Bächli B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol 2002; 178 (3): 165-71.
- García-Álvarez L, Holden M T, Lindsay H, Webb C R, Brown D F, Curran M D, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11 (8): 595-603.
- Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden M T, et al. Guidelines for reporting novel mecA gene homologues. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56 (10): 4997-9.
- Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen L K, et al. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. Clin Microbiol Infect 2013; 19 (1): E16-22.
- Ford B A. mecC-MRSA: Hiding in plain sight. J Clin Microbiol 2017; 56 (1). pii: e01549-17. doi: 10.1128/JCM.01549-17. Print 2018 Jan.
- Mc Dougal L K, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol 1986; 23 (5): 832-9.
- Tomasz A, Drugeon H B, de Lencastre H M, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in Staphylococcus aureus: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33 (11): 1869-74.



Hormona Antimülleriana: Biomarcador Testicular

 12 min.



La hormona antimülleriana es una glicoproteína homodimérica que pertenece a la familia de los factores de crecimiento transformantes beta (TGFβ). La encontramos en altas concentraciones en el feto masculino, durante la infancia y va disminuyendo cuando el niño llega a la pubertad. Se denominó así porque su función principal es inducir la regresión de los conductos de Müller durante la diferenciación sexual en las semanas 8-10 del desarrollo embrionario. A continuación, el Área de Endocrinología de MANLAB nos presenta un estudio en el que destacan la importancia de esta hormona como biomarcador testicular.



Bioq. Mónica Guinzburg
Área Endocrinología – MANLAB Diagnóstico
Bioquímico y Genómico

E-mail: monica.guinzburg@manlab.com.ar



La hormona antimülleriana (AMH), también conocida como sustancia inhibitoria Mülleriana (MIS) o factor inhibitor mulleriano (MIF), se denominó así porque su función principal es inducir la regresión de los conductos de Müller durante la diferenciación sexual en las semanas 8-10 del desarrollo embrionario. En ausencia de esta hormona los conductos se desarrollan generando el útero, trompas de Falopio y tercio superior de la vagina (1,2).

Fue descrita, por primera vez, en la década del 40 por Alfred Jost y col (2). Al principio fue utilizada para el estudio de la patología del testículo y luego su aplicación se fue ampliando hacia la evaluación de la función del aparato reproductor femenino. Es considerada un marcador específico de las

gónadas.

La AMH es una glicoproteína homodimérica que pertenece a la familia de los factores de crecimiento transformantes beta (TGFβ) (12). La encontramos en altas concentraciones en el feto masculino, durante la infancia y va disminuyendo cuando el niño llega a la pubertad. En el hombre adulto y en la mujer los niveles de hormona antimülleriana son menores y llegan a ser no detectables en la perimenopausia (3). Esta hormona presenta características por las cuales su determinación en sangre es de gran utilidad para determinar la actividad gonadal: presenta diferentes niveles de concentración en ambos sexos; se evidencian cambios en sus niveles circulantes durante el desarrollo sexual y es una hormona específica de las células de Sertoli del testículo y de la granulosa del ovario (1,3). Existen en la actualidad varios inmuno-

NUEVO

KITS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE INFECCIONES RESPIRATORIAS

- Reactivos Liofilizados
- Compatible con la mayoría de las plataformas de extracción y PCR en tiempo real del mercado
- Validación CE-IVD para diagnóstico in vitro (CDC y QCMD)
- Kits Multiplex que detectan simultáneamente virus, bacterias u hongos
- Todos los kits tienen el mismo protocolo de ciclado en PCR
- Presentaciones por 32 ó 64 reacciones
- Precios competitivos por determinación de muestra

fast-track 
DIAGNOSTICS



Estomba 964 | C1427COV CABA
Buenos Aires | Argentina
Tel: 54 11 4859 5300
info@tecnolab.com.ar
tecnolab.com.ar

ensayos que nos permiten medir la concentración de AMH en suero (4,1).

Hormona anitmülleriana en el varón prepúber

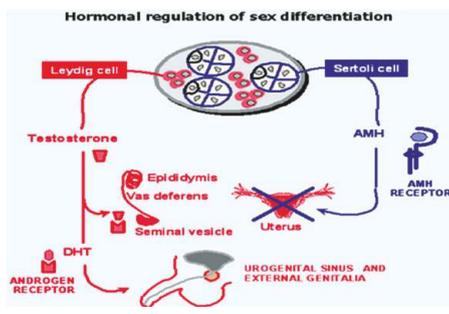
La diferenciación del sexo masculino depende de la expresión de los genes del cromosoma Y. El desarrollo testicular está influenciado por los genes SRY y SOX9 que en principio inducen la diferenciación de las células de Sertoli, donde se produce la AMH e inhibina B y posteriormente se diferencian las células de Leydig encargadas de la secreción de testosterona (5,1).

Se producen dos mecanismos muy importantes durante la diferenciación sexual del varón: la regresión de los conductos de Müller mediado por la AMH y el desarrollo y diferenciación de los conductos de Wolff que dan origen al conducto deferente, vesícula seminal y epidídimo, acción ejercida por la testosterona bajo el estímulo de la gonadotropina coriónica humana (hCG) (1,5,3).

El testículo está formado por dos compartimentos: los tubos seminíferos y el tejido intersticial. En el primero se encuentran las células germinales y las células de Sertoli y en el tejido intersticial encontramos las células de Leydig. Fig. 1 (1,5,6).



Figura 1. Control hormonal de la diferenciación sexual masculina. Los conductos de Wolff son mantenidos por la testosterona (T) producida por las células de Leydig. Los conductos müllerianos retroceden bajo la influencia de la AMH producida por las células fetales de Sertoli, actuando a través del receptor AMH. El seno urogenital y los genitales externos son virilizados por la dihidrotestosterona (DHT), que resulta de la reducción de la testosterona por la enzima 5 α -reductasa (no se muestra). T y DHT actúan a través del mismo receptor de andrógenos.



En los niños, la AMH es detectable al nacer en concentraciones circulantes mucho más altas que en las niñas y estas concentraciones aumentan durante la infancia alcanzando un pico a los 2-3 años de vida, antes de disminuir gradualmente en la pubertad en los estadios Tanner 2 y 3 hasta alcanzar los niveles bajos del adulto (7,8).

Utilidad clínica de la AMH

Dada la importancia de la AMH para medir la actividad de las células de Sertoli es de gran utilidad clínica como ayuda diagnóstica en diversas patologías testiculares. Niveles de AMH dentro del rango de referencia en niños indica presencia de tejido testicular.

Testículos no palpables: un valor de AMH dentro del rango normal tiene un alto valor predictivo para la presencia de testículos en varones con gónadas no palpables (criptorquidia), mientras que valores no detectables de dicha hormona predicen la ausencia de tejido testicular (anorquia) (1).

Ambigüedad genital: la diferenciación sexual masculina, en la vida intrauterina, es dependiente de la acción de los andrógenos y de la AMH (1,9).

En pacientes con genitales ambiguos (cariotipo 46, XY), un valor de AMH dentro del rango de referencia indica una función normal de las células de Sertoli. En cambio un nivel bajo o indetectable es indicativo de disgenesia gonadal con persistencia de las estructuras müllerianas (9,1,5).

Pubertad precoz y retardada: los niveles de gonadotropina y testosterona normalmente disminuyen a valores muy bajos hasta el inicio de la pubertad y solo las células de Sertoli permanecen activas durante la infancia. En el hombre, la AMH es secretada exclusivamente por las células de Sertoli por lo tanto sus niveles en suero reflejan de manera confiable la presencia y la función de los testículos en la etapa prepupal en niños, sin la necesidad de ninguna prueba de estimulación. (1,8,9,10). Tabla: 1



Tabla 1: Niveles esperados AMH en el desarrollo masculino normal y en trastornos

que afectan su producción

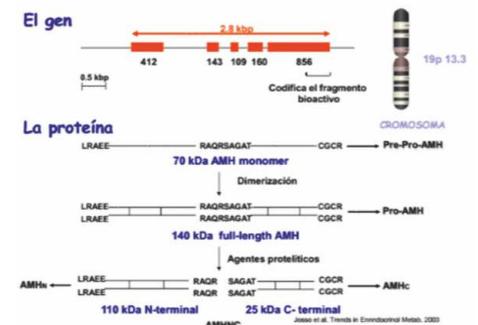
	FSH	LH	AMH	Testosterone
Normal fetus and postnatal 0-6 months	high	high	high	high
Normal childhood	low	low	high	low
Normal puberty	high	high	very low	high
MS (puberty)	high	high	high	high
Central hypogonadism	very low	very low	low	very low
Leydig cell aplasia/T-synthesis defects	high	high	high	very low
Precocious puberty	high	high	very low	high

Importancia del laboratorio

La AMH se sintetiza como una pre-hormona la cual sufre un proceso de glicosilación y dimerización, constituyendo un homodímero unido por puentes disulfuro. Cuando pasa por el citoplasma cada monómero es clivado generando fragmentos N (región pro) y C terminal (región nativa o madura) que permanecen unidos por uniones no covalentes. El dominio C terminal es el que se une al receptor y necesita de la porción N terminal para desencadenar la respuesta biológica. En circulación podemos encontrar una mezcla de la forma pro-AMH y del complejo C-terminal/N-terminal, unido por 2 puentes disulfuro. Fig. 2 (11,12)



Figura 2: AMH y su producto genético, la proteína AMH

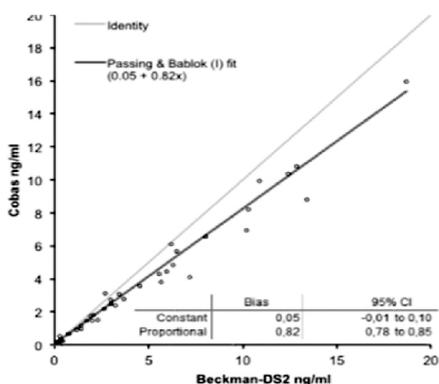


A lo largo del tiempo se diseñaron inmunoensayos con distinta capacidad de detectar las formas moleculares que presenta la AMH en la sangre con lo cual encontramos una gran variabilidad en los resultados obtenidos. Esto se debe, fundamentalmente, a la utilización de anticuerpos dirigidos a distintos epitopes localizados en diferentes regiones de la hormona y a la falta de un estándar internacional (3,11). En MANLAB utilizamos un método electroquimioluminiscente sensible, con buena reproducibilidad, automatizado para plataforma Cobas y con un tiempo de respuesta óptimo. El ensayo ha sido

comparado con el kit AMH Gen II de Beckman Coulter con el cual tiene una muy buena correlación y concordancia. Los resultados obtenidos con Roche son aproximadamente 20 % inferiores a los obtenidos con el método de ELISA y presenta una mejor performance analítica con menores coeficientes de variación (CV) intra e interensayo. Fig: 3 (4,13).



Figura 3: Diagrama de dispersión con Passing-Bablok



Las concentraciones circulantes de AMH deben interpretarse con precaución debido a las diferencias en la forma en que se estandarizan los inmunoensayos y las unidades utilizadas para la medición (6,13,4). Por lo tanto, es muy importante, para el seguimiento del paciente, realizar el análisis con la misma metodología y en el mismo laboratorio.

Dada las fortalezas demostradas por este nuevo método nos planteamos como desafío a futuro poder determinar los valores de referencia en nuestra población infantil.

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Trabajos citados

1. Rey R. Evaluación de la función testicular en el varón prepúber: utilización del dosaje de hormona antimülleriana (AMH) sérica. Arch.

- Argent. Pediatr.2000;98(5): p. 315-324.
 2. Rey R. Anti-Mullerian Hormone: Cinderella Finds New Admirers. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2006; 91(10): p. 3760-3762.
 3. Unger S, Beraja Pizzoglio H. Hormona antimülleriana. Reserva ovárica y reserva testicular. Reproducción. 2010 septiembre; 25(3): p. 137-153.
 4. Van Zanden J, Wagenmaker-Huizinga L, Inia L and Mullero Kobold A. Comparison of the automated Roche Elecsys Cobas Anti Mullerian Hormone (AMH) assay with the Beckman AMH Gen II ELISA. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2016; 41: p. 214-215.
 5. Binet, D. Gorduza, A. Kallas Chemaly, C.-L. Gay, L. Margain, A. Scalabre, P. Mouriquand. Desarrollo genital normal y patológico. EMC - Urología. 2017 junio; 49(2): p. 1-10.
 6. Rey R, Josso N, Racine C. Endotext. [Online]; 2016 [cited 2018 marzo7. Available from: <http://www.endotext.org/chapter/sexual-differentiation/>.
 7. Grinspon R, Loreti N, Braslavsky D, Bedecarrás P, Ambao V, Gottlieb S et al. Utilidad de la hormona anti-mülleriana (AMH) y la inhibina B en el diagnóstico del hipogonadismo en el niño. Rev Venez Endocrinol Metab. 2014; 12(2): p. 76-88.
 8. Edelsztejn N, Grinspon R, Shteingart H and Rey R. Anti-Müllerian hormone as a marker of steroid and gonadotropin action in the testis of children and adolescents with disorders of the gonadal axis. International Journal of Pediatric Endocrinology. 2016; 2016(20): p. 1-20.
 9. Grinspon R, Rey R. Anti-Müllerian Hormone and Sertoli Cell Function in Paediatric Male Hypogonadism. Horm Res Paediatr. 2010; 73: p. 81-92.
 10. Rey R, Ciaccio M, Suárez M, Boquete H, Martínez A, Jasper H, et al. Evaluación diagnóstica del niño y del adolescente sin gónadas palpables. Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo. 2006; 43(1): p. 40-52.
 11. Capece E, Pelanda M, Dicugno M, González de Sampaio E, Buongiorno G, Corazza N y col. La hormona antimülleriana como marcador de función ovárica. rev argent endocrinol metab. 2016; 5(3): p. 106-113.
 12. Josso N and Di Clementi N. Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-b family. TRENDS in Endocrinology and Metabolism. 2003 marzo; 14(2): p. 91-97.
 13. Roche. AMH Anti-Mullerian hormone. 2016. Inserto AMH cobas.

BD Vacutainer®

Líder en Soluciones Preanalíticas

Calidad y Bioseguridad:
Su interés y nuestro compromiso



Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escribanos a: vacutainer@bd.com





Evaluación de una prueba de biología molecular para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea en un hospital de alta complejidad

 14 min.



La implementación de nuevas ayudas diagnósticas, deben estar en concordancia con las necesidades en la atención del paciente, para que tengan un adecuado impacto en las acciones terapéuticas, con el fin de tener un abordaje integral en el proceso asistencial.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tuberculosis es una enfermedad infecciosa con alta morbilidad, se estima que un tercio de la población mundial está infectada. El proceso de diagnóstico de la tuberculosis requiere de una evaluación clínica y ayudas diagnósticas complementarias. En el siguiente trabajo evalúan una prueba de biología molecular para la identificación del *Mycobacterium tuberculosis* y la sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea.



Adrián Peñata-Bedoya^{a*}, Anlly Holguín-Velasquez^b, Santiago Atehortúa-Muñoz^c, Paula Vergara-Aguilar^d, Tatiana Castaño-Sepúlveda^a, Julián Bustamante-Mira^a, Sigifredo Ospina-Ospina^{a,c}

^a Biología Molecular e Inmunogenética de trasplantes. Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

^b Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^c Servicio de Microbiología. Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

^d Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

* Autor para correspondencia.

Unidad de Biología Molecular e Inmunogenética de Trasplantes, Hospital Universitario de San Vicente Fundación.

Correo electrónico: carlosadrianpb@gmail.com

Calle 64 No 51D -154 Medellín, Colombia

Teléfono: (574) 444 1333 ext. 2567-3106

Recibido: 05 de Octubre de 2016; Aprobado: 29 de Noviembre de 2016

Conflictos de interés Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que puedan estar influyendo en los resultados o conclusiones expresadas en el presente estudio.

Fuente de financiación Este estudio fue financiado por el Hospital Universitario de San Vicente Fundación.



Resumen

Objetivo: Evaluar la utilidad de Anyplex™ II_MTB/MDR/XDR para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* y sensibilidad a medicamentos de primera y segunda línea, además del impacto en la conducta terapéutica en pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar atendidos en una institución de alta complejidad de Medellín, 2014-2015.

Material y Metodos: Estudio descriptivo de corte transversal retrospectivo, de pacientes en cuyo proceso de atención se les realizó: baciloscopia, cultivo Ogawa- Kudoh, prueba molecular Anyplex™ II_MTB/MDR/XDR y registro adecuado de historia clínica. Se realizaron medidas estadísticas descriptivas univariadas y de validez diagnóstica.

Resultados: Se incluyeron 156 muestras de 154 pacientes, de los cuales el 65,6% fueron hombres. El diagnóstico de ingreso más frecuente fue el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (46,1%). La sensibilidad y

especificidad global fue del 96,36% (IC 95%: 90,51 - 100) y 90,51% (IC 95%: 83,62 - 96,38) respectivamente. Se detectó algún tipo de resistencia en el 12,6%. El 57% de los resultados fueron tomados en cuenta por el médico tratante para definir conductas terapéuticas.

Discusión: Se obtuvo una sensibilidad mayor respecto a otros estudios previos. Entre las limitaciones a destacar están: el diseño retrospectivo y la no disponibilidad de medios de cultivo líquido (MIGIT).

Conclusión: Anyplex™ II_MTB/MDR/XDR fue útil en la identificación del complejo *M. tuberculosis* y sensibilidad a medicamentos en muestra directa. El resultado de la prueba influyó en la toma de conductas terapéuticas en más de la mitad de los pacientes con resultados positivos. La implementación de nuevas ayudas diagnósticas, deben estar en concordancia con las necesidades en la atención del paciente.

Palabras-clave: tuberculosis; reacción en cadena de la polimerasa; tuberculosis pulmonar; TB-MDR.

Introducción

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa con una alta morbilidad, y según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población mundial está infectada lo que representa un problema de salud pública. Para el 2014, se estimó que 9,6 millones de personas en el mundo adquirieron Tb (1), mientras en Colombia, para el 2013 se notificaron 10.849 casos (2).

La tuberculosis multidrogorresistente (MDR-TB), definida como la resistencia a

Dengue - Zika Chikungunya

Dengue

BIO-RAD

- **Platelia Dengue NS1Ag**
ELISA x 96 tests
- **Dengue NS1Ag strip**
Inmunocromatografía – Test Rápido x 25 tests
- **MultiSure** Dengue IgG, IgA, IgM y NS1Ag
Inmunocromatografía – Test Rápido x 20 tests



- **Dengue IgG**
ELISA x 96 tests
- **Dengue IgM**
ELISA x 96 tests
- **Dengue IgM captura**
ELISA x 96 tests



Zika



- **Zika IgM Captura**
ELISA x 96 tests
- **DPP Zika IgM /IgG**
Inmunocromatografía – Test Rápido x 25 tests



Chikungunya



- **Chikungunya IgG**
ELISA x 96 tests
- **Chikungunya IgM Captura**
ELISA x 96 tests



medicamentos de primera línea (rifampicina-isoniacida) (3), y la tuberculosis ampliamente resistente (XDR-TB), entendida como MDR-TB asociada a resistencia a medicamentos de segunda línea (cualquier fluoroquinolona y al menos un medicamento inyectable de los siguientes: amikacina, kanamicina, capreomicina), se han convertido en obstáculos para el control de la infección. En el 2014, la OMS estimó 480.000 casos de MDR-TB (1). En Colombia, en el mismo periodo, se reportaron 103 casos MDR-TB y dos XDR-TB (4). Por tal motivo, la OMS impulsa el acceso universal al diagnóstico y tratamiento (5).

El proceso diagnóstico de la Tb, requiere de una evaluación clínica y ayudas diagnósticas complementarias (6), además debería incluir pruebas de sensibilidad a medicamentos. Entre las técnicas de valoración a medicamentos se encuentra las proporciones múltiples, metodología catalogada como método de referencia, con un tiempo de respuesta aproximado de 28 días (7). Otras más rápidas como BACTEC™460TB (8) y BACTEC™MGIT (9), evalúan el crecimiento bacteriano en presencia de antibiótico, con resultados entre 3 y 10 días. También están disponibles las técnicas de Biología Molecular (BM) basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con resultados en un día y con el aval de la OMS (10), entre éstas, Xpert® MTB/RIF, que detecta de forma simultánea *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y sensibilidad a rifampicina (11); Genotype MDRplus (Hain-Lifescience-Nehren-Germany) (12) que evalúa sensibilidad a medicamentos de primera línea y, requiere otro kit para detección a segunda.

Con el fin de optimizar el diagnóstico de la Tb y conocer los patrones de sensibilidad, se deben evaluar métodos emergentes como Anyplex™II_MTB/MDR/XDR, el cual consiste en una metodología por BM en tiempo real y PCR múltiple, para la identificación del complejo MTB y detección de las mutaciones más frecuentes en los genes que confieren resistencia a medicamentos de primera línea (rifampicina e isoniazida) como también a fluoroquinolonas y drogas inyectables: amikacina, kanamicina, y capreomicina, con resultados en un día (13). Esta técnica identifica 18 mutaciones que causan resistencia a rifampicina en el gen *rpoB*, 7 mutaciones que causan resistencia a

isoniazida en los genes *katG* e *inhA*, 7 mutaciones que causan resistencia a fluoriquinolonas en el gen *gyrA* y 6 mutaciones que causan resistencia a drogas inyectables en el gen *rrs* y en la región promotora *eis*.

De manera complementaria, el desempeño de una prueba, debería contar con aproximaciones como: utilidad, pertinencia y conductas terapéuticas a partir de resultados de laboratorio. Así, una prueba diagnóstica debe ser considerada como parte en la toma de decisiones clínicas, ya que hay una relación directa de éstas con: la eficacia, el mejoramiento del proceso diagnóstico, la estrategia terapéutica y asistencial (14).

Este estudio evalúa la utilidad de Anyplex™II_MTB/MDR/XDR para la detección de MTB y sensibilidad simultánea a medicamentos de primera y segunda línea, a partir de muestra directa, además de una aproximación del impacto en la toma de decisiones terapéuticas en pacientes atendidos en un hospital de alta complejidad.

Material y Métodos

Estudio descriptivo retrospectivo de corte transversal (noviembre 2014 a junio 2015), con muestreo a conveniencia de pacientes con sospecha de Tb pulmonar, atendidos en el Hospital Universitario de San Vicente Fundación (HUSVF). Las muestras pulmonares (esputo y lavado broncoalveolar) debían tener disponible: baciloscopia, cultivo, prueba molecular y pruebas fenotípicas para fármacos anti tuberculosos cuando aplicó, además del correcto diligenciamiento de las historias clínicas electrónicas.

Pruebas convencionales y fenotípicas a medicamentos

La baciloscopia fue realizada por el método de Ziehl-Neelsen tradicional, el cultivo en Ogawa-Kudoh con Hidróxido de Sodio al 4% (15), siguiendo los protocolos institucionales. A los cultivos positivos, se les realizó la prueba de proporciones múltiples para medicamentos de primera línea (7) en el Laboratorio Departamental de Salud Pública, y para fármacos a segunda línea, con tecnología BACTEC-MGIT-9609 en el Instituto Nacional de Salud.

Anyplex™II_MTB/MDR/XDR

Los pasos de pretratamiento de las muestras, extracción de material genético y preparación de mezcla maestra para PCR múltiple, se realizaron de forma manual acorde a las instrucciones del fabricante. Los pasos de amplificación y generación de curvas melting, fueron realizados en el instrumento CFX-96TM (Bio-Rad), tres controles fueron incluidos en cada corrido: dos positivos (wild type resistant) y uno negativo. Los análisis e interpretación de datos se realizaron en el software Seegene Viewer 2.0.

Datos clínicos

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes, para extraer variables sociodemográficas, clínicas y microbiológicas. Se consideró que el resultado de Anyplex™II_MTB/MDR/XDR tuvo impacto, si fue registrado como base para tomar una conducta terapéutica en el paciente hasta dos días posteriores a su generación, en las siguientes categorías: Inicio de tratamiento, no implementación de tratamiento, mantener tratamiento inicial y cambio de tratamiento.

Análisis de información

La tabulación de los datos se realizó en Excel 2010®, y en SPSS-21.0® se calcularon descriptivos (tablas-gráficos), incluyendo el cálculo de la desviación estándar (DS). Epidat 4.1 de la Organización Panamericana de la Salud, fue utilizado para estadísticos de validez: sensibilidad, especificidad, valores predictivos e índice kappa; el método de referencia fue Ogawa-Kudoh.

El estudio fue aprobado por el comité de Investigación y de Ética del HUSVF. Según resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, este estudio se considera sin riesgo, por ser de fuente secundaria.

Resultados

156 muestras consecutivas de 154 pacientes, fueron incluidas (tabla 1). Los porcentajes de positividad fueron: Cultivo Ogawa-Kudoh, 35,8% (n=56), coloración Ziehl-Neelsen, 31,4% (n=49), Anyplex™II_MTB/MDR/XDR, 40,3% (n=63); el 33,9% fueron positivas tanto por cultivo

como por prueba molecular (53). Un aislamiento correspondió a una micobacteria atípica, no incluido para análisis posteriores.



Tabla 1 Características sociodemográficas y clínicas en la población de estudio.

Características generales	Total n = 154	
	n	%
Sexo		
Hombres	101	65,6
Edad		
X (DE)	43,5	15,8
Me (Riq)	43	26
Ocupación		
Desempleado	38	24,6
Ventas y oficios varios	24	15,5
Diagnóstico de ingreso		
VIH	55	35,7

El índice Kappa entre Anyplex™II _MTB/MDR /XDR y Ogawa- Kudoh, fue de 0,84 (IC 95%: 0,75-0,93 y $p < 0,01$). Para los aislamientos positivos por cultivo y prueba molecular (n=53), las pruebas fenotípicas presentaron una concordancia del 100% (Tabla 3).



Tabla 2 Rendimiento de Anyplex™II MTB/ MDR/XDR según Baciloscopia y tipo de muestra.

	Cultivo positivo		Cultivo negativo		Total	S (IC 95%) / E (IC 95%)	VPP (IC 95%) / VPN (IC 95%)
	Anyplex +	Anyplex -	Anyplex +	Anyplex -			
General	53	2	10	90	155	96,36 (90,51 – 100) / 90,51 (83,62 – 96,38)	84,13 (75,13 – 94,87) / 97,98 (94,70 – 100)
Baciloscopia							
Positiva	45	0	4	0	49	*	*
Negativa	8	2	6	90	106	80,00 (50,21 – 100) / 93,75 (88,39 – 99,11)	57,14 (27,6 – 86,64) / 97,83 (94,30 – 100)
Muestras							
Espudo	21	0	4	19	44	100 (97,6 – 100) / 82,61 (64,94 – 100)	84 (67,63 – 100) / 100 (97,37 – 100)
LBA	32	2	6	71	111	94,12 (84,74 – 100) / 92,21 (85,57 – 98,84)	84,21 (71,30 – 97,12) / 97,26 (92,83 – 100)

S= sensibilidad; E = especificidad

VPP = valor predictivo positivo; VPN = valor predictivo negativo ! * = S, E, VPP y VPN no calculable



Tabla 3 Caracterización a medicamentos antituberculosos por detección de genes de resistencia Anyplex™II MTB/ MDR/XDR. HUSVF, 2015

Perfil sensibilidad	n = 63	%
Susceptibilidad total*	55	87,3
Algún tipo de resistencia	8	12,6
Monoresistencia a H	1	1,58
Monoresistencia a Rif	1	1,58
TB MDR (H + Rif)	4	6,34
TB-MDR más un inyectable	2	3,17
TB-XDR	0	0

* 10 aislamientos presentaron cultivo negativo

H: Isoniacida; Rif: Rifampicina

TB MDR: tuberculosis multirresistente

TB XDR: tuberculosis extremadamente resistente

Inyectables: Amikacina, Kanamicina y Capreomicina

En el 57% (n=89) de los pacientes, el resultado de la prueba molecular fue registrado en la historia clínica como pauta para decisiones terapéuticas, de la siguiente manera: 51,6% (n=46) no implementación de tratamiento, 26,9% (n=24) mantener manejo terapéutico instaurado inicialmente, 19,1% (n=17) útil para iniciar de tratamiento, y 2,2% (n=2) para cambio de manejo antituberculo-

so, por reporte de alguna resistencia.

El tiempo para obtener el resultado: Anyplex™II_MTB/ MDR/ XDR fue de 3 días (DS±2,15), pues por programación del hospital la prueba se realiza tres veces por semana; para los cultivos positivos, de 27 días (DS±5,2), con el reporte de medicamentos a primera línea hasta 50 días (DS±10), y un acumulado total de 70 días (DS± 7,7) para fármacos de segunda línea.

Discusión

La prueba molecular Anyplex™II_MTB/MDR/XDR de reciente disponibilidad en el país y con escasa literatura sobre su rendimiento en Latinoamérica, ofrece ventajas sobre otras metodologías de BM en tuberculosis, por la posibilidad que ofrece de identificar en tiempo real genes de resistencia a varios medicamentos antituberculosos en un solo montaje. El presente estudio responde a la necesidad de documentar el desempeño de ésta, comparada con métodos tradicionales (coloración Ziehl-Neelsen y cultivo Ogawa-Kudoh), todavía de uso rutinario en varias instituciones en el país, que refleja una limitación en el diagnóstico microbiológico, ya que en Colombia para el 2013, solo el 75% de los casos de Tb notificados, fueron confirmados por el laboratorio (2), evidenciando la necesidad de contar con técnicas que sean de mejor desempeño. Otro aporte del presente estudio, es la documentar la aproximación de la conducta terapéutica posterior al resultado de una prueba molecular, como factor importante en la implementación y seguimiento de nuevas ayudas diagnósticas.

La prueba Anyplex™II_MTB/

MEG@NALIZAR
Tecnología y Calidad al servicio de la Salud

- Endocrinología
- Química Clínica
- Marcadores Tumorales
- Marcadores Virales
- Hematología
- Inmunología
- Drogas Anticonvulsionantes
- Inmunosupresores

● Serología

- El Megalaboratorio de los Bioquímicos de Cuyo
- Rigurosos Controles Internos y Externos de Calidad
- Más de 220 laboratorios de toda la Provincia de Mendoza,
- confían en Meganalizar por Tecnología, Calidad y resultados en el día

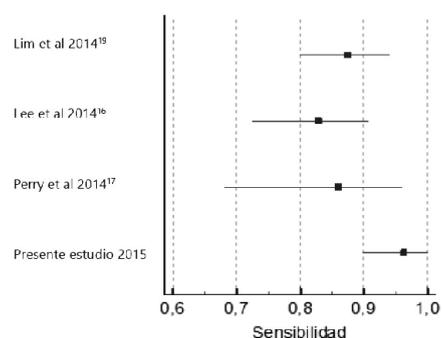
Sede Laboratorio | Montecaseros 2478 Mendoza | Tel. 0261 4373241/42 | mega@analizar-lab.com.ar
Administración | Belgrano 925 Mendoza | Tel. 0261 4412355/65 | gerencia@analizar-lab.com.ar



MDR/XDR, fue positiva en el 40,3%, que comparada con otros estudios que han reportado rendimientos del 13,6% (16) y de 20,9% (17), presentó un desempeño superior en nuestra población. Mientras que las pruebas convencionales como la coloración de Ziehl-Neelsen y el cultivo Ogawa-Kudoh, presentaron un rendimiento diagnóstico del 31,4% (n=49) y 35% (n=56) respectivamente. Una posible explicación al mejor desempeño de la prueba molecular, puede estar en relación con el tipo de población que consulta en la institución, que por el nivel de complejidad atiende un número importante de pacientes con coinfección con VIH (35,7% de los pacientes ingresados al estudio), trasplantados y con otro tipo de comorbilidades, que son factores de riesgo para progresión de Tb latente a Tb activa (18), o casos de difícil manejo como son pacientes con problemas de adherencia al tratamiento antituberculoso, sospecha de fracaso o recaídas que requieren valoración especializada y pruebas rápidas de sensibilidad a fármacos, por lo que el 26,5% (n=13) de las baciloscopias positivas, correspondieron a pacientes con Tb previa.



Figura 1 Gráfica *Forest plot* de la sensibilidad estimada para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* comparado con otros estudios.



La sensibilidad general fue del 96,3% (IC 95%: 90,51- 100), en contraste a estudios previos que reportaron 82,9% (IC 95%: 72,5-90,6)16, 87,5% (IC95%: 80- 94,9)19, y 86% (IC 95%: 68-96)17 (Figura 1); mientras que con baciloscopia negativa, se han reportado sensibilidades del 69,2% y 81,3% (17,19), similares al presente trabajo del 77%, útil para la toma de decisiones terapéuticas mientras está disponible el resultado por cultivo (Tabla 2).

Respecto a los falsos negativos (dos casos), se ha descrito como causas, la presencia de inhibidores y errores técnicos (20), así como problemas en la calidad de la muestra, en especial el LBA, que por dilución, puede interferir en el límite de detección de la prueba.

Es importante tener en cuenta que se requiere una infraestructura y prácticas de laboratorio adecuadas de BM, que garanticen condiciones pre-analíticas óptimas, con el fin de evitar contaminaciones y falsos positivos.

Los nueve casos con cultivo negativo y Anyplex™II_MTB/ MDR/XDR positivo, se deben interpretar en conjunto con los datos clínicos y epidemiológicos del paciente, pues al tomar el cultivo como prueba de referencia, se clasificarían estos resultados como falsos positivos de la prueba molecular, que se pueden explicar en parte por falta de viabilidad bacteriana, inadecuado manejo de la muestra o restos de material genético de la micobacteria en los pacientes con antecedentes de Tb antigua. El centro de control de enfermedades (CDC) recomienda ante sospecha clínica media-alta de Tb, si la baciloscopia es negativa y prueba molecular positiva, considerar diagnóstico presuntivo (21).

Frente a la monoresistencia, a nivel nacional, se ha reportado 3,42% a isoniazida y 0,41% a rifampicina (22), y con leve aumento en los casos tratados previamente, en el presente estudio se presentaron dos casos. No se presentaron casos de XDR-TB, pero se detectó dos muestras del mismo paciente con MDR-TB más resistencia a inyectables; el factor de riesgo principal para desarrollar resistencia, es la exposición inadecuada a medicamentos antituberculosos (23), elemento presente en este caso.

En el 43% (67 casos) de los pacientes, el resultado de Anyplex™II_MTB/MDR/XDR no fue registrado en la historia del paciente para definir alguna conducta terapéutica. Ésta situación debe llevar a una reflexión frente al principal uso de las ayudas diagnósticas, que es reducir el nivel de incertidumbre en la toma de conductas terapéuticas, ya que únicamente deberían solicitarse cuando el resultado vaya a influir en el manejo del paciente. La utilización indiscriminada de pruebas diagnósticas

aumentan costos en el sistema, conduciendo a un detrimento en la calidad de la oferta futura (24).

Como limitaciones podemos mencionar tres aspectos, primero, aunque la concordancia a los fármacos antituberculosos fue del 100% en los cultivos positivos, evaluar el real desempeño de sensibilidad a medicamentos, requeriría un número mayor de aislamientos con algún tipo de resistencia; segundo, el método de referencia, no fue el óptimo, debido a que para el tiempo del presente estudio no se contaba con medios con medios líquidos de cultivo como BACTEC™MGIT, ni con la tinción de auraminarodamina para las baciloscopias, ya que estas metodologías tienen mayor sensibilidad; y por último, el diseño retrospectivo, el cual implica posibles sesgos de calidad en la información.

Por otro lado, con la presente prueba molecular, se hace necesario la evaluación en muestras no respiratorias, debido a que informes previos de otros países (25) y en Colombia (26), la forma extrapulmonar muestra cifras importantes; también se debe realizar otras aproximaciones como por ejemplo de costo-beneficio y costo-efectividad, los cuales complementen el desempeño integral de la técnica evaluada en el presente estudio.

En conclusión, las pruebas moleculares no reemplazan las convencionales, sin embargo, se potencian cuando se combinan con datos clínicos y epidemiológicos. Anyplex™II_TB/ MDR/XDR, ofrece la posibilidad de un tamizaje rápido y confiable de Tb y su perfil de sensibilidad a fármacos comparable con las pruebas fenotípicas de primera y segunda línea, a partir de muestra directa y con un mejor desempeño en aquellas con baciloscopia positiva.

La implementación de nuevas ayudas diagnósticas, deben estar en concordancia con las necesidades en la atención del paciente, para que tengan un adecuado impacto en las acciones terapéuticas, con el fin de tener un abordaje integral en el proceso asistencial.

Agradecimientos

A la unidad de Investigaciones del

HUSVF por el soporte logístico y administrativo.



Bibliografía

- World Health Organization. Twentieth global report on tuberculosis. Report number WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva: World Health Organization; 2015. [consultado 1 Jun 2016]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s22199en/s22199en.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. Informe final tuberculosis, Colombia, 2014 [consultado 12 Jul 2015]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Tuberculosis%202014.pdf>
- Garzón MC, Angée DY, Llerena C, Orjuela DL, Victoria JE. Vigilancia de la resistencia del Mycobacterium tuberculosis a los fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. Biomédica. 2008; 28(3): 319-26. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.71>
- Llerena C, Medina R. Descripción de mutaciones que confieren resistencia a rifampicina e isoniazida de Mycobacterium tuberculosis detectadas mediante GenoType® MTBDRplus V.2 en Colombia. Biomédica 2017; 37(1):28-33.
- World Health Organization. Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015: Geneva: World Health Organization; 2011. [Consultado 15 Jul 2016] Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44557/1/9789241501330_eng.pdf
- Raviglione MC, O'Brien R. Mycobacterial diseases. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. p. 1340-59.

- Canetti G, Rist N, Grosset J. [Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibiologic drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation]. Rev Tuberc Pneumol (Paris). 1963 Mar;27:217-72.
- Mishra B, Rockey SM, Gupta S, Srinivasa H, Muralidharan S. Multi-drug-resistant tuberculosis: the experience of an urban tertiary care hospital in South India using automated BACTEC 460 TB. Trop Doct. 2012 Jan; 42(1):35-7. <http://dx.doi.org/10.1258/td.2011.110247>
- Said HM, Kock MM, Ismail NA, Baba K, Omar SV, Osman AG, et al. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. BMC Infect Dis. 2012 Dec 22; 12(1):369. <http://dx.doi.org/doi:10.1186/1471-2334-12-369>
- World Health Organization. Report of the Tenth Meeting WHO Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis (STAGTB), 27-29. 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
- Blakemore R, Nabeta P, Davidow AL, Vadwai V, Tahiri R, Munsamy V, et al. A multisite assessment of the quantitative capabilities of the Xpert MTB/RIF assay. Am J Respir Crit Care Med. 2011 Nov 1; 184(9):1076-84. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201103-0536OC>
- Barnard M, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Bosman M, Coetzee G, Warren RM. The diagnostic performance of the GenoType MTBDRplus version 2 line probe assay is equivalent to that of the Xpert MTB/RIF assay. J Clin Microbiol. 2012 Nov; 50(11):3712-6. <http://dx.doi.org/doi:10.1128/JCM.01958-12>
- Causse M, Ruiz P, Gutierrez JB, Vaquero M, Casal M. New AnyplexTM II MTB/MDR/XDR kit for detection of resistance mutations in M. tuberculosis cultures. Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis. 2015 Dec; 19(12):1542-6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01958-12>
- Irwig L, Tosteson AN, Gatsonis C, Lau J, Colditz G, Chalmers TC, et al. Guidelines for meta-analyses evaluating diagnostic tests. Ann Intern Med. 1994 Apr 15; 120(8):667-76. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-120-8-199404150-00008>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2 cultivo. OPS; 2008.
- Lee JH, Kim BH, Lee M-K. Performance Evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM and MDR-TB Detection Kit for Detection of Mycobacteria and for Anti-Tuberculosis Drug Susceptibility Test. Ann Clin Microbiol.

- 2014;17(4):115. <https://dx.doi.org/10.5145/ACM.2014.17.4.115>
- Perry MD, White PL, Ruddy M. Potential for use of the Seegene Anyplex MTB/NTM real-time detection assay in a regional reference laboratory. J Clin Microbiol. 2014 May; 52(5):1708-10. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.03585-13>
- Rojas CM, Villegas SL, Piñeros HM, Chamorro EM, Durán CE, Hernández EL, et al. [Clinical, epidemiological and microbiological characteristics of a cohort of pulmonary tuberculosis patients in Cali, Colombia]. Biomédica Rev Inst Nac Salud. 2010 Dec; 30(4):482-91.
- Lim J, Kim J, Kim JW, Ihm C, Sohn Y-H, Cho H-J, et al. Multicenter evaluation of Seegene Anyplex TB PCR for the detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. J Microbiol Biotechnol. 2014 Jul; 24(7):1004-7. <https://dx.doi.org/10.4014/jmb.1403.03071>
- Agudelo C, Builes L, Hernandez M, Robledo J. Nuevos Metodos para el diagnostico del tuberculosis. Iatreia. 2008; 21(3):321-332.
- U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Testing for TB infection. [consultado Aug 13]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/tb/topic/testing/default.htm>
- Instituto Nacional de Salud. Informe final de tuberculosis farmacorresistente en Colombia 2013 [consultado 16 May 2016]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/46637/1/2759186.2014.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. Lineamientos para el manejo programático de pacientes con Tuberculosis Farmacorresistente [Consultado 7 oct 2014]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/micobacterias/Lineamientos%20manejo%20de%20tuberculosis%20Farmacorresistente.pdf>
- Torres D, Sierra Arango F, Beltrán Galvis OA. Cuando la evidencia evalúa pruebas diagnósticas... ¿Qué debemos saber, qué debemos hacer? Rev Colomb Gastroenterol. 2004 Dec; 19(4):281-5.
- Bonilla M del RT, Rosete GC, Sandoval HNM, García JLM, Lozano ML, Leyva CP, et al. Epidemiología molecular de infecciones por micobacterias en pacientes del Hospital Regional 1° de Octubre. Rev Espec Méd-Quirúrgicas. 2014; 19(1):80-7.
- Pacheco M, Awad C, Arias G, Ojeda P, Garay M, Lara A, et al. Extrapulmonary tuberculosis A perspective from a third-level hospital. Rev Colomb Neumol. 2013; 25(1):16-26.

GEMATEC
equipamiento para medicina

Radiometer Analizador de Inmunoensayo AQT90 FLEX

- Parámetros medidos: Troponina T, Troponina I, CKMB (masa), Mioglobina. NT-proBNP. PCR. BhCG y Dímero-D.
- Carga continua de muestras, tiempo promedio de resultado 10 minutos.
- Aspiración de muestra a partir de tubo cerrado (sangre entera, plasma o suero)

QUÍMICA CLÍNICA



INMUNOLOGÍA



MEDIO INTERNO



HEMATOLOGÍA



NUEVO

REPRESENTANTE EN ARGENTINA

RADIOMETER

mindray

Int. Avalos 3651 | (1605) | Munro
Buenos Aires, República Argentina
Tel./Fax: (54 11) 4512 5666
ventas@gematec.com.ar
www.gematec.com.ar





Pruebas bioquímicas para el diagnóstico de anemia megaloblástica*



29 min.



Las anemias macrocíticas se pueden clasificar en dos subtipos: las megaloblásticas y las no megaloblásticas. Entre las causas comunes de la anemia macrocítica megaloblástica se encuentra la deficiencia de Vitamina B12 y Folato, mientras que para la anemia macrocítica no megaloblástica, la causa más frecuente es la presencia de cuadros hemolíticos, hemorragias abundantes o el consumo crónico de alcohol. A continuación le presentamos una revisión con las nuevas determinaciones de laboratorio y cuales son los estudios necesarios para un correcto diagnóstico del paciente con anemia macrocítica.



Héctor Claudio Merlo¹, Silvia Mónica De Paula²

¹ Bioquímico. Jefe de Laboratorio División Hematología. Hospital General de Agudos Dr. J. M. Ramos Mejía. Subcomisión de Bioquímica y Biología. Sociedad Argentina de Hematología.

² Bioquímica. Laboratorio División Hematología. Hospital General de Agudos Dr. J. M. Ramos Mejía. Subcomisión de Eritropatías. Sociedad Argentina de Hematología.

* Subcomisión de Eritropatías, Sociedad Argentina de Hematología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Acta bioquím. clín. latinoam. vol.51 no.3 La Plata set. 2017

Recibido: 30 de julio de 2016

Aceptado: 15 de julio de 2017

CORRESPONDENCIA Dr. Héctor Claudio Merlo, Dra. Silvia Mónica De Paula. Laboratorio División Hematología Hospital General de Agudos CABA, Buenos Aires
E-mail: hematologiaramos@gmail.com



Resumen

Es intención de este trabajo hacer un breve repaso sobre el metabolismo de la Vitamina B₁₂ y del Folato o Vitamina B9. Estas dos vitaminas hidrosolubles juegan un papel importante en el metabolismo celular. Son cofactores de reacciones metabólicas de transferencia de grupos monocarbonados, esenciales para el mantenimiento de la vida. Además se describen las nuevas determinaciones de laboratorio, se evalúan cuáles son los estudios necesarios para arribar a un correcto diagnóstico del paciente con Anemia Macroscítica (AM), su etiología y cómo muchas drogas de uso frecuente en medicina producen AM. Se realiza también la evaluación del conjunto de metodologías que se pueden efectuar como rutina en el laboratorio especializado en hematología y se propone un algoritmo para el diagnóstico del paciente con AM.

Palabras clave: Anemia megaloblástica; Deficiencia de vitamina B₁₂; Deficiencia folato; Algoritmo de anemia macrocítica; Pruebas de laboratorio.

Introducción

TRANSPORTE DE FOLATOS

El ácido fólico o vitamina B9 es una vitamina hidrosoluble que resulta de la unión del ácido pterico y de una o más moléculas

de ácido L-glutámico; su forma activa es el tetrahidrofolato (THF). Se encuentra en alimentos de origen vegetal (frutas, verduras, legumbres) o animal (hígado, riñón).

Los folatos y el ácido fólico (AF) se absorben en el duodeno y yeyuno; los poliglutamatos son hidrolizados por la glutamato carboxipeptidasa II del ribete estriado. Su absorción (mecanismo de transporte activo, saturable y pH dependiente) es mediada por el portador de folatos reducido (RFC) que funciona a pH neutro (codificado por el cromosoma 21) y el transportador de folato acoplado a protones (PCFT) que actúa a pH ácido (codificado por el cromosoma 17).

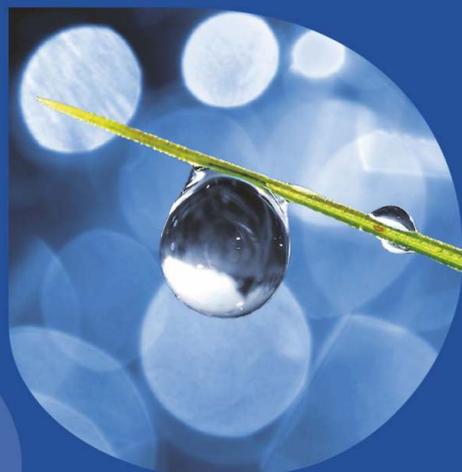
Una vez dentro de la célula la folil poliglutamato sintetasa adiciona residuos glutamato al C-terminal, aumenta su tamaño y evita su salida por las bombas exportadoras de folato. Luego es reducido y metilado a 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF) que cruza la membrana basolateral del enterocito por un mecanismo de intercambio aniónico activo y entra a la circulación portal.

La membrana basolateral del hígado muestra también la característica de un proceso mediado dependiente del sodio; en el hepatocito es convertido en poliglutamato por acción de folilpoli-g-glutamato sintetasa que puede adicionar hasta 8 residuos glutamato.

La folilpoli-g-glutamato carboxipeptidasa los transformará en monoglutamatos secretados en la bilis y reabsorbidos en el intestino delgado.

El riñón participa de la homeostasis dado que el folato filtrado es reabsorbido en el nefrón, que contiene receptores de folato (FR)

Tecnología escalable que acompaña su crecimiento



- Gestión de laboratorios
- Conectividad con analizadores
- Trazabilidad de muestras
- Redes de laboratorios
- Integración hospitalaria
- Facturación



PUBLISHER

Publicación automática de resultados vía fax / email / PDF. Envío simultáneo a pacientes / médicos / instituciones.



WEB

Integración a la web. Consulta interactiva de resultados para Pacientes / Médicos / Derivantes / Recepción en línea de derivaciones.

CONNECT

Comunicación con instrumentos. Producto independiente o componente de NextLAB LIS.



MICROBIOLOGÍA

Definición de paneles de antibióticos (CIM, Disco, IDI) / Manejo de múltiples aislamientos para muestra / Informes preliminares.



SISTEMA DE TRACKING DE MUESTRAS

Seguimiento de las muestras dentro del laboratorio. Producto independiente o integrado a NextLAB LIS.

CONECTOR

Integración en tiempo real de NextLAB LIS con Sistemas hospitalarios / Middleware / LIS de otros fabricantes.



LABORATORY
INFORMATION
SYSTEM®

Flexibilidad y poder de parametrización. Software abierto que puede integrarse con instrumentos de cualquier fabricante. Solución ideal para instituciones públicas y privadas al contemplar facturación e integración con sistemas hospitalarios. NextLAB® LIS se presenta en tres versiones: Lite, Professional y Enterprise.

LITE

PRO

ENT

 **NextLAB®**

SOFTWARE INTELIGENTE

NextLAB by Genetrics S.A.

Av. del Libertador 8630 6to Piso "1"

C1429BNT Núñez Buenos Aires

T. (+5411)52 63 02 75 Rot

F. (+5411)52 63 02 75 Ext 100

info@nextlab.com.ar

en las células del túbulo proximal.

Los FR son una familia de receptores de alta afinidad codificados por 3 genes *alfa*, *beta* y *gamma* localizados en el cromosoma 11. Las *alfa* y las *beta* son glicosilfosfatidilinositol proteínas de anclaje y la *gamma* es secretoria.

La absorción de folato en el citosol por los FR implicaría un proceso de endocitosis (1).

TRANSPORTE DE VITAMINA B12

La vitamina B12 o Cobalamina, también hidrosoluble, resulta de la unión asimétrica de cuatro anillos pirrólicos (anillo de corrina) en torno a un átomo central de cobalto sobre el que se efectuarán procesos de óxido-reducción que conducirán del Co (3+) a Co (1+) (2) (Figura 2).



Figura 1. Ácido fólico.

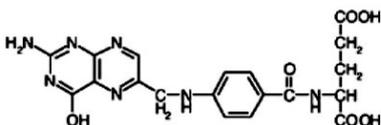
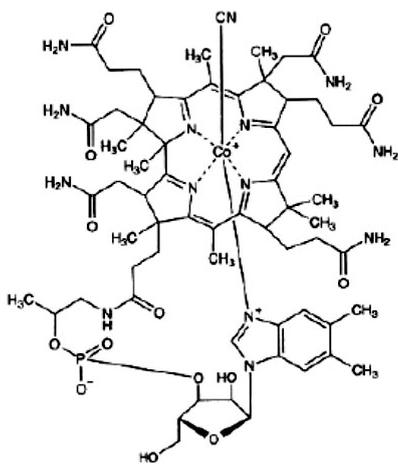


Figura 2. Fórmula química de la Vitamina B12.



Mínimas dosis con necesarias para el organismo. La cadena nutricional comienza con la producción por las bacterias en el tracto intestinal de los herbívoros, la acumulación en sus tejidos y el consumo de productos de origen animal dado que el hombre no puede sintetizarla. La hidroxicobalamina y la

cianocobalamina proveniente de los alimentos serán transformadas en metil- y desoxiadensilcobalamina.

La vitamina B12 es captada por la Haptocorrina, de origen salival, que la protege de la hidrólisis en medio ácido. En el duodeno la Haptocorrina es degradada por las enzimas pancreáticas y la B12 es captada por el Factor Intrínseco (FI) producido por las células parietales; este complejo es absorbido por endocitosis mediada por el receptor Cubilina-AMN.

La cubilina es una proteína de membrana que se une a FI-B12 y AMN es una proteína transmembrana con actividad endocítica.

El FI es degradado por proteasas lisosomales y la B12 retorna al citoplasma por medio de la proteína LMBD, puede permanecer dentro de la célula o ser exportada por el MRP1, transportador basolateral de la célula ileal.

Una vez transportada al plasma circula unida a la Transcobalamina II, la cual puede ser captada por el receptor CD320 en el hígado y demás órganos.

En riñón la recaptura de holotranscobalamina se produce por el receptor Megalina (3).

La B12 es cofactor para dos enzimas: la metionina sintetasa (citoplasmática) y la metilmalonilCoA mutasa (mitocondrial) que cataliza el pasaje de metilmalonilCoA a succinilCoA, metabolito del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

El déficit de B12 reduce la actividad de la metilmalonilCoA mutasa produciendo la acumulación de metilmalonilCoA y ácido metilmalónico (MMA).

La B12 es cofactor de la metionina sintetasa que cataliza la metilación de la homocisteína a metionina, precursor de la S-adenosilmetionina (SAM), donador de grupos metilo necesarios para la metilación de fosfolípidos, neurotransmisores, aminas, ADN, ARN y proteínas básicas de mielina; en la depleción de B12 se inactiva la metionina sintetasa con importante reducción de las reacciones de metilación, y la homocisteína aumenta (4,5).

La deficiencia de B12 o de folatos se traduce en una anemia megaloblástica resultante en una síntesis alterada de ADN. Ambas vitaminas están intrínsecamente ligadas a la vía de la metionin sintetasa que es la única enzima que usa al 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) y lo convierte en su forma metabólicamente activa, el tetrahydrofolato (THF) necesario en el metabolismo de un átomo de carbono.

En la deficiencia de B12 la actividad de la metionin sintetasa se reduce y se bloquea la formación de THF; el folato queda atrapado como 5-MTHF, que es una forma que no puede utilizarse, dado que el pasaje de 5,10-MTHF a 5-MTHF catalizado por la 5,10-metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR) es irreversible.

TRAMPA DE FOLATOS

La SAM es inhibidor alostérico de la MTHFR; en el déficit de B12 la SAM disminuye, por lo que se elimina la inhibición de MTHFR promoviendo la reducción de 5,10-MTHF a 5-MTHF de modo que se utilice para resintetizar metionina y se produce más acumulación de folatos como 5-MTHF.

Las células sufren de una pseudo-deficiencia de folatos dado que no está en su forma activa, de manera que se interrumpe la producción de purinas y pirimidinas necesarias para la síntesis de ADN.

El 5-MTHF no es sustrato de elección para la folilglutamato sintetasa, enzima responsable de la retención celular de folato. Se han reportado bajas concentraciones de folato intraeritrocitario en deficiencia de B12 (5).

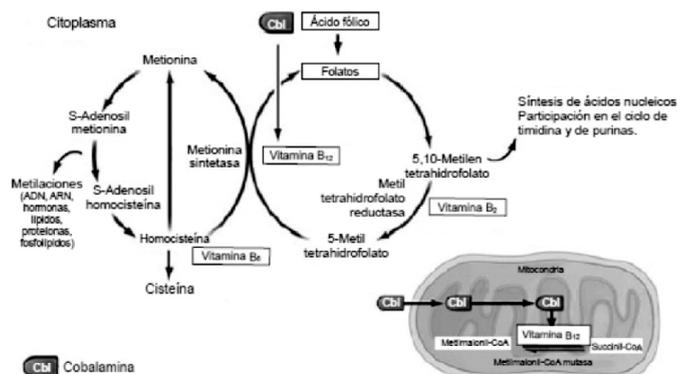
El 5-MTHF puede atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite el mantenimiento de la mielina.

El defecto en la síntesis de ADN compromete a todas las células del organismo con capacidad proliferativa.

La anemia megaloblástica es la manifestación de esta anomalía en la síntesis de ADN; se activa la apoptosis que causará una eritropoyesis ineficaz y se acorta la vida de los glóbulos rojos (Figura 3).



Figura 3. Ciclo metabólico de Folatos y Vitamina B12



EVALUACIÓN DE LAS ANEMIAS MACROCÍTICAS EN EL LABORATORIO

Las anemias macrocíticas (AM) generalmente definidas por un Volumen Corpuscular Medio (VCM) >100 fL, se pueden clasificar en dos subtipos: las megaloblásticas (AM-Me) y las no megaloblásticas (AM-NoMe).

Dentro de las causas comunes de anemia macrocítica

megaloblástica se encuentra la deficiencia de Vitamina B12 (B12) y Folato (Fol), mientras que para la anemia macrocítica no megaloblástica, la causa más frecuente es un aumento de los reticulocitos (Ret) o el consumo crónico de alcohol (6,7). Se debe tener en cuenta también la edad de los pacientes, ya que los valores de B12 y Fol están disminuidos, y los del Ácido Metilmalonico (AMM) y de la Homocisteína total (HCT) están aumentados en adultos mayores de 60 años (7).

CAUSAS DE ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

Fuera de las deficiencias de B12 y Fol, existen varias causas de AM-Me, entre las que se encuentran la inadecuada secreción de Factor Intrínseco (FI), alteraciones en la liberación de B12 del complejo B12-Receptor, malabsorción por anomalías del íleo terminal (para B12) o del yeyuno (para Fol) y anomalías hereditarias o adquiridas en los metabolismos de B12 y Fol (7).

Además, existe una gran cantidad de drogas de uso frecuente en medicina que interfieren con la absorción o distribución de Fol, como agentes anticonvulsivantes (fenobarbital, fenitoína, etc.), anticonceptivos (estrógenos), antimaláricos (quinina, etc.) y antibióticos (ampicilina, tetraciclinas, etc.) (8). Hay drogas que interfieren con el metabolismo de Fol, conocidas generalmente como análogos de folato, que se utilizan en el tratamiento de enfermedades oncológicas, ya sea de tumores sólidos o leucemias (metotrexato,



Analizador Multiparamétrico Totalmente automatizado

Enfermedades Infecciosas

Adenovirus IgG	Legionella Pneumophila 1-6 IgG
Adenovirus IgA	Measles IgG
Chlamydia Pneumoniae IgG	Measles IgM
Chlamydia Pneumoniae IgM	Mycoplasma Pneumoniae IgA
Chlamydia Pneumoniae IgA	Mycoplasma Pneumoniae IgG
Cytomegalovirus IgG	Mycoplasma Pneumoniae IgM
Cytomegalovirus IgG Avidity	Mumps IgG
Cytomegalovirus IgM	Mumps IgM
Epstein-Barr VCA IgG	Respiratory Syncytial Virus IgG
Epstein-Barr VCA IgM	Respiratory Syncytial Virus IgG
Epstein-Barr EBNA IgG	Rubella IgG
Epstein-Barr Early Antigen IgG	Rubella IgG Avidity
Epstein-Barr Early Antigen IgM	Rubella IgM
Helicobacter Pylori IgG	Syphilis Screen Recombi
Helicobacter Pylori IgA	Treponema IgG
HSV 1 Screen	Treponema IgM
HSV 2 Screen	Toscana Virus IgG (Sandfly Fever Virus)
Herpes Simplex 1+2 IGM	Toscana Virus IgM (Sandfly Fever Virus)
Herpes Simplex 1+2 IgG	Toxoplasma IgG
Influenza A IgG	Toxoplasma IgG Avidity
Influenza A IgM	Toxoplasma IgM
Influenza B IgG	Toxoplasma IgA
Influenza B IgM	Varicella IgG
Legionella Pneumophila IgM	Varicella IgM
Legionella Pneumophila 1 IgG	

Autoinmunidad

AINA-8	Glíadin-B
ENA-6-S	Deaminated Gliadin
ANA Screen	Preptide-G
SM	Deaminated Gliadin
SS-A	Preptide -A
SS-B	tTg-A
Scl-70	tTg-G
Cemp-B	ASCA-A
Jo-1	ASCA-G
dsDNA-G	PR3
dsDNA-M	MPO
CCP	GBM
RF-M	a-TG
Cardiolipin-IgG	a-TPO
Cardiolipin-IgM	TG
Beta 2-Glycoprotein-G	LKM-1
Beta2-Glycoprotein -M	AMA-M2
Glíadin-A	Insulin

- Dispositivo individual de un solo uso que contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo.
- Capacidad multiparamétrica: Procesa hasta 30 diferentes pruebas por corrida.
- La velocidad permite obtener resultados simultáneos de diferentes paneles.
- El primer resultado se obtiene antes de 90 minutos.
- Volumen de muestra:
La muestra se dispensa manualmente.
ELISA: Mínimo de muestra 60 uL
Fijación de complemento: Mínimo de muestra 120 uL

Fijación del Complemento

Bordetella Pertussis	Chlamydia
Borrelia	Echo Virus P Mix
Brucella	Influenza A Virus
Campylobacter Jejuni	Influenza B Virus
Legionella Pneumophila	Mycoplasma Pneumoniae
Leptospira Mix	Parainfluenza Mix
Listeria Monocytogenes	Q-Fever
Shigella Flexneri	Reovirus
Yersinia Enterocolitica	Respiratory Syncytial Virus
Echo Virus N Mix	Coxsackie Virus A Mix
Poliovirus Mix	Coxsackie Virus B Mix
Adenovirus	Achinococcus



Próximamente disponibles: Borellia IgG - IgM, Vitamina D, Chlamydia Trachomatis IgG - IgA, Parvovirus IgG - IgM, Panel Vacunación (Tetanos - Difteria - polio IgG), EBV VCA Recombinante.

hidroxiurea, mercaptopurina, etc.) (8). También hay drogas que disminuyen la absorción de B12: antituberculosos y antibióticos (ácido aminosalicílico, isoniacida, neomicina, etc.), hipoglucemiantes orales (metformina); drogas que aumentan la excreción de B12: antihipertensivos (nitroprusiato de sodio) y las que destruyen B12: antihipertensivos (óxido nítrico) (8). Algunos de estos compuestos son conocidos también como antivitaminas, su uso está muy difundido en medicina sobre todo con antagonistas de Fol como el metotrexato y vitamina K (anticoagulantes orales), sin embargo, está aún en las primeras fases de investigación para antagonistas de B12 (9).

OTRAS CAUSAS DE ANEMIA MACROCÍTICA NO MEGALOBLÁSTICA

Como se mencionó más arriba, las causas más frecuentes de AM-NoMe son el abuso crónico de alcohol (con o sin enfermedad hepática) y los cuadros hemolíticos o pérdidas abundantes de sangre, que producen reticulocitosis, como así también la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Dentro de otras causas se pueden distinguir la enfermedad hepática (cirrosis y patología hepática aguda), el hipotiroidismo, mielodisplasias como el síndrome 5q-, anemia diseritropoyética congénita tipo I (CDA I), anemia aplásica, síndrome de Diamond-Blackfand y anemia de Fanconi (6). Existen también, al igual que en el caso de las AM-Me, drogas que producen por distintos mecanismos una anemia macrocítica, como ser las que interfieren en el metabolismo de purinas y/o pirimidinas, con la consiguiente disminución en la síntesis de ADN, por lo general utilizadas en el tratamiento de patologías oncológicas (mercaptopurina, fludarabina, etc.), antigotosos (allopurinol), inmunomoduladores usados en trasplante de órganos y procesos inflamatorios como artritis reumatoidea y artritis psoriásica (azatioprina, leflunomida, etc.) (8). Existen, además, drogas que producen macrocitosis por mecanismos complejos o desconocidos, como algunos antineoplásicos (asparaginasa, arsénico, etc.) (8) y antirretrovirales de uso frecuente en el tratamiento de pacientes HIV positivos (7).

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANEMIAS MACROCÍTICAS

Lo primero es realizar una observación minuciosa de un buen extendido de sangre

periférica, ya que de observar policromatofilia, generalmente asociada a presencia de un número aumentado de Ret, estaría indicando un aumento en la actividad eritroide de la médula y orientaría a pensar en un aumento de la producción debido a pérdida de sangre o anemia hemolítica. Por otro lado, la presencia de neutrófilos hipersegmentados, definida generalmente como la presencia de >5% de neutrófilos con cinco o más lóbulos, ya sea con o sin la presencia de macro ovalocitos, orientaría a una megaloblastosis (6,10).

DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE VITAMINA B12

Los métodos actuales para determinar la concentración de B12 en suero brindan, según los fabricantes, una sensibilidad del 95-97%, pero los valores normales de B12 no excluyen una deficiencia. Por este motivo, es importante realizar también la determinación los metabolitos relacionados como ácido metilmalónico (AMM) y homocisteína total (HCT) los cuales están aumentados, tempranamente, en la deficiencia de B12 (6,7,10).

La determinación de AMM tiene varias desventajas, ya que se trata de un estudio caro, por lo que no está muy difundido y además, por lo general, tiene una demora importante en la devolución de resultados (7,10). Esto se debe a que el método de determinación comprende técnicas de separación por Cromatografía Gaseosa y cuantificación por Espectrometría de Masa (CG-EM) (10-12). Se puede utilizar además una técnica de Cromatografía Líquida y cuantificación por espectrometría de masa en *tandem* (CL-EM/EM), la cual según sus desarrolladores, tiene muy buena correlación con la CG-EM en cuanto a los resultados obtenidos, con CV% intra e inter ensayo menores, de 3,8-8,5% para CG-EM y 1,3-3,4% para CL-EM/EM, pero a diferencia de ésta, tiene una reducción importante en los costos (59% menos) y en el tiempo de procesamiento (75% menor), ya que tiene un tiempo de corrida de 7,5 h contra las 30 h de la CG-EM. Por este motivo sus desarrolladores consideran que puede ser automatizable para más de 100 muestras/día (13).

Con respecto a la determinación de HCT, tiene la desventaja de estar aumentada tanto en la deficiencia de B12 como en la de Fol, por lo que pierde especificidad (7,10).

En los últimos años se ha estado investigando la incorporación de la determinación de B12 intra-eritrocitaria, que junto con el Fol intra-eritrocitario, evalúan los depósitos de dichas vitaminas, ya que éstas se incorporan al glóbulo rojo durante su formación en los precursores de médula ósea y mantienen su concentración durante los 120 días de vida media del eritrocito, disminuyendo por consiguiente a los pocos meses de deficiencia de estos compuestos (14). Esta técnica no está muy difundida, ya que se trata de una técnica experimental de radioensayo de inhibición competitiva (15) y actualmente existe un reactivo comercial de ICN Pharmaceuticals Inc. para la determinación cuantitativa simultánea de Vitamina B12 [57Co] y Folato [125I] en suero y plasma. Este reactivo sirve además para la determinación de Fol intra-eritrocitario, pero no se describe en el inserto del mismo la determinación de B12 intra-eritrocitaria (16).

La Holotranscobalamina (HoloTC) es la fracción activa de B12 y puede ser más específica que los niveles de B12 sérica para determinar el estado de deficiencia de B12. Existe en la actualidad un *test* inmunológico comercial para su determinación, el cual fue planteado como un probable *gold-standard* frente a la determinación de AMM, ya que no se necesita ninguna preparación previa de la muestra (10). Esta técnica se basa en un ensayo inmunológico de captura por anticuerpos monoclonales (17). Sin embargo, el uso de este *kit* comercial está cuestionado, ya que según algunos autores se basa en modelos erróneos. Ellos plantean principalmente que el modelo de Herbert, en el cual se basa la afirmación que la HoloTC sería un indicador precoz de la deficiencia de B12, no considera cómo el reciclado entero-hepático de B12, regula la concentración de HoloTC. En función de esto, la HoloTC sólo sería un indicador temprano de deficiencia de B12 en los casos en que dicha deficiencia se debiera a una interrupción del ciclo entero-hepático. De otra manera, existiría un período de “depleción” en el cual la B12 total caería, mientras que la HoloTC permanecería dentro de valores normales hasta que los depósitos hepáticos se agoten (18).

En este punto es importante destacar que ante la ausencia de un VCM elevado y la presencia de patología neurológica, no se puede excluir la evaluación de una deficiencia de B12 ya que se ha observado que

La más amplia gama de Analizadores de Electrolitos

SEMIAUTOMÁTICOS



V4 Semi Básico

Ideal para laboratorios pequeños con baja cantidad de muestras diarias. No consume mientras no se usa!



V4 Semi Plus

Ideal para laboratorios pequeños con baja cantidad de muestras. Con impresora y conectividad. No consume mientras no se usa!

Desde equipos semiautomáticos para pocas muestras diarias, hasta automáticos de alta gama y prestación para una gran carga de trabajo.

Diseñados y producidos en Argentina comercializados en todo el mundo.

AUTOMÁTICOS



V4 Auto Básico

Para laboratorios medianos y modernos, con auto stand by para reducir consumo, impresora y conectividad.



V4 Auto Plus

Es el instrumento para laboratorios grandes, que necesita gestionar sus muestras en forma autónoma y segura, con toda la conectividad necesaria.

Na⁺

K⁺

Cl⁻

Ca⁺⁺

Li⁺



Inmunoensayo Magnético Quimioluminiscente de Micropartículas (CMIA) de Abbott Diagnostic-Architect y el Enzimo Inmunoensayo Quimioluminiscente competitivo de Siemens HealthCare-Immulite.

Vitamina B12

Architect: Las muestras no necesitan preparación previa y las muestras hemolizadas deben ser descartadas. El tiempo de reacción es de aproximadamente 40 min.

Precisión y Exactitud

El fabricante realizó estudios de imprecisión durante 20 días basados en el protocolo EP5-A2 del CLSI. Se trabajó con 3 lotes de reactivo, 2 lotes de calibradores y 1 panel de sueros, en 2 equipos diferentes. En este estudio se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla I.

Para determinar exactitud, se realizó un estudio respecto al patrón internacional de OMS 03/178, obteniendo una diferencia de -3,6% respecto al valor esperado.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son las siguientes:

Bilirrubina hasta 25,1 mg/dL
Proteínas hasta 12 g/dL
Triglicéridos hasta 3.325 mg/dL

Immulite: En este caso se trata de un ensayo competitivo en fase sólida.

Las muestras se deben desnaturalizar calentando a 100 °C durante 15 a 20 min y luego un enfriamiento de 5 min antes de ser procesadas. El análisis se completa con una corrida de 2 ciclos de 30 min cada uno.



Tabla I. Datos del estudio de imprecisión para la determinación de Vitamina B12

Analizador	Muestra	n	Media (pg/mL)	Intra-ensayo		Inter-ensayo	
				DE	CV%	DE	CV%
1	Suero	360	262	12,6	4,8	16,3	6,2
	C. Bajo	354	246	13,8	5,6	16,7	6,8
	Medio	355	424	14,3	3,4	16,8	4,0
	Alto	359	890	36,0	4,0	38,9	4,4
2	Suero	357	248	11,6	4,7	13,3	5,4
	C. Bajo	356	241	10,4	4,3	12,9	5,4
	Medio	352	408	13,3	3,3	15,5	3,8
	Alto	355	885	23,9	2,7	29,7	3,4

Precisión y Exactitud

El fabricante realiza un estudio de precisión intra-ensayos con 15 replicados de 5 soluciones en una sola tanda. Además, hace precisión inter-ensayos con muestras analizadas en 10 tomas distintas de 3 soluciones. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas II y III.

NO LO PIENSE MÁS, TENEMOS EL EQUIPO IDEAL PARA SU LABORATORIO

Química Clínica



240 Test/Hora
DIRUI CS-T240



400 Test/Hora
DIRUI CS-400



600 Test/Hora
DIRUI CS-600B

Orinas



514 Tiras/Hora
DIRUI H-500

Hematología



60 Hemogramas/Hora
DIRUI BCC-3000B



60 Hemogramas/Hora
DIRUI BF-6500



80 Hemogramas/Hora
Con AUTO-SAMPLER
DIRUI BF-6800

DIRUI 20 años



Bernardo Lew

aproximadamente el 25% de los casos presentan VCM normal (10).

ESTUDIOS PARA DETERMINAR LA ETIOLOGÍA DE LA DEFICIENCIA DE COBALAMINA

Una vez certificada la deficiencia de B12 es importante realizar estudios para determinar la etiología de la anemia. Esto se debe a que se hace imprescindible el diagnóstico de Anemia Perniciosa (AP).

La AP es una enfermedad autoinmune, que puede coexistir con otras como la enfermedad de Hashimoto, la diabetes tipo I, el vitiligo y el hipoadrenalismo.

Es común encontrar en estudios de autoinmunidad para varias endocrinopatías, anticuerpos asociados a AP (10).

ANTICUERPOS ANTI FACTOR INTRÍNSECO

La AP se caracteriza por la presencia de Anticuerpos Anti Factor Intrínseco (AcFI).

Este estudio tiene un alto valor predictivo positivo, ya que están presentes en el 95% de los pacientes con AP, mientras que presenta un bajo nivel de falsos positivos de entre 1–2%, sin embargo tiene una baja sensibilidad ya que están presentes solo en el 40–60% de los pacientes con AP; por lo tanto, este estudio, de ser negativo, no permite descartar el diagnóstico.

Se debe tener en cuenta, además, que la tasa de positividad aumenta con la edad y también en determinados grupos raciales, como los latinoamericanos y los afroamericanos y que, además altos títulos de AcFI pueden interferir dando resultados normales de B12 en suero, por lo cual este estudio está absolutamente indicado en aquellos pacientes con resultados de B12 normal, con presencia de AM y síntomas neurológicos. Asimismo, con técnicas de quimio-luminiscencia, se pueden dar falsos positivos en pacientes que hayan recibido recientemente tratamiento con cobalamina inyectable (10).

ANTICUERPOS ANTI CÉLULAS PARIETALES GÁSTRICAS

Si bien los Anticuerpos anti Células Parietales Gástricas (AcCPG) tienen una baja especificidad para AP, con el progreso de la enfermedad pueden hacerse positivos en el 80% de los pacientes; además, presentan una baja tasa de falsos positivos que se reporta en un 10% de personas normales. Estos anticuerpos son los responsables de causar Aclorhidria Gástrica y los pacientes pueden progresar a AP (10).

DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE FOLATO

El término Folato se refiere tanto a las diferentes formas biológicamente activas de la vitamina, como al Ácido Fólico, que es la forma sintética usada en la suplementación de alimentos y para el tratamiento médico.

Ambos tipos son absorbidos en la zona proximal del intestino delgado (yeyuno) y, aproximadamente el 50% del Fol corporal se encuentra en el hígado.

Si bien la biodisponibilidad de ambas formas es buena, la absorción del Fol dietario está influenciada por varios factores en el lumen intestinal, como así también es vulnerable a degradación por el proceso de cocción de los alimentos. Existe consenso en que la biodisponibilidad del Fol alimentario es 50% menor que la del ácido fólico.

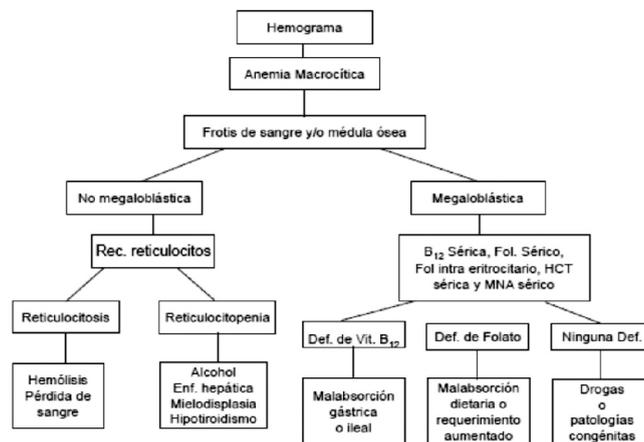
Una baja ingesta de Fol lleva a bajos niveles de Fol en sangre lo que conduce a bajas concentraciones en los tejidos. Sabiendo que el Fol es esencial para la síntesis de ADN, la deficiencia temprana se ve reflejada en los tejidos de rápida proliferación, como la médula ósea y el tracto gastro-intestinal, mientras que la deficiencia severa, puede llevar a pancitopenia y AM (10).

Las técnicas para evaluar el estado deficitario de Fol deberían incluir las determinaciones de Fol sérico e intra-eritrocitario. Los resultados obtenidos van a depender del método de determinación utilizado y pueden surgir de las diferencias en las técnicas de preparación de los hemolizados. La especificidad de resultados bajos de Fol intra-eritrocitario está discutida, ya que más del 60% de pacientes con deficiencia de B12 presentan valores disminuidos de Fol intra-eritrocitario, de modo que se hace indispensable realizar la determinación de B12 sérica junto con Fol sérico e intra-eritrocitario, por lo que la deficiencia de Fol se asume sólo cuando se encuentran valores normales de B12 sérica (6,7). Se debe tener en cuenta además, que el resultado de Fol sérico se ve influenciado por la ingesta reciente de ácido fólico, por lo que pueden verse resultados falsamente negativos en pacientes con deficiencia de Fol.

En función de lo expresado hasta aquí, puede proponerse un algoritmo para el estudio de pacientes con AM, de acuerdo con el propuesto por Green *et al* que se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Algoritmo para la evaluación de pacientes con AM. Adaptado de Green R y Dwyre DM. *Sem Hem* 2015 Oct; 52 (4): 279-86



EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

Las dos metodologías más utilizadas en nuestro medio son:



Tabla II. Resultados de los estudios de precisión intra-ensayo.

Solución	Media (pg/mL)	DE	CV%
1	159	18	11,3
2	204	21	10,3
3	401	27	6,7
4	736	39	5,3
5	1308	77	5,9

Tabla III. Resultados de los estudios de precisión inter-ensayo.

Solución	Media	DE	CV%
1	310	23	7,4
2	660	40	6,1
3	1192	202	17,0

Se realiza además un estudio de exactitud como recuperación con 4 soluciones de distinta concentración dando porcentajes de recuperación entre 93–115% expresado en % de observado/esperado.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son:

Bilirrubina hasta 20 mg/dL
Hemoglobina hasta 3,81 g/dL
Triglicéridos hasta 3000 mg/dL

Folato sérico y folato intra eritrocitario

Architect: Las muestras para determinar Fol sérico no necesitan ninguna preparación previa y las muestras hemolizadas deben ser descartadas. El tiempo de reacción es de aproximadamente 40 min.

Precisión y Exactitud

El fabricante realiza un estudio de imprecisión con el siguiente esquema: usa 3 paneles de suero (S1, S2, S3) en un instrumento, 3 replicados en dos tiempos diferentes durante 20 días con 2 lotes de reactivo. De este estudio se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla IV.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son las siguientes:

Bilirrubina hasta 20 mg/dL
Proteínas hasta 12 g/dL
Triglicéridos hasta 3.000 mg/dL



Tabla IV. Datos del estudio de imprecisión para la determinación de Folato sérico.

Muestra	Lote de Reactivo	Media (ng/mL)	Intra-ensayo		Total	
			DE (ng/mL)	CV%	DE (ng/mL)	CV%
S1	1	3,5	0,12	3,5	0,14	3,9
	2	3,6	0,14	3,9	0,17	4,7
S2	1	10,8	0,18	1,7	0,41	3,8
	2	11,2	0,21	1,9	0,44	4,0
S3	1	16,8	0,27	1,6	0,53	3,1
	2	17,0	0,24	1,4	0,61	3,6

Tabla V. Resultados de los estudios de precisión intra e inter-ensayo.

Muestra	Lote de Reactivo	Media (ng/mL)	Intra-ensayo		Total	
			DE (ng/mL)	CV%	DE (ng/mL)	CV%
H1	1	113,2	6,10	5,4	8,82	7,8
	2	118,1	4,89	4,0	6,49	5,5
H2	1	222,9	7,04	3,2	13,29	6,0
	2	221,9	5,59	2,5	12,19	5,5
H3	1	367,2	7,87	2,1	21,60	5,9
	2	359,1	8,90	2,5	22,97	6,4

Las muestras para determinar Fol intra-eritrocitario requieren 90 min de incubación del hemolizado a temperatura ambiente.

Precisión y Exactitud

El fabricante realizó el mismo esquema que para el Fol sérico, pero con 3 hemolizados (H1, H2, H3) obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla V.

Realizan también un estudio de exactitud con estándar internacional de OMS 03/178, obteniendo un porcentaje de diferencia entre -0,6–1,3% en un intervalo de confianza de 95% y realizan estudio de reactividad cruzada con 3 sustancias interferentes, obteniéndose resultados de reactividad cruzada entre -0,6–2,1%.

Immulte: Se trata de un ensayo competitivo en fase líquida.

Las muestras para la determinación en suero se deben desnaturalizar calentando a 100 °C entre 15 a 20 min y luego un enfriamiento por 5 min.

El ensayo se completa con 2 ciclos de 30 min cada uno.

Precisión y Exactitud

El fabricante realiza estudios de precisión intra-ensayo haciendo 20 replicados de 3 soluciones de diferente concentración en una sola tanda y precisión inter-ensayo de 20 tomas distintas de 3 soluciones. Los resultados obtenidos pueden verse en las Tablas VI y VII.



Tabla VI. Resultados del estudio de precisión intra-ensayo para la determinación de Folato sérico.

Solución	Media	DE	CV%
1	2,1	0,19	9,0
2	5,2	0,22	4,2
3	13	0,67	5,2

Tabla VII. Resultados del estudio de precisión inter-ensayo para la determinación de Folato sérico

Solución	Media	DE	CV%
1	1,8	0,16	8,9
2	5,3	0,21	4,0
3	13	0,96	7,4

Se realiza además un estudio de exactitud como recuperación con 3 soluciones de distinta concentración dando porcentajes de recuperación entre 96–119% expresado en % de observado/esperado. La única interferencia es la bilirrubina y la concentración máxima que mostró una

interferencia menor al 10% es la siguiente:
Bilirrubina hasta 20 mg/dL.

Para la determinación de Fol intra-eritrocitario se debe incubar el hemolizado 90 min a temperatura ambiente.

El fabricante no informa el estudio de precisión para esta determinación.

HOMOCISTEÍNA

Architect: Las muestras para la determinación de HCT no necesitan ninguna preparación previa.

El tiempo de reacción es de aproximadamente 30 min.

Precisión y Exactitud

El fabricante realiza un estudio basado en el protocolo descrito en la guía EP5-A2 por el CLSI. Se analizaron por duplicado 3 controles y 5 muestras de plasma humano utilizando 2 lotes de reactivos, 2 veces al día durante 20 días, con 2 analizadores. Se generó una curva de calibración nueva para cada lote de reactivos cada día del análisis, Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VIII.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son:

Bilirrubina hasta 20 mg/dL
Hemoglobina hasta 1 g/dL



Tabla VIII. Resultados del estudio de precisión intra-ensayo para la determinación de homocisteína sérica.

Muestra	Analizador	Lote Rvo.	N	Media (μmol/L)	Intra-ensayo		Total	
					DE	CV%	DE	CV%
Control Bajo	1	1	80	7,40	0,26	3,5	0,43	5,9
	2	2	80	7,58	0,18	2,4	0,25	3,3
Control Medio	1	1	80	13,21	0,26	2,0	0,64	4,8
	2	2	80	13,37	0,24	1,8	0,41	3,0
Control Alto	1	1	80	26,77	0,63	2,3	1,09	4,1
	2	2	80	25,73	0,47	1,8	0,73	3,8
Muestra 1	1	1	80	4,78	0,19	4,0	0,30	6,3
	2	2	80	4,71	0,13	2,8	0,18	3,8
Muestra 2	1	1	80	11,03	0,22	2,0	0,48	4,3
	2	2	80	10,89	0,13	1,2	0,23	2,1
Muestra 3	1	1	80	17,60	0,43	2,4	0,77	4,4
	2	2	80	17,29	0,27	1,6	0,46	2,6
Muestra 4	1	1	80	35,40	0,79	2,2	1,19	3,4
	2	2	80	34,83	0,71	2,0	0,87	2,5
Muestra 5	1	1	80	41,84	0,71	1,7	1,35	3,2
	2	2	80	41,46	0,68	1,6	1,12	2,7

Proteínas menores de 3 g/dL y mayores de 12g/dL
Triglicéridos hasta 6000 mg/dL

Immulite: Se trata de un ensayo competitivo de fase sólida.

El pretratamiento lo realiza el instrumento y dura 30 min. El ensayo se completa con un ciclo de 30 min.

Precisión y Exactitud

El fabricante realiza estudios de pre-

cisión intra-ensayos procesando 4 muestras por cuadruplicado en 20 tandas, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla IX.

Se realiza además un estudio de exactitud como recuperación con 3 soluciones de distinta concentración dando porcentajes de recuperación entre 85–108% expresado en % de observado/esperado.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son:

LA SOLUCIÓN EN HEMATOLOGÍA



Orphee Mythic 22 AL
Total Automático 5 DIFF
+ Bioseguridad



GEO MC
Total Automático 3 DIFF
+ Bioseguridad



Orphee Mythic 22 OT
5 DIFF + Sistema Tubo Abierto



Orphee Mythic 18
3 DIFF + Sistema Tubo Abierto



Bioseguridad - Sistema Tubo Cerrado
PC + Monitor + Impresora
Conexión a LIS



Reactivos Nacionales



I.B.S.A.
INSTRUMENTAL BIOQUÍMICO S.A

Bilirrubina hasta 20 mg/dL
Hemoglobina hasta 5,12 g/dL
Triglicéridos hasta 3000 mg/dL

Holotranscobalamina

Como ya se mencionó, la HoloTC es la fracción metabólicamente activa de la B12 y reflejaría mejor y en forma más temprana la deficiencia de esta vitamina. En la actualidad existe un reactivo comercial para su determinación con el sistema Architect-Abbott.

Las muestras para este ensayo no requieren preparación previa y el tiempo de reacción es de 30 min.

Precisión y Exactitud

El fabricante realiza un estudio basado en el protocolo descrito en la guía EP5-A2 por el NCCLS. Se analizaron 2 controles de diferente concentración y 5 muestras de suero humano, utilizando 2 lotes de reactivos, calibradores y controles, 2 replicados, 2 veces al día durante 20 días, con 2 analizadores. Se utilizó una curva de calibración única para cada lote de reactivos durante todo el estudio, Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla X.



Tabla IX. Resultados del estudio de precisión intra-ensayo para la determinación de homocisteína sérica.

Solución	Media	Intra-ensayo		Total	
		DE	CV%	DE	CV%
1	3,94	0,29	7,4	0,41	10,4
2	9,88	0,47	4,8	0,75	7,6
3	11,1	0,38	3,4	0,46	4,1
4	25,9	1,06	4,1	1,31	5,1

Tabla X. Resultados del estudio de precisión intra-ensayo para la determinación de HoloTC en suero.

Muestra	Analizador	Lote Rvo.	n	Media (pmol/L)	Intraserie		Total	
					DE	CV (%)	DE	CV (%)
Control Bajo	1	1	80	15,42	0,64	4,2	0,76	4,9
	2	2	80	15,56	0,59	3,8	0,63	4,1
Control Alto	1	1	80	49,82	1,87	3,8	2,65	5,3
	2	2	80	47,75	1,80	3,8	2,13	4,5
Muestra 1	1	1	80	18,56	0,36	1,9	0,97	5,2
	2	2	80	16,81	0,46	2,8	0,86	5,1
Muestra 2	1	1	80	24,62	0,56	2,3	1,02	4,2
	2	2	80	22,40	0,51	2,3	0,74	3,3
Muestra 3	1	1	80	52,95	0,86	1,6	2,01	3,8
	2	2	80	48,36	1,33	2,7	2,07	4,3
Muestra 4	1	1	80	81,34	1,83	2,2	3,83	4,7
	2	2	80	72,15	2,17	3,0	3,37	4,7
Muestra 5	1	1	80	113,74	2,07	1,8	4,85	4,3
	2	2	80	100,08	4,39	4,4	5,83	5,8

Las concentraciones máximas de los interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son:

Bilirrubina: 20 mg/dL
Hemoglobina: 200 mg/dL
Proteínas Totales: 10 g/dL
Triglicéridos: 850 mg/dL

Factor Reumatoideo: 70 UI/mL

Immulite: Esta plataforma no cuenta con reactivos para la determinación de este analito.

Conclusiones

Como se puede observar, en los análisis de precisión y exactitud realizados por los fabricantes, no se ven grandes diferencias entre las dos metodologías utilizadas. La mayor dificultad radica en que los ensayos en plataforma Immulite requieren más trabajo manual y eventualmente, son de más larga duración. Por lo tanto, la elección de la metodología a utilizar dependerá sólo de las posibilidades de adquisición de equipamiento y reactivos por parte de la institución a la que pertenezca cada usuario.

En lo que se refiere al kit de ICN Diagnostic (Kit de Radioensayo SimulTRAC-S) para la determinación simultánea de B12 y Folato, cabe destacar que ninguno de los autores tiene experiencia en el uso del mismo, pero por lo que se deduce del inserto, resulta una técnica muy laboriosa, larga (tiempos de preparación de las muestras), con mucho y minucioso trabajo manual.



Referencias bibliográficas

- Hamid A, Nissar AW, Jyotdeep K. New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption. Association with epigenome stability and cancer development. *Febs J* 2009. Publicado en línea 23 de marzo de 2009; Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2009.06959.x/full>.
- Kräuler B. Biochemistry of B12-cofactors in human metabolism. *Subcell Biochem* 2012; 56: 323-46.
- Fedosov SN. Physiological and molecular aspects of cobalamin transport. *Subcell Biochem* 2012; 56: 347-67.
- Oberley MJ, Yang DT. Laboratory testing for cobalamin deficiency in megaloblastic anemia. *Am J Hematol* 2013 Jun; 88 (6): 522-6.
- Huges CF, Ward M, Hoey L, McNulty H. Vitamin B12 and ageing: current issues and interaction with folate. *Ann Clin Biochem* 2013 Jul; 50 (Pt.4): 315-29.
- Green R, Dwyre DM. Evaluation of macrocytic anemias *Semin Hematol* Oct 2015; 52 (4): 279-86.
- Wickramasinghe SN. Diagnosis of megaloblastic anemias. *Blood Rev* 2006; 20: 299-318.
- Hesdorffer CS, Longo DL. Drug-induced megaloblastic anemia. *New Eng J Med* 2015; 373: 1649-58.
- Zelder F, Sonnay M, Prieto L. Antivitamins for medicinal applications. *Chem Bio Chem* 2015; 16: 1264-78.
- Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM. Guidelines for the diagnosis of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol* 2014 Aug; 166 (4): 496-513.
- Stabler SP, Macell PD, Podell EI, Allen RH, Lindenbaum J. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1986; 77: 1601-12.
- Savage SP, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994; 96 (3): 239-46.
- Magera MJ, Helgeson JK, Matern D, Rinaldo P. Methylmalonic acid measured in plasma and urine by stable-isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2000; 46 (11): 1804-10.
- Diaz ML, Linares V. Evaluation of vitamin B12 state and folate. *Hematología* 2015; 19(3): 264-5.
- Das KC, Manusselis C, Herbert V. Determination of vitamin B12 (cobalamin) in serum and erythrocytes by radioassay, and of holo-transcobalamin II (holo-TC II) and holo-haptocorrin (holo-TC I and III) in serum by adsorbing holo-TC II on microfine silica. *J Nut Bio* Aug 1991; 2 (8): 455-64.
- Inserto Kit de Radioensayo SimulTRAC-S Vitamina B12 [57Co]/Folato [125I], ICN Pharmaceuticals Inc. Diagnostic Division.
- Miller JW, Garrod HG, Rockwood AL, Kushnir MM, Allen LH, Haan MN, et al. Measurement of vitamin B12 and holo-transcobalamin, singly and in combination in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006; 52 (2): 278-85.
- Golding PH. Holo-transcobalamin (Holo-TC, Active-B12) and Herbert's model for the development of vitamin B12 deficiency, a review and alternative hypothesis Published online Springerplus 2016; 5 (1): 668. Available from URL: springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2252-z.



MONTEBIO

TEST RÁPIDOS

INFECCIOSAS

MONTEBIO STREP A
MONTEBIO STREP B
MONTEBIO CLAMIDIA
MONTEBIO SALMONELLA
MONTEBIO SHIGELLA
MONTEBIO H. PYLORI Ag.
MONTEBIO ROTAVIRUS
MONTEBIO ADENOVIRUS
MONTEBIO ROTA/ADENO
MONTEBIO INFLUENZA A/B
MONTEBIO C. DIFFICILE A/B
MONTEBIO NOROVIRUS
MONTEBIO E. COLI O157
MONTEBIO LEGIONELLA
MONTEBIO CAMPYLOBACTER
MONTEBIO RSV
MONTEBIO HEPATITIS C
MONTEBIO C. DIFFICILE GDH

DROGAS Y ALCOHOL

MONTEBIO DROGAS EN SALIVA
MONTEBIO DROGAS EN ORINA
MONTEBIO DROGAS EN SANGRE
MONTEBIO ALCOHOL EN ORINA
MONTEBIO ALCOHOL EN ALIENTO

CARDÍACOS

MONTEBIO TROPONINA I
MONTEBIO DIMERO-D
MONTEBIO COMBO CARDÍACO
(TROPONINA I / CK-MB /
MIOGLOBINA)

TUMORALES

MONTEBIO SANGRE OCULTA
MONTEBIO Hb/Hp.
(HEMOGLOBINA/HAPTOGLOBINA)

FERTILIDAD

MONTEBIO EMBARAZO

ALERGIA

MONTEBIO ICE TOTAL

**ADEMÁS IMPORTAMOS/DISTRIBUIMOS
LAS SIGUIENTES MARCAS**



**PARATEST
ECO**

SIEMENS

MERCK



SIGMA-ALDRICH

Oficina y Depósito: Vera 575 (Capital Federal)
Tel/FAX:(54 11) 4858-0636 (Rotativas)
info@montebio.com.ar | www.montebio.com.ar

Toxoplasmosis congénita: Diagnóstico serológico, RPC, aislamiento y caracterización molecular de *Toxoplasma gondii*



20 min.



El diagnóstico de la toxoplasmosis congénita (TC) en el recién nacido es muy importante para aminorar las secuelas de la enfermedad. En el siguiente estudio evalúan los métodos utilizados para el diagnóstico de TC en los neonatos nacidos de madres que cursaron una infección aguda durante el embarazo.



Liliana Carral, Federico Kaufer, Lais Pardini, Ricardo Durlach, Gastón Moré, María C. Venturini y Cristina Freuler

Hospital Alemán de Buenos Aires, Argentina. Centro de Toxoplasmosis (LC, FK, RD, CF).

Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias. Laboratorio de Inmunoparasitología (LP, GM, MCV).

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina (LP, GM).

Los autores declaran que no existieron conflictos de interés en el presente estudio. No hubo fuentes de financiación externas.

Rev Chilena Infectol 2018; 35 (1): 36-40

Recibido: 20 de junio de 2017

Aceptado: 4 de enero de 2018

Correspondencia a:

Liliana Ángela Carral
lacarral@yahoo.es



Resumen

Introducción: El diagnóstico de toxoplasmosis congénita (TC) en el recién nacido es muy importante porque debe recibir tratamiento siempre, sintomático o no, para evitar o aminorar las secuelas de la enfermedad. **Objetivo:** Evaluación comparativa de los métodos disponibles en la institución para el diagnóstico de TC. **Materiales y Métodos:** Se evaluaron métodos diagnósticos en 67 niños cuyas madres cursaron toxoplasmosis aguda durante el embarazo. Se utilizó la técnica de Sabin Feldman para IgG al nacimiento y durante el seguimiento serológico hasta el año de vida. Para determinar IgM, IgA e IgE se utilizó la técnica *immunosorbent agglutination assay* (ISAGA). El diagnóstico directo se realizó por reacción de polimerasa en cadena (RPC), aislamiento y caracterización molecular del parásito. **Resultados:** La sensibilidad (S) de ISAGA IgM fue 87%, ISAGA IgA 91% y la especificidad (E) fue 100% para ambas; cuando se realizaron en conjunto, la S aumentó a 98%. La detección de IgE contribuyó al diagnóstico cuando se la detectó sólo en la sangre del neonato y no en sangre materna. Se aisló el parásito en cuatro casos de TC, uno fue genotipo II y los otros tres, genotipos "atípicos". La S del aislamiento fue 80% y la E 100%. **Conclusión:** Los métodos serológicos utilizados mostraron una buena eficacia diagnóstica. Un caso fue detectado sólo por el aislamiento y la caracterización molecular tiene gran valor epidemiológico.

Introducción

La infección por *Toxoplasma gondii* en el embarazo puede producir graves consecuencias en el feto, como muerte

intrauterina, corio-retinitis, hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, microcefalia, microftalmia, ceguera, retraso mental o psicomotor. La gravedad de las secuelas de la toxoplasmosis congénita (TC) está asociada a la edad del feto en el momento de la infección materna. Los niños nacidos de una madre infectada en el primer trimestre tienen alta probabilidad de estar gravemente afectados, mientras que 80% de los niños que se infectan durante el tercer trimestre nacen asintomáticos. Todos los recién nacidos (RN) con TC requieren tratamiento, incluyendo los que nacen asintomáticos para evitar el riesgo de desarrollo de secuelas tardías (1).

El diagnóstico serológico del RN se hace con la investigación de las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE específicas en sangre. Las IgM, IgA e IgE no atraviesan la placenta, su detección indica producción fetal y se las utiliza como marcadores serológicos de infección congénita. La IgG atraviesa la placenta y en los niños no infectados, los títulos de las IgG (de origen materno), descienden hasta su desaparición total. Por el contrario, en los niños infectados los títulos se mantienen o aumentan y ofrecen un elemento diagnóstico fundamental. Al año del nacimiento el diagnóstico es definitivo, el niño será considerado libre de infección cuando las IgG específicas no sean detectables en su sangre. La persistencia de las IgG confirma la infección prenatal (2).

La técnica más sensible para la determinación de IgM, IgA e IgE es *immunosorbent agglutination assay* (ISAGA) (3). El estudio serológico simultáneo de la sangre materna y del RN ofrece la utilidad diagnóstica comparativa; si alguno de los anticuerpos IgM, IgA o IgE está presente en la sangre del niño y no en la de la madre,

confirma la infección congénita.

El estudio serológico debe ser completado con la metodología directa que incluye el aislamiento del parásito y la reacción de polimerasa en cadena (RPC) en la placenta, sangre de cordón y/o sangre del RN (4).

El objetivo del presente estudio fue evaluar los métodos utilizados en nuestro laboratorio para el diagnóstico de TC en los neonatos nacidos de madres que cursaron una infección aguda durante el embarazo.

Debido a que la patogenicidad de la infección podría estar asociada a diferentes genotipos de *Toxoplasma gondii* (5) se realizó un estudio experimental en conjunto con el Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata para la caracterización molecular de los aislamientos obtenidos.

Materiales y Métodos

Se incluyeron 67 niños RN de madres a quienes se diagnosticó toxoplasmosis aguda durante el embarazo en el Centro de Toxoplasmosis del Hospital Alemán de Buenos Aires (CTHA) entre enero de 2006 y marzo de 2016. Cuatro casos fueron pesquizados mediante el programa de prevención de la TC implementado en el Hospital Alemán donde se realizan controles serológicos trimestrales a las embarazadas. El resto de los casos corresponden a derivaciones de otros centros cuando las pruebas de tamizaje sugirieron una infección aguda y se derivaron al CTHA para la confirmación diagnóstica y seguimiento.

El estudio utilizó el algoritmo diagnóstico para el RN del Consenso Argentino para la Prevención de la Toxoplasmosis Congénita de 2005 que incluye la determinación de IgG, la detección de IgM, IgA e IgE y la comparación con la serología materna. Además, se incluyó el aislamiento del parásito a partir de placenta o sangre de cordón y la RPC (4).

El estudio serológico utilizó para la determinación de IgG la reacción de Sabin Feldman (SF) (6), método de referencia para toxoplasmosis y la técnica de la ISAGA para la detección de IgM, IgA e IgE. Cuando alguna de las reacciones con la técnica de ISAGA fue positiva se repitió el estudio, con un lapso mínimo de 10 días, para descartar la contaminación con sangre materna (7-9).

En 18 casos se realizó RPC en tiempo real (RPC-TR) en sangre de cordón umbilical mediante la amplificación de una secuencia repetitiva de la región del gen B1 del genoma de *T. gondii* (10).

Veintiuna placentas y 20 muestras de sangre de cordón umbilical (SC) se procesaron según el procedimiento descrito por MH Bessieres (11) para el aislamiento del parásito. Se consideraron positivos si se detectaron anticuerpos específicos en suero de ratón mediante la reacción de SF y/o se observaron quistes del protozoo en el cerebro. Los materiales de los aislamientos positivos se enviaron al LAINPA para su caracterización molecular. Se conservaron

Calbiotech 25(OH) Vitamina D ELISA



Enzimoimmunoensayo **sensible, robusto, adaptable** a sistemas automatizados y manuales

No requiere preparación externa de la muestra ni utiliza solventes orgánicos.

Ventajas del Ensayo

- Amplio Rango Dinámico: 0.25ng/mL a 150ng/mL
- Linealidad: 90% - 111%
- Reactividad cruzada del 100% respecto a D2 y D3



LABORATORIOS BACON S.A.I.C

Tel. +54(11) 4709-0171 / fax +54(11) 4709-2636

www.bacon.com.ar | ventas@bacon.com.ar

por pasaje en ratones GKO para interferón gamma, cultivo celular y criopreservación en nitrógeno líquido.

Adicionalmente se realizó una prueba de RPC utilizando los partidores TOX5-TOX8 que permitió detectar ADN específico del parásito. Los aislamientos se caracterizaron por nPCR-RFLP (RPC anidada seguida por cortes con enzimas de restricción) para nueve marcadores (nSAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c29-2, c22-8, L358, PK1, APICO), procediendo como se describiera en estudios previos (12).

El diagnóstico de TC se consideró positivo si se cumplieron una o varias de las siguientes condiciones:

- uno de los marcadores serológicos (IgM, IgA o IgE) presente en dos muestras consecutivas en suero con diez días de diferencia, o
- un aislamiento positivo y/o la IgG permanecía positiva al año.

La infección prenatal se descartó en los niños que presentaron marcadores serológicos y aislamiento negativos al nacimiento y que por protocolo fueron seguidos con la serología hasta la desaparición total de las IgG.

Los RN fueron evaluados clínica-mente, con fondo de ojo y ecografía cerebral.

Resultados

La reacción de SF en los 67 RN incluidos en el estudio tuvo títulos iguales o mayores a 1/4.096.

En 43 niños la reacción de SF se tornó negativa durante el seguimiento serológico en el primer año de vida y se los consideró libres de infección (*grupo LI*). Ninguno de ellos presentó IgM, IgA o IgE positiva ni al nacimiento ni en controles posteriores. El estudio del grupo LI incluyó el procesamiento de 20 placentas y 16 muestras de sangre de cordón umbilical para aislamiento del parásito, los cuales fueron todos negativos, y la realización de RPC-TR que se llevó a cabo en 16 muestras de sangre de cordón, en 14 casos fue negativa y positiva en dos.

El diagnóstico de TC se hizo en 24 RN, (*grupo TC*). En 20 RN del grupo TC la ISAGA IgM e IgA fueron positivas, en un RN sólo fue positiva la IgM y en otros dos sólo la IgA. La búsqueda de IgE se realizó a 14 de los 24 RN y seis resultaron positivos, en un caso la IgE fue positiva en el niño y negativa en la madre. Un caso de TC presentó los tres marcadores serológicos negativos y fue diagnosticado sólo con el aislamiento.

La técnica de RPC-TR se realizó sólo en dos RN del grupo TC y uno fue positivo.

Con el propósito de aislar el parásito se procesaron una placenta y cuatro muestras de sangre de cordón. En la placenta y en tres muestras de sangre de cordón se aisló *T. gondii*. En la muestra de sangre de cordón restante el aislamiento fue negativo, la muestra no fue obtenida al nacimiento sino siete días después, cuando el niño ya estaba en tratamiento.

La genotipificación del protozooario a partir de la placenta resultó tipo clonal II (12) y los tres aislamientos de sangre de cordón umbilical fueron "atípicos", uno tipo III para todos los marcadores excepto para C29-2 (tipo I), los otros dos aislamientos fueron tipo III para la mayoría de los marcadores y uno de ellos tipo I para PK1, L358 y C22-8 y el otro aislamiento tipo II para PK1 y tipo I para L358 (13).



Tabla 1. Sensibilidad (S), especificidad (E), VPP y VPN de las reacciones serológicas

	S (n)	E (n)	VPP (n)	VPN (n)
ISAGA M	87% (71/74)	100% (43/43)	100% (21/21)	93% (43/46)
ISAGA A	91% (22/24)	100% (43/43)	100% (22/22)	95% (43/46)
ISAGA E	43% (6/14)	100% (22/22)	100% (6/6)	73% (22/30)
ISAGA M+A	95% (23/24)	100% (43/43)	100% (23/23)	98% (43/44)

Tabla 2. Sensibilidad (S), Especificidad (E), VPP y VPN del aislamiento del parásito

	S (n)	E (n)	VPP (n)	VPN (n)
Aislamiento	80% (4/5)	100% (36/36)	100% (4/4)	97% (36/37)

Tabla 3. Signos clínicos de los recién nacidos con toxoplasmosis congénita

Casos: 24	N	%
Total sintomáticos	19	79
Muerte	1	4
Microcefalia	1	4
Sepsis	1	4
Corio-retinitis	11	46
Maculopatía	2	8
Estrabismo	1	4
Calcificaciones cerebrales	2	8
Hepato-esplenomegalia	1	4
Petequias	1	4
Ictericia	1	4
Asintomáticos	5	21

En la Tabla 1 se muestra la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictor positivo (VPP) y valor predictor negativo (VPN) calculados sobre los resultados obtenidos con las reacciones serológicas y en la Tabla 2 la de los aislamientos.

En la Tabla 3 se detalla la manifestación clínica de los recién nacidos.

Discusión

La TC, consecuencia de una primoinfección intragestacional aguda, es prevenible con los programas de control serológico durante el embarazo y sus secuelas se pueden evitar o aminorar con el tratamiento adecuado. Los RN deben ser estudiados desde el punto de vista clínico y de laboratorio. Si se confirma la infección, deben ser tratados. Los RN sin evidencia clínica ni serológica deben ser controlados hasta la desaparición total de las IgG para poder descartar la infección congénita (14).

La patogenicidad de la TC depende del período de embarazo de la infección materna, de la gravedad de la infección intrauterina, del

tratamiento materno y de la virulencia del parásito actuante. En este estudio, ocho madres cursaron su primoinfección durante el 3° trimestre y sólo recibieron unas pocas semanas de tratamiento; 16 de ellas no habían sido controladas y el diagnóstico se realizó en el momento del parto. En un estudio previo de nuestro grupo sobre la prevención de la TC en nueve hospitales de Buenos Aires, los casos de TC se detectaron en RN de madres que no habían tenido controles durante la gestación o en quienes el diagnóstico se efectuó en el parto o pocas semanas antes por lo cual no habían recibido tratamiento efectivo (15). Estos resultados avalan la importancia de los programas de prevención de la TC.

El diagnóstico serológico del RN se realizó con la detección de IgM y/o IgA en sangre en 96% de los casos. La determinación de ambos marcadores fue importante ya que en dos niños sólo se pudo detectar IgA y en otro sólo IgM. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (16,17). La comparación entre la serología del neonato y la de su madre

confirmó dos casos, en uno se detectó IgE positiva sólo en el suero del niño y en el otro los títulos de IgM, IgA e IgE fueron significativamente mayores en el suero del RN en dos muestras obtenidas con 10 días de diferencia (2).

Si bien la sensibilidad de la serología es alta, no alcanzó a 100%; un caso fue diagnosticado sólo mediante el aislamiento del parásito en un RN con todos los marcadores serológicos negativos. El aislamiento es una importante herramienta para el diagnóstico de la TC; aproximadamente 10% de los pacientes con marcadores serológicos negativos son diagnosticados mediante este método (18).

La RPC-TR en sangre de cordón fue aplicada en sólo dos muestras del grupo de niños con TC en nuestro estudio, y una resultó negativa. El procesamiento de mayor número de muestras permitirá estimar la sensibilidad más adecuadamente. El resultado negativo en una muestra con TC podría explicarse por una carga parasitaria baja, el tratamiento materno o una

inadecuada conservación y transporte de la muestra. Los dos casos de RPC-TR positiva en el grupo de los RN no infectados fueron considerados como falsos positivos cuando se descartó la infección congénita al año con las IgG negativas.

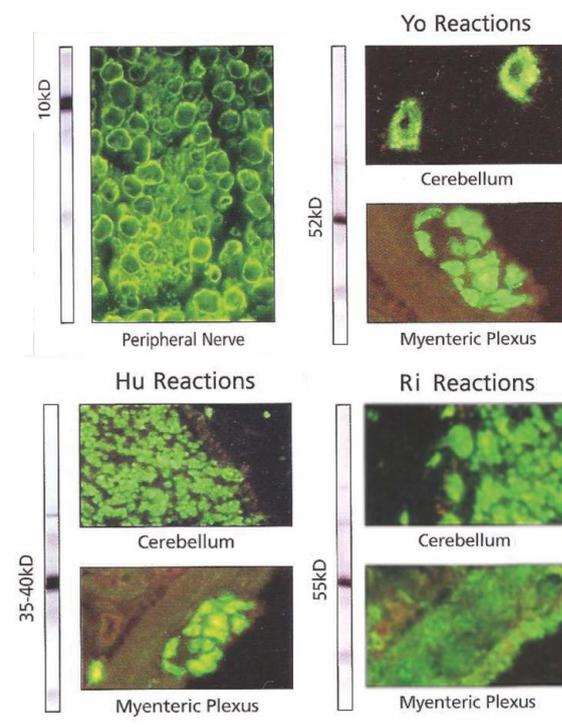
Los aislamientos del parásito tuvieron una buena performance con una sensibilidad de 80% (4/5) y una especificidad de 100%. En un caso fue el único marcador positivo de la infección congénita. En el paciente con infección aguda y aislamiento negativo, la toma de muestra se realizó en sangre del niño a los siete días de vida, cuando ya estaba bajo tratamiento y sugiere la importancia de tomar las muestras para serología, RPC o aislamiento lo más cercanas posible al parto y antes de iniciar el tratamiento.

En el presente estudio 19 de 24 (79%) de los niños con TC presentaron uno o más signos clínicos y los más frecuentes fueron las lesiones oculares, la corio-retinitis 11/19 (46%), maculopatías 2/19 (8%) y el estrabismo 1/19 (4%). Otros estudios



AUTOINMUNIDAD

- ✓ Neuropatías
- ✓ Anticocleares
- ✓ Antígenos Extraíbles
- ✓ Improntas
- ✓ Inmunofluorescencia
- ✓ Automatización



también muestran una elevada frecuencia de signos y secuelas en niños cuyas madres no habían sido diagnosticadas durante su embarazo comparados con otra cohorte de RN cuyas madres tuvieron acceso a programas de prevención (19).

La patogenicidad de la infección podría estar asociada al genotipo del *T. gondii* (5) involucrado en la infección. En Europa se aisló con más frecuencia el genotipo clonal II en los casos de enfermedad congénita y la mayoría de los RN fueron asintomáticos, los aislamientos con genotipos I y III sólo fueron obtenidos en 10 y 9% de los pacientes, respectivamente. En Sudamérica (Brasil, Colombia, Guyana y Argentina) es frecuente el aislamiento de los genotipos III y atípicos, y hay evidencia que la frecuencia y gravedad es mayor, con compromiso ocular en particular (20,21). El riesgo de lesiones oculares en RNs infectados en Europa es de 10%, mientras que en Brasil es de 50% con una frecuencia de reactivaciones cuatro veces mayor (22). Se postula la co-evolución hospedero-parásito, dada por una larga adaptación del hospedero a un determinado tipo de parásito, para explicar la baja patogenicidad observada en Europa. Por otra parte, la alta diversidad genotípica de *T. gondii* característica de Sudamérica podría relacionarse con una menor adaptación de los hospederos, especialmente aquellos con ancestros europeos, y la observación de casos más graves (23). En un estudio en conjunto del Laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán con el LAINPA se reportó el primer aislamiento con genotipificación en Argentina a partir de placenta y fue tipo clonal II (12). Tres de los aislamientos a partir de sangre de cordón fueron genotipos considerados "atípicos" y no difieren demasiado de otros aislamientos de Sudamérica. Un genotipo fue similar al identificado en ToxoDB como #14 ó 138 y los otros dos serían genotipos nuevos de acuerdo a la ToxoDB siendo tipo III para la mayoría de los marcadores, uno de ellos tipo I para PK1, L358 y C22-8 y el otro tipo II para PK1 y tipo I para L358 (13). Los aislados caracterizados en este estudio, si bien son pocos casos, sugieren que los genotipos circulantes del parásito en nuestro país serían similares a los encontrados en el resto de Sudamérica y el alto porcentaje de secuelas observado argumenta a favor de la necesidad de controlar a nuestras mujeres

embarazadas para prevenir casos de TC.

Conclusión

Los métodos serológicos utilizados mostraron una buena performance para el diagnóstico de la TC. El diagnóstico serológico tiene un alto nivel de de S y E (98 y 100%, respectivamente). El aporte de técnicas del examen directo, RPC y el aislamiento del parásito, asociados al seguimiento serológico hasta el año de vida, es fundamental para el diagnóstico de la TC. La genotipificación está reservada a los laboratorios de investigación, tiene gran valor epidemiológico, justificando mayores estudios colaborativos e interdisciplinarios para ampliar el conocimiento del impacto de los diferentes genotipos de *T. gondii* en la salud de la población.



Referencias bibliográficas

- 1.- Remington J S, McLeod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington J S, Klein J O (Eds). Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 4th ed. Philadelphia Wb Saunders 1995; 140-267. 4.
- 2.- Pomares C, Montoya J G. Laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2016; 54 (10): 2448-54.
- 3.- Pinon J M, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech, et al. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. J Clin Microbiol 2001; 39: 2267-71.
- 4.- Durlach R, Kaufe F, Carral L, Freuler C, Ceriotto M, Rodríguez M, et al. Consenso argentino de toxoplasmosis congénita. Medicina (Buenos Aires) 2008; 68: 75-87.
- 5.- Rico-Torres C P, Vargas-Villavicencio J A, Correa D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35 (7): 1079-88.
- 6.- Sabin A B, Feldman H A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma). Science. 1948; 108 (2815): 660-3.
- 7.- Desmonts G, Naot Y, Remington J S. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and

acquired Toxoplasma infections. J Clin Microbiol 1981; 14 (5): 486-91.

8.- Saathoff M, Seitz H M. Detection of toxoplasma specific IgA and IgM antibodies in serum samples of adults with acquired toxoplasma infection. Z Geburtsh Perinat 1992; 196: 221-3.

9.- Wong S Y, Hajdu M P, Ramírez R, Thulliez P, McLeod R, Remington J S. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 2952-9.

10.- Burg J L, Grover C M, Pouletty P, Boothroyd I C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; 27 (8): 1787-92.

11.- Bessières M H, Berrebi A, Rolland M, Bloom M C, Roques C, Cassaring S, et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001; 94 (1): 37-45.

12.- Pardini L, Carral L A, Bernstein M, Gos M L, Olejnik P, Unzaga J M, et al. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from a human placenta in Argentina. Parasitol Int 2014; 63 (2): 470-2.

13.- Diagnóstico de Toxoplasmosis. Experiencia en el Hospital Alemán de Buenos Aires. Liliana Carral, F. Kaufe, M Messina, V. Schneider. Centro de Toxoplasmosis del Hospital Alemán de Buenos Aires. <http://www.protozoologia.org.ar/Admin/mim/Libro de resúmenes SAP2016. pdf>. [julio de 2017].

14.- Villena I, Ancelle T, Delmas C, García P, Brezin A P, Thulliez P, et al. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. Toxosurv network and National Reference Centre for Toxoplasmosis. Euro Surveill 2010; 24: 15.

15.- Carral L, Kaufe F, Durlach R, Freuler C, Olejnik P, Nadal M, et al. Multicenter study on the prevention of congenital toxoplasmosis in Buenos Aires. Medicina (B. Aires) 2008; 68: 417-22.

16.- Moncada P A, Montoya J G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther 2012; 10 (7): 815-28.

17.- Murat J B, Souvignet A, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M P, Bost-Bru C, Pelloux H. Assessment of the IgA immunosorbent agglutination assay for the diagnosis of congenital toxoplasmosis on a series of 145 toxoplasmic seroconversions. Clin Vaccine Immunol 2015; 22 (4): 456-8.

18.- Robert-Gangneux F, Dupret P, Yvenou C, Quinio D, Poulain P, Guiguen C, et al. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Pediatr Infect Dis J 2010; 29: 33-8.

19.- Olariu T R, Remington J S, McLeod R, Alam A, Montoya J G. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. Pediatr Infect Dis J 2011; 30 (12): 1056-61.

20.- Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi A L, Rizzo L V, Belfort R Jr, et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. Emerg Infect Dis 2006; 12: 942-9.

21.- Sauer A, de la Torre A, Gómez-Marin J, Bourcier T, Garweg J, Speeg-Schatz C, et al. Prevention of retinochoroiditis in congenital toxoplasmosis: Europe versus South America. Pediatr Infect Dis J 2011; 30 (7): 601-3.

22.- Gilbert R E, Freeman K, Lago E G, Bahia-Oliveira L M G, Tan H K, Wallon M, et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2 (8).

23.- Robert-Gangneux F, Dardé M L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev 2012 (2): 264-96.

LO NUEVO

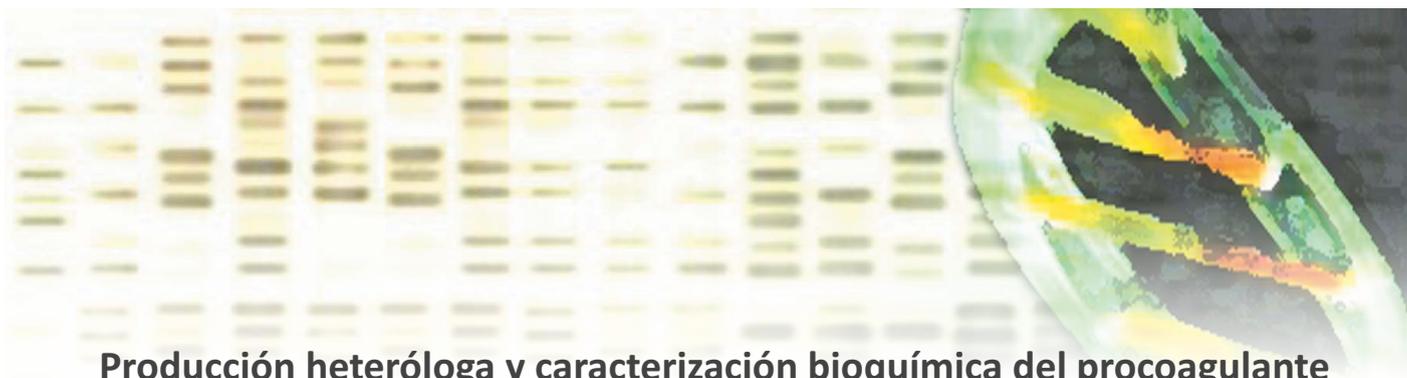
está por llegar



ba bioars

Estomba 961 - Ciudad de Buenos Aires - Argentina - Tel: +5411 4555 4601
Mail: pl@[bioars.com.ar](mailto:pl@bioars.com.ar) - Web: www.bioars.com.ar





Producción heteróloga y caracterización bioquímica del procoagulante humano Factor VIII para ensayos de cristalización de macromoléculas proteicas



27 min.



Las enfermedades cardiovasculares son la causa principal de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y en vías de desarrollo. Entre las manifestaciones clínicas más frecuente y dañinas podemos destacar la isquemia cardíaca y la enfermedad cerebrovascular, destacando la formación de coágulos sanguíneos (trombos) como el evento más común. En el siguiente artículo les acercamos un trabajo sobre producción heteróloga del Factor de coagulación VIII para su utilidad en este tipo de trastornos.



Erick Hernández-Carvajal¹, Silvia Arce-Solano², Didier Mena-Aguilar², Pablo Fuentes-Prior³

1 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: erhernandez@itcr.ac.cr

2 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

3 Institut d'Investigació Biomèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona, España.

Hernández-Carvajal, E; Arce-Solano, S; Mena-Aguilar, D; Fuentes-Prior, P. Producción heteróloga y caracterización bioquímica del procoagulante humano Factor VIII para ensayos de cristalización de macromoléculas proteicas.

Tecnología en Marcha. Vol. 29-4. Octubre-Diciembre 2016. Pág 78-91.

Fecha de recepción: 6 de abril de 2016

Fecha de aprobación: 28 de junio de 2016

Palabras clave: Enfermedad cardiovascular; trombina; FVIII; cristalización de proteínas; difracción de rayos X.



Resumen

A pesar de la relevancia médica y el impacto económico en los sistemas de salud, las enfermedades cardiovasculares, tales como infartos cardíacos y accidentes cerebrovasculares, siguen siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo. Esto se debe a que las bases estructurales y funcionales de los procesos de formación de los coágulos sanguíneos o trombos solo se conocen de forma incompleta. La trombina juega un papel esencial en estos procesos y los fundamentos atómico-moleculares de su interacción con otros factores que participan en el proceso de coagulación son poco conocidos, en particular el reconocimiento de importantes sustratos como los factores V y VIII, así como el receptor de plaquetas PAR1. Dada la importancia de estos factores, en esta investigación se produjeron fragmentos del factor VIII humano (FVIII) y se caracterizaron bioquímicamente para realizar ensayos de cristalización de complejos FVIII-Trombina. Para ello, (1) se sobreexpresaron heterológicamente los conectores ácidos entre los dominios del factor VIII (denominados FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3), (2) se purificaron y caracterizaron estos fragmentos recombinantes, (3) se formaron sus complejos con la trombina y (4) se inició la búsqueda de las condiciones de cristalización de estos complejos proteicos. La producción del FVIII, y en particular la

determinación de las condiciones en las que crecen cristales del tamaño y calidad apropiados, son un auténtico cuello de botella en los estudios de estructura-función, por ello se considera que la optimización de estos procesos permitirá obtener un mayor número de cristales de proteína de calidad adecuada para futuros estudios de difracción de rayos X.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares continúan siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y su incidencia es aún mayor en aquellos en vías de desarrollo (Nichols, 2012). El evento común que desencadena las dos manifestaciones clínicas más frecuentes y dañinas de las dolencias del sistema circulatorio -la isquemia cardíaca (o infarto) y la enfermedad cerebrovascular (o ictus)- es la formación de coágulos sanguíneos (trombos) que interrumpen el suministro de oxígeno y nutrientes al corazón y al cerebro, respectivamente. A pesar de la importancia médica de estas patologías, las bases estructurales y funcionales de estos procesos no se conocen por completo, por lo que una comprensión profunda de los mecanismos que conducen a la formación del coágulo de fibrina es fundamental para obtener una imagen detallada de los eventos patofisiológicos asociados con la generación de los trombos. Esta información es también fundamental para interpretar las consecuencias de las mutaciones identificadas en pacientes con hemofilia o con trombosis, y para avanzar hacia el tratamiento personalizado de las enfermedades cardiovasculares,

redundando así, a mediano o largo plazo, en importantes beneficios sanitarios y económicos.

El proceso de coagulación de la sangre ocurre como resultado de una compleja red de proteínas activadas de forma concertada, progresiva y estrictamente regulada, que incluyen varios lazos de retroalimentación positiva y negativa. Estos lazos son esenciales para una rápida -pero controlada- formación del coágulo, desencadenada por estímulos fisiológicos en los vasos sanguíneos dañados (por ejemplo, al sufrir una herida en la piel). Entre las proteínas más importantes que participan en este proceso se encuentra la trombina, que pertenece a la familia de las proteasas serínicas similares a la tripsina. Su precursor, la protrombina, se sintetiza en el hígado y se secreta al torrente sanguíneo. Esta proteasa se considera uno de los factores de la coagulación más importantes porque juega un papel clave en la activación de varias moléculas esenciales para la

formación del coágulo, principalmente el fibrinógeno, el factor XIII y los receptores activados por proteasas (PARs) en la superficie de las plaquetas. Asimismo, la trombina inicia uno de los más importantes lazos de retroalimentación positiva al modular su propia generación activando los cofactores procoagulantes V (FV) y VIII (FVIII) (Davie *et al.*, 1991).

Los cofactores procoagulantes FV y FVIII son grandes glicoproteínas multidominio que comparten una organización de dominios A1-A2-B-A3-C1-C2. Polipéptidos relativamente largos y ricos en residuos ácidos llamados a1, a2 y a3 conectan los dominios del FVIII A1-A2, A2-B y B-A3, respectivamente, dando una organización de dominios que se puede representar como A1-(a1)-A2-(a2)-B-(a3)-A3-C1-C2. De forma similar, la estructura de dominios del FV se puede describir como A1-A2-(a2)-B-(a3)-A3-C1-C2. Ambos cofactores son activados por la trombina mediante proteólisis limitada de enlaces peptídicos

específicos. En el caso del FVIII humano, la trombina hidroliza los enlaces Arg³⁷²-Ser³⁷³ entre las regiones a1 y A2, Arg⁷⁴⁰-Ser⁷⁴¹ entre el conector a2 y el dominio B, y Arg¹⁶⁸⁹-Ser¹⁶⁹⁰ en la frontera a3-A3, generándose el heterotrímero A1/A2/A3-C1-C2 y liberando el altamente glicosilado dominio B (ver figura 1).

El reconocimiento y procesamiento de muchos sustratos fisiológicamente relevantes de la trombina requiere interacciones iniciales con regiones positivamente cargadas presentes en la superficie de esta proteasa, y distantes del sitio activo, conocidas como exositos I y II. El exosito I es esencial para el reconocimiento de sustratos (fibrinógeno, PARs, FV, FVIII), el receptor endotelial trombomodulina y diversos inhibidores como la hirudina (Corral-Rodríguez *et al.*, 2011; Gandhi *et al.*, 2010; Fuentes-Prior *et al.*, 2000). Por otra parte, el exosito II es el sitio de unión del sulfato de heparán y la heparina, así como nuevamente de los cofactores V y VIII

 **Medix
Biochemica**

actim[®]
INFLUENZA
A&B

¿Resfrío o GRIPE?

La prueba inmunocromatográfica de un solo paso Actim[®] Influenza A&B, rápida y de fácil uso, ayuda al diagnóstico de infecciones por influenza en el momento. Diferencia entre antígenos de virus influenza A y B. Detecta varios subtipos de influenza A, incluyendo gripe porcina y aviar. Resultados confiables en 10 minutos. Los kits incluyen todo el material requerido para el ensayo.

¿Virus Sincicial Respiratorio?

La prueba inmunocromatográfica de un solo paso Actim[®] RSV, rápida y de fácil uso, ayuda al diagnóstico de infecciones por RSV en el momento. Reconoce ambos tipos, A y B, de RSV. Resultados confiables en 15 minutos. Los kits incluyen todo el material requerido para el ensayo.

actim[®]
RSV

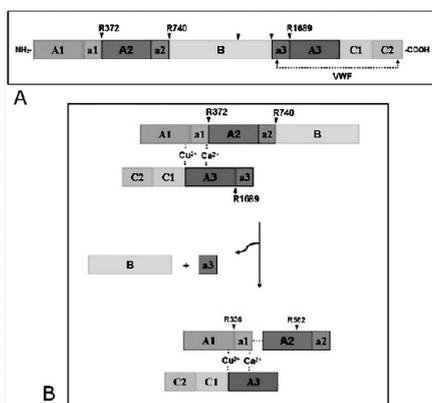
Allende 3274 (1417)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Tel: (54 11) 4639 3488 (líneas rotativas)
Fax: (54 11) 4639 6771
etcventa@etcint.com.ar
www.etcint.com.ar

 **etc**
internacional

(Corral-Rodríguez *et al.*, 2011, Segers *et al.*, 2007; Myles *et al.*, 2002).



Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de activación del factor VIII. Los factores V y VIII son activados por proteólisis limitada efectuada principalmente por la trombina, en presencia de fosfolípidos. **A.** Estructura del FVIII inactivo con los dominios globulares A1, A2, A3, B, C1 y C2, así como los conectores interdominios a1, a2 y a3. Estos conectores son regiones ricas en residuos ácidos que preceden a los sitios de corte y activación de la trombina. Dos flechas en el dominio B indican los sitios de corte reconocidos por las endoproteasas intracelulares que dan origen al heterodímero del FVIII. Se muestra también la zona de interacción con su proteína transportadora, el factor de von Willebrand (vWF). **B.** La trombina hidroliza los enlaces Arg³⁷²-Ser³⁷³, Arg⁷⁴⁰-Ser⁷⁴¹ y Arg¹⁶⁸⁹-Ser¹⁶⁹⁰ en el heterodímero del FVIII (R372, R740 y R1689, respectivamente, indicados con flechas). Como consecuencia de estas reacciones se libera el dominio B y el conector a3 de la molécula precursora, dando origen al heterotrímero activo, el FVIIIa, compuesto ahora por los dominios A1, A2, y una cadena formada por los módulos A3, C1 y C2. Este heterotrímero se asocia por interacciones electrostáticas (interlineado) y es estabilizado por iones Cu²⁺ y Ca²⁺. Las flechas rojas indican los sitios de corte de la proteína C activada (APC), que conducen a la disociación del dominio A2 y con ello a la pérdida de la función activadora del cofactor.



Estudios bioquímicos previos sugie-

ren que la activación de los cofactores V y VIII por la trombina requiere de interacciones entre los exositos I y II y los conectores ácidos (a1, a2, a3) que preceden a los residuos de corte (figura 1A), ya que estos contactos permiten orientar los enlaces peptídicos a hidrolizar dentro del sitio activo de la trombina, en una conformación óptima para la catálisis (Newell & Fay 2008; Segers *et al.*, 2007; Myles *et al.*, 2002). Sin embargo, el conocimiento acerca de las bases atómico-moleculares de estas interacciones es todavía muy limitado y permanece casi sin explorar. Esta información estructural y funcional es esencial para obtener una comprensión profunda de los procesos que conducen a la formación de trombos.

Por esta razón, para estudiar las interacciones moleculares entre el FVIII humano y la trombina, se sobreexpresaron de forma heteróloga en *Escherichia coli* los conectores interdominios ácidos del factor VIII (FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3). Esto permitió obtener los fragmentos proteicos recombinantes suficientes para evaluar su calidad y pureza, y realizar ensayos preliminares para la búsqueda de las condiciones de cristalización de complejos binarios específicos de FVIII con trombina.

Materiales y métodos

Clonaje de los conectores interdominios del FVIII humano

Las secuencias de los conectores del FVIII, junto a algunas de sus características fisicoquímicas relevantes, se muestran en el cuadro 1. Los fragmentos FVIII (330-372), FVIII (712-740) y FVIII (1649-1689), incluyen una cola de histidinas en el extremo N-terminal que facilita su purificación por cromatografía de afinidad. Se trabajó también con variantes del FVIII con mutaciones puntuales del conector, FVIIIa1 (R372Q, G373P) y FVIIIa3 (R1689Q).



Cuadro 1. Secuencias y características fisicoquímicas básicas de los fragmentos derivados del factor VIII humano. Se incluye el peso molecular (P_m) expresado en daltons

(Da), el punto isoeléctrico teórico (pI) y la absorbancia teórica para una solución de 1 g/L de la proteína pura a 280 nm (Abs_{0,1%}). Los parámetros se calcularon utilizando las herramientas ProtParam del servidor de ExPASy (www.expasy.org/tols) (Wilkins *et al.*, 1999).

Fragmento	Secuencia de aminoácidos	P _m (Da)	pI	Abs _{0,1%} ^{teó}
FVIIIa1 (330-372)	ASHHHHHHPEELPQLMKNNELASLYYDUULUSKMDVNRKDDNSPSKQHSFGC	8404,7	4,51	0,239
FVIIIa2 (712-740)	ASIIHHHHGGHNTDQYEDSYEDGASLLSNNAIEPTKSGCC	4726,9	5,75	1,261
FVIIIa3 (1649-1689)	ASIIHHHHIGETITTLTSGDCCEDYDQTSNEMKEDTDYKCCDNGSPKSGCC	8264,5	4,54	0,471

Los conectores FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3 fueron clonados en el vector pET-3a, respectivamente. Con cada plásmido se transformaron, mediante choque térmico, diferentes cepas competentes de *E. coli* [BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) pLysE] por triplicado. Las cepas transformadas se incubaron en placas Petri con agar LB, ampicilina (100 ug/mL) y/o cloranfenicol (34 ug/mL) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Para verificar la transformación se realizaron extracciones de ADN de plásmido a partir de precultivos de al menos tres colonias transformadas, empleando el kit comercial GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas #K0503). Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro (NanoDrop™ Lite) y se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. Las muestras por triplicado se enviaron a secuenciar a Macrogen (Maryland, Estados Unidos).

Sobreexpresión y purificación de los fragmentos recombinantes

A partir de las muestras confirmadas por secuenciación de ADN, se seleccionó una única colonia y se inoculó en 50 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes. El cultivo se incubó durante la noche a 37 °C con agitación constante a 225 rpm. Al día siguiente, los 50 mL del precultivo se inocularon en 0.5 litros de medio LB con antibióticos, en un matraz de 2 litros, a 37 °C con agitación constante a 225 rpm. Una vez alcanzado el valor OD entre 0.4-0.6 para la absorbancia a 600 nm, se realizó la inducción adicionando IPTG a una concentración final de 0.55 mM. Se incubó a 37 °C durante seis horas con agitación constante a 225 rpm, se centrifugaron las células cultivadas a 4500 g



Alere™ i

Resultados moleculares en
menos de 15 minutos.

Alere™ i Influenza A & B

Alere™ i RSV

Alere™ i Strep A*

ALERE ES AHORA ABBOTT

Para más información visite www.alere.com o
contactese con su Representante.

§ 2018 Alere. Reservados todos los derechos. Alere i es una marca comercial del grupo de empresas Alere. Todas las fotografías se muestran únicamente con fines ilustrativos. Las personas que aparecen en esas fotografías son modelos.

durante 20 minutos y el sedimento obtenido se congeló a -20°C .

La extracción de las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* se realizó mediante lisis celular por congelación/descongelación, agregando tampón de lisis (40 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 1mM beta-mercaptoetanol, 0.5 ug/mL ADNasa). Se incubó durante 30 minutos en rotor y luego se realizaron dos ciclos de congelación/descongelación. Seguidamente, se centrifugó a 12000 g durante 30 minutos a 4°C para separar la fracción soluble de la insoluble. A partir de la fracción soluble se efectuó la purificación de la proteína de interés mediante incubación con la resina de afinidad Ni-NTA acoplada a agarosa (Qiagen). La suspensión con resina se trasvasó a una columna, se recuperó la fracción no unida a la resina, se realizaron dos lavados con 30 mM imidazol, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0. Finalmente, se realizó la elución del material unido de forma específica a la resina empleando 500 mM imidazol, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0. Las muestras purificadas se evaluaron mediante SDS-PAGE al 12%.

La autenticidad y pureza de los fragmentos recombinantes purificados se comprobó mediante espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF). Se evaluó la masa de cada uno de los fragmentos recombinantes sin digerir y digeridos con las endoproteinasas Asp-N o tripsina (Roche- Diagnostics), según correspondía. Los resultados de espectrometría de masas se analizaron con el programa ProteinPilot.

Cristalización de los fragmentos recombinantes purificados con trombina humana

Para la búsqueda de las condiciones de cristalización, los fragmentos del FVIII purificados se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con trombina humana (Haematologic Technologies, Inc.), previamente dializada contra el tampón HEPES/NaCl pH 6.0. Los complejos respectivos se prepararon con un exceso molar del fragmento recombinante del sustrato (2:1) en el mismo tampón y se concentraron a 2.5 mg/mL utilizando dispositivos Amicon Ultra-15 con poro nominal de 3kDa (Millipore). Se empleó la técnica de difusión de vapor utilizando la modalidad de gota colgante (*hanging drop*) en placas para cristalización (ComboPlates™, Greiner). Se evaluaron los kits de cristalización: Structure Screen, Morpheus y ProPlex (Molecular Dimensions), para un total de 292 condiciones de cristalización evaluadas. Se mezcló 1 μL de disolución concentrada de proteína con 1 μL de solución de cristalización y se incubó a 20°C . Las gotas fueron periódicamente inspeccionadas utilizando un estereoscopio MEIJI EMZ-TR (Meiji Techno Corporation).

Resultados

Clonaje y sobreexpresión de los fragmentos recombinantes del FVIII

El análisis del clonaje y de la secuencia de los plásmidos de expresión conteniendo los conectores FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3, y sus variantes, se confirmó mediante secuenciación de ADN luego de comparar la secuencia teórica de cada uno de los plásmidos codificantes *in silico* con el electroferograma de secuenciación respectivo. Como ejemplo, en las figuras 2 y 3 se muestra la

secuenciación de ADN y la traducción *in silico* del FVIIIa3.

Posteriormente, los primeros experimentos de sobreexpresión de los fragmentos se llevaron a cabo en medio de cultivo LB con la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* a 37°C , y se evaluaron los resultados después de la inducción a las 2, 4, 6, 8 y 12 h. Se comprobó que a tiempos superiores a las seis horas de inducción no había un incremento proporcional en los niveles de sobreexpresión, y además se comenzaban a detectar productos de degradación del conector. También se hicieron experimentos de expresión en las cepas de *E. coli* BL21, pLysS y pLysE, para determinar si con ellas aumentaba la cantidad del fragmento recombinante obtenido. Sin embargo, la sobreexpresión de los conectores a1, a3 y sus respectivas variantes tuvieron rendimientos similares en las tres cepas, y en todas ellas el fragmento se expresaba soluble (datos no mostrados). Consecuentemente, en los experimentos de sobreexpresión que se realizaron de forma rutinaria para estos conectores se trabajó con la cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS.



Figura 2. Electroferograma de la secuenciación del FVIIIa3. Se muestra únicamente el rango de nucleótidos donde se encuentra la secuencia del gen que codifica para el conector del factor FVIIIa3. La secuenciación fue realizada por la empresa Macrogen y se visualizó utilizando el software BioEdit (versión 7.1.9).

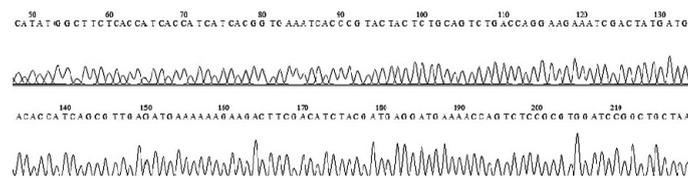


Figura 3. Traducción *in silico* de la secuencia nucleotídica a los residuos aminoacídicos correspondientes del FVIIIa3. Se presenta en letra minúscula la secuencia de nucleótidos (tripletas) que codifican para el conector interdominio FVIIIa3 y en letra mayúscula los aminoácidos respectivos para cada codón. La traducción se realizó utilizando la herramienta ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>)

```
gcttctcaccatcaccatcatcaccggtgaaatcacccgtactactctgcagtctgaccag
A S H H H H H H G E I T R T T L Q S D Q
gaagaaatcgactatgatgacaccatcagcgttgagatgaaaaagaagacttcgacatc
E E I D Y D D T I S V E M K K E D F D I
tacgatgaggatgaaaaccagtctccgctggatccgctgctaa
Y D E D E N Q S P R G S G C -
```

Extracción, purificación e identidad de los fragmentos del FVIII

Una vez extraídas las proteínas por medio de la técnica de congelación/ descongelación, se procedió a trabajar con la fracción soluble obtenida. Los fragmentos se purificaron por cromatografía de afinidad por metal con Ni-NTA, eluyendo de la resina de afinidad con 500 mM de imidazol, obteniéndose un considerable grado de pureza (figura 4).

El rendimiento promedio de recuperación del fragmento

recombinante FVIIIa1 fue de 0,5 mg de proteína a partir de 1 litro de cultivo bacteriano, mientras el del FVIIIa3 fue de 0,4 mg. Los productos obtenidos fueron analizados por espectrometría de masas en modo negativo, identificando la presencia del fragmento FVIIIa1 y el fragmento FVIIIa3 según correspondía y confirmando su pureza, al observar un pico de masa de 6404.55 Da y de 6284.44 Da, respectivamente (datos no mostrados).

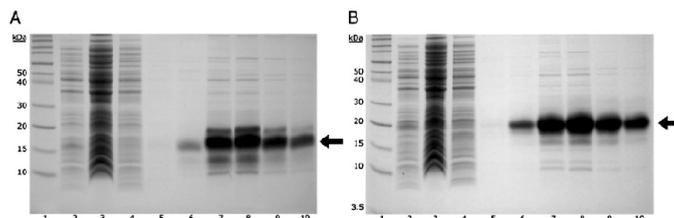
Comprobación de la secuencia de los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3 mediante digestión enzimática

Además, la identidad de los fragmentos FVIIIa1 y FVIIIa3 purificados se confirmó por espectrometría de masas a partir de fragmentos generados mediante digestión con la endoproteinasa Asp-N o tripsina, respectivamente. Las masas obtenidas se compararon con las masas teóricas según PeptideMass de ExPASy (Wilkins *et al.*, 1999) y con mMass 3.9.0 (Strohalm *et al.*, 2008). Se comprobó la presencia de picos con relaciones m/z correspondientes a las masas teóricas de los fragmentos monocargados generados (figuras 5 y 6).



Figura 4. Análisis por SDS-PAGE de la expresión heteróloga y la purificación del conector FVIIIa1 (A) y FVIIIa3 (B). Se evaluaron los niveles de proteína expresados durante las seis horas de inducción tras añadir 0.55 mM IPTG al cultivo bacteriano. El carril 1 corresponde al

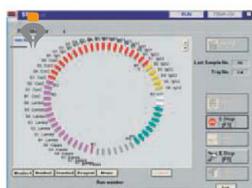
marcador de peso molecular (*Novex Sharp*). En el carril 2 se muestra una alícuota de las células totales; en el carril 3 se visualiza la fracción de proteínas no unidas a la resina de afinidad Ni-NTA; en los carriles 4 y 5 se presentan alícuotas de lavados sucesivos con 30 mM de imidazol; mientras que en los carriles 6 a 10 se muestran las fracciones de eluciones sucesivas de la resina con 500 mM de imidazol, donde se evidencia el fragmento de interés purificado (indicado con una flecha).



Expresión y purificación del fragmento FVIIIa2

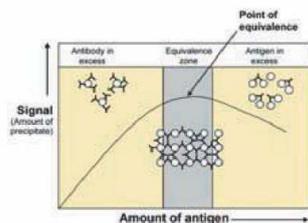
En ensayos preliminares se expresó el fragmento FVIIIa2 en las diferentes cepas de *E. coli* indicadas anteriormente y a temperaturas de 28, 30, 34 y 37 °C durante seis horas de inducción. Los mejores resultados se obtuvieron con la cepa BL21(DE3) al inducir a 30 °C durante seis horas. Sin embargo, la mayor parte del fragmento se encontró en la fracción insoluble, por ello, el sedimento obtenido tras la centrifugación se incubó en tampón Tris/NaCl que contenía concentraciones crecientes de úrea (2, 4, 6 y 8 M). Al analizar las

SPAplus - El Especialista en Proteínas



Resultados Rápidos

- ✓ 15min el primero
- ✓ Cada 30 seg. los siguientes



Exceso de Antígeno Automático Re - diluciones Automáticas



Refrigeración On board



Calibración Directa



Conexión a LIS



- ✓ IgG, IgA, IgM, Subclases de IgG e IgA
- ✓ Alfa 1, Alfa 2, Beta 2 Micro, Cistatina
- ✓ IgD, IgE, CH50, C1 inhibidor, C3c, C4
- ✓ Albúmina, Microalbuminuria
- ✓ Haptoglobina, Ceruloplasmina
- ✓ Apo A, Apo B, Lpa
- ✓ Ferritina, Transferrina, ASO, RF, CRP
- ✓ Freelite, Hevylite

ONYVA SRL – Dr. Adolfo Dickman 990/994. CABA

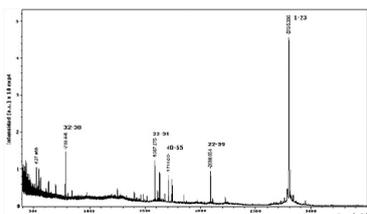
Tel. (54 11) 5235-3970 - ventas@onyva.com.ar - www.onyva.com.ar

ONYVA

fracciones correspondientes por SDS-PAGE, se observó que el fragmento de interés se extraía mayoritariamente en 4 y 6 M de úrea. La purificación del fragmento FVIIIa2 se realizó unificando los extractos obtenidos de las disoluciones de 4 y 6 M de úrea y empleando la resina Ni-NTA agarosa. Las fracciones correspondientes se evaluaron mediante SDS-PAGE al 12% (datos no mostrados). El rendimiento promedio de recuperación del conector FVIIIa2 fue de ~0.2 mg de proteína a partir de 1 litro de cultivo bacteriano, y las muestras se debieron mantener en tampón Tris/NaCl con 2 M de úrea. No se continuó trabajando con este fragmento debido a que las altas concentraciones de úrea interfieren en los ensayos de cristalización.



Figura 5. Verificación de la identidad del fragmento recombinante FVIIIa1. El conector FVIIIa1 purificado fue digerido con la endoproteínasa Asp-N y los péptidos resultantes se analizaron por espectrometría de masas en modo reflector con polaridad negativa. En el espectro mostrado se identifican los picos correspondientes a las masas que se indican en la tabla correspondiente, donde aparecen las masas teóricas calculadas con PeptideMass (www.expasy.org/tools/peptide-mass.html) (Wilkins *et al.*, 1999) y con mMass 3.9.0 (Strohalm *et al.*, 2008). Se verificó la secuencia completa del fragmento FVIIIa1 a partir de la posición 1 (A1a) hasta la 55 (Cys) del fragmento recombinante.



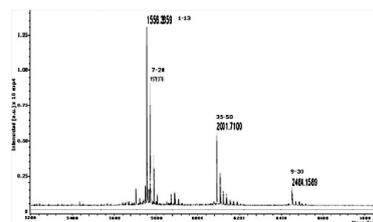
Posición	Masa teórica (Da)	Masa experimental (Da)	Secuencia del fragmento recombinante
1-23	2795.9452	2795.335	ASHHHHHHHPEEFQLRMKNLEAE
22-39	2088.6703	2088.054	AFDYDDDI TDSEMDVRF
40-55	1711.7889	1710.854	DDDNPSFQIRGSGC
22-35	1587.5639	1587.875	AEDYDDLTDSEMD
32-38	789.8923	789.441	SEMDVRF

Cristalización de los complejos proteicos

En la búsqueda de las condiciones de cristalización de los fragmentos purificados FVIIIa1, FVIIIa3 y sus variantes -acomplejados con trombina humana-, se evaluaron 296 tampones de cristalización distintos con el objetivo de encontrar condiciones que favorezcan la formación de cristales proteicos de calidad. A partir del complejo FVIIIa1 (R372Q, G373P)·Trombina se observó crecimiento de cristales en la condición 1-33 de Structure Screen a los ocho días (figura 7). Uno de los cristales obtenidos mide aproximadamente 44 μm de largo por 6 μm de ancho (figura 7A), y al repetir la condición para aumentar el número de cristales se obtuvieron varios con dimensiones de 20 μm x 14 μm y con un mayor grosor (figura 7B), lo que podría permitir recolectar un mejor conjunto de datos de difracción.

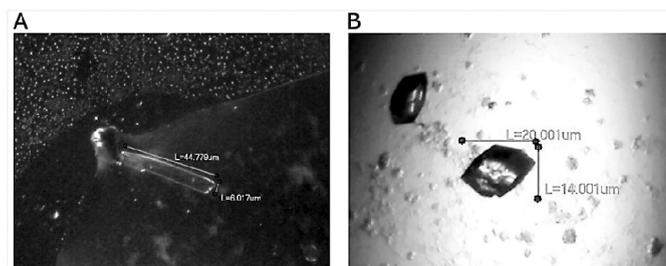


Figura 6. Verificación de la identidad del fragmento FVIIIa3. La proteína recombinante purificada fue digerida con tripsina, y los péptidos resultantes se analizaron por espectrometría de masas en modo reflector con polaridad positiva. En el espectro mostrado se identifican los picos correspondientes a las masas que se indican en la tabla correspondiente, donde aparecen las masas teóricas calculadas con PeptideMass y con mMass.



Posición	Masa teórica (Da)	Masa experimental (Da)	Secuencia del fragmento recombinante
9-30	2484.5634	2484.1589	GEITRTTQSDQEEIDYDDTIS
35-50	2001.0055	2001.7100	KEDFDIYDEDEENQSPR
7-20	1577.6804	1578.3761	HHGEITRTTQSDQ
1-13	1556.6298	1556.3859	ASHHHHHHH-GEITR

Figura 7. Cristales obtenidos de la variante del FVIIIa1 (R372Q, G373P) en complejo con trombina. A. Cristal de proteína obtenido en la condición 1-33 de Structure Screen (Molecular Dimensions) conteniendo 0.2 M de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.1 M de Tris pH 8.5 y 30% p/v de PEG 4000. B. La repetición de la misma condición permitió obtener cristales más pequeños, pero más gruesos. Imágenes capturadas con la cámara HDCE-II, empleando el programa ScopelImage 9.0, en un estereoscopio MEIJI EMZ-TR (Meiji Techno Corporation).



Discusión

Sobreexpresión heteróloga de los conectores ácidos FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3

Al iniciar la presente investigación se partió de la hipótesis de que los interconectores de los dominios A1-A2, A2-B y B-A3 del factor VIII de la coagulación son importantes tanto para la activación del cofactor como para la actividad del FVIII dentro del complejo X-asa (Corral-Rodríguez *et al.*, 2011, Newell & Fay 2007; Yuan *et al.*, 2005), lo que se evidencia por el alto grado de conservación entre diferentes especies de mamíferos (figura 8) tanto para el conector FVIIIa1 que incluye los residuos Pro³³⁰-Arg³⁷² (figura 8A), como el FVIIIa2 con los residuos Asp⁷¹²-Arg⁷⁴⁰ (figura 8B) y el FVIIIa3 que contiene la región Glu¹⁶⁴⁹-Arg¹⁶⁸⁹ (figura 8C). Estos conectores preceden a los sitios de corte

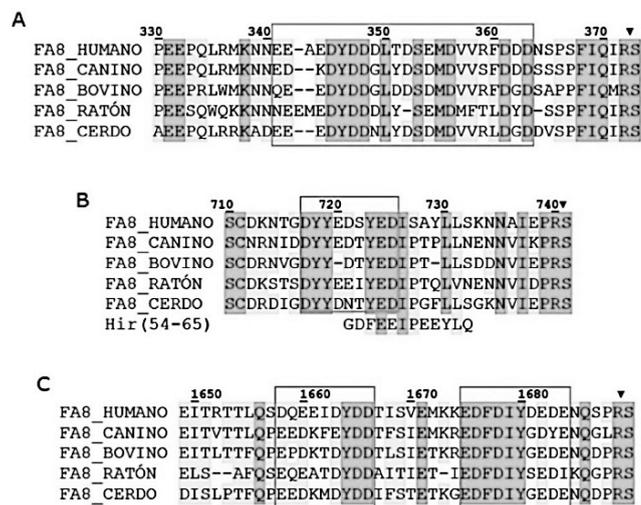
reconocidos por la trombina que son relevantes fisiológicamente, Arg³⁷²-Ser³⁷³, Arg⁷⁴⁰-Ser⁷⁴¹ y Arg¹⁶⁸⁹-Ser¹⁶⁹⁰, respectivamente.

La activación del FVIII mediada por la trombina es fundamental para los procesos procoagulantes, de ahí la importancia de estudiar las interacciones trombina-FVIII. Resultados publicados sobre la interacción de los residuos Glu⁶⁶⁶-Glu⁶⁷² del conector α2 del FV con el exosito I de la trombina (Corral- Rodríguez *et al.*, 2011) evidencian la importancia de regiones ricas en residuos ácidos y aromáticos en estas interacciones. Por otra parte, otros investigadores han reportado que los residuos ácidos Glu⁷²⁰-Asp⁷²⁵ del conector FVIIIa2 (Newell & Fay, 2008) son importantes para la activación del FVIII mediada por la trombina. Esta información previa, junto con la característica de que cada uno de los conectores del FVIII contiene regiones ricas en residuos ácidos que les confieren cargas netas negativas, sugiere que estos conectores interactúan con los exositos básicos I y II de la trombina para presentar los sitios de corte y activación del cofactor en el centro activo de la proteasa.



Figura 8. Alineamientos múltiples de los conectores del FVIII de diferentes especies de mamíferos. Se presentan las secuencias de las regiones FVIIIa1 (A), FVIIIa2 (B) y FVIIIa3 (C). La numeración corresponde al FVIII humano maduro. Los residuos estrictamente conservados en cada uno de los conectores se muestran con fondo gris oscuro; otros residuos bien conservados o reemplazados

conservativamente están sombreados en gris claro. Las regiones ricas en aminoácidos de carácter ácido o aromático se muestran dentro de un recuadro y el sitio de corte por la trombina se indica con un triángulo invertido. En el panel B se presenta la secuencia del extremo C-terminal de la hirudina (Hir-C) debajo de las secuencias del conector FVIIIa2 topológicamente equivalentes. En C, nótese que el conector FVIIIa3 presenta dos regiones diferenciadas ricas en aminoácidos de carácter ácido. Los alineamientos se generaron con T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000; Poirot *et al.*, 2003).



Biocientífica
Calidad en Reactivos. Excelencia en Biotecnología.

Líderes en el mercado de inmunología clínica y biología molecular

Soluciones específicas para problemas diagnósticos

www.biocientifica.com.ar
CE • GMP • ISO 9001:2008 • NS-EN ISO 13485:2012

Líneas:

Inmunofluor
Diffu-Plate
Antisueros
Aesku Diagnostics
Bio-Diagnostics
Bühlmann Laboratories
Imtec - Human
Macherey Nagel

Meridian Bioscience
Sacace
Solis BioDyne
Trinity Biotech
Virion – Serion
Virostat
Zentech

Reactivos e instrumentos:

Inmunología
Inmunodeficiencias
Autoinmunidad
Neuroautoinmunidad
Enfermedades infecciosas
Parasitología
Virología
Hematología
Biología molecular
Genética
Genómica
Gastroenterología
Metabolismo del calcio
Medicina forense
Microarrays

Estas observaciones nos llevaron a estudiar la formación de complejos de los conectores ácidos del FVIII con la trombina. Para cumplir este objetivo, se clonaron, sobreexpresaron y purificaron los tres conectores del FVIII, así como sus variantes puntuales. Aunque los constructos iniciales utilizados en estos estudios se optimizaron de forma similar, se observaron diferencias significativas en la solubilidad de los fragmentos recombinantes. Por ejemplo, los conectores a1 y a3 y sus respectivas variantes se lograron extraer con buen rendimiento en la fracción soluble a partir de la sobreexpresión en células de *E. coli*, probablemente debido a que son cadenas polipeptídicas relativamente cortas, carentes de elementos de estructura secundaria y con un notable carácter polar (45-46% de los residuos). Mientras que el FVIIIa2 se extrajo en tampones conteniendo 4-6 M de urea, probablemente este fragmento recombinante tiende a agregar debido a su menor porcentaje de residuos polares (38% vs 45-46%).

Al evaluar las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE, se observó que para todos los casos tanto del FVIIIa1 como del FVIIIa3 y sus respectivas variantes, cuyo peso molecular teórico está entre aproximadamente 6.4 y 6.3 kDa, migraron a la misma distancia aproximada que la banda de 20 kDa del marcador de peso molecular utilizado. Estudios han demostrado que los múltiples residuos ácidos presentes en una proteína son capaces de neutralizar parte de las cargas negativas (aún en geles desnaturalizantes), disminuyendo de manera considerable la migración en el gel de poliacrilamida (Shi *et al.*, 2012, Rath *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, la identidad de estas proteínas se confirmó mediante espectrometría de masas analizando los fragmentos completos, así como cada uno de los picos generados por la digestión limitada. A partir de estos últimos se logró obtener la secuencia experimental de cada fragmento y se identificó una alta homología con el Factor VIII de la coagulación de *Homo sapiens* (Uniprot: P00451) con un porcentaje de confianza del 99%. Estos resultados de expresión, purificación e identificación confirman que es posible expresar de forma heteróloga estos fragmentos del FVIII, en

cantidades y con un nivel de pureza adecuados para estudios bioquímicos y de cristalización.

Búsqueda de condiciones de cristalización de los conectores del FVIIIa1, FVIIIa3 y sus variantes respectivas, unidos a la trombina

La sobreexpresión en *E. coli* de los fragmentos FVIIIa1 (337-372), FVIIIa3 (1649-1689), así como de los mutantes FVIIIa1 (R372Q, G373P) y FVIIIa3 (R1689Q), permitió obtener suficiente cantidad de proteínas con una alta calidad y grado de pureza, lo cual es casi siempre el cuello de botella para poder realizar estudios de cristalización y cristalografía debido a la gran cantidad de proteínas que se requieren (Rupp, 2009).

Nuestros resultados previos con los experimentos de *band shift* de los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3 que evidencian la interacción con la trombina (datos no mostrados), nos motivaron a buscar condiciones de cristalización de complejos de estos fragmentos del FVIII con la proteinasa, con el objetivo de obtener cristales de calidad, para posteriormente resolver las estructuras 3D de dichos complejos. Sin embargo, según nuestra experiencia con trabajos previos en la resolución de estructuras 3D (Hernández-Carvajal, 2013), se decidió modular el sitio de corte y activación de los conectores para favorecer la forma acomplejada con la trombina. Para ello se realizaron mutaciones dirigidas en las posiciones P₁ y P_{1'} sobre los residuos de arginina y serina, los cuales fueron reemplazados por glutamina y prolina, respectivamente. Dado que la glutamina tiene una cadena lateral no cargada y la prolina dificulta a las proteasas serínicas procesar los enlaces Xxx-Pro, se espera que estos cambios favorezcan la formación de complejos más estables entre la trombina y sus sustratos.

Los cristales conseguidos están siendo almacenados para para realizar experimentos de difracción de rayos X en los sincrotrones ALBA (Barcelona, España) o ESRF (Grenoble, Francia), para evaluar el resultado de esta estrategia y tratar de resolver la estructura tridimensional del complejo.

Conclusiones

Se sobreexpresaron heterológicamente en *E. coli* y se purificaron los fragmentos del FVIII humano correspondientes a los conectores FVIIIa1, FVIIIa2 y FVIIIa3, así como las variantes FVIIIa1 (R372Q, G373P) y FVIIIa3 (R1689Q), evidenciando la capacidad de producir suficiente proteína para ensayos bioquímicos y de cristalización.

Se realizó la búsqueda de condiciones de cristalización, obteniéndose cristales del complejo Trombina-FVIIIa1 (R372Q, G373P) en la condición Structure Screen 1-33 que contiene 0.2 M de MgCl₂·6 H₂O, 0.1 M de Tris pH 8.5 y 30% p/v de PEG 4000.

Agradecimientos

Agradecemos al Programa de Pasantías para Movilidad Estudiantil FEES-CONARE y a la Rectoría del TEC, por apoyar económicamente la estancia de S.A.S. en el Biomolecular NMR Laboratory en el Hospital de San Raffaele (Milán, Italia). A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC por el financiamiento de este proyecto (VIE CF 1510030).



Referencias

- Corral-Rodríguez, M.A., Bock, P.E., Hernández-Carvajal, E., Gutiérrez-Gallego, R. & Fuentes-Prior, P. (2011). Structural basis of thrombin-mediated factor V

activation: the Glu666-Glu672 sequence is critical for processing at the heavy chain-B domain junction. *Blood*, 117, 7164-73.

- Davie, E.W., Fujikawa, K. & Kiesel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30, 10363-70.
- Fuentes-Prior, P., Iwanaga, Y., Huber, R., Pagila, R., Rumennik, G., Seto, M., Morser, J., Light, D.R. & Bode, W. (2000). Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature*, 404, 518-25.
- Gandhi, P.S., Chen, Z. & Di Cera, E. (2010). Crystal structure of thrombin bound to the uncleaved extracellular fragment of PAR1. *J Biol Chem*, 285, 15393-8.
- Hernández-Carvajal, E. (2013). *Estudios de estructura y función de las interacciones de la trombina con sustratos fisiológicos*. Tesis de Doctorado en Biomedicina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona.
- Myles, T., Yun, T.H. & Leung, L.L. (2002). Structural requirements for the activation of human factor VIII by thrombin. *Blood*, 100, 2820-6.
- Newell, J.L. & Fay, P.J. (2007). Proteolysis at Arg740 facilitates subsequent bond cleavages during thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *J Biol Chem*, 282, 25367-75.
- Newell, J.L. & Fay, P.J. (2008). Acidic residues C-terminal to the A2 domain facilitate thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *Biochemistry*, 47, 8786-95.
- Nichols, M., Townsend, N., Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., Scarborough, P. & Rayner, M. (2012).

European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.

- Notredame, C., Higgins, D.G. & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, 302, 205-17.
- Poirot, O., O'Toole, E. & Notredame, C. (2003). Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res*, 31, 3503-6.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V., Chen, G. & Deber, C. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS*, 106, 1760-65.
- Rupp, B. (2009). *Biomolecular crystallography: principles, practice and application to structural biology*. Garland Science.
- Segers, K., Dahlback, B., Bock, P.E., Tans, G., Rosing, J. & Nicolaes, G.A. (2007). The role of thrombin exosites I and II in the activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem*, 282, 33915-24.
- Shi, Y., Mowery, R., Ashley, J., Hentz, M., Ramirez, A., Bilgicer, B., Slunt-Brown, H., Borchelt, D. & Shaw, B. (2012). Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. *Protein Science*, 21, 1197-1209.
- Strohm, M., Hassman, M., Kosata, B. & Kodicek, M. (2008). mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22, 905-8.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C.,

Williams, K.L., Appel, R.D. & Hochstrasser, D.F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-52.

- Yuan, Q.P., Walke, E.N. & Sheehan, J.P. (2005). The factor IXa heparin-binding exosite is a cofactor interactive site: mechanism for antithrombin-independent inhibition of intrinsic tenase by heparin. *Biochemistry*, 44, 3615-25.



PKL PPC 1100H

Analizador Hematológico,
5- Part Dif con Reticulocitos

ESPECIFICACIONES:

- 27 Parámetros:** WBC,LYM%,MON%,NEU%,EOS%,BAS%,LYM#,MON#,NEU#,EOS#,BAS#,RBC, HGB, HCT,MCV, MCH, MCHC,RDW_CV,RDW_SD,PLT,MPV,PDW,PCT,P_LCR, RETIC%, RETIC_ABS, IRF
2 Histogramas para RBC y PLT
2 scategramas: 1) 5 diferencial 2) Eosinófilos y Neutrófilos
Scategramas 3-D
- Principios de operación:** 5-Diff WBC: Citometría de Flujo (FCM)+ luz de dispersión de 4 ángulos
WBC : mediciones ópticas y de impedancia volumétrica
RBC/PLT: Método de impedancia volumétrica
HGB: colorimetría libre de cianuro
RET: Citometría de Flujo (FCM)+dispersión de luz laser
+ Método químico de teñido
- Modos de muestra:** Auto carga 160 µL, modo manual 160 µL, modo prediluido 40 µL
- Diámetro de apertura:** WBC 100 µm RBC/PLT 80 µm
- Producción:** Auto carga hasta 110 m/h - Modo manual hasta 100 m/h
- Dispositivo de muestreo:** Rack con capacidad de 120 muestras,
- Almacenamiento de información:** Hasta 200,000 resultados
- Alarmas:** Mensajes de error
- Pantalla:** Pantalla de PC con sistema Linux,
Pantalla color TFT de 14 pulgadas
- Medida:** 760x684mx676,5 mm

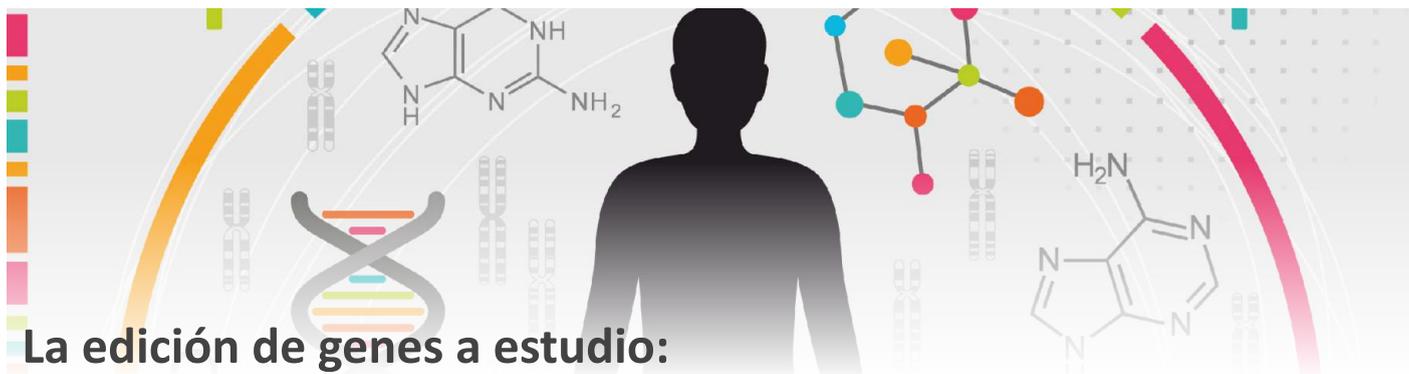


AADEE S.A.

"Una empresa que habla su mismo idioma"

REPRESENTANTE EXCLUSIVO





La edición de genes a estudio: Los problemas bioéticos que puede tener esta nueva tecnología



7 min.



En la presente editorial realizada por el Dr. Gamba - Bernal trata los nuevos paradigmas de la edición de genes y los problemas bioéticos que pueden traer nuevas tecnologías.



Gilberto A. Gamboa-Bernal¹
1 Universidad de La Sabana, Colombia.
E-mail: gilberto.gamboa@unisabana.edu.co



El año 2016 se inició con un anuncio que vuelve a revolucionar la investigación biotecnológica sobre la terapia génica, al revivir las esperanzas sobre el tratamiento de infecciones como la malaria y el VIH sida, de enfermedades como la distrofia muscular, la fibrosis quística, o aquellas otras donde está implicado el sistema endocrino, como la diabetes.

Pero no solo esto, con la tecnología CRISPR-Cas9 puede ser posible también cambiar casi cualquier organismo vivo, vegetal o animal, a través de un proceso que imita lo que naturalmente hace una bacteria al combatir un virus: mediante un ARN guía se identifican y reemplazan sectores específicos del ADN, para lograr los cambios deseados.

Con la CRISPR se busca la secuencia diana del gen que se va a intervenir, y se une a ella; la enzima Cas9 corta ambas cadenas del ADN de la

secuencia que se quiere cambiar. En las reparaciones celulares este corte de la doble cadena hace que se agreguen varios pares de bases de ADN en el sitio, cosa que es suficiente para hacer mutar el gen entero. La misma técnica de segmentación y de corte se puede utilizar para insertar un nuevo gen, que codifica para un rasgo deseable, pudiéndose agregar cientos o miles de pares de bases de ADN (1).

Aunque se trata de una tecnología que lleva cerca de tres años en investigación (2), principalmente en organismos vegetales, solo hasta el año 2015 fue utilizada en humanos (3) y esto ha despertado las alarmas, principalmente de tipo ético, ya que el experimento no salió bien y fue suspendido en una fase temprana; incluso revistas como Nature y Science decidieron no publicar lo que finalmente vio la luz a través de la revista Protein & Cell (4).

La utilización de la CRISPR-Cas9 tiene diferente connotación ética cuando se analiza esa tecnología aplicada a organismos vegetales y animales distintos del hombre. En los seres humanos, aunque se tengan grandes posibilidades de éxito en términos de curación de enfermedades o de mejoramientos de la condición humana, siempre será descalificada la técnica si en su desarrollo mueren seres humanos, así estén solo en estado embrionario.

A finales del 2015, en la Academia Nacional de Ciencias, Ingeniería y Medicina de Estados Unidos tuvo lugar una cumbre internacional para debatir sobre las implicaciones de esta nueva tecnología, principalmente en los campos ético y social (5). En la cumbre participaron, además, la

Royal Society y la Academia de Ciencias de China, e instaron a todas las academias nacionales para que se cree un foro internacional permanente que estudie el estado actual de la investigación sobre la materia y las posibles aplicaciones clínicas de la tecnología en los seres humanos; las decisiones políticas en cada nación; las correspondientes regulaciones; y las directrices necesarias para que la CRISPR-Cas9 supere las actuales limitaciones de seguridad y no se pongan en peligro los sujetos humanos actuales y futuros.

Ese foro debe ser lo más amplio y plural posible, compuesto por científicos de las áreas biomédicas y sociales, expertos en ética y bioética; legisladores y proveedores de la atención en salud; pacientes, familiares y personas con discapacidad; gestores y financiadores de la investigación; representantes de las iglesias, defensores de los ciudadanos y del interés público; representantes de la industria y el público en general. Es decir, se debe buscar una participación abierta pues las repercusiones de esta biotecnología afectan a todo el mundo y a las generaciones futuras.

Las conclusiones de los expertos de la cumbre tienen, desde la perspectiva bioética, algunas inconsistencias que deben ser trabajadas más a fondo por ellos en reuniones subsiguientes: de una parte, hacen depender la investigación básica y preclínica de la tecnología de que se presenten unas normas legales, donde al parecer lo más importante es la supervisión; y unas pautas éticas, en las que importa más no establecer un embarazo con los embriones sobre los que se experimenta para el cambio de genes, que la vida misma

de esos embriones. Es decir, no se tiene ninguna consideración ética sobre la manipulación que implica la edición de secuencias genéticas en embriones humanos.

Sin embargo, se insiste en que la edición de genes se debe dirigir a la alteración de las secuencias genéticas solo en las células somáticas, vale decir, en aquellas cuyos genomas no se transmiten a la siguiente generación; de esta manera, la afectación (para bien o para mal) solo se limita al individuo que recibe el cambio. Pero también dejan abierta la posibilidad de hacer cambios futuros en la línea germinal, para alterar genéticamente gametos o embriones, de tal manera que los individuos resultantes pueden transmitir a las generaciones futuras los cambios que se hagan en sus genomas. Esta licencia no es distinta de la autorización para realizar eugenesia con los seres humanos, pero el documento no lo dice.

Los expertos de la cumbre no desconocieron los problemas que se pueden ocasionar con la modificación de los genomas humanos, en términos de introducir variantes naturales o cambios genéticos totalmente novedosos, con el riesgo de ediciones incorrectas y producción de mutaciones no deseadas, de mosaicismos en las células de los embriones jóvenes. Tampoco dejaron de lado los posibles efectos que esos cambios genéticos puedan tener más adelante por las interacciones con otras variantes genéticas,

con el medio ambiente, con los medicamentos, etc.; ni la dificultad de eliminar más adelante esas alteraciones genéticas y la imposibilidad de mantenerlas circunscritas a una determinada región o país.

Tampoco descartan el riesgo de discriminación que se puede generar con los cambios genéticos, ni que la alteración intencional de la evolución humana pueda tener una connotación negativa; no obstante, sostienen que es amplio el consenso sobre permitir este tipo de tecnología.

En esa cumbre se conformó un comité multidisciplinario de expertos que ya inició su trabajo con la recopilación de información en la misma reunión; en los encuentros que se seguirán, los expertos deberán estar al tanto de los desarrollos investigativos que se están haciendo y plantear respuestas a las inquietudes y los problemas tanto científicos como éticos y sociales que la nueva técnica está generando. A finales del 2016 se espera un informe sobre el trabajo realizado por el comité de expertos.

Algunos temas que deberían ser aclarados, y que seguramente el comité los abordará en las sesiones de trabajo, son los siguientes:

Los investigadores en las universidades y las empresas han desatado una carrera de vértigo y están investigando frenéticamente para poder patentar, cuanto antes, las ediciones de genes con fines

netamente comerciales (6). Incluso, se están dando fusiones entre empresas que se ocupan de temas afines (DuPont y Caribou Biosciences) y también entre empresas y universidades, para trabajar colaborativamente. Es cierto que en el campo de los organismos vegetales la nueva tecnología podría ayudar a la solución de muchos problemas cuyo origen está en la escasez o en la falta de alimentos, pero todavía es prematuro evaluar la seguridad de los alimentos transgénicos o modificados genéticamente (7).

La CRISPR-Cas9 puede además incrementar el control que los humanos podemos ejercer sobre la vida en el planeta, que muchas veces no se ha caracterizado por el cuidado y la conservación, sino por todo lo contrario; no son despreciables los efectos sobre el equilibrio biológico, tanto de plantas y animales modificados genéticamente, que pueden llevar a la extinción de especies silvestres o salvajes e incluso domésticas (8).

El tema de las patentes no carece de especial importancia: es necesario determinar la titularidad de ellas, si son los investigadores, los médicos o los pacientes los que deberían beneficiarse de este régimen de patentes tan heterogéneo. El sistema actual de patentes en el mundo tiene sus problemas y es necesario adelantarse y determinar la forma como deben ser estudiadas y concedidas, durante cuánto tiempo y en beneficio de quién o quiénes (9).

DIAGNOS MED S.R.L. 



www.diasource-diagnostics.com

17 (OH) PROGESTERONA NUEVA!

Adaptable para sistemas abiertos Elisa

Controles incluidos

Opcional: Extracción de muestra para neonatos

CALPROTECTINA ELISA

Opcional: Set de recolectores de muestra

CROMOGRANINA ELISA Y RIA

RSR

Diagnostics for Autoimmunity

www.rsrltd.com

3 Screen Islet Cell (ELISA)

IA2 (ELISA Y RIA)

VGKC Ab (RIA)

VGCC Ab (RIA)

Otro tema estrechamente relacionado con el anterior es el conflicto de los derechos del paciente y los derechos de propiedad intelectual. En junio de 2013, una decisión del Tribunal Supremo de Estados Unidos alteró la patentabilidad del material genético y es importante volver a estudiar las implicaciones éticas de patentar genes. Esto a pesar de que la ONU, a través de Unesco, declaró que "el genoma humano es la base de la unidad fundamental de todos los miembros de la familia humana y del reconocimiento de su dignidad intrínseca y su diversidad. En sentido simbólico, el genoma humano es el patrimonio de la humanidad" (10), dichas patentes sugieren una propiedad del material genético que está en contra de la dignidad de la que es titular cualquier ser humano, desde su estado más primitivo de desarrollo y puede además dificultar el acceso a la asistencia sanitaria e inhibir el supuesto progreso médico (11).

El papel que juega la epigenética está cada vez más estudiado y se debe tener en cuenta la interacción de la edición de genes y medio ambiente. La epigenética tiene gran importancia en la programación del desarrollo embrionario normal, donde la influencia de factores biológicos y ambientales puede alterar ese desarrollo a corto o mediano plazo (12).

Aunque algunos vean como un imperativo la investigación con embriones humanos, no obstante esto pueda conducir a la muerte de los embriones (13), es muy importante mantener la prohibición de no intervenir en la línea germinal humana (14), y extremar las medidas de prudencia para que la investigación que se realice en la línea somática no se haga a costa de la vida de los embriones.

Los cambios que se pudieran producir con la edición de genes en términos de un incremento de la capacidad cognitiva, de la longevidad, de la memoria o de la concentración, y en general de cualquier rasgo deseable, ponen a la CRISPR-Cas9 en el terreno de una herramienta abiertamente eugenésica. Así será posible "producir" niños al capricho de sus padres, o de cualquier tipo de personas que, sin estar relacionadas por un vínculo matrimonial, puedan pagar las técnicas y "darse" el gusto de tener un hijo a la medida de sus deseos (15).

En este campo se empieza a abrir una verdadera tronera desde la perspectiva ética: la edición de genes en la especie humana puede ser "la certificación final" del extropianismo o transhumanismo: Habermas tenía razón al anticipar esa característica de la técnica, cuando se convierte en instrumento de una ideología (16) que va mucho más allá de una visión simplemente tecnofuturista (17) y que implica un cambio esencial en el ser humano. Ya no se trata solo de un tema terapéutico mediante el cual se brinda un tratamiento a cierto tipo de enfermedades, sino que sería posible un mejoramiento de la especie que va mucho más allá del debate sobre la auto-comprensión ética de la misma, donde se hacen diferencias entre la dignidad humana y la dignidad de la vida humana, llegando a relativizar o a banalizar esa realidad ontológicamente constitutiva de la persona (18).

Se dice muy fácil que es factible mejorar la naturaleza humana, pero la implicación es distinta cuando el planteamiento va más allá: no solo mejorarla, sino también cambiarla. Esa es una de las pre-concepciones del movimiento transhumanista, que tiene sus raíces en los inicios del siglo XX, de una simbiosis entre el cientificismo y la teoría evolucionista.

La literatura de ficción (Wells, Huxley, Benítez, Assimov) ayudó en gran medida a que se hicieran planteamientos en los cuales la libertad individual poco importaba, pues debería ponerse al servicio del bienestar de todos, y a que se pudieran incrementar las capacidades humanas mediante la tecnología. Así mismo, señalaba que la investigación científica y tecnológica no debería tener limitación alguna, y que la inteligencia artificial, la ingeniería molecular, la nanotecnología, etc., se debían desarrollar sin restricciones.

Julian Huxley (1887-1975), hermano de Aldous Huxley, fue quien empezó a hablar de transhumanismo y lo introdujo de la siguiente manera:

La especie humana puede, si lo desea, trascenderse a sí misma no solo esporádicamente -un individuo aquí de cierta manera, un individuo ahí de otra- sino en su totalidad, como humanidad. Necesitamos un nombre para esta nueva creencia.

Tal vez el transhumanismo servirá: el hombre permaneciendo hombre, pero trascendiéndose mediante la realización de nuevas posibilidades de y para su naturaleza humana (19).

Otro término se introdujo más adelante, en la década de los ochenta del siglo pasado, gracias a los aportes de Max More: el extropianismo. Se trata de un intento de dotar al transhumanismo de un mínimo piso filosófico, donde hacen su aparición algunos valores y principios aparentemente loables como: progreso perpetuo, autotransformación, optimismo práctico, tecnología inteligente, sociedad abierta (información y democracia), autodirección y pensamiento racional (20).

Sin embargo, las aplicaciones de esos principios van mucho más allá. El movimiento extropiano propone: retardar o revertir el proceso de envejecimiento; reproducción artificial sin restricciones; técnicas para asistir a la memoria, la concentración y la energía mental; terapias de alargamiento de la vida; tecnologías de elección reproductiva; procedimientos criogénicos; bienestar emocional a través del control de los centros del placer; existencia pos-biológica y muchas otras tecnologías posibles para la modificación y el perfeccionamiento humano (21).

Estos efectos ya se están viendo en la vida diaria: "el materialismo neuro-biologista, la búsqueda del cuerpo perfecto a través de la cirugía plástica, la eugenesia liberal a través de la selección embrionaria, el diagnóstico prenatal y el aborto eugenésico, son manifestaciones claras de cómo esta ideología se va haciendo cada vez más presente en las democracias occidentales" (22). El transhumanismo está empezando a entrar en nuestra cultura y crecerá sin medida si no se le desenmascara; la edición genética puede ser una de sus últimas consecuencias.

No han sido pocos los detractores de este movimiento (23). Para Francis Fukuyama, "El transhumanismo es la idea más peligrosa del mundo" (24). Leon Kass afirma que "el ser humano se degrada a sí mismo, cuando en lugar de respetar su propia naturaleza trata de alterarla" (25), y que el transhumanismo es un "ataque frontal a la dignidad humana y los sutiles

modos en los que nuestros intentos de afirmar el dominio tecnológico sobre la naturaleza humana podrían terminar deshumanizándonos al minar varios significados tradicionales tales como el significado del ciclo de la vida, el significado del sexo, el significado del comer, y el significado del trabajo" (26).

El mundo está en un cambio de cultura, donde la posmodernidad intenta deconstruir al ser humano y culminar el reduccionismo antropológico que inició la Modernidad (27); lo que hace falta no es un hombre modificado y mejorado, sino un redescubrir lo que el ser humano es, para ayudarlo en su vulnerabilidad, cuidarlo en su fragilidad, potenciarlo en su humanidad y tratarlo siempre teniendo en cuenta la profunda dignidad que encierra.

Esta edición de Persona y Bioética contiene los siguientes aportes:

De Argentina y España, las doctoras Corina Busso y Pilar León Sanz escriben su artículo "Investigación con pacientes en cuidados paliativos: dilemas éticos y percepción pública sobre su vulnerabilidad. Estudio exploratorio". La doctora Ángela Arenas Massa, de Chile, es la autora de "Enseñanza de bioética en la carrera de odontología. Reflexiones y prospectivas". También de Chile, el Pbro. Eduardo Rodríguez Yunta trata sobre "Determinantes sociales de la salud mental. Rol de la religiosidad".

Cinco son los aportes de Colombia a este número: Ángela María Wilches Flórez y Jorge Enrique Almansa Manrique son los autores de "Los estrógenos ambientales como consecuencia del modelo de desarrollo y sus impactos socio-biológicos. Reflexiones desde un marco bioético"; el doctor Edgar Ernesto Caro Ramírez escribe sobre la "Economía ecológica. Paradigmas de la economía". Los doctores Elías Bermeo Antury y Mauricio Quimbaya estudiaron la "Secuenciación de próxima generación y su contexto eugenésico en el embrión humano". Y el doctor Fernando Suárez Obando hace claridad sobre el "Consentimiento Informado como criterio de inclusión. ¿Confusión conceptual, manipulación, discriminación o coerción?" Finalmente, el doctor José Alexander Carreño D. escribe "En investigación clínica el

consentimiento informado debe ser un proceso dinámico".

El doctor Juan Fernando Sellés con "La experiencia de los límites: el dolor y la finitud temporal", y el doctor Joaquín García-Alandete con "Persona, carácter y valores según Rudolf Allers en The Psychology of Character" nos escriben desde España.

La primera colaboración procedente del Japón está a cargo del doctor Jaime Teixeira da Silva: "On the abuse of online submission systems, fake peer reviews and editor-created accounts".



Referencias

- Hartenian, E.; Doench, J. Genetic screens and functional genomics using CRISPR/Cas9 technology. *FEBS Journal*. 2015;282(8):1383-93.
- Lander, E. The Heroes of CRISPR. *Cell*. 2016;164(1):18-28.
- Liang, P. et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein & Cell*. 2015;6:363-72.
- Otieno, MO. CRISPR-Cas9 Human Genome Editing: Challenges, Ethical Concerns and Implications. *J Clin Res Bioeth*. 2015;6(6):253-255. Doi: 10.4172/2155-9627.1000253.
- The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. On Human Gene Editing: International Summit Statement [visitado 2016 Mar 19]. Disponible en: <http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a>
- Grushkin, D. DuPont in CRISPR-Cas patent land grab. *Nature biotechnology*. 2016;34(1):13-13. Doi: 10.1038/nbt0116-13.
- Hilbeck, A.; Binimelis, R.; Defarge, N.; et al. No scientific consensus on GMO safety. *Environmental Sciences Europe*. 2015;27(4):1-6. Doi: 10.1186/s12302-014-0034-1.
- Alta, C.; Greely, H. CRISPR critters and CRISPR cracks. *The American Journal of Bioethics*. 2015;15(12):11-7. Doi: 10.1080/15265161.2015.1104138.
- Huang, YH. Gene patents: A broken incentives system. *Journal of Religion and Health*. 2013;52(4):1079-1084.
- Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos [visitado 2016 Abr 1] Disponible en: [Disponible en: http://portal.unesco.org/es/ev.phpURL_ID=13177&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html](http://portal.unesco.org/es/ev.phpURL_ID=13177&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html)
- Huys, I.; Matthijs, G.; van Overwalle, G. The fate and future of patents on human genes and genetic diagnostic methods. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(6):441-48.
- Lester, BM.; Conrad, E.; Marsit, C. Introduction to the special section on epigenetics. *Child Development*. 2016;87(1):29-37.
- Savulescu, J.; Pugh, J.; Douglas, T.; Gyngell, Ch. The moral imperative to continue gene editing research on human embryos. *Protein & Cell*. 2015;6(7):476-79.
- Lanphier, E.; Urnov, F.; Haecker, SE.; et al. Don't edit the human germ line. *Nature*. 2015;519:410-11.
- Regalado, A. Engineering the perfect baby. *MITS Technol Rev*. 2015;118(3):27-33.
- Habermas, J. *Ciencia y Técnica como "Ideología"*. Madrid: Tecnos; 2007.
- Ursua, N. La "convergencia de tecnologías" (CT) y la "mejora técnica del ser humano": una visión tecnofuturista. *Thémata. Revista de Filosofía*. 2012;46:67-90.
- Habermas, J. *El futuro de la naturaleza humana: ¿hacia una eugenesia liberal?* Barcelona: Paidós; 2009.
- Huxley, J. *Nuevas botellas para vino nuevo*. Londres: Chatto & Windus; 1957.
- More, M.; Vita-More, N. *The Transhumanist Reader: Classical and Contemporary Essays on the Science, Technology, and Philosophy of the Human Future*. Malden: John Wiley & Sons; 2013.
- Koval, S. Convergencias tecnológicas en la era de la integración hombre-máquina. *Rev. Razón y Palabra*; 2011 [visitado 2016 Abr 3]; 16 (75). Disponible en: http://razonypalabra.org.mx/N/N75/varia_75/05_Koval_V75.pdf
- González-Melado, FJ. Transhumanismo (humanity +). *Rev. Pax et Emérita*. 2011;6:205-28.
- Postigo-Solana, E. Transhumanismo y post-humano: principios teóricos e implicaciones bioéticas. *Rev. Medicina e Morale*. 2009;(2):267-82.
- Fukuyama, F. *Trahumanism* [visitado 2016 Abr 3]. Disponible en: <http://www.foreignpolicy.com/articles/2004/09/01/transhumanism>
- Kass, L. El debate sobre el mejoramiento humano y la dignidad humana. Una crítica a Nick Bostrom. *Rev. Teoría y Derecho*. 2012;11:82-93.
- Kass, L. *Life, liberty, and the defense of dignity: the challenge for bioethics*. San Francisco: Encounter Books; 2002.
- Pastor, LM.; García-Cuadrado, JA. *Modernidad y postmodernidad en la génesis del transhumanismo-posthumanismo*. Cuadernos de Bioética. 2014;XXV(3):342-65.



agenda

Formación de Posgrado

FORMACION DE POSGRADO



Oferta Académica con
modalidad a distancia

Curso de Actualizaciones en antimicrobianos de uso Ambulatorio y Hospitalario

Organiza: COFyBCF
E-mail: elarning.cofybcf@gmail.com
Web:
www.cofybcf.org.ar/cursos_adistancia.asp

Curso de Hematología gratuito FUPAU- ORION

Módulo 1: Educar para un desarrollo humano sustentable.
Desafíos actuales en la enseñanza de las ciencias y la formación profesional.
Módulo 2: Elaboración de proyectos educativos con responsabilidad social.
Organiza: UNR (Universidad Nacional Rosario)
Tel-Fax: 54-11-4394-4337
E-mail: presidencia@fupau.org.ar; cursos@fbyoyf.unr.edu.ar

Curso de Actualización en Psicofarmacología

Fecha de inicio: consultar (cada módulo prevé una dedicación de 120 horas distribuidas en 3 meses)
Organiza: COFyBCF (Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de Capital Federal)
E-mail: bioquimicos@cofybcf.org.ar
educacioncontinua@cofybcf.org.ar
Web: www.cofybcf.org.ar

Actualización en Hemostasia y Coagulación

Inscripción: permanente
Organiza: UNL (Universidad Nacional del Litoral)
E-mail:
formacioncontinua@fcb.unl.edu.ar
Web: www.fcb.unl.edu.ar

Líquidos de punción: Laboratorio Bioquímico-clínico

Inscripción: Permanente
Organiza: UNL (Universidad Nacional del Litoral)
Lugar: Santa Fe, Argentina
Tel: 54-342-4575216 int. 122
E-mail:
formacioncontinua@fcb.unl.edu.ar
Web: www.fcb.unl.edu.ar

Monitoreo Terapéutico de drogas

Inscripción: Permanente
Organiza: UNL (Universidad Nacional del Litoral)
Lugar: Santa Fe, Argentina
E-mail:
formacioncontinua@fcb.unl.edu.ar
Web: www.fcb.unl.edu.ar/app/cursos

Líquidos de Punción: Laboratorio Bioquímico Clínico

Inicio: Consultar
Organiza: ABA (Asociación Bioquímica Argentina)
Tel: 54-11-4381-2907
E-mail: cursos@aba-online.org.ar

Diagnóstico de las Hemoglobinopatías. Casos Clínicos

Fecha: Consultar
Organiza: ABA (Asociación Bioquímica

Argentina)
Tel: 54-11-4381-2907
E-mail: cursos@aba-online.org.a

Bioquímica Clínica de los Líquidos y Electrolitos

Inscripción Permanente
Organiza: UNL (Universidad Nacional del Litoral)
E-mail:
formacioncontinua@fcb.unl.edu.ar
Web: www.fcb.unl.edu.ar/app/cursos

Micología Médica

Inscripciones Abiertas
Organiza: Fundación Química Argentina
E-mail: Info@fundacionquimica.org.ar

Curso Estadística Básica

Disponibilidad Continua
Organiza: GMigliarino Consultores
E-mail: info@migliarino.com
Web: www.gmigliarino.com/Cursos/130

Errores Congénitos del metabolismo: Rol del Laboratorio de urgencias y especializado

Fecha: Consultar
Organiza: ABA (Asociación Bioquímica Argentina)
Tel: 54-11-4381-2907
E-mail: cursos@aba-online.org.ar

Anticoagulación: Estudio y Control de los Tradicionales

Fecha de inicio: Consultar
Organiza: ABA (Asociación Bioquímica Argentina)
Tel: 54-11-4381-2907
E-mail: cursos@aba-online.org.ar



X Congreso
Argentino de
la Calidad en
el Laboratorio
Clínico

Calilab

24 AL 27 DE OCTUBRE
BUE2018

VIII Jornadas Latinoamericanas
de la Calidad en el
Laboratorio Clínico



naranhaus diseño

Centro de Exposiciones
y Convenciones
de Buenos
Aires

EVENTO DECLARADO
Libre de humo de Tabaco



- GARANTÍA DE CALIDAD
 - ACREDITACIÓN
 - BIOSEGURIDAD
 - BIOQUÍMICA CLÍNICA
 - ENDOCRINOLOGÍA
 - FASES PRE-ANALÍTICA Y POST-ANALÍTICA
 - GENÉTICA Y GENÓMICA
 - PRUEBAS DE ATENCIÓN AL LADO DEL PACIENTE (POCT)
 - EDUCACIÓN
 - ESTANDARIZACIÓN Y ARMONIZACIÓN
 - HEMATOLOGÍA
 - HEMOSTASIA
 - HISTOCOMPATIBILIDAD
 - INMUNOLOGÍA
 - MEDIO INTERNO
 - MICROBIOLOGÍA
 - NEFROLOGÍA
 - PESQUISA NEONATAL
 - TOXICOLOGÍA
 - ALIMENTOS
 - BIOÉTICA
- TEMARIO
PRELIMINAR



Centro de Exposiciones



www.fba.org.ar/calilab



Citometría de Flujo

Fecha: consultar

Organiza: ABA (Asociación Bioquímica Argentina)

Tel: 54-11-4381-2907

E-mail: cursos@aba-online.org.ar

Errores Congénitos del metabolismo: Rol del Laboratorio de urgencias y especializado

Inicio: Consultar

Organiza: ABA (Asociación Bioquímica Argentina)

Tel: 54-11-4381-2907

E-mail: cursos@aba-online.org.ar

El Laboratorio Clínico en Pediatría

Fecha: 7 de Mayo de 2018

Organiza ABA (Asociación Bioquímica Argentina)

E-mail: cursos@aba-online.org.ar

Curso Integral sobre Líquidos de Punción

Fecha: 7 de Mayo de 2018

Organiza ABA (Asociación Bioquímica Argentina)

E-mail: cursos@aba-online.org.ar

Gestión y Administración de Centrales de Esterilización Hospitalarias

Inicio: 8 de Mayo 2018

A cargo de: Dra. Rosana Bromberg.

Organiza: Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal
<http://www.cofybcf.org.ar/vermas-cursos.asp?376>**Automatización e Interferencias en los resultados Hematológicos. Su interpretación a través del Análisis de Casos**

Fecha: 14 de Mayo de 2018

Organiza ABA (Asociación Bioquímica Argentina)

E-mail: cursos@aba-online.org.ar

Esquemas de Evaluación Externa de la Calidad

Fecha: 14 de Mayo de 2018

Organiza: GMigliarino Consultores

E-mail: info@gmigliarino.com

Web: www.gmigliarino.com/Cursos/136**Introducción a la Biología Molecular y sus Aplicaciones Clínicas II**

Fecha: 21 de Mayo de 2018

Organiza ABA (Asociación Bioquímica Argentina)

E-mail: cursos@aba-online.org.ar

Tópicos de Hematología en el Neonato.**Casos Clínicos**

Fecha: 4 de Junio de 2018

Organiza ABA (Asociación Bioquímica Argentina)

E-mail: cursos@aba-online.org.ar

Técnicas Avanzadas de Biología Molecular

Fecha: 4 de Junio de 2018

E-mail: info@aulagenyca.com

Web:

www.aulagenyca.com/curso/técnicas-avanzadas-de-biología-molecular**Incertidumbre de Medida (Modelos de Estimación para el Laboratorio Clínico)**

Fecha: 18 de Junio de 2018

Organiza: GMigliarino Consultores

E-mail: info@gmigliarino.com

Web: www.gmigliarino.com/Cursos/137**Verificación de Métodos para Serología Infecciosa: Métodos Cuantitativos que se Reportan como valores Cualitativos**

Fecha: 09 de Julio de 2018

Organiza: GMigliarino Consultores

E-mail: info@gmigliarino.com

Web: www.gmigliarino.com/Cursos/138Oferta Académica
Presencial, Internacional**COREBIO2018-IX Congreso Nacional de Residentes Bioquímicos**

Fecha: 16 al 18 de Mayo de 2018

Auditorio Fundación

Beethoven.CABA.Argentina

Web: www.congresocorebio2018.com.ar**Capacitación Práctica en Técnicas de Microcopias de Fluorescencia**

Fecha: 4 al 8 de Junio de 2018

Lugar: CABA, Argentina

Organiza: Universidad de Buenos Aires

E-mail: posgrado@ffyb.uba.ar

Sistemas de Gestión de Calidad. Su implementación en el Laboratorio

Fecha: 4 al 13 de Junio de 2018

Lugar: CABA, Argentina

Organiza: Universidad de Buenos Aires

E-mail: posgrado@ffyb.uba.ar

II Congreso Internacional de Zoonosis. IX Congreso Argentino de Zoonosis.**Alimentos y Zoonosis: Desafíos del siglo XXI**

Fecha: 5 al 7 de Junio de 2018

Lugar: CABA, Argentina

rganiza: Universidad de Buenos Aires

E-mail: posgrado@ffyb.uba.ar

9º Congreso Bioquímico ROSARIO 2018- XVIII Jornadas Argentina de Microbiología (JAM)

Fecha: 7 y 8 de Junio de 2018

Lugar: Ctro. De Convenciones Ros Tower. Rosario, Argentina.

Web: www.colebioqsf2.org**Principios de Nanobiotecnología**

Fecha: 11 al 15 de Junio de 2018

Lugar: Rosario, Argentina

Organiza: Universidad de Buenos Aires

E-mail: posgrado@ffyb.uba.ar

Conocimientos Actuales y Perspectivas en el Estudio de la Interface Materno-Fetal: Hacia una Mejor Comprensión de la Placenta Humana

Fecha: 25 al 29 de Junio de 2018

Lugar: CABA, Argentina

Organiza : Universidad de Buenos Aires

E-mail: posgrado@ffyb.uba.ar

Detección de Proteínas Alergénicas en Alimentos

Fecha: 25 al 29 de Junio de 2018

Lugar: CABA, Argentina

Organiza: Universidad de Buenos Aires

E-mail: posgrado@ffyb.uba.ar

Señales de Transducción que participan en la Regulación del Crecimiento Celular- Teórico/Práctico

Fecha: 25 de Junio al 2 de Julio de 2018

Lugar: CABA, Argentina

Organiza: Universidad de Buenos Aires

E-mail: posgrado@ffyb.uba.ar

XXIII Jornadas Bioquímicas del Noa

Fecha: 4,5 y 6 de Octubre de 2018

Lugar: Centro Cultural. Termas de Río

Hondo,Santiago del Estero
Organiza. Colegio de Bioquímicos de
Santiago del Estero
Web: www.jornadasbioquimicasnoa.org

CALILAB 2018

Fecha: 24 al 27 de Octubre de 2018
Lugares: CABA,Argentina
Organiza: FBA (Fundación Bioquímica
Argentina)
E-mail: info@fba.org.ar

II Congreso Científico Profesional de Bioquímica

Fecha: 12 al 15 de Junio de 2019
Lugar: Córdoba,Argentina
E-mail: graduados@fcq.unc.edu.ar

CUBRA XV

Fecha: Octubre 2019
Resistencia, Chaco, Argentina
Organiza Colegio Bioquímico de Chaco
E-mail:
congresocubra_chaco2019@gmail.com



Oferta Académica
Presencial, Nacional

XII Congress of the Latin American Association of Immunology –ALAI

Fecha: 14 al 18 de Mayo de 2018
Lugar: Cancún, México
Web: <http://immunomexico2018.mx/index.ht>

Congreso Mundial FMH (Federación Mundial de Hemofilia) 2018

Fecha: 20 al 24 de Mayo de 2018
Lugar: Glasgow,Escocia.
E-mail: registration2018@wfh.org

XXII Congreso SEIMC

Fecha: 24 al 26 de Mayo de 2018
Lugar: Bilbao, España
Organiza: Soc. de . Española de
Enfermedades Infecciosas
Y Microbiología Clínica.
E-mail: seimc20182pacífico-meetings.com
Web: www.seimc2018.org

5th EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase

Fecha: 22 al 23 de Mayo 2018
Lugar: Munich,Alemania
Web: www.ifcc.org/ifcc-congresses-and-conferences

3º Congreso Internacional de Seguridad del Paciente

Fecha: 7 al 8 de Junio de 2018
Lugar: Santiago ,Chile
E-mail: educación@fspchile.org
contacto@fspchile.org
Web: www.fspchile.org

41st European Congress of Citology

Fecha: 10 al 13 de Junio 2018
Lugar: Madrid,España
E-mail: ecc2018@kenes.com
Web: www.cytology2018.com

International Symposium on Dendritic Cells

Fecha: 10 al 14 de Junio de 2018
Lugar: Arquisgrán,Alemania
E-mail: dc2018@conventus.com
<http://www.dc-2018.com>

XXXVI Nordic Congress of Clinical Chemistry

Fecha: 12 al 15 de Junio de 2018
Lugar: Helsinki,Finlandia
Web: www.nfkk2018.fi

20º Symposium on Infections in the Immunocompromised Host

Fecha : 17 al 19 de Junio de 2018
Lugar: Atenas,Grecia
E-mail: alkidis@ascentltd.gr
<https://ichs2018.com>

7th International Symposium on Critical Care Testing and Blood Gases

Fecha: 21 al 22 de Junio de 2018
Lugar: Antibes, Francia
Web: www.criticalcaretesting-antibes2018.eu

1º Conferencia IFCC,EFLM,AFCB “Medicina de Laboratorio”: Conocer las necesidades de las naciones mediterráneas.

Fecha: 2 a 4 de Julio de 2018
Lugar: University of tor Vergata-Roma,Italia.
http://ifccorg.hosting.insoft.dk/media/476771/flyer_nov-2017.pdf

2nd World Congress on Cancer

Fecha: 23 al 25 de Julio de 2018
Lugar: Bologna,Italia
E-mail: cancer@colossalfacet.com
<http://colossalfacet.com/cancer-conference/>

5th European Congress of Immunology

Fecha: 2 al 5 de Setiembre de 2018
Lugar: Ámsterdam, Países bajos.
E-mail: Eci2018@medacad.org
Web: www.eci2018.org/home

Congreso Internacional de Genética

Fecha: 10 al 14 de Setiembre de 2018
Lugar: Foz de Iguazú,Brasil
E-mail: contato@sbg.org.br

Lymphocyte antigen receptor signalling

Fecha: 25 al 29 de Agosto de 2018
Lugar: Siena,Italia
E-mail: cosima.badari@unisi.it
<http://meetings.embo.org/event/18-lymphocyte>

Santorini Conference “Systems medicine and personalized health & therapy” The odyssey from hope to practice”

Fecha: 30 de Setiembre de 2018
Lugar: Santorini, Grecia
<http://santoriniconference.org>

6TH Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society

Fecha: 27 al 30 de Octubre de 2018
Lugar: Boston, Estados Unidos
E-mail: cytokines@mci-group.com

XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2018.

Fecha: 13 al 16 de Noviembre de 2018
Lugar: Parque Araucano. Santiago, Chile.
<http://alam.science/alam-2018/>

23 ° Congreso Europeo de Medicina de Laboratorio IFCC-EFLM. (EUROMEDLAB 2019)

Fecha: 19 a 23 de Mayo 2019
Lugar: Barcelona, España
Organiza: Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC ML)
E-mail:
info@euromedlab2019barcelona.org



Empresas Auspiciantes

AADEE S.A.

Av. Triunvirato 4135 5° Piso (1431)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Te: 54-11-4523-4848
Fax: 54-11-4523-2291
www.aadee.com.ar

Abbott Laboratories Argentina S.A.

Ing. Butty 240, piso 12 (1001)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Tel: (54 11) 5776 7311 / 7315
add_argentina_mkt@abbott.com
www.abbottdiagnostics.com

Abbott Rapid Diagnostics

14 de Julio 616/628
Ciudad de Buenos Aires
Tel: 0800.555.9200
alere.ar@alere.com
www.alere.com

Becton Dickinson Argentina S.R.L.

Av. Libertador 110 P.2 (1638)
Vicente Lopez, Buenos Aires
Tel: (54 11) 4718 7900 - 0800 444 55
BD (23)
crc_argentina@bd.com
www.bd.com

Bernardo Lew e hijos SRL

info@bernardolew.com.ar
www.bernardolew.com.ar
Bahía Blanca: Perú 150 - CP: 8000
Tel. (54 291) 455-1794
Fax. 54-291-451-4416
Buenos Aires: Cbtes. Malvinas 3087
CP: 1427
Tel. (54 11) 4523-9901
Fax. (54 11) 4522-4322
Mendoza: Juan B. Justo 561 - CP: 5500
Tel. (54 261) 425-2002
Fax. (54 261) 425-9966
Neuquén: Castelli 455 - CP: 8300
Tel. (54 299) 442-9888
Fax. (54 299) 447-3556
Santa Rosa: Allem 705 - CP: 6300
Tel/Fax. (54 2954) 41-0011
Trelew: Inmigrantes 557 - CP: 9100
Tel. (54 2965) 42-9790
Fax. (54 2965) 43-4277

BIOARS S.A.

Estomba 961 (1427)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Tel./Fax (54 11) 4771-7676/ 3783
pl@bioars.com.ar
www.bioars.com.ar

Biocientífica S.A.

Iturri 232 (1427)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Tel: (54-11) 4857-5005
Fax: (54-11) 4857-1004
www.biocientifica.com.ar

Biodiagnostico S.A.

Av. Ing. Huergo 1437, PB (1107)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Tel/fax: (54 11) 4300 9090
info@biodiagnostico.com.ar
www.biodiagnostico.com.ar

Diagnos Med S.R.L.

Conesa 859 (1426)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Tel: (54 11) 4552 2929
info@diagnosmed.com
www.diagnosmed.com

ETC Internacional S.A.

Allende 3274 (1417)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Tel: (54 11) 4639 3488 (líneas
rotativas)
Fax: (54 11) 4639 6771
etcventa@etcint.com.ar
www.etcint.com.ar

Gematec S.R.L.

Avalos 3651 (1605)
 Munro - Buenos Aires
 Tel: (54 11) 4794 7575 / 7676
 Fax: (54 11) 4794 3184
 info@gematec.com.ar
 ventas@gematec.com.ar

Genetrics S.A. - NextLAB

Av. del Libertador 8630 6to piso Of. 1 y
 2 (1429) Ciudad de Buenos Aires
 Tel. (54 11) 5263 0275 rotativo
 E-mail: info@nextlab.com.ar
 web: www.nextlab.com.ar

JS Medicina Electrónica SRL

Bolivia 460 (1603)
 Villa Martelli, Buenos Aires
 Tel : 4709-7707 4709-7677 4709-
 1131
 Fax: 4709-7707
 info@jsweb.com.ar
 www.jsweb.com.ar

IACA LABORATORIOS

- San Martín 68, Galería Plaza (8000)
 Bahía Blanca - Buenos Aires
 Tel: (54 291) 459 9999
 Fax: (54 291) 459 9996 / 8
 - Moreno 1730, piso 1, depto. H (1093)
 Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Tel/Fax: (54 11) 4371 0046
 Cel: (011) 155 1322214
 laboratorios@iaca.com.ar
 www.iaca.com.ar

Instrumental Bioquímico S.A.

Venezuela 3755 (1603)
 Villa Martelli, Buenos Aires
 Tel / Fax: (54 11) 4709 7700
 ibsa@instrumental-b.com.ar
 www.instrumental-b.com.ar

Laboratorio de Medicina

Olaya 1644 (1414)
 Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Tel: (54 11) 4514 9370 al 76
 info@labmedicina.com

www.labmedicina.com

Laboratorios Bacon

Uruguay 136 (1603)
 Villa Martelli, Buenos Aires
 Tel: (54 11) 4709 0171
 Fax: (54 11) 4709 2636
 bacon@bacon.com.ar
 www.bacon.com.ar

MANLAB

Marcelo T. de Alvear 2263 (1122)
 Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Tel: (54 11) 4825 0066 / 3008 - 4826
 4004 / 1087
 derivaciones@manlab.com.ar
 www.manlab.com.ar

Meganalizar

Cede Laboratorio:
 Montecaseros 2478 (5500) Mendoza
 Tel. (54 261) 4373241/42
 mega@analizar-lab.com.ar
 Administración:
 Belgrano 925 (5500) Mendoza
 Tel. (54 261) 4236647/9125/9333
 gerencia@abm.org.ar

Montebio S.R.L.

Vera 575, Ciudad Autonoma de Buenos
 Aires
 Tel/fax: (54 11) 4858 0636
 info@montebio.com.ar
 www.montebio.com.ar

ONYVA SRL

Dr. Adolfo Dickman 990/994
 Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Tel. (54 11) 5235-3970
 ventas@onyva.com.ar
 www.onyva.com.ar

Siemens Healthineers

Julián Segundo Agüero N° 2830 (1605)
 Munro, Buenos Aires
 Tel: +54 11 5432 6816
 www.healthcare.siemens.com.ar
 siemenshealthineers.ar@siemens.com

Stambouliau Laboratorio

Av. Scalabrini Ortiz 676 (1414)
 Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Tel: (54 11) 4858-7000
 laboratorio@stambouliau.com.ar
 www.stambouliau.com.ar

Tecnolab s.a.

Estomba 964 (1427)
 Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Tel. (54 11) 4555 0010 / 4859 5300
 Fax: (54 11) 4553 3331
 info@tecnolab.com.ar
 www.tecnolab.com.ar



Rubros

Proveedores generales por especialidades bioquímicas

Autoinmunidad

Abbott Rapid Diagnostics
Bernardo Lew e hijos S.R.L.
Biocientífica S.A.
Biodiagnostico S.A.
Diagnos Med S.R.L.
ETC Internacional S.A.

Bacteriología

Abbott Rapid Diagnostics
Becton Dickinson Argentina S.R.L.
Biodiagnostico S.A.
Britania S.A.
ETC Internacional S.A.
Montebio S.R.L.
ONYVA SRL
Tecnolab s.a.

Biología Celular

Becton Dickinson Argentina S.R.L.
BIOARS S.A.
Biocientífica S.A.
ETC Internacional S.A.
Montebio S.R.L.
Tecnolab s.a.

Biología Molecular

Abbott Rapid Diagnostics
Becton Dickinson Argentina S.R.L.
Bernardo Lew e hijos S.R.L.
BIOARS S.A.
Biocientífica S.A.
Biodiagnostico S.A.
Diagnos Med S.R.L.
ETC Internacional S.A.
Laboratorios Bacon S.A.I.C.
Montebio S.R.L.
Siemens Healthcare
Tecnolab s.a.

Bromatología

Becton Dickinson Argentina S.R.L.
Bernardo Lew e hijos S.R.L.

Clínica General

AADEE S.A.
Abbott Laboratories Argentina S.A.
Bernardo Lew e hijos S.R.L.
Biodiagnostico S.A.

JS Medicina Electrónica SRL

Montebio S.R.L.
Siemens Healthcare

Cultivo Celular

ETC Internacional S.A.

Endocrinología

AADEE S.A.
Abbott Laboratories Argentina S.A.
Abbott Rapid Diagnostics
Bernardo Lew e hijos S.R.L.
BIOARS S.A.
Biodiagnóstico S.A.
Diagnos Med S.R.L.
Laboratorios Bacon S.A.I.C.
Montebio S.R.L.
ONYVA SRL
Siemens Healthcare

Genética

Becton Dickinson Argentina S.R.L.
Biocientífica S.A.
Biodiagnostico S.A.
Montebio S.R.L.
Tecnolab s.a.

Hematología

AADEE S.A.
Abbott Laboratories Argentina S.A.
Abbott Rapid Diagnostics
Bernardo Lew e hijos S.R.L.
BIOARS S.A.

Biocientífica S.A.
Biodiagnostico S.A.
ETC Internacional S.A.

Gematec S.R.L.
Instrumental Bioquímico S.A.
Montebio S.R.L.
ONYVA SRL
Siemens Healthcare
Tecnolab s.a.

Histocompatibilidad

Biocientífica S.A.
Biodiagnostico S.A.

Inmunología

Abbott Laboratories Argentina S.A.
Abbott Rapid Diagnostics
Becton Dickinson Argentina S.R.L.
Bernardo Lew e hijos S.R.L.
BIOARS S.A.
Biocientífica S.A.
Biodiagnostico S.A.
Diagnos Med S.R.L.
Montebio S.R.L.
ONYVA SRL
Siemens Healthcare
Tecnolab s.a.

Marcadores Neoplásicos

Abbott Laboratories Argentina S.A.
Bernardo Lew e hijos S.R.L.
BIOARS S.A.
Biocientífica S.A.
Biodiagnostico S.A.
Diagnos Med S.R.L.
Siemens Healthcare
Tecnolab s.a.

Micología

Becton Dickinson Argentina S.R.L.
Bernardo Lew e hijos S.R.L.
Biodiagnostico S.A.



Rubros

Parasitología

Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 BIOARS S.A.
 Biocientífica S.A.
 Biodiagnostico S.A.
 ETC Internacional S.A.
 Montebio S.R.L.
 Tecnolab s.a.

Pediatría y Neonatología

AADEE S.A.
 Abbott Rapid Diagnostics
 Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 BIOARS S.A.
 Biocientífica S.A.
 Biodiagnostico S.A.
 Diagnos Med S.R.L.
 ETC Internacional S.A.
 Laboratorios Bacon S.A.I.C.
 Montebio S.R.L.
 ONYVA SRL

Toxicología y Forense

Abbott Laboratories Argentina S.A.
 Abbott Rapid Diagnostics
 Biocientífica S.A.
 Montebio S.R.L.
 Tecnolab s.a.

Virología

Abbott Laboratories Argentina S.A.
 Abbott Rapid Diagnostics
 Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 BIOARS S.A.
 Biocientífica S.A.
 Biodiagnostico S.A.
 ETC Internacional S.A.
 Montebio S.R.L.
 ONYVA SRL
 Siemens Healthcare
 Tecnolab s.a.

Equipamiento e Insumos para Laboratorios

Acreditación de Laboratorios

Biodiagnostico S.A.

Agitadores

BIOARS S.A.
 ETC Internacional S.A.
 Instrumental Bioquímico S.A.

Aparatos de Medición

Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 BIOARS S.A.
 Laboratorios Bacon

Autoanalizadores

Abbott Laboratories Argentina S.A.
 Abbott Rapid Diagnostics
 Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 BIOARS S.A.
 Biocientífica S.A.
 Biodiagnostico S.A.
 JS Medicina Electrónica SRL
 Montebio S.R.L.
 Siemens Healthcare

Balanzas

Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 ETC Internacional S.A.

Centrifugas

Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 ETC Internacional S.A.

Citómetros

Abbott Rapid Diagnostics
 Becton Dickinson Argentina S.R.L.

Cromatógrafos

Tecnolab s.a.

Coagulómetro

AADEE S.A.
 BIOARS S.A.
 Montebio S.R.L.
 ONYVA SRL

Cultivos Celulares

Becton Dickinson Argentina S.R.L.

Espectrofotómetros

BIOARS S.A.
 Biodiagnostico S.A.
 Montebio S.R.L.
 Tecnolab s.a.

Gases en sangre y electrolitos

AADEE S.A.
 Becton Dickinson Argentina S.R.L.
 Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 Gematec S.R.L.
 JS Medicina Electrónica SRL
 Montebio S.R.L.
 Siemens Healthcare

Insumos para Laboratorios

AADEE S.A.
 Becton Dickinson Argentina S.R.L.
 Bernardo Lew e hijos S.R.L.
 BIOARS S.A.
 Biodiagnostico S.A.
 Diagnos Med S.R.L.
 ETC Internacional S.A.
 Gematec S.R.L.
 Montebio S.R.L.

Laboratorio receptor de derivaciones

IACA LABORATORIOS
 Laboratorio de Medicina
 (acreditado bajo Norma ISO 15.189)
 MANLAB
 Stamboulia Laboratorio
 (Laboratorio acreditado bajo la norma IRAM-
 NM-ISO 15189:2010 y el estándar MA2 de la
 Fundación Bioquímica)

Meganalizar

Laboratorio receptor de derivaciones en Biología Molecular

IACA LABORATORIOS
 Laboratorio de Medicina
 (acreditado bajo Norma ISO 15.189)
 MANLAB
 (Acreditado en Biología Molecular en



Rubros

Fundación Bioquímica Argentina)

Stamboulia Laboratorio
(Laboratorio acreditado bajo la norma IRAM-
NM-ISO 15189:2010 y el estándar MA2 de la
Fundación Bioquímica)

Laboratorio receptor de derivaciones en Inmunología

MANLAB

Meganalizar

Stamboulia Laboratorio
(Laboratorio acreditado bajo la norma IRAM-
NM-ISO 15189:2010 y el estándar MA2 de la
Fundación Bioquímica)

Laboratorio receptor de derivaciones en Inmunoserología

IACA LABORATORIOS

Laboratorio de Medicina
(acreditado bajo Norma ISO 15.189)

MANLAB

Meganalizar

Stamboulia Laboratorio
(Laboratorio acreditado bajo la norma IRAM-
NM-ISO 15189:2010 y el estándar MA2 de la
Fundación Bioquímica)

Laboratorio receptor de derivaciones en Histocompatibilidad e Inmunogenética

MANLAB
(Laboratorio habilitado según Resolución N°
252-253/12 del INCUCAI, para la Tipificación
de Receptores y Donantes para Trasplantes de
Órganos)

Stamboulia Laboratorio
(Laboratorio acreditado bajo la norma IRAM-
NM-ISO 15189:2010 y el estándar MA2 de la
Fundación Bioquímica)

Laboratorio receptor de derivaciones en Medicina Genómica

MANLAB
(Acreditado en Biología Molecular en
Fundación Bioquímica Argentina)

Stamboulia Laboratorio
(Laboratorio acreditado bajo la norma IRAM-
NM-ISO 15189:2010 y el estándar MA2 de la
Fundación Bioquímica)

Luminiscencia

Bernardo Lew e hijos S.R.L.

Biodiagnostico S.A.

Diagnos Med S.R.L.

Siemens Healthcare

Material Descartable

Becton Dickinson Argentina S.R.L

Bernardo Lew e hijos S.R.L.

ETC Internacional S.A.

Montebio S.R.L.

Material de Vidrio

Montebio S.R.L.

Material para Electroforesis

Bernardo Lew e hijos S.R.L.

BIOARS S.A.

Biodiagnostico S.A.

ETC Internacional S.A.

Tecnolab s.a.

MEIA

Abbott Laboratories Argentina S.A.

Micropipetas

Bernardo Lew e hijos S.R.L.

ETC Internacional S.A.

Montebio S.R.L.

Tecnolab s.a.

Genómica - Microarrays

Biocientífica S.A.

ETC Internacional S.A.

Quimioluminiscencia

Bernardo Lew e hijos S.R.L.

Biodiagnostico S.A.

Montebio S.R.L.

Siemens Healthcare

Tecnolab s.a.

Reactivos

AADEE S.A.

Abbott Laboratories Argentina S.A.

Abbott Rapid Diagnostics

Bernardo Lew e hijos S.R.L.

BIOARS S.A.

Biocientífica S.A.

Biodiagnostico S.A.

Diagnos Med S.R.L.

ETC Internacional S.A.

Montebio S.R.L.

Siemens Healthcare

Tecnolab s.a.

RIA - IRMA

Diagnos Med S.R.L.

Montebio S.R.L.

Servicio Técnico

Abbott Rapid Diagnostics

BIOARS S.A.

Biodiagnostico S.A.

Instrumental Bioquímico S.A.

Montebio S.R.L.

Tecnolab s.a.

Software

Abbott Laboratories Argentina S.A.

Abbott Rapid Diagnostics

Bernardo Lew e hijos S.R.L.

BIOARS S.A.

Diagnos Med S.R.L.

Genetrics S.A. - NextLAB

Termocicladores

Biodiagnostico S.A.

Test Rápidos

Abbott Laboratories Argentina S.A.

Abbott Rapid Diagnostics

Bernardo Lew e hijos S.R.L.

BIOARS S.A.

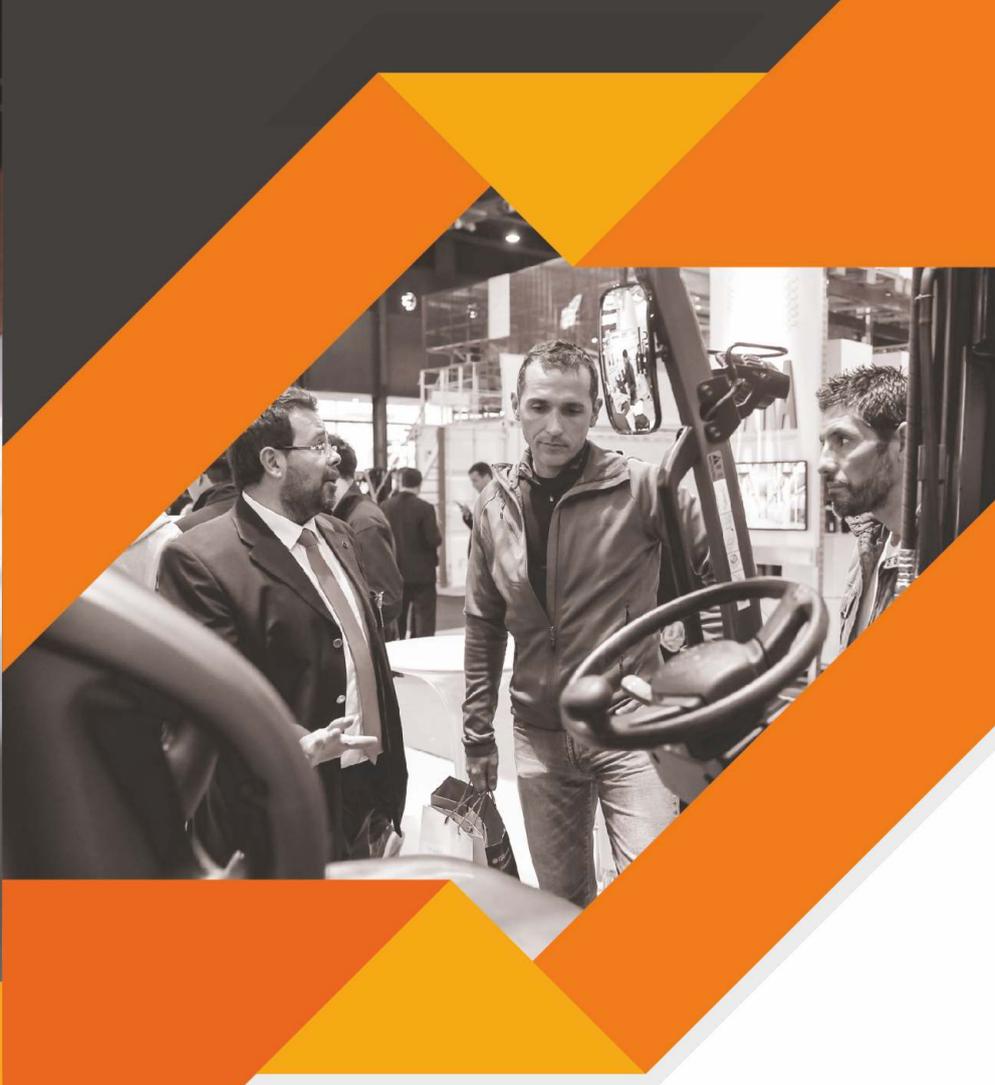
Biodiagnostico S.A.

Britania S.A.

ETC Internacional S.A.

Montebio S.R.L.

Siemens Healthcare



**18-21
Septiembre
2018**

14 a 20hs

*La Rural Predio Ferial
Buenos Aires - Argentina*



**EXPO
LOGISTI-K**

13ª Exposición Internacional de Equipamiento, Tecnología y Soluciones
para la Logística, el Flujo de Información y la Cadena de Abastecimiento

SUPPORTS
LOGISTI-K



INTERNATIONAL SUPPORT



SPONSORS



ORGANIZES



UN TRATAMIENTO ADECUADO NECESITA UN DIAGNOSTICO PRECISO

- MEDICINA GENOMICA
- QUIMICA CLINICA
- HEMATOLOGIA / HEMOSTASIA
- MICROBIOLOGIA
- VIROLOGIA / INMUNOSEROLOGIA
- ENDOCRINOLOGIA / METABOLISMO
- CITOLOGIA

- AUTOINMUNIDAD / ALERGIAS
- TOXICOLOGIA / MONITOREO DE DROGAS
- PROTEINAS
- SCREENING NEONATAL
- HISTOCOMPATIBILIDAD
- ANDROLOGIA
- CITOGENETICA

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico