

# 15<sup>o</sup> CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA

## MEMORIAS

### SESIONES DEL SÁBADO

#### Plenaria

[Buenas prácticas de bioseguridad en la gestión del laboratorio.](#)

*Ernesto Casis Sáenz*

#### Calidad en el actuar del laboratorio

[El impacto de los ejes trazadores en la estrategia de calidad del laboratorio.](#)

*Alba Cecilia Garzón González*

[Estrategias de verificación y validación de métodos en el laboratorio clínico.](#)

*Luz Adriana Stevens Gualdrón*

[Normalización para el laboratorio clínico; el laboratorio ideal.](#)

*Andrés Hernández Velandia*

#### Metabolismo y sistema cardiovascular

[Lipemia postprandial y riesgo cardiovascular.](#)

*Alicia Norma Alayón*

[Enzimas cardíacas en el contexto de la clínica.](#)

*Virgil Carballo Zárate*

#### Inmunología un área en constante movimiento

[Inmunofluorescencia: anticuerpos antinucleares, un reto para el laboratorio \(basados en las recomendaciones internacionales\).](#)

*Claudia Marcela Tafur Amaya*

[HIV, Tamizaje, diagnóstico y confirmación.](#)

*Verónica Rojas Quimbay*

[Dieta, nutrición y alergias.](#)

*Javier Marrugo Cano*

## **Marcadores Moleculares y Genéticos**

[Vitamina D: aspectos clínicos.](#)

*Valeria Pastorino Casas*

[Diagnóstico molecular de enfermedades genéticas a través de NGS: Utilidades y desarrollo en Colombia.](#)

*Jubby Marcela Gálvez Bermúdez*

## **Biología Molecular a la vanguardia**

[Treinta y tres años de un sistema ultramicroanalítico en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Nuevos ensayos moleculares y pruebas rápidas.](#)

*Anny Armas Cayarga*

[Banco de sangre público de cordón umbilical y terapia celular, actualidad y desarrollo en Colombia.](#)

*Bernardo Camacho Rodríguez*

[Marcadores moleculares en pruebas de paternidad y genética forense: un recorrido desde sus orígenes.](#)

*Beatriz Martínez Alfaro*

## CONFERENCIAS

## PLENARIA

### **BUENAS PRÁCTICAS DE BIOSEGURIDAD EN LA GESTIÓN DEL LABORATORIO**

**Ernesto Casis Sáenz**

Licenciado en Medicina y Cirugía. Master en Dirección y Gestión de Laboratorios Clínicos. PhD en Medicina. España.

Los laboratorios clínicos son un área fundamental en el proceso de atención médica además son estructuras en constante evolución, debido a los continuos avances de la tecnología, la aparición de nuevas pruebas, la mejora de técnicas y las necesidades de cualificación del personal.

El laboratorio clínico está sometido a un importante y continuo proceso de transformación estrechamente ligado a un modelo sanitario cambiante, a la evolución tecnológica y a una limitación progresiva de los recursos disponibles.

La simplificación de los procedimientos analíticos, la automatización y la informatización permiten a los especialistas de laboratorio una mayor dedicación a protocolizar procedimientos diagnósticos, atender consultas de los médicos y generar información según las necesidades de estos y preocuparse de la bioseguridad y centrarse en la atención al paciente.

Los laboratorios clínicos deben adaptarse para poder responder positivamente a las nuevas demandas. Esta transformación se ha de efectuar respetando las distintas especialidades que lo integran, pero marcando objetivos comunes y compartiendo recursos, para ofrecer a pacientes, médicos y gestores unos servicios de calidad a unos costes óptimos. Por tanto están en cambio continuo, y como dato podemos decir que La mitad de las transacciones de datos dentro de un Hospital son datos de Laboratorio y que el 70% de las decisiones clínicas tienen el soporte de datos de laboratorio.

Este cambio ha de realizarse con el pleno protagonismo de los profesionales del laboratorio, pero apoyado por la administración, mediante el aporte de herramientas organizativas y de gestión, así como de equipos y tecnología de vanguardia, para maximizar la eficiencia de las actividades que se desarrollan.

Los avances tecnológicos, y la aparición de nuevas especialidades, han determinado, en las últimas décadas, la implantación y consolidación de diferentes modelos de laboratorio con sistemas organizativos diversos.

Podemos decir que la primera Generación de modelos de laboratorio abarca de los años 50 hasta final de la década de los 60, en ella los principales hitos fueron: La introducción por Wallace y Joseph Coulter en 1957 del primer contador de células y en 1952 Leonard Tucker Skeggs marca el comienzo de la era de la Automatización con la invención del Autoanalizador. También aparecen Reactivos listos para su uso y finalmente se crean, dentro de las instituciones sanitarias, estructuras independientes, jerarquizadas, dotadas de espacio, personal y material propios.

La 2ª Generación dura hasta la mitad de la década de los 80 con la generalización de Instrumentos Mecanizados. En los 80 también empieza a tener importancia el concepto de TAT y la minimización de volúmenes de muestra. Lundberg describe el proceso total del laboratorio el "total testing process (TTP) que va desde que el médico piensa en la solicitud hasta que la información suministrada se incorpora a su decisión, y definió el "brain-to-brain turnaround time" como una serie de 9 pasos que siempre se dan en el proceso de laboratorio y que consisten en: petición, obtención de la muestra, identificación, transporte, preparación, análisis, informe, interpretación y acción. En todas ellas pueden aparecer problemas de seguridad y/o bioseguridad.

La 3ª Generación abarca hasta el fin de la década de los 90 con la implantación métodos de control de calidad, la aparición autoanalizadores de inmunoanálisis, así como de los sistemas de TLA y MLA, automatización procesos Pre y Post analíticos.

Además en esta década se focaliza la atención hacia el paciente y hacia la Calidad Total y mejora continua, siendo la etapa de la reorganización y de la gestión del Laboratorio.

Finalmente en los últimos años la 4ª Generación incide en nuevos modelos de gestión, moderación de los costes, creciente demanda asistencial, adaptación de la forma de actuación a las necesidades reales de la clínica: proceso de reingeniería con unidades más operativas y creación de unidades basadas en el conocimiento en estrecha colaboración con la clínica.

Actualmente el proceso analítico se entiende desde la solicitud a la toma de decisiones. Como hemos mencionado se ha introducido el concepto de Calidad Total en el laboratorio clínico que es la garantía de que cada actividad del proceso total de análisis es efectuado correctamente, proporcionando la toma de decisiones médicas válidas y los efectivos cuidados del paciente, así como el de Seguridad del paciente que exige la garantía de la calidad de las fases pre y pos analíticas. También se han introducido Indicadores de la calidad no analítica y la norma de Acreditación ISO 15189.

Los nuevos modelos de calidad del Laboratorio se dirigen fundamentalmente a la seguridad del paciente, prioridad actual del Laboratorio Clínico, así como a la Gestión de la calidad del proceso completo orientada a paciente: solicitud pruebas interpretación y toma de decisiones.

En cuanto a la norma de Acreditación: ISO 15189 recoge que el proceso pre analítico deberá formar parte del sistema de gestión de la calidad del laboratorio indicado en el manual de calidad del laboratorio, por lo que será evaluado y sometido a auditorias, de forma que se asegure su conformidad y demuestre que se lleva a cabo de acuerdo a necesidades y requisitos de los usuarios, además de mejorar de forma continua su eficacia. Además exige procedimientos documentados e información de actividades preanalíticas, así como indicadores de la calidad de las fases preanalítica, analítica y postanalítica, para realizar el seguimiento y evaluar los aspectos críticos, y evaluar sistemáticamente la contribución del laboratorio al cuidado del paciente.

Además desde el 10 mayo de 2010 existe una Directiva Europea (UE 2010/32/EU) sobre la prevención de lesiones por objetos punzantes y cortantes en el sector sanitario que exige que todas las organizaciones sanitarias implementen normas obligatorias de seguridad para proteger a los profesionales en el ámbito sanitario. Esta directiva entró en vigor el 1 de junio de 2010 y debió implementarse en los estados miembros de la Unión Europea, como muy tarde el 11 de mayo de 2013.

La UE estima que los pinchazos con aguja “causan más de un millón de lesiones al año”, por tanto, su prevención se ha convertido en un problema que todas las organizaciones sanitarias de Europa tienen que abordar. Dicha directiva, trata específicamente, entre otros temas, la necesidad de “proporcionar dispositivos médicos que incorporen mecanismos de seguridad”, desde guantes hasta sistemas Aguja múltiple de seguridad toma de muestras, Holders de seguridad, Sistemas alados, Tubos de plástico etc., ya que numerosos estudios han demostrado su papel fundamental en la reducción de lesiones por pinchazos con aguja.

Esta directiva confirma que es responsabilidad de las empresas proteger a los profesionales de las lesiones ocasionadas por objetos cortantes y punzantes, siendo su cumplimiento obligatorio.

El Laboratorio hoy en día debe de centralizar el mayor número de pruebas posible así como racionalizar el número de muestras (ahorro y seguridad) e integrar economías de escala, así como un volumen suficiente de actividad para las pruebas más complejas. Además ha de estar muy automatizado para disminuir la intervención humana y así conseguir una mayor eficiencia en sus procesos, un alto grado de fiabilidad y un menor riesgo biológico, es decir una mayor Bioseguridad. Esta automatización puede abarcar a todo el proceso de Laboratorio desde la petición electrónica, agendas automáticas, gestores de colas que organicen la

extracción de muestras y optimicen la espera de los pacientes, identificaciones automáticas con código de barras. Control informático de rutas de transporte al laboratorio, clasificación y distribución automática de muestras, disminución de riesgos biológicos( no destaponado, manipulación mínima), análisis en cadenas automatizadas así como archivos automáticos de muestras, alicuotados automáticos y finalmente informes electrónicos con o sin imágenes asociadas.

La fuerza de conducción del Laboratorio es la Atención al Paciente y debe hacerse de manera eficaz y económica. Esto conlleva cambios profundos que lo dirijan hacia la Optimización para economizar y mantener los costos bajos, ofrecer la mayor calidad posible de resultados, el tiempo más rápido de respuesta, crear el flujo más sencillo de trabajo en el laboratorio y conseguir clientes satisfechos.

Resumiendo, como dice Tadano, el objetivo del Laboratorio es producir análisis de calidad y construir un sistema de información que realmente satisfaga el cuidado del paciente.

## CALIDAD EN EL ACTUAR DEL LABORATORIO

### EL IMPACTO DE LOS EJES TRAZADORES EN LA ESTRATEGIA DE CALIDAD DEL LABORATORIO

Alba Cecilia Garzón González

Bacterióloga, Especialista en Gerencia de Salud y en Sistemas de Garantía de Calidad y Auditoría de Servicios. [www.acgcalidad.com](http://www.acgcalidad.com)

Desde que se estableció el PAMEC como una herramienta para fortalecer el autocontrol y enfoque por procesos en las instituciones de salud, las entidades han presentado diferentes barreras en su implementación organizacional pasando desde solo contar con un documento del PAMEC, sin realizar su implementación y gestión, hasta el año 2014 donde en las entidades empiezan a dar pasos cortos y presentar pequeños esbozos de la implementación del proceso del PAMEC, con una clara evidencia del entendimiento de intencionalidad y desarrollo.

La implementación y desarrollo del PAMEC, está centrada en el sentido holístico y sistemático, en el que las organizaciones deben alcanzar un nivel de excelencia a través de la implementación de mejores prácticas y altos estándares de calidad como son los requisitos establecidos en la Res. 123 Sistema Único de Acreditación en Salud; el objetivo central del PAMEC es lograr la promoción del autocontrol que conlleve a las organizaciones a mantener un enfoque preventivo en sus procesos y de igual forma que las organizaciones cumplan con principios de calidad

internacionales como es la gestión por procesos. Para poder lograr este objetivo las organizaciones deben cambiar culturalmente su pensamiento de trabajo pasar de un pensamiento lineal enfocado solo a ciertas tareas de mi proceso a un pensamiento sistémico en el cual el enfoque de trabajo debe ser mucho más amplio aplicando el ciclo de calidad PHVA, que inicia desde el monitoreo del desempeño de los procesos de la organización en el cual puedo identificar brechas, comparar con metas de calidad, estandarizar y verificar la adherencia al cumplimiento en la implementación de los planes de mejora; todos los pasos anteriores nos llevarán finalmente al aprendizaje organizacional, que es lo que finalmente le da sentido a este proceso evaluativo.

Teniendo claro el panorama del PAMEC en Colombia sobre estándares de nivel superior, podemos entender de mejor forma los cambios que vienen en su implementación con la generación por parte del Ministerio de Protección Social, mediante la Resolución 2082 de 2014, donde reglamentó el nuevo esquema de operación del Sistema Único de Acreditación en Salud, que ICONTEC viene operando desde el año 2004, y adicionalmente enmarca la filosofía de acreditación en salud en los siguientes ejes:

**La Seguridad de paciente** entendida como el conjunto de elementos estructurales, procesos, instrumentos y metodologías que busca minimizar el riesgo de sufrir un evento adverso en el proceso de atención en salud. En el laboratorio entendido como la búsqueda de minimizar el riesgo de presentar eventos adversos en los resultados de los pacientes.

**Humanización** aplicada desde el conocimiento de los derechos y deberes de los usuarios del laboratorio y su vivencia en cada una de las actividades realizadas por los colaboradores, así como el respeto entre los compañeros.

**Gestión del riesgo**, entendido como el balance entre los riesgos, costos y beneficios de todos los procesos del laboratorio.

**Gestión de la Tecnología** mediante un proceso racional de adquisición y utilización que beneficie a los usuarios y a las instituciones, en el que la planificación de la adquisición de los equipos biomédicos sea racional y no afecte el beneficio y la confiabilidad de los resultados emitidos.

**Transformación cultural**, en el que el laboratorio tenga un compromiso real en prestar una atención con calidad, en el que se aporte a un desarrollo sostenible basados en un comportamiento ético y transparente.

**Responsabilidad social empresarial**, entendido como la corresponsabilidad en la disminución de inequidades buscando el mejoramiento integral de las condiciones de vida de las partes interesadas que nos rodean como los proveedores, clientes IPS Y EPS, sociedad, individuo y medio ambiente.

**Atención centrada en el usuario**, una filosofía en la que buscamos identificar, satisfacer y exceder las necesidades de nuestros usuarios, teniendo claro la dignidad y respeto, los mecanismos de comunicación, la participación del usuario en los procesos de la organización y la accesibilidad a los servicios.

Los ejes de la acreditación en salud, deben ser abordados sistémicamente cómo el vehículo de cambio en la Transformación de la Cultura organizacional a largo plazo, en el que se alinean las normas, la cultura y la ética. Esta transformación promovida desde el direccionamiento y el talento humano, tiene en cuenta el aprendizaje organizacional y la internalización de conocimientos, estrategias y buenas prácticas, así como la Responsabilidad Social entendida como la corresponsabilidad de las instituciones, la sociedad y los individuos, que contribuye con acciones concretas a disminuir las inequidades de las comunidades en particular y la sociedad en general y a la rendición de cuentas en relación con los resultados del mejoramiento continuo organizacional producto del desarrollo de estándares de calidad superior.

La acreditación en salud es una forma de demostración de compromiso social. De acuerdo a lo anterior nuestro proceso de ejecución del PAMEC debe incluir el desarrollo de los ejes de acreditación al interior de la organización, buscando siempre que estos se vean reflejados en todas las actividades realizadas por el laboratorio.

## **ESTRATEGIAS DE VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS EN EL LABORATORIO CLÍNICO**

Luz Adriana Stevens Gualdrón

Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Especialista en Gestión de la Calidad del Laboratorio Clínico.  
Auditora ICONTEC.

Cada vez que un laboratorio emprende el reto de innovar, ya sea a través de la apertura de nuevos servicios, ampliación de la capacidad de producción o renovación tecnológica entre otros, surge la necesidad de evaluar las especificaciones de desempeño de las plataformas analíticas y los métodos que emplean en el análisis. Es ahí donde se genera un sin número de interrogantes: ¿debemos Verificar o validar estos métodos?, ¿quién debe asumir esta responsabilidad?, ¿qué estrategias son realmente eficientes en términos de aplicabilidad, practicidad y costo/beneficio para la organización?, y a su vez debe cerciorarse que esta evaluación permita dar cumplimiento a los diferentes requisitos, voluntarios y de obligatorio cumplimiento que aplican al laboratorio clínico.

Para empezar a resolver estas inquietudes es muy importante tener claridad en el enfoque actual de los conceptos de validación y verificación como herramientas



para conocer el desempeño de un método. Estos dos conceptos tienden a emplearse para las mismas actividades, pero el objeto principal de cada uno es el que realmente nos da su campo de aplicación.

El vocabulario internacional de metrología define la validación como la verificación de que los requisitos especificados son adecuados para su uso previsto, por otra parte, la verificación es definida como la aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados y se conoce también como validación secundaria. Alineados a estos conceptos podemos concluir que los protocolos de validación de métodos nos permiten saber cuál va a ser el uso previsto de un sistema de medición, mostrando que el método es útil como herramienta diagnóstica; mientras que los protocolos de verificación, permiten obtener evidencia objetiva de que los requisitos especificados han sido cumplidos.

Es por ello, que los reactivos para diagnóstico in vitro han sido validados por el fabricante y los datos se encuentran en el inserto, no obstante, el laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente estos métodos previo a su uso en el laboratorio, bajo sus condiciones propias de operación (equipo, calibradores, analistas, etc.) generando evidencias objetivas, para confirmar su adecuación frente a los requisitos establecidos.

Las evaluaciones empleadas en los estudios de validación de métodos, requieren Ejecución de ensayos experimentales y aplicación de técnicas estadísticas reconocidas para la estimación de los límites de detección, cuantificación y linealidad, que determinan el intervalo reportable del método; test de precisión para estimar los errores al azar; estudios de comparación de métodos para estimar el error sistemático; estudios de recuperación e interferencias que determinan la especificidad analítica, entre otros.

La verificación surge a raíz de la necesidad de los laboratorios para comprobar si podían tener al menos el mismo desempeño analítico como ha sido establecido por los fabricantes de equipos y reactivos sin emplear protocolos complejos que demandan un tiempo prolongado para su ejecución y recursos económicos con los cuales muchas veces no es viable contar.

Ahora, como seleccionar los experimentos que permitan conocer lo suficiente acerca del desempeño analítico del método y a la vez cumplir con la normativa que rige los laboratorios? protocolos publicados en guías internacionales (por ejemplo CLSI, Clinical Laboratory Standard Institute) pueden ser aplicados a cualquier laboratorio, independientemente de sus recursos y áreas que lo conforman; el uso y aplicación de las mismas depende las características de desempeño a evaluar, por ejemplo CLSI EP15-A3 para la Verificación de precisión y estimación del sesgo, CLSI- EP31A-IR para la Verificación de la comparabilidad de los resultados del paciente dentro en sistemas automatizados de HealthCare, CLSI EP12-A2

Evaluación de Desempeño Prueba Cualitativa, CLSI C28-A3 Establecimiento y verificación de intervalos biológicos de referencia entre otras.

Las metas analíticas pueden ser adoptadas de las definidas por manufactura en sus estudios de validación, estudios internacionales de grupos científicos como estándares de Variabilidad Biológica, CLIA, Rilibak, Rhoads, estado del arte, entre otros.

Los resultados obtenidos de estos estudios son comparados frente a las metas analíticas de desempeño definidos por el laboratorio como requisitos de calidad para determinar si se evidencian o no errores clínica y/o estadísticamente significativos que puedan impactar de forma negativa la decisión clínica.

Lo más importante en este proceso es identificar, conocer y aplicar las herramientas que permitan al laboratorio el uso de metodologías adecuadas y a la medida garantizando en términos de aseguramiento de la calidad y costo-eficiencia de los procesos de medición la seguridad del paciente.

## **NORMALIZACIÓN PARA EL LABORATORIO CLÍNICO; EL LABORATORIO IDEAL**

Andrés Hernández Velandia

MD. Bacteriólogo, Master en Morfología humana. Profesional de Normalización Sector Salud ICONTEC.

El laboratorio clínico participa de manera fundamental y estratégica en el proceso de promoción y prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento a usuarios y pacientes que asisten al médico con variados motivos de consulta, por lo cual el laboratorio y sus profesionales asumen un rol que se interrelaciona con múltiples ámbitos dentro del mismo servicio, los cuales deben funcionar con un engranaje sistemático cuyo objetivo es el de garantizar la labor como apoyo diagnóstico con el máximo estándar de calidad y eficiencia.

Una herramienta que fortalece el desempeño de la labor diaria de los laboratorios clínicos es la implementación, apropiación y seguimiento de un grupo de estándares cuya referencia internacional validada buscan que se cumplan los objetivos de trabajo en lo que al laboratorio clínico refiere.

La calidad dentro del laboratorio clínico, así como cualquier otra unidad de negocio, debería ser contemplada como parte de un sistema de gestión definido y establecido; en la actualidad la calidad se entiende como una estrategia que integra múltiples recursos, razón fundamental para que los laboratorios clínicos y sus

profesionales se apropien de términos como calidad integral y la calidad analítica no sea el único y exclusivo foco de atención.

Un sistema de gestión de calidad dentro de un laboratorio clínico busca integrar las partes que una vez acopladas entre sí, facilitarán el desempeño de su labor en términos puntuales como garantía de la calidad, trazabilidad, oportunidad, eficiencia y exactitud los cuales vistos desde el interior de la unidad de negocio se esperan resultantes como una efectiva planeación estratégica, disminución de costos de no calidad, aumento de la rentabilidad, oportunidad de mejora y evaluación cuantificable que refleje un panorama tan general como específico; en términos del usuario y paciente quienes son los clientes externos de esta unidad de negocio, se espera una tasa de satisfacción global muy cercana a la meta establecida por la propia organización, entendiéndose como un indicador que realmente permita valorar el grado de cumplimiento respecto a lo planificado.

El sistema de gestión de la calidad concebido para el laboratorio clínico, contempla todos los procesos estratégicos y de apoyo, los cuales son núcleo de atención para lograr los objetivos reales de esta unidad de negocio, la responsabilidad del desempeño no recae sobre solo una persona en especial, sin embargo si debe existir un líder identificable que compile y estructure la múltiple información que puede llegar a recibirse.

En términos de recursos, la plataforma fundamental y base estratégica de desarrollo, se encuentra el recurso humano, el cual debe acoplarse a una serie de requerimientos que no deben ser vistos como restrictivos para un profesional determinado, quien al no cumplirlos, esta organización debe estar en capacidad en un periodo determinado de tiempo de proveer los medios para su desarrollo y cumplimiento y garantizar formalmente la idoneidad técnica, científica y ética de los profesionales y auxiliares que hacen parte del laboratorio clínico; la capacitación permanente basada en necesidades detectadas, la evaluación de desempeño en términos técnico- científicos y actitudes éticas propias de su labor son algunas de las estrategias que se plantean dentro de un sistema de gestión organizado e implementado.

Un laboratorio clínico ideal es aquel, que cuenta con tecnología de vanguardia y en el cual los instrumentos, equipos y sistemas semi o automatizados no cuentan con autonomía propia y son permanentemente controlados por el recurso humano que se ha mencionado. Dentro de este contexto el sistema de calidad propuesto para un laboratorio clínico en términos de analítica, busca llegar al grado mínimo de error que de alguna manera se garantiza con una tasa de manipulación manual escasa y en situaciones específicas, sin embargo, la idoneidad del profesional del laboratorio se debe encontrar a un nivel que le permita la autonomía y poder de decisión frente a los procesos y resultados emitidos por un instrumento analítico, normalmente utilizados en la rutina del laboratorio clínico. La tecnología de esta unidad de negocio, requiere atención permanente, con estrategias planificadas y en algunos

casos no esperados actividades correctivas, las cuales en ambos casos, se derivan de procesos y procedimientos referentes a sistemas metrológicos internos con una expansión a programas inter-laboratorio, programa de mantenimiento del recurso tecnológico acorde a las necesidades de los instrumentos, siempre según los requerimientos de los mismos usuarios.

El proceso consecutivo desde la recepción de una muestra a analizar (condiciones pre-requisito), el análisis de la muestra según lo requerido (condiciones analíticas) y emisión de un valor resultante posterior al análisis (condiciones post-analíticas), son los elementos que integrados entre sí bajo un esquema planificado de desempeño medible y destacando la identificación de oportunidades de mejora llegarán a satisfacer las necesidades por las cuales un usuario o paciente ha llegado al servicio de laboratorio clínico; esta cadena no funciona independiente y se evidencia claramente la necesidad de integrar los procesos que hacen parte en la prestación del servicio.

El sistema de gestión del laboratorio clínico, debe estar sincronizado de manera intrínseca con la regulación gubernamental aplicable, la cual es la base de funcionamiento del servicio propiamente dicho. Dentro de los programas de auditoría para el mejoramiento continuo propuestos por las normas nacionales vigentes se encuentran inmersos elementos de un sistema de garantía de calidad que aportan a la labor del laboratorio clínico diaria; la información oportuna y veraz a usuarios del servicio, confidencialidad en el manejo de los datos, oportunidad en la prestación del servicio, eficiencia y eficacia que son piezas clave en el sistema obligatorio de garantía de la calidad en salud para Colombia, son bases de desarrollo para un sistema de gestión de la calidad propuesto para un laboratorio clínico, lo cual evidencia que los sistemas de gestión de calidad se encuentran orientados como primera medida al cumplimiento de la regulación nacional vigente, que posteriormente será alimentada con procesos y procedimientos para llegar a tal fin.

Cada laboratorio clínico debe proponer, identificar, delimitar y controlar las etapas de sus procesos, reconocer las entradas de los mismos, modificaciones que suceden a estas entradas para finalmente obtener una salida que inmediatamente se convierte en entrada para otro proceso y así sucesivamente.

En Colombia actualmente se encuentra disponible la norma técnica colombiana NTC 15189 laboratorios clínicos: requisitos generales para la calidad y la competencia, un estándar con referencia internacional que estructura de manera sistemática los procesos propios del laboratorio clínico que como se mencionó al inicio del presente artículo es una herramienta que propone un modelo de sistema de gestión basado en enfoque por procesos, definidos para este servicio de salud.

Se debe resaltar que la norma técnica colombiana NTC 15189, se encuentra basada y alineada con el fundamento y estructura de las normas NTC ISO – IEC 17025 y

NTC ISO 9001, las cuales contemplan la cadena de valor en su totalidad: proveedores, clientes internos, clientes externos, garantía de calidad analítica y una adecuada generación de informes de resultados, todos estos procesos se encuentran enmarcados en un esquema de identificación de oportunidad de mejora y prevención de desviaciones no esperadas.

El cumplimiento voluntario y consciente de los requisitos generales para la calidad y competencia en los laboratorios clínicos es una excelente herramienta que brinda un favorecedor avance para aquellas instituciones que se encuentran en ruta de acreditación en salud y un soporte estructurado para el esquema actual del sistema único de habilitación en salud.

## **METABOLISMO Y SISTEMA CARDIOVASCULAR**

### **LIPEMIA POSTPANDRIAL Y RIESGO CARDIOVASCULAR**

Alicia Norma Alayón

Bioquímica, MSc en bioquímica clínica, MSc en Desarrollo Social. Argentina

Se entiende por estado de lipemia posprandial al periodo durante el cual se produce un incremento en sangre de la concentración de lípidos, como consecuencia de la ingesta de una comida rica en grasas. Este aumento se da principalmente en forma de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos (denominadas TRLs, por sus siglas en inglés) y se asocia con riesgo cardiovascular (1).

Las razones que explicarían esta asociación parecen tener que ver con el desarrollo de un estado transitorio de inflamación de bajo grado, durante el cual las TRLs jugarían un importante papel, en procesos que involucran generación de radicales libres, activación leucocitaria y disfunción endotelial, con incremento de la expresión de moléculas de activación y receptores, en monocitos circulantes y en células endoteliales (2).

Las evidencias han mostrado que estos factores contribuyen y, en ocasiones incluso son factores independientes, para el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Lo que se postula actualmente es que la generación de TRLs podría aportar a la inflamación local, interactuando con células circulantes inflamatorias como neutrófilos y monocitos, causando liberación de citoquinas y contribuyendo de esta manera a la transformación del macrófago en células espumosas, responsables del deterioro vascular y la formación de la placa (3). Estudios del impacto de una ingesta aguda de comida rica en grasa han mostrado aumento del número de neutrófilos

con un pico máximo a las 3 horas con expresión de marcadores de activación en monocitos y neutrófilos tanto in vivo (4) como in vitro (5).

Por su parte, se conoce que los lipopolisacáridos (LPS) son capaces de disparar los eventos inflamatorios mencionados, y ha resultado un interesante hallazgo conocer que su concentración guarda relación directa con los niveles de colesterol y de triglicéridos, y se asocia con condiciones metabólicas como la obesidad abdominal, la resistencia a insulina y la diabetes mellitus tipo 2 (6,7), tal como evidencia un estudio comparando personas obesas y no obesas, el cual mostró que la ingesta de una comida rica en grasas produce un incremento en los niveles de TRL y LPS, y que estos aumentos son mayores en obesos (8).

El aumento de LPS circulantes se debería a la afinidad que éstos presentan por las lipoproteínas que transportan grasas exógenas desde el intestino, lo que explicaría su comportamiento durante el estado posprandial y la influencia que sobre este indicador han mostrado tener el tipo de grasa ingerida (9, 10) y las características de la microbiota intestinal (11). Esto ha permitido considerar actualmente que una alimentación adecuada, más allá de la cantidad de grasa ingerida, tiene que ver con el tipo de ácidos grasos que la componen, siendo responsable en parte del limitado impacto que ha tenido limitar la cantidad de ingesta grasa en los indicadores epidemiológicos de riesgo cardiovascular (12).

Lo expresado pone de manifiesto que más allá de los cambios en el perfil lipídico, aunque ligado a éstos, la ingesta grasa parece influenciar el incremento en los niveles de LPS en suero y la activación leucocitaria, escenario en el cual se favorece la aparición de interacciones adhesivas intercelulares sucesivas, facilitan que la célula circulante activada tome contacto con la superficie del endotelio, se adhiera a éste y lo atraviese alcanzando la capa íntima arterial.

Este proceso de internación del leucocito a la pared arterial se puede hacer efectivo por medio de un proceso de diapédesis paracelular o transcelular y parece involucrar una estructura de membrana denominada compartimiento de borde lateral reciclable, en la que participan selectinas y moléculas de adhesión vascular (VCAM-1), intercelular (ICAM-1) y plaquetarias (PECAM), así como otras proteínas presentes en las uniones entre células, responsables de regular la permeabilidad celular y la migración transendotelial como el complejo VE-caderina y las cateninas (13,14).

Dependiendo de señales del contexto, los monocitos pueden resultar en dos fenotipos de activación, denominados clásica o M1 y alternativa o M2, los cuales han sido aislados tanto en sangre periférica como en placa ateromatosa (15). Estudios comparando los dos perfiles muestran que existe notable diferencia en la expresión de genes y evidencian la posibilidad del monocito/macrófago de reprogramar la señalización, e intervenir en las fases de desarrollo y resolución del proceso inflamatorio (16). Vista desde esta perspectiva, la inflamación en su primera

fase estaría convocada a destruir al agente causal y, en un segundo momento, a la remoción de los detritos y regreso a la condición sana, pudiendo ser considerada como producto de un proceso evolutivo finamente controlado que busca restaurar la homeostasis de la morfología y función tisular (17).

De acuerdo con lo anterior, la inflamación del momento posprandial y su impacto en la salud están condicionados por múltiples relaciones que involucran diferentes moléculas y estructuras celulares, lo que obliga a considerar excesiva la importancia que históricamente se le adjudicó a la cantidad de grasa ingerida, para dar paso a una mirada de mayor alcance que incluya la participación del sistema gastrointestinal, la flora bacteriana, los procesos de inflamación y los cambios en circulación y tejidos, a fin de comprender y evaluar de mejor manera las estrategias que se utilicen en aras de controlar el creciente aumento de morbilidad de origen cardiovascular.

Lo expuesto permite concluir que:

1. La naturaleza multifactorial del fenómeno del riesgo cardiovascular muestra la riqueza de escenarios donde se pueden desarrollar procesos diagnósticos e investigativos que permitan una mejor comprensión y un más acertado direccionamiento de las intervenciones dirigidas a combatir una de las primeras causas de morbilidad del mundo entero.
2. Para el laboratorio clínico y el mundo médico, tan ligados a valoraciones del estado en ayunas, la evidencia del estado inflamatorio de bajo grado producido en la etapa posterior a la ingesta de alimentos es un reto, especialmente cuando se toma conciencia del hecho de que el individuo promedio pasa la mayor parte de su vida en estado postprandial (18), lo que sugiere que, así como se entiende mejor el metabolismo de los glúcidos desde la evaluación del mismo luego de administrar una carga de hidratos de carbono estandarizada, el metabolismo de las grasas pudiera ser mejor comprendido desde la adecuada comprensión de la dinámica del consumo y desde la complejidad que propone la diversidad de opciones en términos de tipos de grasa.

### **Bibliografía**

1. Bravo E, Napolitano M, Botham KM. Postprandial lipid metabolism: the missing link between life-style habits and the increasing incidence of metabolic diseases in Western Countries? The Open Translational Medicine Journal. 2010; 2:1-13.
2. Botham KM, Wheeler-Jones CPD. Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis. Progress in Lipid Research. 2013; 52:446–64.
3. de Vries MA, Klop B, Eskes SA, van der Loos T, Klessens-Godfroy FJM, Wiebolt J, et al. The postprandial situation as a pro-inflammatory condition. Clin Invest Arterioscl. 2014; 26(4):184-92.
4. van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C, Sijmonsma TP, Plokker HWM, De Jaegere PP, Castro Cabezas M. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers Atherosclerosis. 2004; 177:175–82.
5. Alipour A, van Oostrom AJHMM, Izraeljan A, Verseyden C, Collins JM, Frayn KN, Plokker TWM, Elte JWF, Castro M. Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins. Arterioscler Thromb

- Vasc Biol. 2008;28:792-7.
6. Harte AL, Varma MC, Tripathi G, McGee KC, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, et al. High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2012; 35(2): 375-82.
  7. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 2012; 3(4): 279- 288.
  8. Michalski MC, Vors C, Pineau G, Draï J, Malpuech-Brugère C, Vidal H. Postprandial endotoxemia increases with fat amount in obese men: inflammatory impact of LPS handling. *FASEB J*. 2015; 29:393.5
  9. Holmer-Jensen J, Karhu T, Mortensen LS, Pedersen SB, Herzig K, Hermansen K. Differential effects of dietary protein sources on postprandial low grade inflammation after a single high fat meal in obese non-diabetic subjects. *Nutrition Journal* 2011, 10:115.
  10. <http://www.nutritionj.com/content/10/1/115>.
  11. Camargo A, Rangel OA, Haro C, Meza ER, Peña P, Meneses ME, Marin C, Yubero EM, Perez P, Delgado J, et al. Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. *Food Chemistry*. 2014; 162: 161–71.
  12. Moran CP, Shanahan F. Gut microbiota and obesity: Role in aetiology and potential therapeutic target. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2014; 28: 585-597.
  13. Schwab U, Lotte L, Tholstrup T, Haldorsson TI, Riserus U, Uusitupa M, Becker W. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type-2 diabetes, cardiovascular disease, and cancer: a systematic review. *Food & Nutrition Research*. 2014; 58: 1-26.
  14. Razakandrainibe R, Combes V, Graub GE, Jambou R. Crossing the wall: The opening of endothelial cell junctions during infectious diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* . 2013; 45:1165-73.
  15. Muller WA, How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response. *Am J Pathol*. 2014; 184: 886-96.
  16. Satho N, Shimatsu A, Himeno A, E Sasaki Y, Yamakage H, et al. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients. *Diabetes Care*. 2010; 33(1): E7.
  17. Dushkin MI. Macrophage/foam cell is an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role. *Biochemistry (Moscow)*. 2012; 77(4):327-38.
  18. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, 2014; 5:1-22. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514
  19. Varela LM. Estudio de la respuesta postprandial de células vasculares y su implicación en la aterosclerosis. (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla, España, 2012.

## ENZIMAS CARDÍACAS EN EL CONTEXTO DE LA CLÍNICA

Virgil Carballo Zárate\*, Jair Martínez Villarreal\*\*

\*MD, Internista, Universidad de Cartagena. \*\* Residente de Medicina Interna.

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares se consideran la pandemia más significativa del siglo XXI. Dentro de ellas, la enfermedad coronaria es la más prevalente y la que más morbi-mortalidad genera.

Según la Organización Panamericana de la Salud, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo y para el 2020



serán responsables de 25 millones de muertes al año. En toda Colombia, el infarto agudo del miocardio ocupa el segundo lugar en mortalidad tanto en hombres como en mujeres, con altas tasas de morbilidad.

La isquemia cardíaca se define como la situación en la que el corazón recibe un aporte sanguíneo inadecuado para mantener sus funciones esenciales, con la consecuente carencia de oxígeno. En el caso del tejido miocárdico, la función es estrictamente dependiente de la irrigación sanguínea dado que, en su carácter de órgano altamente aerobio, el corazón posee una escasa reserva energética en caso de deficiente aporte sanguíneo.

Existen numerosas causas de isquemia miocárdica, pero indudablemente la más frecuente es la aterosclerosis coronaria. Otra causa de gran importancia es el vasoespasma coronario, trombosis (coágulos sanguíneos), la anemia severa y la hipotensión importante.

Se define angina como la situación clínica en la que se produce un dolor en el pecho causado por flujo sanguíneo insuficiente al músculo cardíaco. El dolor generalmente comienza de forma lenta y empeora durante unos minutos antes de desaparecer.

El angor o angina estable, se desencadena en condiciones de esfuerzo físico, emociones, durante la digestión o por acción del frío y se alivia con el reposo y la acción de vasodilatadores coronarios (nitroglicerina, solinitrina). La causa más común es la arteriopatía coronaria.

El angor o angina inestable describe un síndrome que es intermedio entre la angina estable y el infarto de miocardio: un patrón en aceleración o "crescendo" de dolor torácico que dura más que la angina estable, se presenta con menos esfuerzo o en reposo o responde menos a los medicamentos.

Se define infarto, al proceso patológico en el que una porción del parénquima es privada súbitamente de circulación sanguínea por obstrucción de vasos arteriales y al conjunto de fenómenos (desde isquemia hasta necrosis) consecutiva a esta obstrucción. La angina inestable y el infarto de miocardio se consideran síndromes coronarios agudos; mientras que la angina estable es una condición crónica.

Una vez que se ha producido la lesión de la membrana, la velocidad de aparición de moléculas intracelulares en circulación depende sobre todo del flujo sanguíneo; por lo tanto, un área de miocardio lesionado con una perfusión sanguínea deficiente, libera estas moléculas mucho más lentamente que las áreas en las que la recirculación es más adecuada.

Los biomarcadores son considerados como moléculas, proteínas o enzimas medibles en plasma, que proporcionan un valor diagnóstico y pronóstico independiente que refleja un estado de enfermedad o trastorno subyacente.

El biomarcador ideal en el síndrome coronario agudo, por ejemplo, debe elevarse rápidamente y permanecer así por un amplio período de tiempo; debe ser específico del tejido cardíaco, aparecer en cantidades proporcionales a la extensión del daño, su proceso de medición debe ser exacto, estar estandarizado y su resultado ser fácil de interpretar. Los marcadores que son empleados para cribado deben ser económicos y altamente sensibles, mientras aquellos que se usan para monitoreo de tratamiento deben contar con baja variabilidad biológica y su costo es menos importante.

### **Biomarcadores de lesión miocárdica**

**Creatín quinasa (CK, CPK, adenosina trifosfato-creatín-N-fosfotransferasa):** La molécula de CK es un dímero compuesto por dos subunidades, no idénticas: M y B. Cada una tiene un peso molecular de 40000 daltons. Estas subunidades M y B, son el producto de dos genes estructurales distintos, y puesto que la forma activa de la enzima es un dímero, solamente pueden existir tres pares distintos de subunidades: BB o CK1 (“Brain”), MB o CK2 y MM o CK3 (“Muscle”).

El CK-MM, predomina en el músculo esquelético y cardíaco. CK-MB, está presente en el músculo cardíaco (de 25 a 46% de la actividad de CK total) y también, en menor grado, en el músculo esquelético (< 5%) y otros tejidos.

La actividad de CK se encuentra elevada en necrosis o atrofia aguda del músculo estriado, enfermedades del corazón, hipertermia maligna, últimas semanas de embarazo, hipotiroidismo y, ligeramente, en inyecciones intramusculares y espasmos musculares.

Aunque no es específico del corazón, se utiliza en la diagnosis del SCA, sobre todo, en el caso de CKMB.

Se considera que el tiempo mínimo para biomarcadores cardíaco debe ser menor de 60 minutos, pero número de estudios demuestran que menos del 25% de los hospitales pueden cumplir con esta meta. Definiendo el tiempo de respuesta (TAT), como el periodo de tiempo indicado para realizar el informe.

**Troponina:** Complejo proteínico regulador de la función contráctil del músculo estriado. Consta de 3 polipéptidos distintos: Troponina C, que fija el calcio; Troponina T, que liga el complejo troponina a la tropomiosina; y Troponina I, que es la subunidad inhibidora del complejo troponina-tropomiosina.

La Troponina I, se encuentra en fibras de músculo rápidas, fibras de músculo lentas y corazón (cTnI), ésta última expresada tanto en aurículas como en ventrículos y siendo de mayor interés en el SCA. Se libera precozmente al torrente sanguíneo después de un SCA; parece persistir en plasma durante, al menos, 5 a 7 días.

La Troponina I y la Troponina T, que permanece presente en la sangre durante 10 a 14 días, pero es menos precoz y cardioespecífica que la anterior, están siendo muy usadas en la actualidad como marcadores de síndrome coronario de urgencia al ser liberadas por el tejido cardíaco.

**Proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us):** La proteína C reactiva, miembro de la familia de las pentraxinas, es sintetizada por los adipocitos hepáticos en respuesta a la inflamación. Desde 1944 se conoce que el plasma de los pacientes que han sufrido un infarto. Infarto agudo del miocardio tiene una alta concentración de PCR, pero más que su alza tras la necrosis, interesa la elevación antes de ésta.

Más recientemente, con el reconocimiento de que la inflamación es un componente crítico en la determinación de la estabilidad de la placa y con la disponibilidad de ensayos ultra sensibles, los niveles de PCR por debajo del rango establecido inicialmente como “normal” empezaron a tener un valor predictivo en los individuos con riesgo de enfermedad coronaria.

Múltiples estudios prospectivos de diferentes cohortes han demostrado que las concentraciones elevadas de PCR-us se asocian con aumento en el riesgo de eventos coronarios después del ajuste multivariable de los factores de riesgo tradicionales, por lo que según las guías del American College of Cardiology (ACC), la principal utilidad de la PCR-us es como adyuvante a la estratificación de riesgo cardiovascular en la población sana con riesgo moderado (recomendación con nivel de evidencia IIaB).

A pesar de la literatura abundante que hay en la actualidad sobre la PCR-us, las líneas guías internacionales sólo la recomiendan con grado IIa como útil para seleccionar pacientes para terapia con estatinas, si cumplen los siguientes requisitos:

- Pacientes de género masculino de 50 años o más.
- Mujeres de 60 años o más, con colesterol menor de 130 mg/dL, que no tomen hipolipemiantes, sin terapia de reemplazo hormonal o inmunosupresora y sin enfermedad cardiovascular clínica, enfermedad renal o contraindicaciones a las estatinas.

**Interleucina 6 (IL-6):** Es una glicoproteína de cadena simple producida por muchos tipos celulares, incluyendo monocitos/macrófagos activados, células endoteliales y adipocitos.

Representa la principal citosina procoagulante, pero su función más importante es la amplificación de la cascada inflamatoria, por lo que interviene directamente en el proceso aterotrombótico.

Desafortunadamente no existen guías de práctica clínica basadas en la evidencia que recomienden el uso de la IL-6 como marcador de síndrome coronario agudo.

**Albúmina modificada por isquemia:** La albúmina es la proteína de más alta concentración plasmática; entre sus funciones se encuentra el transporte de iones metálicos. Posee cuatro puntos de unión con diferentes especificidades para estos iones. Dos de ellas se ubican en su extremo aminoterminal y confieren la capacidad de unirse a los metales de transición.

Cuando hay isquemia, en los capilares hipoxémicos se produce un cambio en el octapéptido terminal que reduce esta capacidad de unión. Probablemente, las especies reactivas de oxígeno son el agente causal de este cambio conformacional en la molécula de albúmina, haciéndola actuar como antioxidante con el fin de reducir el daño.

La albúmina modificada por isquemia aumenta la sensibilidad diagnóstica de los biomarcadores cardiacos convencionales. Debido alto valor predictivo negativo, la medición de la albúmina modificada por isquemia confiere información valiosa en el estudio del paciente con síndrome coronario agudo, y puede ayudar a excluir pacientes con baja probabilidad de isquemia miocárdica. Sin embargo, la IMA es una prueba que se puede elevar en cualquier situación que curse con isquemia, por lo que su empleo como única prueba en el estudio del paciente con dolor torácico que se sospecha es de origen isquémico, tiene una especificidad diagnóstica inaceptable.

**CD40L:** El ligando CD40 es una glicoproteína transmembranosa que contiene un dominio homólogo al factor de necrosis tumoral y es expresado principalmente por plaquetas y linfocitos T activados. La unión de la forma soluble con el receptor de los linfocitos B lleva a su proliferación, adhesión y diferenciación. Por otro lado, la unión con el receptor de las células endoteliales tiene efectos proinflamatorios e indica la coagulación al inducir la expresión del factor tisular en los monocitos.

La mayor utilidad de esta proteína es permitir la individualización del tratamiento, así los pacientes que tienen concentraciones plasmáticas más elevadas se benefician del tratamiento con antagonistas de los receptores IIb/ IIIa y se reduce el riesgo de sufrir infarto o muerte en los siguientes meses. Sin embargo muchas enfermedades pueden aumentarla en síndrome coronario agudo.

La búsqueda del biomarcador ideal continúa y probablemente no acabará nunca. Sigue la evaluación de las múltiples moléculas disponibles y de los nuevos marcadores potenciales como ensayos únicos y combinándolos entre sí. El futuro en el tratamiento del síndrome coronario probablemente irá enfocado en el análisis multimarcador. Todos los marcadores mencionados en esta revisión tienen limitaciones; muchos de los estudios usan la muerte o los eventos cardiovasculares

mayores como desenlace principal al ser fácilmente medibles; no obstante, esos desenlaces son el resultado de una constelación de eventos fisiopatológicos que aún no están claramente establecidos y que podrían ejercer un papel fundamental en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Con base en nuestra revisión de la literatura, los marcadores que parecen estar más cerca de cumplir los criterios de un biomarcador óptimo son las troponinas ultrasensibles, la albúmina modificada por isquemia, y el ligando CD40S.

## INMUNOLOGÍA UN ÁREA EN CONSTANTE MOVIMIENTO

### INMUNOFLUORESCENCIA: ANTICUERPOS ANTINUCLEARES, UN RETO PARA EL LABORATORIO (BASADOS EN LAS RECOMENDACIONES INTERNACIONALES)

Claudia Marcela Tafur Amaya

Bacterióloga, Especialista en marketing y Ventas. Experta en microbiología e inmunofluorescencia. Alemania.

El uso de las pruebas de laboratorio en las enfermedades autoinmunes reumatológicas es indispensable ya que tienen desarrollo un gran papel en la clasificación o soporte diagnóstico de algunas enfermedades y en el pronóstico de otras. La utilidad de los resultados depende de múltiples factores entre ellos las características de sensibilidad y especificidad, además de la adecuada interpretación de los resultados analizados siempre por el especialista dentro del contexto clínico del paciente.

Los anticuerpos antinucleares (ANA) están dirigidos contra una variedad de antígenos nucleares y citoplasmáticos y aparecen con mayor frecuencia en las enfermedades reumáticas sistémicas. Por consiguiente, su determinación es una importante ayuda para el diagnóstico diferencial. Así, por ejemplo, los anticuerpos SS-A (Ro) y SS-B (La) se asocian con el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y el síndrome de Sjögren (SS), y los anticuerpos anti-dsDNA y anti-Sm, contra las histonas y contra los nucleosomas se relacionan con LES. Los anticuerpos anti-RNP se asocian con la enfermedad mixta del tejido conectivo y LES, los anticuerpos anti-Scl-70 con la esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva, ESP), los anticuerpos anti-Jo-1 con la Polimiositis y la dermatomiositis, y los anticuerpos contra la proteína del centrómero con el síndrome CREST.

Hasta este momento, el método de elección para la detección de ANA ha sido la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células eucariotas, como las células HELa y HEP-2. Aunque la inmunofluorescencia es un método sensible, la

realización de la prueba en un gran número de muestras es laboriosa y es necesaria la correcta estandarización durante el procesamiento y en la interpretación ya que la metodología puede estar sujeta a determinados errores debido a la interpretación de los resultados por el personal del laboratorio, el tipo de conjugado utilizado, la calidad del sustrato, el tipo de anticuerpos, la sustancia fluorescente, las diluciones realizadas, el punto de corte y a las diferencias entre los microscopios de fluorescencia, entre muchos más.

Los Anticuerpos antinucleares (ANA) son fundamentales para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, y han sido determinados por la metodología de inmunofluorescencia indirecta (IFI) durante largo tiempo. A medida que la demanda de pruebas ANA aumentó, se desarrollaron técnicas alternativas para lograr una estandarización más fácil y de acceso dinámico para el laboratorio. Estas plataformas alternativas se diferencian en sus perfiles de antígenos, la sensibilidad y la especificidad. Frente a estas nuevas opciones aparecieron una serie de incertidumbres relativas a la normalización y a la interpretación de los resultados incongruentes. Por lo tanto, muchos especialistas dedicados a la autoinmunidad han trabajado tratando de lograr un acuerdo mundial al respecto.

En este caso un grupo internacional de expertos ha creado recomendaciones para las pruebas de ANA por diferentes métodos. Dos grupos participaron en esta iniciativa. La iniciativa europea de normalización en autoinmunidad en representación de 15 países europeos y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas / Organización Mundial de la Salud / Fundación de Artritis / El centro para el control y prevención de enfermedades / y el comité de normalización de autoanticuerpos.

Las recomendaciones incluyen en particular, los papeles de IFI como el método de referencia, y la importancia de definir tinción nuclear y citoplasmática, unificar la terminología utilizada para la descripción de los patrones, punto de corte estimado, además de recalcar la necesidad de incorporar alternativas que permitan realizar la prueba de manera automatizada. Estas recomendaciones se basan en el conocimiento actual y puede permitir la armonización de los algoritmos locales para las pruebas y evaluación de ANA y autoanticuerpos relacionados.

## Bibliografía

1. Wiik A, Cervera R, Haass M, et al. European attempts to set guidelines for improving diagnostics of autoimmune rheumatic disorders. *Lupus* 2006; 15:391–6.
2. Fritzler MJ, Fritzler ML. The emergence of multiplexed technologies as diagnostic platforms in systemic autoimmune diseases. *Curr Med Chem* 2006; 13:2503–12.
3. Bossuyt X, Louche C, Wiik A. Standardisation in clinical laboratory medicine: an ethical reflection. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1061–3.
4. Shoenfeld Y, Cervera R, Haass M, et al. EASI – The European Autoimmunity Standardization Initiative: a new initiative that can contribute to agreed diagnostic models of diagnosing autoimmune disorders throughout Europe. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109:138–44.

5. Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International consensus statement on testing and reporting of ant neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111:507–13.
6. Andreoli L, Rizzini S, Allegri F, et al. Are the current attempts at standardization of ant phospholipid antibodies still useful? Emerging technologies signal a shift in direction. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34:356–60.
7. Anon. Case Records of the Mass General Hospital. Case 5-2009. A 47-yearold woman with a rash and numbness and pain in the legs. *N Engl J Med* 2009; 360:711–720
8. Agmon-Levin, Nancy, Damoiseaux Jan, Cees Kallenberg, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies *Ann Rheum Dis* published online October 14, 2013.

## HIV, TAMIZAJE, DIAGNÓSTICO Y CONFIRMACIÓN

Verónica Rojas Quimbay  
Bacterióloga, Master en Administración

El objetivo fundamental de la detección del VIH consiste en reconocer al mayor número posible de personas infectadas, en una etapa temprana de su infección, para vincularlas eficazmente con los servicios de prevención, atención y tratamiento (5). Es muy importante señalar que las pruebas de detección y la orientación con respecto al VIH, independientemente del modelo de prestación del servicio, deben cumplir con: 1) el consentimiento, 2) la confidencialidad, 3) la orientación, 4) los resultados correctos de la prueba y 5) la vinculación con la atención de salud (5,7).

Los ensayos para la detección del VIH están divididos fundamentalmente en dos categorías (6): 1) las pruebas de tamizaje; diseñadas para detectar a todas las personas infectadas; y 2) las pruebas confirmatorias diseñadas para diferenciar a las personas que obtienen un resultado falsamente reactivo por pruebas de tamizaje de aquellos que están verdaderamente infectados (1).

Las pruebas de tamizaje, son conocidas también como pruebas de escrutinio, cribado, “screening”, despistaje o presuntivas. En este grupo de pruebas se encuentran: 1) las pruebas rápidas, que se fundamentan en la afinidad antígeno-anticuerpo a través de inmunocromatografía, membranas de flujo y aglutinación (1,3,6) y 2) las pruebas basadas en el principio de inmunoensayo enzimático (EIA), que de acuerdo al producto detectable pueden ser ELISA, MEIA, CMIA, ECLIA, CLIA, etc. (1,3,7).

El VIH se diagnostica típicamente a través de la detección de anticuerpos contra el VIH (marcador serológico) y/o antígeno p24 del VIH, en lugar de la detección directa de los componentes propios del virus por pruebas de ácidos nucleicos (NAT) (marcadores virológicos) (1,7). En la actualidad, las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico del VIH detectan anticuerpos VIH-1/2, con ensayos de cuarta generación que incorporan la detección de ambos anticuerpos VIH-1/2 y del

antígeno p24 del VIH (1,7). Cuando la prueba inicial del VIH no puede discernir un diagnóstico, ensayos suplementarios pueden ser utilizados, tales como aquellos ensayos que detectan solamente antígeno p24 del VIH o ensayos que pueden detectar tipos específicos de anticuerpos VIH-1/2 (7).

Las pruebas de tipo confirmatorio, son también llamadas pruebas suplementarias (1). Los ensayos confirmatorios más utilizados son la inmunoelectrotransferencia como el “Western Blot” (WB) o análisis equivalentes, que se basan en proteínas recombinadas o en péptidos sintéticos capaces de detectar anticuerpos contra proteínas específicas del VIH-1 o del VIH-2 (1,5). También hacen parte de este grupo de pruebas, el cultivo viral y los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (7).

El patrón de aparición de los marcadores de laboratorio es muy consistente y permite la clasificación de la infección por el VIH en diferentes etapas que se observan en la tabla 1 (2).

La duración del período de ventana depende de tres factores principales: 1) la genética del virus, 2) la genética y la inmunocompetencia del huésped y 3) el componente que exactamente detecta el ensayo (antígenos y/o anticuerpos) (7). En particular, el formato del ensayo determina su capacidad para detectar anticuerpos tempranos (incluyendo IgM, IgA, IgG); esto puede también depender del tipo de muestra, tal como fluido oral, sangre venosa, capilar o total y suero/plasma (7). El período de ventana más corto se observa generalmente con las pruebas serológicas de cuarta generación, seguido por los ensayos de tercera generación (ver figura 1) (7).

Período de Eclipse	Período de Ventana	Infección Aguda	Infección Establecida
Intervalo inicial después de la infección con el VIH cuando no hay marcadores de laboratorio consistentemente detectables.	Intervalo entre la infección con el VIH y la primera detección de anticuerpos.	Intervalo entre la aparición de ARN del VIH detectable y la primera detección de anticuerpos.	Caracterizado por una respuesta de anticuerpos de tipo IgG completamente desarrollada y suficiente para cumplir con los criterios de interpretación de una prueba confirmatoria tipo WB.

Tabla 1: Etapas de la infección de HIV según su aparición y detección por el laboratorio Fuente: elaboración propia



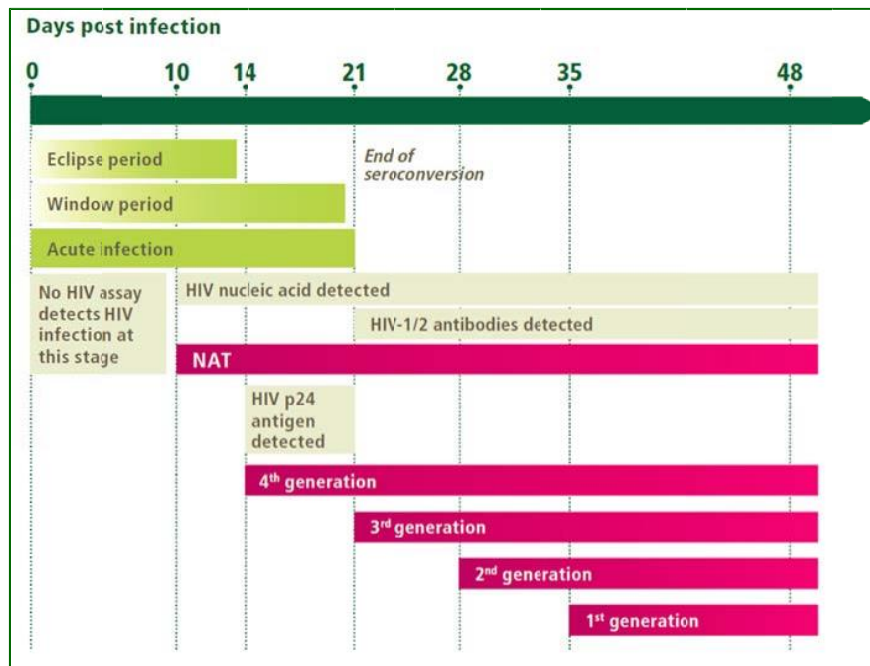


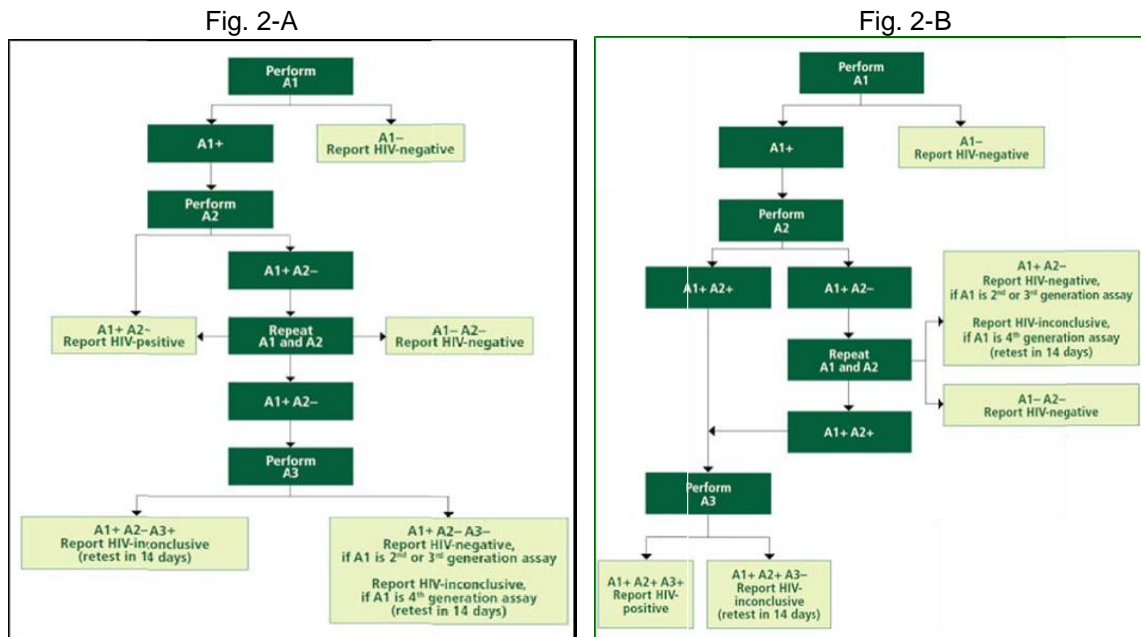
Figura 1. Detección de la infección de VIH con varios formatos y generaciones pruebas de diagnóstico in-vitro durante la historia natural de la infección. Fuente (7)

Teniendo como propósito mejorar la calidad de la prestación de los servicios y la aceptabilidad y la utilización de las pruebas de detección y la orientación en relación con el VIH, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda en muchos entornos el uso de pruebas rápidas de diagnóstico, en lugar de los medios de diagnóstico convencionales de laboratorio (5). Recomienda estrategias normalizadas para la realización de las pruebas, para incrementar al máximo la exactitud de los resultados y reducir al mínimo los costos. La estrategia más apropiada en cada situación depende fundamentalmente de: 1) los objetivos de las pruebas, 2) el tipo de epidemia de infección por el VIH y 3) de la prevalencia en la población destinataria (5).

Las estrategias aplican con todos los formatos de análisis del VIH y todas las combinaciones de formatos de la prueba (5). Es fundamental utilizar pruebas basadas en diferentes preparaciones de antígenos del VIH y en componentes diferentes del estuche, a fin de reducir al mínimo la posibilidad de resultados negativos falsos o positivos falsos cruzados (5). Estas estrategias se han elaborado dando por hecho, que todas las pruebas utilizadas para la detección del VIH ofrecen como mínimo una sensibilidad de 99% y una especificidad mínima de 98%, lo cual corresponde a un valor diagnóstico global de un resultado positivo de 99% (5) (7).

Se ha demostrado que las combinaciones de ensayos inmunoenzimáticos, las combinaciones de pruebas rápidas de diagnóstico o una mezcla de combinaciones de ambos tipos pueden ofrecer resultados tan fiables y en algunos

casos más fiables, que la combinación habitual de ensayos inmunoenzimáticos e inmunoelectrotransferencia, con un costo mucho menor (5).



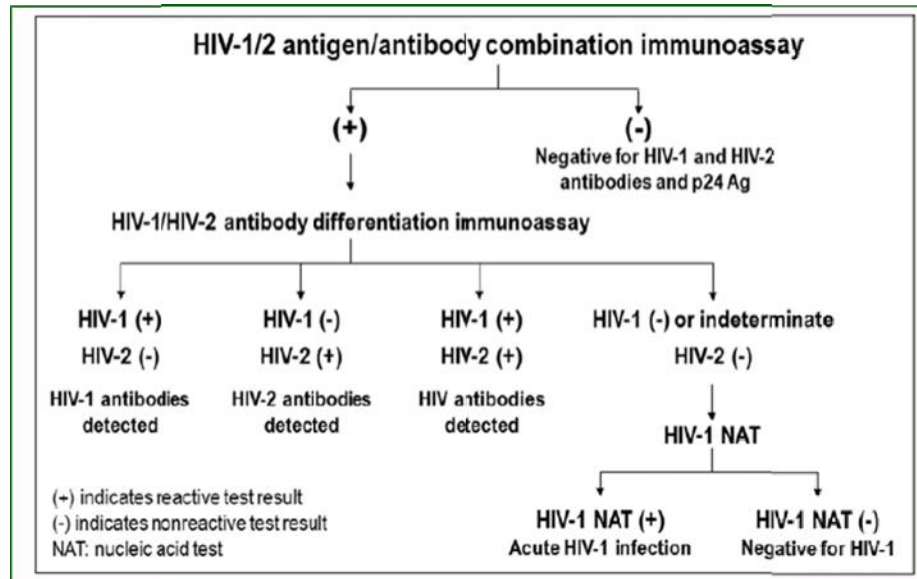
Figuras 2-A y 2-B. Estrategias de pruebas serológicas para el diagnóstico del VIH en entornos de alta prevalencia (2-A) y baja prevalencia (2-B). Fuente: (7).

Respecto a las pruebas confirmatorias, en la actualidad se aplica una selección de diferentes pruebas del VIH en un orden particular, con el fin de reducir al mínimo el número de análisis confirmatorios costosos (5). Las pruebas de confirmación se deben utilizar solo con el fin de resolver los casos con resultados no concluyentes (5). Por consiguiente, se recomienda que los países consideren la posibilidad de poner a prueba los algoritmos que utilizan pruebas rápidas de diagnóstico o combinaciones de pruebas rápidas y análisis inmunoenzimáticos en placas de microvaloración, en lugar de combinaciones de análisis inmunoenzimáticos e inmunoelectrotransferencia (5).

En algunos países los ensayos de inmunofluorescencia y “Western Blot” (WB) se siguen utilizando como ensayos suplementarios. Sin embargo, estos son menos sensibles en general, ya que son ensayos de primera generación, y además pueden ser costosos. Estos ensayos están siendo reemplazados por ensayos suplementarios rápidos más específicos que utilizan proteínas y/o péptidos recombinantes (7).

El algoritmo recomendado por el “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) acerca de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la infección por el VIH, es una secuencia de pruebas utilizadas en combinación, para mejorar la precisión del diagnóstico del laboratorio del VIH a partir de las pruebas de suero o plasma. Se incluyen pruebas de antígenos y de ácidos nucleicos (NAT) del VIH

porque los estudios en alto riesgo de VIH, demuestran que con las pruebas de anticuerpos podrían perderse un porcentaje considerable de las infecciones por VIH detectables por las pruebas virológicas. Las recomendaciones no incluyen pruebas rápidas del VIH-1/VIH-2 de combinación antígeno/anticuerpo o pruebas de ácido nucleico (NAT) para VIH-2 (2).



Figuras 3. Algoritmo de pruebas de laboratorio para VIH recomendado para muestras de suero o plasma. Fuente: (2)

El algoritmo anterior (Figura 3) aumenta la capacidad de detectar la infección aguda por VIH-1, sin embargo, ningún ensayo de laboratorio puede detectar la infección por el VIH inmediatamente después de su adquisición. La duración del período de eclipse entre la infección y la aparición de ARN del VIH no está bien definida a partir de los estudios clínicos y probablemente varía con la vía de infección, el tamaño del inóculo y la sensibilidad del NAT utilizado para detectar los ácidos nucleicos del VIH-1 (2).

El “Western Blot” (WB) para VIH-1 y los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) para VIH-1, previamente recomendados para hacer un diagnóstico de laboratorio de la infección VIH-1, ya no forman parte del algoritmo recomendado, debido a que la confirmación de resultados de inmunoensayo iniciales reactivos con estas pruebas, puede producir resultados falsos negativos o indeterminados en el curso temprano de la infección por VIH (2). El uso de “Western Blot” para VIH-1 para la confirmación de estos inmunoensayos, puede producir resultados falsos negativos durante la seroconversión (2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere la adopción de medidas costo-efectivas, respetuosas de los derechos del ser humano y acordes a la realidad local (4). Para el caso de Colombia, en Marzo de 2015 el Instituto Nacional de Salud

publicó el Protocolo de vigilancia en salud pública para el evento de VIH – SIDA, en donde se indican los algoritmos para diagnóstico en: 1) mayores de 18 meses, adolescentes y adultos no gestantes, 2) gestantes y 3) menores de 18 meses. En general las pruebas presuntivas pueden ser pruebas rápidas o enzimoimmunoanálisis (EIA) de tercera o cuarta generación. Como segunda prueba y posterior a un resultado reactivo, puede realizarse una prueba diferente, ya sea en formato de prueba rápida o de prueba EIA de tercera o cuarta generación. Si después de estos 2 resultados, el diagnóstico no es concluyente, como tercera prueba puede optarse por otra prueba rápida o prueba EIA de tercera o cuarta generación (diferente a la prueba presuntiva y a la segunda prueba) o por carga viral o “Western Blot”. Para el caso de las gestantes y en este punto, la única opción es realizar carga viral y ante un resultado no concluyente, se procede a realizar como cuarta prueba el “Western Blot” (3,4).

Según la Organización Panamericana de Salud (OPS) y la Organización Mundial de Salud (OMS), existen muchos modelos de prestación de servicios de orientación y pruebas de detección del VIH que se pueden escoger y la mayor eficacia se logrará con una combinación de modelos de prestación (5). Para concluir, cada país debe escoger el modelo de prestación de servicios de manera estratégica, considerando como criterios clave: 1) el tipo de epidemia, 2) la eficacia en función de los costos, 3) la equidad en el acceso y 4) los recursos existentes (5).

### Bibliografía

1. Buttò S, Sulígoi B, Fanales-Belasio E, Raimondo M. Laboratory diagnostics for HIV infection. *Ann Ist Super Sanità* 2010;46:24-33.
2. Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories. (2014). Quick Reference Guide—Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: updated recommendations. Estados Unidos: CDC.
3. Instituto Nacional de Salud, INS (2015). Protocolo de vigilancia en salud pública VIH – SIDA. Colombia: INS.
4. Ministerio de Salud y Protección Social, Fondo de Población de las Naciones Unidas – UNFPA (2014). Guía de práctica clínica basada en la evidencia científica para la atención de la infección por VIH/Sida en adolescentes (con 13 años de edad o más) y adultos. Colombia: MINSALUD.
5. Organización Mundial de la Salud, OMS (2013). Métodos de prestación de servicios de orientación y pruebas de detección del VIH: marco de un programa estratégico. Washington, D.C.: OPS.
6. World Health Organization, WHO (2004). HIV Assays: Operational Characteristics Report 14/Simple/Rapid tests. Ginebra: WHO.
7. World Health Organization, WHO (2015). Consolidated guidelines on HIV testing services 5cs: consent, confidentiality, counselling, correct results and connection. Ginebra: WHO.

## DIETA, NUTRICIÓN Y ALERGIAS

Javier Marrugo Cano

MD, Magister en Inmunología, Profesor Instituto de Investigaciones Inmunológicas Universidad de Cartagena, [jmarrugoc@unicartagena.edu.co](mailto:jmarrugoc@unicartagena.edu.co)

Las enfermedades alérgicas (AS, RA y DA) constituyen una problemática de salud pública para muchos países. Desde la década de los 60 estas vienen en aumento. Un estudio reciente determinó la prevalencia global de AS, mediante reporte de sibilancia, en un 8.6%. Dennis et al estimó prevalencias de AS, RA y DA en Colombia durante el año 1998 del 10.4%, 22.6% y 3.9%, respectivamente. En el 2009, el mismo autor muestra que la prevalencia de estas enfermedades es mayor, especialmente para RA y DA. En Cartagena de Indias (Bolívar, Colombia) se calculó una prevalencia de AS del 8.8% y de RA del 16.4%.

Actualmente el reporte de síntomas mediante cuestionarios es la metodología que se utiliza en la mayoría de estudios epidemiológicos donde se estima la prevalencia de este grupo de enfermedades. El estudio ISAAC (The International Study of Asthma and Allergy in Childhood) ha estimado la prevalencia de enfermedades alérgicas en niños en más de 105 países, incluyendo naciones donde nunca se había llevado a cabo esta medición, constituyéndose como el estudio epidemiológico más grande a nivel mundial, que además ha tratado de estandarizar la metodología para evaluar este grupo de enfermedades.

Uno de los hallazgos más sobresalientes del estudio ISAAC es la variabilidad de la prevalencia entre los países, inclusive dentro de sus comunidades, por ejemplo la diferencia de DA entre el país con menor prevalencia fue de 60 veces con respecto al de mayor prevalencia. Dicho contraste podría deberse a las limitaciones expuestas anteriormente; no obstante, se definieron mismos grupos etarios (niños entre 6 y 7 años, 13 y 14 años) y la estrategia para definir los casos fue la misma (cuestionario de reporte de síntomas). Aunque existen limitaciones propias del método, como el sesgo de memoria, la baja sensibilidad y los diversos idiomas, es poco probable que solo estas expliquen por completo las diferencias tan marcadas que se observan entre las diferentes regiones del mundo.

Las enfermedades alérgicas son consideradas complejas debido a que no existe un solo factor o un modelo que explique por completo la causalidad de las mismas. Una de las principales contribuciones de este tipo de iniciativas epidemiológicas, además de reconocer que las enfermedades alérgicas afectan a una gran parte de la población mundial, es la generación de hipótesis que expliquen, parcialmente, porque la prevalencia es mayor en ciertas poblaciones.

En múltiples estudios se ha reportado una la mayor prevalencia de enfermedades alérgicas y atopia en poblaciones urbanas que rurales. Lo anterior ha permitido

plantear algunos factores inherentes al urbanismo como los responsables en el incremento progresivo de estas a nivel mundial. La polución, la exposición a alérgenos, la condición de fumador pasivo, el mayor o menor consumo de algunos grupos de alimentos o nutrientes, la exposición a diversos tipos de helmintos se ha relacionado con una mayor prevalencia de alergias.

La hipótesis de la higiene, propuesta por Strachan a finales de los 80, plantea que el contacto con microorganismos infecciosos podría evitar el desarrollo de las enfermedades alérgicas, promoviendo la polarización de la respuesta inmunológica hacia un perfil Th1. Por lo tanto, el aumento de estas podría ser explicado por las condiciones más limpias en que los individuos habitan, resultado de un estilo de vida más urbano. Diversos estudios epidemiológicos se han diseñado para evaluar esta hipótesis, sin embargo los resultados no han sido consistentes.

El estilo de vida rural (nacimiento o crianza en una granja, contacto con ganado, consumo de leche no pasteurizada) ha mostrado, en algunos estudios, ser un factor protector para el desarrollo de las alergias, sin embargo no se han definido con exactitud cuáles son las exposiciones que determinan dicha protección, o si es un conjunto de ellas. El contacto con microorganismos se ha estudiado con variables asociadas como la exposición materna a animales de granja, vía del parto (vaginal vs cesárea), infecciones y uso de antibióticos en etapas tempranas de la vida, vacunaciones, asistencia a guarderías (infecciones adquiridas en la comunidad), infecciones parasitarias, y la concentración de endotoxina en el polvo de las casas, entre otras. Recientemente Ege et al. mostró que la diversidad de bacterias y hongos, valorada por técnicas de migración de DNA (Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple) y de cultivos, presentes en el polvo de las casas se relacionaba inversamente con el riesgo de sufrir de asma; además permitió identificar familias de bacterias que podrían ser las responsables del efecto protector del estilo de vida rural.

De esta manera, la hipótesis de la higiene suscita actualmente una interesante discusión que permita dilucidar como se generan las enfermedades alérgicas y cuáles son los factores implicados. Otro de los factores que ha venido tomando importancia en los estudios epidemiológicos es la dieta y algunos de sus componentes. El patrón de dieta mediterránea, y algunos nutrientes como las vitaminas A, D y E, el zinc, al igual que ciertas frutas y vegetales han mostrado en diversos estudios transversales y longitudinales su asociación protectora con el AS principalmente.

La dieta de la población ancestral mediterránea (norte de África y costa mediterránea europea) es caracterizada por una alta ingestión de alimentos vegetales como frutas y verduras, grandes cantidades de pan, cereales, legumbres, nueces, bajo consumo de productos lácteos, huevos y pequeñas cantidades de carne de res y de pollo. Además, esta dieta tiene un bajo contenido en grasas saturadas, alto contenido de carbohidratos, fibra, antioxidantes y un alto contenido de grasas

poliinsaturadas omega-3, proveniente principalmente del aceite de oliva y en algunas aéreas mediterráneas del consumo de pescado.

Algunos investigadores han estudiado la influencia de la dieta sobre las enfermedades atópicas analizando por grupos de alimentos, en vez de nutrientes individuales, lo que se denomina patrones dietarios. Un ejemplo de este tipo de estudios, fue el realizado por de Batle et al. en niños y madres en México, donde se encontró una asociación inversa entre ingesta de dieta mediterránea y el desarrollo de algunas enfermedades alérgicas. Utilizando cuestionarios de frecuencia de consumo y cuestionarios estandarizados de autopercepción para determinar la prevalencia de enfermedades alérgicas, los autores indagaron las dietas de los niños en los últimos 12 meses, la dieta de sus respectivas madres en el periodo de gestación y la frecuencia de estas enfermedades. Encontraron que la dieta mediterránea en los niños durante los últimos 12 meses estuvo inversamente asociada con asma permanente (OR = 0.60, 95% CI = 0.40–0.91) y rinitis permanente (0.64, 0.47–0.87), mientras que no encontraron ninguna asociación entre la alimentación prenatal con patrones dietarios mediterráneos y enfermedades alérgicas.

Para explicar los mecanismos por el cual el ambiente modifica la susceptibilidad de padecer las enfermedades alérgicas, se han postulado los cambios epigenéticos. La epigenética consiste en todas aquellas modificaciones en el ADN, la cromatina, las moléculas de RNA reguladoras y otros procesos que son independientes del código genético (herencia) pero que están relacionados con la expresión de genes. Los trabajos en donde se evalúa como los patrones dietarios pueden regular eventos epigenéticos en el contexto de las enfermedades alérgicas son escasos. Hollingsworth et al demostraron en un modelo murino de AS, que una dieta rica en donadores metilo tiene relación con una mayor severidad de la enfermedad. Al igual, identificó 82 loci asociados a genes que eran diferencialmente metilados después de una dieta rica en donadores metilo, lo que sugiere que los factores dietarios podrían modificar el riesgo de AS a través de un mecanismo epigenético.

## MARCADORES MOLECULARES Y GENÉTICOS

### VITAMINA D: ASPECTOS CLÍNICOS

Valeria Pastorino Casas  
MD, Especialista en Endocrinología – Argentina.

La vitamina D es una hormona esteroidea involucrada en el metabolismo óseo, cuya función principal es mantener la homeostasis cálcica. Se obtiene a través de la dieta y fundamentalmente por acción de los rayos ultravioleta B (UVB) en la

piel. No es una verdadera vitamina y se le considera una hormona, puesto que puede sintetizarse endógenamente, actúa en forma endocrina y su concentración no depende exclusivamente de aportes nutricionales.

Por otra parte, la vitamina D3 o colecalciferol se sintetiza en la piel a partir de la conversión del 7-dehidrocolesterol en previtamina D3 por efecto de los rayos UVB. Luego, la previtamina D3 se isomeriza a vitamina D3 en un proceso dependiente de la temperatura de la piel. La producción dérmica es regulada de tal manera que cuando hay exceso de exposición a rayos UVB se producen metabolitos inactivos que evitan la intoxicación (1). La vitamina D2 o ergocalciferol se genera a través de un proceso similar que ocurre en los vegetales.

La incorporación a través de la dieta es limitada dado que existen pocos alimentos naturalmente ricos en vitamina D (salmón, caballa, sardina, aceite de hígado de bacalao, atún, yema de huevo, hongos). Algunos lácteos y jugos están fortificados con vitamina D (2). La vitamina D que proviene tanto de la síntesis cutánea como de la ingesta, es hidroxilada a nivel hepático a 25(OH)D (calcidiol) por la enzima 25 $\alpha$ -hidroxilasa y luego en el riñón, a 1,25(OH) $_2$ D (calcitriol) por la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa. El calcitriol es el metabolito activo de la vitamina D. Cuando la síntesis de 1,25(OH) $_2$ D es suficiente, la 25(OH)D se transforma a nivel renal en el metabolito inactivo 24,25(OH) $_2$ D. La 1 $\alpha$ -hidroxilación renal está rigurosamente regulada siendo estimulada por la PTH, la hipocalcemia y la hipofosfatemia e inhibida por la misma 1,25(OH) $_2$ D, la hipercalcemia, la hiperfosfatemia y el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) (2).

Los diferentes metabolitos de vitamina D circulan unidos a una proteína ligadora (DBP) que tiene alta homología con la albúmina (2). La mayor parte de las acciones de la vitamina D están mediadas por el receptor de vitamina D (VDR), miembro de la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas. Al ingresar a sus células diana, el calcitriol se disocia de la DBP y se une al VDR, el cual sufre cambios conformacionales en su estructura tridimensional que le permiten transportarse hacia el núcleo, donde se heterodimeriza con el receptor del ácido retinoico (RXR). El complejo VDR/RXR se une a regiones promotoras del ADN para regular la transcripción génica (efecto genómico) (3). El calcitriol también puede unirse al VDR ubicado en caveolas de la membrana plasmática dando origen a segundos mensajeros lo que desencadena una respuesta rápida (efecto no genómico) (4).

Las acciones llamadas “clásicas” de la vitamina D consisten en promover la absorción intestinal de calcio y fósforo, la reabsorción renal de calcio y la movilización de calcio del hueso para mantener la calcemia en un rango normal (5). El VDR no se encuentra únicamente en el intestino, riñón y hueso, sino que se expresa en casi todos los tejidos humanos, con lo cual la vitamina D tiene funciones que van más allá del metabolismo óseo conocidas como acciones “no



clásicas” (5). Además, se ha demostrado que la piel, ganglio linfático, colon, mama, próstata, médula adrenal, páncreas, cerebro y placenta, expresan la  $1\alpha$ -hidroxilasa y producen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , que actúa en forma autocrina o paracrina regulando la proliferación y diferenciación celular y la función del sistema inmune (6). Estas acciones “no clásicas” de la vitamina D han sido motivo de numerosas investigaciones en los últimos años.

La hipovitaminosis D está ampliamente distribuida a nivel mundial, afectando aproximadamente a 1 billón de personas y representa un problema de Salud Pública. Existen ciertas situaciones o enfermedades que aumentan el riesgo de padecerla: baja exposición solar o uso de protectores solares, hiperpigmentación cutánea, vivir en latitudes elevadas, baja ingesta de vitamina D, síndromes de malabsorción, enfermedad renal crónica, insuficiencia hepática, diversos fármacos y obesidad entre otros (5).

La hipovitaminosis D produce raquitismo en los niños, mientras que en los adultos, la clínica es variable según el grado de deficiencia, pudiendo ocasionar osteomalacia, hiperparatiroidismo secundario con menor densidad mineral ósea (osteopenia u osteoporosis) y debilidad muscular con aumento de la probabilidad de caídas, llevando todo esto a un incremento del riesgo de fracturas (7). En los últimos tiempos, se ha vinculado al déficit de vitamina D con distintas afecciones, tales como diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular (hipertensión arterial, infarto, insuficiencia cardíaca), cáncer (especialmente de mama, próstata y colon), enfermedades autoinmunes (diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoidea, lupus, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis), infecciones, asma, esquizofrenia, depresión, y otras (8).

Incluso se ha asociado a la vitamina D con la mortalidad, siendo ésta menor en los pacientes con niveles adecuados de vitamina D y en aquellos suplementados (9).

También son relevantes las consecuencias de la hipovitaminosis D durante el embarazo. En la madre, provoca hiperparatiroidismo secundario y mayor riesgo de resistencia insulínica, preeclampsia y parto prematuro. En el neonato predispone a bajo peso, menor crecimiento posnatal, hipocalcemia y raquitismo congénito (8).

La medición del calcidiol sérico es el mejor indicador clínico del estatus nutricional de vitamina D. No es útil la determinación del calcitriol porque aun en situaciones de hipovitaminosis severa sus niveles se mantienen dentro del rango normal, a expensas de un hiperparatiroidismo secundario (2). Se considera como nivel sérico óptimo de  $25(\text{OH})\text{D}$  al valor que suprime la PTH circulante, permite una máxima absorción intestinal de calcio, mantiene una adecuada densidad mineral ósea, evita la osteomalacia y disminuye el riesgo de caídas y fracturas. Aunque existen controversias con respecto a este valor, la mayoría de los autores considera que el nivel sérico óptimo de  $25(\text{OH})\text{D}$  es  $\geq 30$  ng/ml y definen como

insuficiencia a valores entre 21 y 29 ng/ml y como deficiencia a aquellos <20 ng/ml (2). Todavía no hay evidencia suficiente para poder recomendar un punto de corte por encima del cual se producen los beneficios extraóseos pero este valor parecería ser similar o levemente más alto al nivel deseado para las acciones clásicas.

En los últimos años ha habido un importante incremento en la demanda a los laboratorios de determinaciones de vitamina D, ante las numerosas investigaciones sobre sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. Como consecuencia se han desarrollado varios ensayos automatizados para tratar de cubrir esa demanda, reemplazando los ensayos manuales. Las controversias que rodean la medición de 25(OH)D están directamente relacionadas con los problemas que existen para determinarla en el laboratorio: su naturaleza altamente hidrofóbica, su fuerte unión a la DBP, la presencia de múltiples metabolitos de vitamina D que pueden interferir en los ensayos, la falta de un método de referencia y de una estandarización internacional adecuada (10). Esta situación hace que existan en la literatura discrepancias en los resultados entre distintos autores al emplear diferentes metodologías para la medición de la 25(OH)D en los estudios de investigación. Actualmente se utilizan una gran variedad de métodos para medir a la vitamina D, cuyas diferencias ponen en duda el uso de un único valor de corte y sugieren que la prevalencia de déficit es dependiente del ensayo (10,11). Debido a esto se ha propuesto calcular un valor de corte específico para cada ensayo, lo que dificultaría el seguimiento del paciente en el tiempo. Los médicos deben estar al tanto de todas estas limitaciones para poder interpretar con cautela los resultados y tomar decisiones clínicas correctas.

Se ha propuesto a la cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS) con dilución isotópica como método de referencia. Además el NIH (National Institute of Health) junto al NIST (National Institute for Standards and Technology), el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) y la Universidad de Ghent en Bélgica han lanzado el Programa de Estandarización de Ensayos de vitamina D (VDSP) (del cual participan proveedores de ensayos) que ayudará a resolver la problemática con respecto a la medición de la vitamina D y así mejorar la práctica clínica y de salud pública en el mundo (12).

Para el tratamiento de la hipovitaminosis D pueden utilizarse tanto el ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) como el colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) (2). La suplementación puede ser diaria, semanal, quincenal, mensual o trimestral, y las dosis son variables. Cuando los intervalos entre dosis son largos conviene indicar vitamina D<sub>3</sub>, ya que su vida media sérica es mayor que la de D<sub>2</sub>. La ventana terapéutica es amplia, y el riesgo de intoxicación es bajo; casi nunca ocurre con niveles de 25(OH)D < a 150 ng/ml (11). Durante el tratamiento con vitamina D existen 2 etapas, una de corrección del déficit en la que se utilizan dosis altas, y otra de mantenimiento donde las dosis administradas tienen como objetivo mantener la concentración

sérica de 25(OH)D en el rango deseable (11). Los efectos adversos del tratamiento son muy raros e incluyen la hipercalcemia, la hipercalciuria y la litiasis renal (11). El interés por la vitamina D está en aumento por sus importantes implicancias clínicas, por lo que es necesario resolver las dificultades metodológicas actuales para poder seguir avanzando con los estudios de investigación y para que los médicos frente a sus pacientes puedan interpretar correctamente los resultados obtenidos y tomar decisiones adecuadas.

### Referencias:

1. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006, 92:4-8.
2. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(7):1911-30.
3. Barsony J, Prufer K. Vitamin D receptor and retinoid X receptor interactions in motion. *Vitamines and Hormones* 2002; 65:345-376.
4. Huhtakangas J, Olivera C, Bishop J, Zanello L, Norman A. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D-vitamin D $_3$  in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004; 18(11):2660-2671.
5. Holick M. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007, 357:266-81.
6. Zehnder D, Bland R, Williams M, McNinch R, Howie A, Stewart P, Hewison M. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitaminD $_3$ -1 $\alpha$ hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001; 86(2):888-894.
7. Lips P, Van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25(4):585-91.
8. Hossein-nezhad A, Holick M. Vitamin D for Health: A Global Perspective. *Mayo Clin Proc*. 2013; 88(7):720-55.
9. Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whitfield K, Wetterslev J, Simonetti RG, Bjelakovic M, Gluud C. Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 1:CD007470. doi: 10.1002/14651858.CD007470.pub3.
10. Erich Fradinger. Controversias en la medición de 25-hidroxivitamina D. *Actual. Osteol* 2014; 10(1): 85-90.
11. Sánchez A, Oliveri B, Mansur JL, Fradinger E, Mastaglia S. Diagnóstico, prevención y tratamiento de la hipovitaminosis D. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 2013; 50:140-56.
12. Sempos CT, Vesper H, Phinney K, Tienpoint L, Coates P. Vitamin D status as an international issue. National surveys and the problem of standardization. *The VDSP. Scand J Clin Lab Invest* 2012; 242:32-40.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES GENÉTICAS A TRAVÉS DE NGS: UTILIDADES Y DESARROLLO EN COLOMBIA

Jubby Marcela Gálvez Bermúdez

MD, Magíster en Epidemiología Genética. Magíster en Genética Humana

El desarrollo de técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) ha permitido el avance a gran escala en el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas, principalmente enfermedades mendelianas.

La secuenciación NGS se basa en el análisis simultáneo a través de secuenciación, de un número prácticamente ilimitado de genes, a un costo cada vez más accesible. La NGS, también conocida como secuenciación masiva en paralelo, actúa a partir de templados de ADN amplificados clonalmente o moléculas simples de ADN que son secuenciados en paralelo; a diferencia de la secuenciación convencional de Sanger, basada en la separación electroforética de productos de PCR, secuenciados en reacciones individuales.

Actualmente contamos con diferentes plataformas de NSG (Roche, Illumina, Life Technologies, etc.) que ofrecen cada vez mayor precisión con menores costos y tiempos de entrega de resultados. Estas plataformas difieren básicamente en su configuración, longitud de los reads (lecturas), frecuencia y tipos de errores en su secuencia, rendimiento, métodos químicos para la secuenciación y costos.

Las enfermedades de origen genético, aunque individualmente son raras, afectan una proporción importante de individuos a nivel mundial, por lo que su confirmación diagnóstica es esencial para el buen manejo de estos pacientes. El diagnóstico molecular, es la herramienta de confirmación para la mayoría de ellas, especialmente las heredades de manera mendeliana. Por tanto, las técnicas de NGS son una herramienta de altísima utilidad en muchas de estas enfermedades, principalmente aquellas que: 1. Tienen gran heterogeneidad genética, lo que significa que son causadas por más de un gen (muchas de ellas por decenas de genes); 2. Son causadas por genes de gran tamaño, por lo que su análisis a través de secuenciación de Sanger puede ser de alto costo e implicar tiempos de resultados muy elevados; o 3. Tienen un cuadro clínico heterogéneo y/o ambiguo, lo que hace que su diagnóstico y aproximación clínica sea extremadamente difícil, mientras que una aproximación molecular podría ser la respuesta a la confirmación diagnóstica.

Para este último grupo de enfermedades, la secuenciación de NGS ha permitido lo que hace unos años era inimaginable: llegar a un diagnóstico confirmatorio a partir de la genética y no de la clínica. El estudio diagnóstico que ha permitido este logro es la secuenciación de Exoma, en la que se secuencian y analizan todas las regiones codificantes del genoma, o en ocasiones, solo aquellas que han sido relacionadas con enfermedades genéticas mendelianas (más de 4.800 genes) de manera simultánea.

En Colombia, hasta hace poco este tipo de estudios eran de acceso limitado por varias razones: 1. No se contaban con las plataformas necesarias para la realización de este tipo de estudios en nuestro país, por lo que estas pruebas se realizaban en países como Estados Unidos o en Europa; y 2. La implementación de estas plataformas parecía ser de alto costo y difícil procesamiento.

En la actualidad, en Colombia contamos con las plataformas necesarias para la realización de NGS, y aún más importante, contamos con el conocimiento necesario y alianzas estratégicas para el análisis de datos, que es un punto crucial a la hora de generar resultados de este tipo de estudios.

## BIOLOGÍA MOLECULAR A LA VANGUARDIA

### TREINTA Y TRES AÑOS DE UN SISTEMA ULTRAMICROANALÍTICO EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. NUEVOS ENSAYOS MOLECULARES Y PRUEBAS RÁPIDAS

Anny Armas Cayarga

Bioquímica, MSc en Microbiología, Jefa del departamento de Diagnóstico Molecular, Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba. anny.armas@cie.cu

#### Introducción

La tecnología SUMA o sistema ultramicroanalítico contiene una línea de productos cuya finalidad es contribuir a la prevención y mejoramiento de la calidad de vida de miles de personas en Cuba y en el mundo. Es producida por el Centro de Inmunoensayo (CIE, La Habana, Cuba), que con más de 28 años de experiencia se ha especializado en el desarrollo y producción de sistemas diagnósticos, así como de estrategias para programas de salud. Hasta la fecha se han desarrollado e introducido en el sistema de salud cubano 33 estuches diagnósticos para 19 patologías.

Se cuenta con una experiencia de 33 años de uso del SUMA en Cuba y en el mundo en diferentes programas de salud como: (1) El programa de atención materno infantil, que incluye el ensayo de cuantificación de la alfafetoproteína para la detección pre-natal de defectos en el cierre del tubo neural, los ensayos de detección de anticuerpos al virus de inmunodeficiencia humana 1+2 (VIH 1/2) y del antígeno de superficie de la hepatitis B para el control de la transmisión vertical de estos agentes infecciosos, y los ensayos para la pesquisa neonatal de Hipotiroidismo Congénito, Fenilcetonuria, Hiperplasia Adrenal Congénita, Deficiencia de Biotinidasa y Galactosemia; (2) El programa de Vigilancia Epidemiológica para el control de enfermedades transmisibles como el VIH-SIDA, las hepatitis B y C, el Dengue, la lepra y la enfermedad de Chagas, empleando los sistemas diagnósticos para la pesquisa de estas enfermedades; (3) Programa de certificación de sangre y órganos, para evitar la transmisión parenteral del VIH, el VHB y el VHC; y (4) Programa para el control de enfermedades crónicas no

transmisibles, donde se incluyen la diabetes, la enfermedad renal crónica y los tumores malignos.

La utilización de la tecnología SUMA en Cuba, ha tenido un impacto en la reducción de la mortalidad infantil y en el control de la transmisión vertical del VHB y del VIH. Cuba es el primer país del mundo en lograr la eliminación de la transmisión de madre a hijo del VIH. Con el empleo de esta tecnología se han podido diagnosticar y tratar a tiempo 976 niños con enfermedades heredo metabólicas como resultado de la pesquisa neonatal, evitando el retraso mental severo irreversible o la muerte en estos niños. Se ha logrado la reducción de la transmisión de enfermedades infecciosas como la hepatitis B, C, Chagas, Lepra, VIH y Dengue. La aplicación del SUMA en el programa para el control de enfermedades crónicas no transmisibles ha posibilitado el diagnóstico precoz del cáncer de próstata y colon, logrando aumentar las posibilidades terapéuticas para estas enfermedades. En el programa de control del cáncer cervicouterino, se ha obtenido un incremento en la cobertura y calidad de la pesquisa citológica, una disminución de los resultados no útiles y un aumento en la capacidad de diagnóstico precoz y tratamiento del cáncer cervicouterino y sus lesiones precursoras.

### **Nuevas pruebas rápidas de la tecnología SUMA**

La tecnología SUMA cuenta hoy con nuevas pruebas rápidas útiles en la pesquisa de diferentes enfermedades infecciosas como las hepatitis B, C, el Dengue, la Sífilis y la infección por el VIH 1/2. Todos los ensayos tienen un sistema interno de control de la calidad que garantiza que el procedimiento se ha ejecutado apropiadamente.

El ensayo SUMARAPID VHC es una prueba inmunocromatográfica de doble antígeno para la detección visual de anticuerpos contra el VHC en suero y plasma humano. Emplea 100 µL de muestra. La comparación de este ensayo con el UMELISA HCV (Tecnosuma, CIE, Cuba) empleando 138 muestras de suero clasificadas por el UMELISA, de las cuales 86 son positivas a anticuerpos del VHC y 52 negativas, mostró una sensibilidad del 97,7% y una especificidad del 100%. En la evaluación se incluyeron, además, cinco muestras positivas en período de ventana, según el ensayo comercial Hepanostika HCV (Biomérieux) y las cinco resultaron positivas por el ensayo SUMARAPID VHC. Los resultados obtenidos avalan el empleo de esta prueba para la pesquisa de la hepatitis C en grupos de riesgo.

El ensayo SUMARAPID Dengue NS1 es una prueba inmunocromatográfica de doble anticuerpo para la detección visual del antígeno NS1 del virus del dengue en suero, plasma y sangre total. Emplea 100 µL de muestra. Para la evaluación del ensayo se emplearon 155 muestras de suero de pacientes con infección por Dengue, tomadas entre el primer y cuarto día de comienzo de los síntomas, clasificadas como positivas por el ensayo Platelia Dengue NS1 Ag, BioRad, USA; 41 muestras de suero procedentes de pacientes con infección por Dengue, tomadas

entre el primer y cuarto día de comienzo de los síntomas, clasificadas como negativas por el ensayo comercial Platelia Dengue NS1 Ag, BioRad, USA y 32 muestras de suero procedentes de pacientes no infectados con el virus del Dengue. De las 155 muestras positivas a NS1, se detectaron 139 positivas por el ensayo SUMARAPID Dengue NS1, obteniéndose una sensibilidad clínica del 89,7% (De las 16 muestras falsas negativas, 9 tuvieron bajos niveles de positividad en el ELISA de referencia). La especificidad clínica fue del 100% (73/73 negativas). Los valores de sensibilidad y especificidad clínica obtenidos se consideran adecuados para este tipo de ensayo y se encuentran en correspondencia con lo reportado por otras pruebas de similar principio por lo que se recomienda el uso de esta prueba en el diagnóstico temprano de la infección por Dengue en cualquier área de salud.

El ensayo SUMARAPID Combo Dengue es una prueba inmunocromatográfica que permite la detección visual de anticuerpos IgG, IgM y antígeno NS1 del virus del Dengue en suero, plasma y sangre total. La prueba consta de dos casetes, uno para la prueba de antígeno NS1 de Dengue y el otro para la prueba de anticuerpos IgG/IgM específicos de Dengue. Para NS1: Se ensayaron 49 muestras (10 negativas y 39 positivas, evaluadas por la prueba SUMARAPID Dengue NS1 y por el ELISA comercial Platelia Dengue NS1 Ag (BioRad, USA). La sensibilidad clínica fue de un 94,9% (37/39 positivas) y la especificidad clínica, de un 100%. Al comparar la prueba de anticuerpos IgG/IgM de Dengue con el Panbio dengue test kit (Australia), empleando 206 muestras positivas y 253 negativas, se obtuvo una sensibilidad del 99,0% y una especificidad del 96,8%. Se evaluaron además, las 16 muestras con infección confirmada por Dengue y resultado positivo por Platelia Dengue NS1 Ag y negativo por SUMARAPID Dengue NS1. Diez de los 16 falsos negativos del SUMARAPID Dengue NS1, se detectaron positivos en el ensayo SUMARAPID Combo Dengue, pues resultaron positivos a IgM, lo cual avala la utilización de este último para el diagnóstico temprano de la infección por Dengue.

El ensayo SUMARAPID Sífilis es una prueba inmunocromatográfica para la detección visual de anticuerpos contra el *Treponema Pallidum* (TP) en suero, plasma y sangre total. Se emplearon 109 muestras de suero provenientes de individuos con sífilis activa, confirmados por las pruebas de detección rápida de reagentes plasmáticos (RPR) [Centis, Cuba] y Hemaglutinación de *Treponema pallidum* (HATP) [Centis, Cuba]; 96 muestras de sueros negativos a sífilis, confirmados por RPR y HATP. Se obtuvo un 100% de sensibilidad y especificidad clínica, resultados que avalan el empleo de esta prueba rápida para la pesquisa activa de Sífilis.

Los ensayos SUMARAPID VIH 1/2 (3 líneas) y SUMARAPID VIH 1/2 (en saliva), son pruebas inmunocromatográficas de doble antígeno, para la detección visual de anticuerpos contra el VIH 1/2 en suero/plasma y saliva, respectivamente. Para la comparación del ensayo SUMARAPID VIH 1/2 (3 líneas) con el ELISA de referencia (UMELISA HIV 1+2 RECOMBINANT, CIE, Cuba), se emplearon 104 muestras positivas al VIH 1/2 (de ellas, 23 positivas al VIH-2) y 37 muestras negativas. Todas

las muestras positivas fueron confirmadas por Western Blot. El ensayo SUMARAPID VIH 1/2 (3 líneas) mostró una sensibilidad clínica del 98,1% (102/104 positivas) y una especificidad clínica del 100% (37/37 negativas). La evaluación del ensayo SUMARAPID VIH 1/2 (en saliva) se realizó empleando 103 muestras de saliva positivas al VIH 1/2, procedentes de pacientes con diagnóstico confirmado de VIH, y 44 muestras de saliva de seronegativos al VIH 1/2. Todos los individuos participantes en el estudio fueron evaluados además con el ensayo SUMARAPID VIH 1/2 (3 líneas) y el UMELISA HIV 1+2 RECOMBINANT, que en este caso se empleó como prueba de referencia. La sensibilidad clínica obtenida para el ensayo SUMARAPID VIH 1/2 (en saliva) fue del 94,17% (97/103 positivas) y se obtuvo un 100% de especificidad clínica (44/44 negativas). Ambos ensayos pueden ser empleados en la pesquisa de la infección por VIH cuando se requiere de un resultado rápido.

El SUMARAPID VIH 1/2-Sífilis es una prueba inmunocromatográfica de doble antígeno, para la detección visual de anticuerpos contra el TP y el VIH 1/2 en suero, plasma y sangre total. Se evaluó la sensibilidad y especificidad del ensayo empleando 20 muestras con diagnóstico confirmado de VIH, 8 muestras de suero positivas a sífilis, caracterizadas por el ensayo SYPHILIS SCREENING Recombinant (Elisa tipo “sandwich” para la detección cualitativa de anticuerpos totales (IgG+IgM) al TP, 27 muestras de suero negativas a ambas infecciones, procedentes de donantes del Banco de Sangre Provincial de La Habana y 92 muestras con coinfección VIH-Sífilis. Se obtuvo una sensibilidad clínica del 100% para Sífilis (100/100 positivas) y del 100% para VIH (112/112 positivas) mientras que la especificidad clínica en ambos casos fue del 100% (27/27 negativas), recomendando el uso de este ensayo para la pesquisa de ambas infecciones cuando se requiere de un resultado rápido en las áreas de salud.

El SUMARAPID COMBO VHB es una prueba rápida, inmunocromatográfica, diseñada para la determinación cualitativa del VHB en suero o plasma humano. Permite la detección visual de los cinco marcadores principales en una infección por el VHB. Estos son: el antígeno de superficie del VHB (HBsAg), anticuerpos contra el antígeno de superficie del VHB (Anti-HBs), el antígeno e del VHB (HBeAg), anticuerpos dirigidos contra el antígeno e del VHB (Anti-HBe), y anticuerpos contra la región “core” del VHB (Anti-HBc). El volumen de muestra empleado es de 80 µL. La evaluación de la sensibilidad y especificidad clínica del ensayo SUMARAPID COMBO VHB se muestra por marcadores individuales. HBsAg: Sensibilidad 100% (200/200) y especificidad 98,3% (118/120); Anti- HBs: Sensibilidad 99,2% (119/120) y especificidad 96,0% (192/200); HBeAg: Sensibilidad 98,5% (64/65) y especificidad 96,9% (247/255); Anti-HBe: Sensibilidad 98,2% (54/55) y especificidad 97,0% (257/265); y Anti-HBc: Sensibilidad 97,5% (117/120) y especificidad 95,5% (191/200). Se recomienda el uso de esta prueba para la realización de estudios epidemiológicos.



## Nuevos ensayos moleculares de la tecnología SUMA

Dada la necesidad de confirmar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas se han desarrollado nuevos ensayos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real, con elevada sensibilidad, especificidad y amplio rango dinámico, lo que permite que puedan ser empleados en la confirmación y el seguimiento del efecto terapéutico de los antivirales en los pacientes infectados.

El SUMASIGNAL VHC es un ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real basado en un sistema de extracción por partículas magnéticas. Tiene una sensibilidad de 25 UI/mL y una especificidad clínica y analítica del 100%. Presenta un rango lineal de 50-1x10<sup>8</sup>UI/mL. Cuando se comparó con el ensayo comercial COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test v2.0 (Roche Diagnostics), empleando 36 muestras clínicas, se obtuvo una alta correlación entre ambas pruebas ( $r=0,952$ ).

El SUMASIGNAL VHB (un paso) es un ensayo para la cuantificación por PCR en tiempo real del ADN del VHB en suero o plasma humano. Emplea 5  $\mu$ L de muestra y no requiere de un paso de extracción del ADN, siendo un ensayo muy sencillo y rápido (2,5 horas), con muy buena sensibilidad (100 UI/mL), una especificidad del 100% y un rango de cuantificación de 500 – 5 x 10<sup>9</sup>UI/mL. La comparación con el ensayo comercial COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV test v2.0 (Roche Diagnostics), empleando 87 muestras clínicas, mostró una correlación alta entre ambos ensayos ( $r=0,926$ ).

El SUMASIGNAL VPH 16/18 es un ensayo de PCR en tiempo real, apropiado para el diagnóstico de una infección por los virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (tipos 16 y 18) y para la pesquisa temprana del cáncer cervical. Emplea 5  $\mu$ L de muestra (secreciones del tracto reproductivo) y no requiere de un paso de extracción del ADN del VPH. Tiene una sensibilidad de 400 cop/mL, una especificidad clínica y analítica del 100% y un amplio rango dinámico (400-4x10<sup>9</sup>cop/mL). Al comparar este ensayo con la prueba de referencia CLART HPV2 (Genómica, España), empleando 85 muestras clínicas, se obtuvo un índice de concordancia kappa de 0,95 entre ambas pruebas, que es considerado de “muy bueno” por encontrarse en el rango de 0,81 a 1.

## Conclusiones

La tecnología SUMA, surgida en un inicio como una necesidad imperiosa de disminuir la mortalidad infantil en Cuba, ha contribuido en estos 33 años a mejorar la calidad de vida de la población cubana y a dar solución a las nuevas necesidades de salud en Cuba y en otros países del mundo.

## **BANCO DE SANGRE PÚBLICO DE CORDÓN UMBILICAL Y TERAPIA CELULAR, ACTUALIDAD Y DESARROLLO EN COLOMBIA**

**Bernardo Camacho Rodríguez**

MD, MSc. Director Científico Banco de Sangre, Tejidos y Células Hemocentro Distrital- Secretaría de Salud de Bogotá.

Las células madre de la sangre o células hematopoyéticas (denominadas también células progenitoras hematopoyéticas), son responsables de formar y renovar continuamente las células de la sangre (glóbulos rojos, blancos y plaquetas), durante la vida de un individuo. El trasplante de estas células, con una fuerte evidencia científica, es utilizado en todo el mundo, para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades hematológicas malignas y no malignas y algunos tumores sólidos.

La sangre obtenida del cordón umbilical una vez se produce el nacimiento, contiene una cantidad significativa de células madre progenitoras hematopoyéticas, que adecuadamente recolectadas, procesadas y criopreservadas bajo estrictos protocolos y criterios de calidad, son almacenadas, para estar disponibles en los casos en que exista una correcta indicación de trasplante, con el propósito de reconstituir la médula ósea y formar los distintos elementos sanguíneos, esenciales para conservar la vida.

El primer trasplante alogénico relacionado (familiar), de sangre de cordón umbilical fue realizado por la Dra. Gluckman hace casi 30 años en el Hospital Necker de París a un niño que padecía anemia de Falconi. Desde entonces empezaron a establecerse en varias ciudades del mundo, especialmente de EEUU y la Comunidad Europea, bancos públicos de sangre de cordón umbilical al servicio de la comunidad.

Un aspecto que ha estimulado la creación de bancos de sangre de cordón umbilical públicos, lo constituye el hecho que solamente entre el 25 al 30% de los pacientes candidatos a trasplante alogénico (cuando el donante es alguien diferente al mismo paciente) tienen en su familia un hermano 100% compatible HLA para trasplante. Así, el 70% de los pacientes, depende de encontrar un donante compatible fuera de su familia, a través de alguno de los registros de donantes existentes en el mundo

Este hecho motivó la creación de los bancos públicos de cordón umbilical y la posibilidad de acceder a sus registros, dado que estas células, están almacenadas y disponibles rápidamente, haciendo que el tiempo para disponer de ellas se reduzca significativamente. Además, por su fácil consecución y disponibilidad, es posible almacenar células provenientes de los diferentes grupos étnicos de un territorio, incrementando las posibilidades para que un paciente dado encuentre un producto compatible en un país o una región determinada.

Un banco de sangre de cordón umbilical (BSCU) es un centro especializado responsable de la selección de la madre/bebé donante, y por la colección, procesamiento, pruebas de laboratorio, almacenamiento y distribución de las unidades de sangre de cordón umbilical. Los BSCU de carácter público, se caracterizan porque la participación en el programa es voluntaria a través de la donación, y las unidades almacenadas pueden ser utilizadas para el tratamiento de cualquier paciente compatible HLA que las requiera, en cualquier lugar del mundo. Dado que las unidades almacenadas se encuentran prácticamente listas para distribución, el tiempo para efectuar los trasplantes se reduce significativamente.

Actualmente existen más de 150 bancos públicos SCU, distribuidos alrededor del mundo, concentrados mayoritariamente en Europa, Estados Unidos, Australia y Japón. Estos BSCU tienen más de 600.000 unidades almacenadas y disponibles para trasplante. Se estima que cerca de 30.000 trasplantes alogénicos de células madre de cordón umbilical han sido realizados hasta la fecha en el mundo.

Para los bancos de SCU es indispensable establecer protocolos en los cuales se descartan las unidades que no cumplen con los criterios de control biológico en cuanto a volumen mínimo de SCU, números de células totales y progenitores hematopoyéticos, presencia de contaminación bacteriana o fúngica y de evidencias de enfermedades infectocontagiosas. Así mismo deben existir protocolos validados de fraccionamiento, criopreservación, etiquetado para el almacenamiento, y tipificación de moléculas del sistema HLA (este último únicamente para bancos públicos de SCU), bajo un sistema gestión de calidad.

Se ha determinado en la práctica, que los criterios de selección y control biológico entre BSCU públicos y privados no son los mismos. Los BSCU autólogos o privados, manejan estándares más bajos en cuanto a controles biológicos y microbiológicos, debido a que estos bancos, prácticamente no realizan descarte de las unidades recolectadas. Por su parte, el descarte por volumen y celularidad en los bancos públicos varía entre el 60% y el 80% de las unidades colectadas, de acuerdo con los criterios de celularidad establecidos en cada banco, por lo general, el sostenimiento de los bancos públicos de SCU es de carácter estatal.

“La relación de unidades de SCU trasplantadas que provienen de los bancos públicos, en contraste con las que provienen de los privados es de 300:1. Para el año 2010, sólo 100 de 900.000 unidades de SCU almacenadas en bancos privados, habían sido trasplantadas. Esto se debe en parte a la baja calidad de las unidades almacenadas en bancos privados, y probablemente a que el uso autólogo de la SCU no está indicado clínicamente, pues muchas de las enfermedades que son susceptibles de tratamiento con CPH, llevan una impronta genética que estaría presente en las células trasplantadas. Los bancos privados en contraste con los públicos, no parecen tener una misión y un objeto terapéutico claro, razón por lo que su existencia ha sido cuestionada ética y científicamente”.

Como ha sido reconocido, son inicialmente altos los costos de inversión requeridos, para implementar y poner en operación, un Banco de Sangre de Cordón Umbilical Público- BSCU, con el propósito de obtener por procesamiento, células madre progenitoras o precursores hematopoyéticos-CPH; inversión que en la mayoría de los países, es asumida por el estado, pero que una vez puesto al servicio de la población, generan, una alta retribución a la sociedad, en términos sanitarios y de políticas públicas asistenciales y del derecho a la salud, al constituirse como una alternativa terapéutica con evidencia científica, para el tratamiento enfermedades hematológicas malignas, no malignas, inmunodeficiencias congénitas, diversos síndromes metabólicos, así como el desarrollo de cientos de ensayos clínicos para el tratamiento o cura de otras enfermedades. Un aspecto importante a considerar en lo que se ha llamado la segunda generación de los BSCU, es su utilidad como fuente de investigación de la biología de la células madre, la inmunología de los trasplantes, la inmunoterapia y la medicina regenerativa.

Son varias las razones que justifican la implementación de un BSCU público en un país como Colombia-BSCU, entre otras su gran población y el incremento de patologías con indicación de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas-Tx CPH. En Colombia, según cifras del Departamento Administrativo Nacional de Estadística, la primera causa de muerte en los niños de 5 a 14 años es el tumor maligno del tejido linfático, de los órganos hematopoyéticos y tejidos afines. De otra parte, la recolección de sangre de cordón umbilical local, permite aumentar la probabilidad para que los pacientes candidatos con indicación de Tx CPH puedan encontrar fácilmente unidades histocompatibles, con mayor oportunidad, acceso, equidad y menor costo para el sistema de salud.

La Secretaría de Salud de Bogotá a través del Banco de Sangre, Tejidos y Células-Hemocentro Distrital, ha implementado y puesto en operación, el Primer Banco Público de Sangre de Cordón Umbilical-BSCU de Colombia, financiado con recursos públicos del orden distrital y recursos provenientes del Sistema General de Regalías- Fondo de CT&I, banco que inició operaciones en el año 2013. La meta en una primera fase, es disponer de 5.000 unidades de Sangre de Cordón Umbilical-USCU de primera calidad. Un criterio fundamental es que en dicho inventario, estén representadas muestras de sangre de cordón, de todas las minorías étnicas del país, por lo cual serán tomadas unidades de sangre de cordón de todas las regiones del país, a través del desarrollo del denominado Programa Cordial, que significa crear una red de unos 30 centros hospitalarios y maternidades seleccionadas, que apoyarán y participarán de este programa de donación, que tiene el carácter de ser voluntario y altruista, esto quiere decir que las unidades obtenidas, procesadas, criopreservadas y disponibles en este BSCU público, estarán al servicio de toda la población colombiana local, y apoyados en el registro internacional estar disponible para los residentes colombianos en el exterior y pacientes en cualquier lugar del mundo, cuya USC sea histocompatible y tenga indicación de Tx CPH. Colombia es el 4° país en Latinoamérica en contar con un BSCU público.

De otra parte, bajo el anterior proyecto se adelanta el montaje de la primera sala blanca GMP de la Unidad de Terapia Celular del Hemocentro Distrital, que busca desarrollar investigaciones a partir de aislar, cultivar, caracterizar, manipular, expandir y modificar células madre, tanto progenitores hematopoyéticos como mesenquimales, cuyo propósito es: 1. Obtener productos de terapia somática celular, en donde células o tejidos vivos son usados para restaurar o mejorar la función de órganos o tejidos. 2. Obtener productos de terapia génica, en donde a través de vectores virales se manipula el material genético de componentes celulares o tisulares para su posterior uso en restaurar o mejorar la función de órganos y tejidos y 3. Obtener productos de ingeniería tisular, en donde distintos tipos de componentes celulares y tisulares en combinación con otro tipo de biomateriales son usados para regenerar, reemplazar o reparar órganos o tejidos.

El BSCU público del Hemocentro Distrital, se complementará con la creación de un Registro Nacional de donantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas-CPH, cuyo proyecto está en curso y pretende en un lapso de 10 años crear un registro de 100.000 donantes de CPH, con lo cual se incrementarán considerablemente las probabilidades de encontrar donantes histocompatibles de CPH, especialmente para los pacientes que en Colombia y otros que en cualquier lugar del mundo tengan indicación de trasplante de CPH.

## REFERENCIAS

1. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013; 122:491–8.
2. Barker JN, Byam CE, Kernan NA, et al. Availability of cord blood extends allogeneic hematopoietic stem cell transplant access to racial and ethnic minorities. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010; 16:1541–8.
3. Bone Marrow Donors Worldwide. Cord Blood Registries. Disponible en: [http://www.bmdw.org/index.php?id=statistics\\_cordblood](http://www.bmdw.org/index.php?id=statistics_cordblood).
4. Camacho B, Gómez A, Implementación del Banco Público de Células Madre de Cordón Umbilical y de una Unidad de Terapia Celular en el Hemocentro Distrital de la Secretaría de Salud de Bogotá DC. Documento presentado al Sistema General de Regalías, Fondo CT&I 2012
5. Cutler C, Ballen KK. Improving outcomes in umbilical cord blood transplantation: state of the art. *Blood Rev*. 2012 Nov;26(6):241-6.
6. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321:1174-8.
7. Henao J, Pacheco EC, Arboleda GD, Gómez A, Restrepo LM, Por Qué un Banco Público de Células Madre de Sangre de Cordón Umbilical en Colombia?? *Salud UIS* 2005; 37:85- 92
8. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*. 1996; 335:157-166.
9. Orjuela G, Franco L, Camacho B, Estudios Técnicos para el Establecimiento y Organización del Registro Nacional de Donantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas en Colombia. Documento presentado al Sistema General de Regalías, Fondo CT&I Hemocentro Distrital, Secretaría de Salud de Bogotá, 2015
10. Perdomo AM, Camacho B, Banco de Sangre de Cordón Umbilical: Actualidad y perspectivas; Hemocentro Distrital, Secretaría de Salud de Bogotá DC 2015
11. Perdomo AM, Orjuela G, Camacho B, Banco Público de Sangre de Cordón Umbilical Documento Técnico de Operación. Hemocentro Distrital Secretaría de Salud de Bogotá DC 2014

12. Rocha V & Gluckman E. Cord blood banks and umbilical cord blood transplantation in children and adults. In: Treleaven J & Barret AJ (eds). *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice*. Oxford, UK: Churchill Livingstone Elsevier, 2008 cap. 22
13. Salguero G, Terapia Celular y Medicina Regenerativa: Actualidad y Perspectivas, Hemocentro Distrital, Secretaría Distrital de Salud, 2015
14. Sullivan MJ. Banking on cord blood stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:555-63.

## MARCADORES MOLECULARES EN PRUEBAS DE PATERNIDAD Y GENÉTICA FORENSE: UN RECORRIDO DESDE SUS ORÍGENES

Beatriz Martínez Alfaro

Profesor Asociado, Coordinadora Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena

El genoma de un individuo está conformado, por partes iguales provenientes de padre y madre. Este hecho, resulta de una sencilla explicación científica en la cual se ha definido un total de 46 cromosomas para cada persona, de los cuales 23 se heredan del padre y 23 de la madre. La mayoría de éstos, sin embargo, pueden alterar su contenido propiamente paterno o propiamente materno, en un proceso denominado recombinación, en el cual, de manera aparentemente aleatoria, se intercambia la información de cromosomas homólogos, es decir, del 1 materno y el 1 paterno, del 2 paterno y el 2 materno, del 3 paterno y el 3 materno, etc. De esta manera, a través de aproximadamente 70.000 generaciones que tiene la humanidad (de 200.000 años de antigüedad), hay una enorme probabilidad de haber permeado los cromosomas paternos, o masculinos, con información proveniente de los cromosomas maternos, o femeninos, y viceversa. Un solo cromosoma escapa a este proceso de recombinación: el cromosoma-Y.

El descubrimiento desde 1980 de los polimorfismos del ADN en el genoma humano y la demostración de que esta variabilidad está ampliamente distribuida en las poblaciones humanas, permitió que los científicos en el área genética reconocieran el enorme potencial que ofrece el ADN en identificación humana y forense. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionó adicionalmente una poderosa herramienta para los análisis forenses y de paternidad al igual que los continuos avances tecnológicos en la biología molecular, unidos al desarrollo informático.

Desde hace 30 años son varios los marcadores que se han utilizado; como los loci o marcadores de VNTR (número variable de repeticiones en serie), STR (repeticiones cortas en serie) SNPs y SNVs (polimorfismos de nucleótidos únicos y variables) y que se encuentran disponibles hasta nuestros días mediante paquetes comerciales, lo que ha facilitado enormemente su estudio. El valor del análisis de ADN como herramienta de investigación es extraordinario debido al gran número de genotipos que existe en la población, el cual conduce a una alta probabilidad de

encontrar patrones genéticos exclusivos de cada individuo. Esto significa una enorme probabilidad de excluir cualquier individuo falsamente acusado y una posibilidad muy pequeña de apareamiento erróneo y resolviendo con mucha confianza cualquier disputa de paternidad.

Los marcadores genéticos en cromosomas sexuales también han sido objeto de gran estudio y utilidad en identificación humana. El cromosoma-Y está constituido por ADN de 40 mm de longitud (60 megabases), de los cuales el 95% no recombina y el 5%, llamado porción pseudoautosómica, puede recombinar su contenido con el cromosoma X. Se considera hoy en día, por consiguiente, que en este cromosoma tenemos ADN cuyo origen es exclusivamente masculino. De igual manera, se ha postulado que el ADN contenido en las mitocondrias por fuera del núcleo de todas nuestras células, es de origen exclusivamente femenino, puesto que el espermatozoide pierde todas sus mitocondrias en el momento de penetrar en el óvulo. Así, siguiendo este razonamiento, se ha postulado una “Eva mitocondrial” como metáfora del ancestro femenino común para toda la humanidad. En efecto, los estudios de las secuencias del ADN extraído de la mitocondria en individuos de diferentes poblaciones parecen converger en una sola predecesora, que habría vivido en el África hace 200.000 años.

Con el mejoramiento de las técnicas de secuenciación de ADN, la descripción del genoma humano y el desarrollo de bases de datos de haplotipos, la identificación humana y el diagnóstico de enfermedades a partir del estudio del ADN, se han convertido en prácticas confiables y rutinarias en los planos clínicos, legales e investigativos. Estas nuevas tecnologías producen grandes volúmenes de datos a bajo costo (en relación con las plataformas actuales) que se aplican en general a varias preguntas de la genética médica, la biología evolutiva, la antropología molecular, la filogenia, la epidemiología y meta genómica. Esta es la llamada secuenciación de próxima generación (NGS).

Como resulta evidente tras una revisión exhaustiva de la literatura científica de los últimos años, son muchos los marcadores genéticos que han tenido buena aceptación, siempre apuntando a la utilización de los más informativos y que presenten mayor simplicidad técnica.