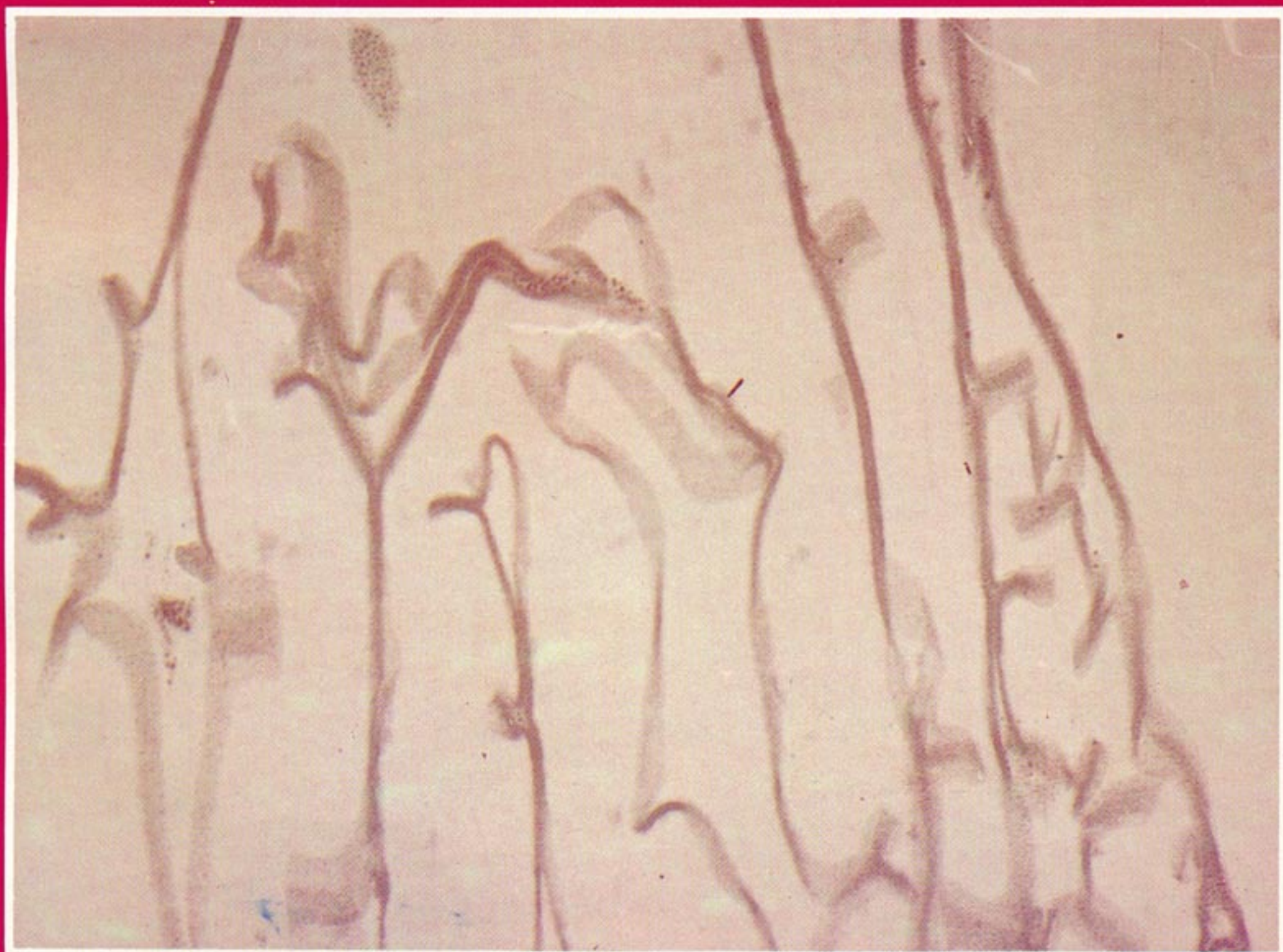


ACTA CIENTIFICA



**DE LA SOCIEDAD
VENEZOLANA
DE BIOANALISTAS
ESPECIALISTAS**

VOLUMEN I • N° 1 • 1992





ACTA CIENTIFICA

DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS

Volumen I • Nº 1 • 1992

JUNTA DIRECTIVA 1991-1993

Lic. ANA MONZON DE OROZCO
Presidente

Dr. AXEL RODOLFO SANTIAGO
Vice-Presidente

Lic. ZULEYMA MOROCOIMA DE G.
Sec. General

Lic. FIDIAS HERRERA DE HERRERA
Sec. Científica

Lic. ZORAIDA NATALE
Sub-Sec. Científica

Lic. CARMEN LLATAS DE SZCZERBAN
Sec. de Finanzas

Lic. MARISA GATTI
Primer Vocal

Lic. RAFAEL ROA
Segundo Vocal

Lic. LIGIA SALINAS DELPINO
Tercer Vocal

COMITE ASESOR:
La Junta Directiva

COMITE DE REDACCION:
Lic. ROSANDRA MAZZALI I.
Lic. ANA MONZON DE OROZCO

PORTADA: Membranas de tumor de
mama observadas al microscopio elec-
trónico.

Trabajo Experimental: Lic. Ana Monzón
de Orozco.

Fotografía: Dra. María Esther Guevara.

Contenido

Editorial 2

Incidencia y cuantificación de micoplasmas
en saliva de pacientes con enfermedad periodontal
y en sujetos con encía sana.
Lic. Rosandra Mazzali de Ilja 3

Acetilación en adultos: determinación
de la velocidad.
Lic. Pina Balducci S., Dr. Victor Balducci S. 15

Prevalencia de anticuerpos contra virus respiratorio
sincicial en población infantil menor de 5 años.
Lic. Milagros Portillo S., Lic. María E. Maioriello V. ... 25

Estudio clínico-micológico de micosis superficiales
de una comunidad militar en Puerto Ayacucho,
Territorio Federal Amazonas. *Lic. Rosanna
Martín A., Lic. Ma. de los Angeles Rivas G.* 31

Eficacia diagnóstica de la reacción indirecta
de anticuerpos fluorescentes para el estudio
de la esquistosomiasis mansoni.
*Lic. Jacqueline Serra H., Lic. Eyra D. Rangel E.,
Lic. Zulay Rached U., Lic. Lizbeth C. Rengel R.* 45

Normas para la publicación de trabajos
en el Acta Científica de la Sociedad Venezolana
de Bioanalistas Especialistas 56

Editorial

Quiero que mis primeras palabras sean de reconocimiento y gratitud para quien con su espíritu de colaboración y generosidad hizo posible la realización de este número de **ACTA CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS**, me refiero a la colega y amiga Lic. Rosandra Mazzali de Ilja.

En estos tres años que me ha tocado estar al frente de la Sociedad, la realización de nuestro Organó de Divulgación Científica, constituyó una prioridad, hoy la emoción embriaga al espíritu transformándose en una realidad tangible. Gracias a Dios por brindarnos la salud, las ganas de trabajar, la creatividad y la oportunidad de presentar este primer número y así seguir avanzando con responsabilidad y compromiso en el desarrollo de nuestra profesión.

Esta revista se distingue en su primera edición con dos trabajos que fueron el Premio Científico de la Sociedad, otorgado a profesionales del Bioanálisis y tres trabajos del premio "Franca Billi" para estudiantes de Bioanálisis, destacando de esta manera la importancia de esta actividad científica, lo cual redundará en promoción de la misma y así en el cumplimiento de nuestro objetivo, el estímulo para quienes demuestren la vigencia de su creatividad y que contribuyan a la divulgación de los conocimientos científicos.

Mi agradecimiento a todos los que hicieron posible esta revista, que pusieron todo de sí para alcanzar una Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas mejor.

Colegas a ustedes dedicamos especialmente este logro.

Lic. Ana Monzón de Orozco
Presidente de la S.V.B.E.

INCIDENCIA Y CUANTIFICACION DE MICOPLASMAS EN SALIVA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL Y EN SUJETOS CON ENCIA SANA

Rosandra Mazzali de Ilja (*)

RESUMEN

Es ampliamente conocido que el nicho ecológico de los micoplasmas bucales lo constituye tanto el saco gingival en los pacientes con periodontitis (PP), como el surco gingival en los sujetos con encía sana (ES), diseminándose de allí a la saliva, y por ende a toda la cavidad bucal.

Los objetivos de este trabajo fueron: detectar la incidencia y cuantificar la concentración de micoplasmas en 30 PP y en 50 sujetos con ES, para comprobar si hay diferencia entre ellos -En segundo lugar evaluar "in vitro", la supervivencia de *M. salivarium* ante diferentes agentes, tanto físicos (temperaturas de 4, 22, 37 y 40°C), como químicos (sustancias empleadas como antisépticos en la higiene de la boca).

Para la primera parte se tomaron muestras de saliva, tanto con capilares como con hisopos de algodón, en ambos grupos. Con las mismas se determinó tanto la incidencia como la cuantificación de las colonias de micoplasmas aislados, siguiendo

técnicas recomendadas por el C.D.C. de Atlanta. Las curvas de supervivencia de *M. salivarium* se realizaron tomando muestras de la mencionada cepa cultivada en medio líquido, a intervalos de 48 horas, desde el día cero hasta el 40º, cuantificando posteriormente la concentración del microorganismo en cada una de ellas.

Para las pruebas con agentes químicos se impregnaron discos de 8 mm de diámetro, con los diferentes antisépticos, colocándolos sobre cultivos semiconfluentes de *M. salivarium* en agar.

Los resultados demostraron un porcentaje de positividad para micoplasmas del 80% en los PP y del 50% en los de ES, siendo las concentraciones del 5.0×10^3 a 8.0×10^6 para los primeros y de 3.0×10^2 a 4.5×10^4 en el segundo grupo ($P < 0.001$).

En relación a las pruebas de supervivencia, comprobamos que *M. salivarium* se mantuvo hasta 32-34 días a temperaturas de 4, 22 y 37°C, mientras que a 40°C se inactivó a partir del 8º día. En cuanto a los agentes químicos, ninguno demostró ser capaz de inhibir el crecimiento de la citada cepa.

(*) Bioanalista-Microbiólogo, Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela (UCV).

Este trabajo se hizo acreedor al Premio: Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, año 1990.

Conclusiones: tanto la incidencia, como la concentración de micoplasmas, fueron mayores entre los casos con EP, en relación a los sujetos con ES.

Sólo temperaturas iguales o superiores a 40°C con capaces de frenar el desarrollo de *M. salivarium*, en cambio ninguno de los antisépticos evaluados, tuvo acción contra dicha cepa, pese a tratarse de microorganismos carentes de pared celular. Todo ello explica, en parte, el por qué de la persistencia de dicha especie como colonizador crónico de la cavidad bucal, en un alto porcentaje de la población.

OBJETIVOS

1. Determinar la incidencia de micoplasmas en la saliva de pacientes con enfermedad periodontal y en sujetos con encía sana, para establecer relación entre los dos grupos.
2. Evaluar 2 métodos para la toma de las muestras de saliva: tubo capilar tipo microhematocrito hisopo de algodón.
3. Cuantificar la presencia de micoplasmas en cada grupo, con el fin de comprobar si hay diferencias significativas.
4. Determinar la supervivencia de una cepa de *Mycoplasma salivarium*, aislada de un paciente con periodontitis, ante diferentes agentes, tanto físicos (diferentes temperaturas de incubación), como químicos (antisépticos más comúnmente empleados en la higiene de la cavidad bucal). Todo ello con el fin de determinar el por qué de la cronicidad de la colonización de dichos microorganismos.

INTRODUCCION

"La enfermedad periodontal es una de las afecciones más difundidas de la humanidad. No hay nación ni región del mundo que se vea libre de ella, y en su mayor parte tiene una alta frecuencia, afectando aproximadamente a la mitad de la población infantil, y a casi toda la población adulta".

World Health Organization: Technical Report Series

Nº 207, página 3, 1961.

La enfermedad periodontal constituye en la actualidad un grave problema de salud pública en todo el mundo. Las estadísticas varían entre las

diversas poblaciones, pero es consenso general que dicha afección es la principal causa de la pérdida de dientes en la población adulta mayor de 35 años de edad. Sin embargo no es una enfermedad exclusiva del adulto, ya que comienza mucho antes de que sea necesaria la extracción dentaria; ya a los 15 años 4 de cada 5 personas tienen gingivitis, y en aproximadamente el 4% hay periodontitis. No todas las gingivitis de edades tempranas evolucionan hacia enfermedad periodontal, pero con muy pocas excepciones, la periodontitis que destruye la dentadura de los adultos, comienza con una gingivitis (Carranza 1984).

Etiología de la enfermedad periodontal:

En la etiología de la enfermedad gingival y periodontal intervienen tanto factores locales como generales. Los primeros son los que provienen del medio que rodea el periodonto, mientras que los generales se originan en el estado del paciente. Los factores locales inducen inflamación, que es el proceso patológico principal de la periodontitis, mientras que los factores generales condicionan la respuesta periodontal a los locales, de tal manera que con frecuencia el efecto de los irritantes locales (bacterias y sus productos) es agravado por el estado general del paciente (mecanismos inmunológicos).

Los microorganismos juegan un papel muy importante en la etiología de la enfermedad periodontal, como factores desencadenantes, perpe-tuantes o complicantes. Está ampliamente demostrado que la localización selectiva de las bacterias en diferentes sitios anatómicos de la cavidad bucal, depende de su capacidad de adherirse a determinada superficie, lográndolo por varios mecanismos: mediante agregación salival, gracias al principio electrostático, por síntesis de polímeros extracelulares, por presencia de fimbrias o por simple adherencia física (Sabelli 1985).

Evidencias aportadas en la última década indican que las principales vías de entrada de las bacterias al tejido periodontal son: a través del epitelio de unión, del surco y/o saco gingival. En el cuadro Nº 1 están resumidos la mayor parte de los mecanismos de interacción entre los microorganismos y el hospedero en la enfermedad periodontal.

Criterios que determinan cuándo un microorganismo es periodontopatógeno:

Si bien el criterio clásico de reconocer la etiología bacteriana de un determinado proceso infeccioso humano, debe seguir los postulados de Koch, éstos no pueden ser aplicados en su totalidad en el estudio de la enfermedad periodontal, pues las infecciones bucales están asociadas a una interrelación compleja de factores. Por ello Socranski en 1977 sugirió como alternativa a los postulados de Koch, 5 criterios que reflejan el actual conocimiento de la relación de determinado agente, con la enfermedad periodontal:

1. El número de microorganismos incriminados, debe estar incrementado en el sitio patológico, e inversamente, debe reducirse o eliminarse en los sitios sanos.
2. Si el agente etiológico es suprimido, la enfermedad debe detenerse.
3. La respuesta del hospedero puede suministrar una guía importante ante el papel de ciertos microorganismos en determinada enfermedad. Un incremento o disminución de respuesta celular y/o la mediada por anticuerpos, ante cierta especie, en la enfermedad periodontal, sugiere un papel de esa bacteria en el proceso infeccioso.
4. Demostración del poder patógeno de ciertas bacterias incriminadas en la citada enfermedad, en animales de experimentación.
5. Virulencia bacteriana.

Se calculan entre 300 y 400 las especies microbianas que pueden recuperarse de la placa dental, entre microorganismos cultivables y no cultivables, correspondientes a los siguientes géneros: *Actinobacillus*, *Bacteroides*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Campylobacter*, *Bacterionema*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Eikenella*, *Haemophilus*, *Micrococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Vibrio*, *Selenomonas*, *Rothia*, *Arachnia*, *Acidaminococcus*, *Peptococcus*, *Brahnamella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Wolinella*, *Mycoplasma*, *Candida*, *Trichomonas*, *Entamoeba*, etc.

De todos ellos los más incriminados actualmente como causantes de enfermedad periodontal son los siete primeros géneros, aunque todos los demás de una u otra forma cooperan en el proceso inflamatorio que acompaña dicha afección. Sin embargo en la última década, gracias a numerosos estudios, han aparecido claras evidencias que incluyen al género *Mycoplasma*, en particular la especie *M. salivarium*, como miembros de la flora periodontopatógena.

Los micoplasmas son considerados como habitantes normales de la cavidad bucal, formando parte de su microbiota. Las especies de la familia *Mycoplasmataceae* que pueden hallarse en dicho sitio anatómico son: *M. salivarium*, *M. orale*, *M. buccale*, *M. faucium*, y eventualmente *Ureaplasma urealyticum* y *M. hominis*, siendo las dos primeras las más frecuentes.

El primer aislamiento de micoplasmas en cavidad bucal, a partir de muestras de saliva, fue realizado hace 4 décadas (Morton 1951); posteriores estudios demostraron la amplia distribución de dichos microorganismos en diferentes nichos de la boca y en diversas patologías (Burnet 1959, Barile 1960, Shklair 1962, Razin 1964, Serene 1967, Engel 1970, Kumagai 1971 y Watanabe 1967, 1972). *M. salivarium* ha sido aislado con más frecuencia del saco gingival de pacientes con enfermedad periodontal que en sujetos con encía sana (Engel 1970, Kumagai 1971, Watanabe 1972, 1986, Perrone 1987), siendo además la especie de micoplasma predominante en placa dental (Kumagai 1971, Uchida 1981, Perrone 1987). Las principales evidencias que apoyan la correlación entre la presencia de *M. salivarium* a elevadas concentraciones y periodontitis, son:

a. Elevados títulos de anticuerpos contra dicha especie en pacientes con la mencionada enfermedad (Kumagai 1971, Watanabe 1986), así como anticuerpos IgM producidos contra la IgG en animales de experimentación (Watanabe 1987).

b. La liberación de histamina al producirse el contacto entre el microorganismo y los leucocitos (Parkinson 1975a)

c. La fagocitosis de micoplasmas por parte de los leucocitos, como consecuencia de la liberación de enzimas lisosomales (Parkinson 1975b).

C U A D R O N º 1
INTERACCION MICROORGANISMOS-HOSPEDERO
EN LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

MICROORGANISMOS	Cocos Gram + Actinomyces sp. bacterias Gram-	Bacteroides sp. Fusobacterium sp. Selenomonas sp. Mycoplasma Treponema	Bacteroides de pigmentación negra	Actinobacillus actinomycetencoMitans Capnocytophaga
MECANISMOS DE ACCION	Componentes moleculares, enzimas, endotoxinas.	Comp. molecul. Factores inhibitorios de quimiotaxis; actividad fibrinolítica) Enzimas (colagenasa, tripsina, fosfolipasa). Sustancias tóxicas: endotoxinas factor citotóxico.	cápsula, polisacáridos, enzimas : colagenasa, tripsina, fibrinolisisina, hialuronidasa, heparina, ribo y desoxiribonucleasa. indol, amoniaco, hidrógeno sulfurado metilmercaptano ácidos grasos	Comp. moleculares enzimas sustancias tóxicas: endotoxinas leucotoxinas
RESPUESTA HOSPEDERO	activación del complemento, quimiotaxis; PMN-macrófagos Inflamación alergia tipo I	PMN-macrófagos muerte de los PMN linfocitos B linfocitos T complemento	Lesiones de tejidos blandos reabsorción de tejido óseo	Enzimas lisosomales alergia tipos I, II y III alergia tipo IV
	ENFERMEDAD GINGIVITIS	PERIODONTITIS	PERIODONTITIS	PERIODONTITIS PERIODONTITIS JUVENIL LOCALIZADA

Modificado de Slots 1982 y Sabelli 1985.

d. La inducción experimental de hipersensibilidad retardada por parte de *M. salivarium* en conejos (Matsuura 1978).

Además se ha comprobado el efecto micoplásmico de extractos de polimorfonucleares in vitro (Dajani 1969), así como la inducción de citotoxicidad en linfocitos normales de ratón, mediada por la presencia de una especie de ratón: *M. arthritidis* (Cole 1980).

e. Estudios por microscopia electrónica han demostrado presencia de micoplasmas en el epitelio oral del saco gingival de pacientes con periodontitis (Carranza 1983, Jung 1981, Newman 1984, Saglie 1985), así como en eritrocitos (Razin 1980).

f. Además dichos microorganismos poseen una gran variedad de mecanismos bioquímicos, tales como: lipólisis, proteólisis, hemólisis, hemadsorción, hemaglutinación, hidrólisis de arginina se-

guida por eliminación de altas concentraciones de amoníaco, actividades estas que facilitan su adherencia y la de otros patógenos a la célula hospedadora, causando diversos tipos de alteraciones en la misma.

Varias investigaciones reportan la presencia de *M. salivarium* como agente causante de gingivitis y periodontitis (Kumagai 1971, Freedman 1968, Watanabe 1972), así como en encía crónicamente inflamada (Freedman 1968), en periodontitis crónica (Saglie 1982a). También se observó en muestras de placa dental en pacientes con síndrome de Papillón-Lefevre (Jung 1981) no habiéndose encontrado en cambio en pacientes edentulos (Razin 1964), o en concentraciones muy escasas (Watanabe 1971).

Se postula que la presencia de micoplasmas bucales en elevadas concentraciones depende de varios factores presentes en el surco y/o saco gingival, tales como: condiciones microaerofilicas, factores nutricionales presentes en los detritus celulares y/o a una relación simbiótica con el resto de la microbiota del área.

PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

Pacientes:

Se escogieron 80 individuos que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, para tratamientos diversos, dividiéndose en 2 grupos de acuerdo al aspecto de su encía:

a. 50 mostraron encía sana, con una profundidad de surco gingival igual o menor a 3 mm. La edad de dicho grupo, que se tomó como control, estuvo comprendida entre 15 y 50 años, con una media de 32; 27 del sexo femenino y 23 del masculino.

b. 20 pacientes con enfermedad periodontal, con una profundidad de saco gingival mayor de 3 mm. Dentro de este grupo se incluyeron: 5 con periodontitis juvenil, 1 con síndrome de Papillón-Lefevre y 24 con periodontitis del adulto. Las edades estuvieron comprendidas entre 12 y 53 años, con una media de 30; 18 del sexo femenino y 12 del masculino.

Los criterios para la evaluación del estado de la encía de todos estos sujetos fueron los empleados por la Cátedra de Periodoncia de esta Facultad,

realizándose la toma de las muestras bajo la supervisión de profesores y/o estudiantes de postgrado en dicha especialidad.

Toma de las muestras de saliva:

Se hizo de 2 maneras:

a. Aspirando la muestra con tubos capilares de 80 x 1 mm, del tipo empleado para microhematocrito en laboratorio clínico, pero sin heparina, colocado en la región lingual de los molares inferiores.

b. Impregnando un hisopo de algodón, estéril, con saliva y frotando simultáneamente la encía de los molares, en la misma región previamente citada. Cada muestra fue colocada en tubos que contenían 2 ml de caldo PPLO con 1000 UI/ml de penicilina, enviándose inmediatamente al laboratorio.

Siembra de las muestras:

Las muestras fueron procesadas de inmediato al llegar al laboratorio; en ambos casos se mezclaron bien con la ayuda de un vortex, para la elución del material, luego se retiró tanto el tubo de hematocrito como el hisopo, de los respectivos tubos, procediéndose a su siembra. La misma se realizó tanto en medio líquido (caldo PPLO con arginina, suplementado con suero de caballo y extracto de levadura) como en medio sólido (agar suplementado, similar al caldo), a razón de 0,1 ml por placa de Petri de 60 mm de diámetro y de 0,4 ml por vial con 3,6 ml de medio líquido. La siembra en placas se hizo por duplicado y empleando 2 diluciones de factor 10 (1:10 y 1:100, además del puro); la incubación de las mismas se llevó a cabo en condiciones anaeróbicas, empleando el sistema Gas Pak de BBL, por períodos de 72 a 96 horas. Las fórmulas de los medios empleados para el aislamiento de micoplasmas, fueron las recomendadas por el Center for Diseases Control de Atlanta (Velleca 1980).

Cuantificación de micoplasmas:

La cuantificación se realizó contando el número de colonias de micoplasmas observado en las diluciones de los cultivos en agar, con ayuda de un microscopio estereoscópico con aumento total de 100X, calculando las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Aislamiento de la cepa de M. salivarium OD-87:

El aislamiento se realizó a partir de la saliva de un paciente con periodontitis, sembrada en agar, clonada, cultivada en caldo e identificada por el método de inhibición del crecimiento con el antisero homólogo.

Identificación de la cepa de M. salivarium OD-87:

La identificación de la mencionada cepa se llevó a cabo por 2 procedimientos: por inhibición del crecimiento con el antisero específico (Clyde 1964) y por microscopia electrónica de transmisión.

Para el primer método se sembró una placa de Petri con el medio arriba señalado, con una concentración de micoplasmas de 1.0×10^4 /ml, colocándose en forma equidistante, los 5 discos impregnados con los respectivos antiseros de cepas bucales: *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. orale*, *M. faucium*, *M. buccale*, suministrados por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland (tramitados por la OPS de Caracas). Se incubó en anaerobiosis por 3 días.

Microscopia electrónica de transmisión:

Para ello se concentraron 500 ml de cultivo de la cepa *M. salivarium* OD-87 en caldo con arginina, por centrifugación a 40.000 rpm por 1 hora, resuspendiéndose el sedimento en un volumen de 0,5 ml de solución salina fosfatada pH 7.2 (concentración 100X). Posteriormente se fijó con una solución de glutaraldehído al 2% en el mismo tampón, durante 2 horas, igual tiempo se aplicó ácido ósmico al 1%. Luego se procedió a la deshidratación del material en diferentes concentraciones de alcohol etílico, desde 50% hasta 100%, se incluyó en Epon, dejándose polimerizar por 48 horas a 60°C. Los cortes se realizaron con microtomo Poster-Blum MT-28, tiñéndose con acetato de uranio y citrato de plomo; la observación se hizo en microscopio electrónico Hitachi H-500.

Curvas de supervivencia de la cepa de M. salivarium OD-87 a diferentes temperaturas:

Se realizaron mediante tomas de cultivos en medio líquido de la referida cepa, incubados respectivamente a 0, 22, 37 y 40°C, desde el día cero hasta el 40º, a intervalos de 48 horas. Todas las muestras se mantuvieron congeladas a -20°C hasta

concluir el experimento, al cabo de lo cual se sembraron en placas de Petri, determinándose los títulos a las 72 horas de incubación a 37°C (en UFC/ml).

Pruebas de supervivencia con los agentes químicos de la cepa M. salivarium OD-87:

Se evaluaron las siguientes sustancias: 4 enjuagues bucales (Fluorinse, Fluocaril, Oraldine y Listerine), 2 agentes oxidantes (Amosan y agua oxigenada de 10 volúmenes), 3 anti-inflamatorios (Laimoqualin, Tantum y Gencivol) y 3 cremas dentales (Crest, Colgate y Pepsodent). Como controles se emplearon discos de tetraciclina de 30 ug/ml, antimicrobiano altamente efectivo contra *M. salivarium*.

Con todas las sustancias líquidas se impregnaron discos de 8 mm de diámetro, mientras que con las pastosas se hicieron previamente suspensiones al 10% en caldo PPLO; todos estos agentes químicos se emplearon tanto puros como diluidos 1:10. Los discos impregnados se colocaron en forma equidistante en placas de Petri sembradas con la referida cepa a una concentración de 1.0×10^4 /ml UFC, en forma similar a la descrita anteriormente.

RESULTADOS

La incidencia de micoplasmas obtenida para los dos grupos de pacientes evaluados fue la siguiente: 50% (25/50) para los de encía sana (grupo control) y del 80% (24/30) para los de enfermedad periodontal.

En cuanto a la cuantificación de dichos microorganismos (cuadro N° 2) encontramos que en el primer grupo las concentraciones variaron entre 3.0×10^2 y 4.5×10^4 (media: 3.5×10^3) mientras que para el segundo estuvieron entre 5.0×10^3 y 8.0×10^6 (media: 1.0×10^5), con un valor de $P < 0,001$.

Las concentraciones mas elevadas de micoplasmas correspondieron a los casos de periodontitis juvenil y al síndrome de Papillón-Lefèvre (ver cuadro N° 2).

No hubo diferencia significativa entre los conteos realizados con los 2 tipos de muestras (hisopos y capilares de microhematocrito).

La identificación de la cepa de *M. salivarium* OD-87, cuyas colonias típicas con aspecto de "hue-

C U A D R O N º 2

CONTAJES DE COLONIAS DE MICOPLASMAS EN LOS DOS GRUPOS DE SÚJETOS EVALUADOS EN UFC/ML

Grupo control (N=50)			Grupo con periodontitis (N=30)		
Nº	edad	contaje (UFC/ml)	Nº	edad	contaje (UFC/ml)
1	29	0	1	51	1.9 x 10 ⁴
2	32	0	2	48	9.0 x 10 ⁵
3	25	1.2 x 10 ²	3	40	4.4 x 10 ⁴
4	20	7.1 x 10 ³	4	35	8.1 x 10 ³
5	41	0	5	16*	5.4 x 10 ⁶
6	47	0	6	18*	7.0 x 10 ⁶
7	15	3.0 x 10 ²	7	53	8.2 x 10 ³
8	42	8.0 x 10 ²	8	29	5.0 x 10 ³
9	40	1.2 x 10 ³	9	18*	3.2 x 10 ⁶
10	35	0	10	38	0
11	28	2.0 x 10 ⁴	10	36	5.0 x 10 ⁴
12	26	5.2 x 10 ²	11	29	8.6 x 10 ⁵
13	20	0	12	31	2.4 x 10 ⁴
14	48	0	14	28	4.5 x 10 ⁴
15	31	1.4 x 10 ³	15	39	0
16	50	4.3 x 10 ⁴	16	45	0
17	28	0	17	30	8.6 x 10 ⁵
18	30	2.5 x 10 ³	18	12**	8.0 x 10 ⁶
19	19	0	19	41	9.0 x 10 ⁵
20	36	1.8 x 10 ²	20	31	0
21	40	0	21	27	5.4 x 10 ⁴
22	43	1.6 x 10 ²	22	25	2.0 x 10 ⁵
23	29	0	23	21	4.8 x 10 ⁴
24	32	0	24	14*	6.8 x 10 ⁶
25	26	4.5 x 10 ⁴	25	16*	1.8 x 10 ⁶
26	39	2.5 x 10 ³	26	28	0
27	19	0	27	31	3.6 x 10 ⁴
28	24	0	28	36	8.8 x 10 ³
29	23	0	29	31	0
30	31	1.1 x 10 ³	30	30	7.8 x 10 ⁵
31	32	0			
32	45	6.0 x 10 ²			
33	49	0			
34	31	0			
35	35	3.5 x 10 ²			
36	39	2.5 x 10 ³			
37	26	1.2 x 10 ⁴			
38	23	8.0 x 10 ²			
39	24	0			
40	31	0			
41	37	0			
42	40	1.6 x 10 ²			
43	43	0			
44	27	7.5 x 10 ²			
45	37	0			
46	45	1.0 x 10 ⁴			
47	28	0			
48	27	2.6 x 10 ³			
49	36	1.4 x 10 ²			
50	31	0			

* Pacientes con periodontis juvenil

** Pacientes con síndrome de Papillón - Lefévfe

vo frito" observamos en la Foto N° 1, dio un claro halo de inhibición alrededor del disco que contenía el antisuero homólogo.

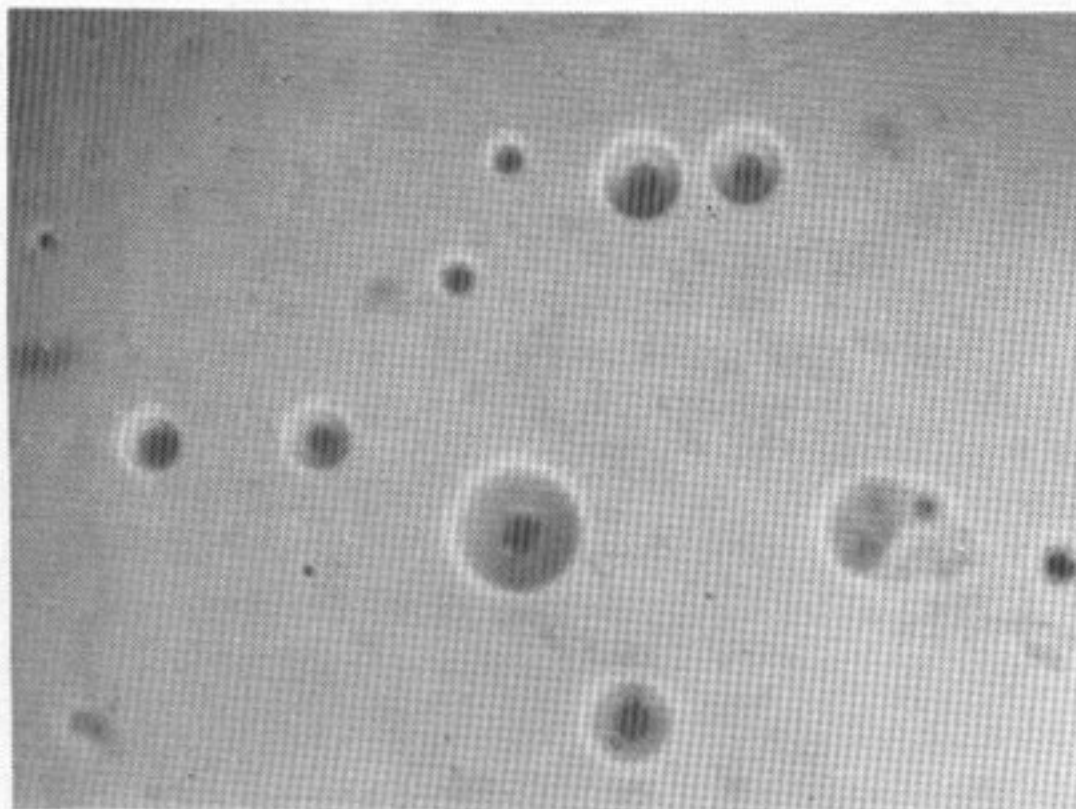


FOTO 1: COLONIAS TÍPICAS DE MYCOPLASMA SALIVARIUM (CEPA OD-87) CON ASPECTO DE "HUEVO FRITO", EN CULTIVO DE 4 DÍAS EN AGAR PPLO SUPLEMENTADO. AUMENTO: 300X.

La microscopía electrónica de transmisión demostró estructuras características del género Mycoplasma, tanto de forma cocoide como alargadas, con su típica membrana plasmática trilaminar y ausencia de pared celular, perfectamente diferenciables de las bacterias (Foto N° 2).

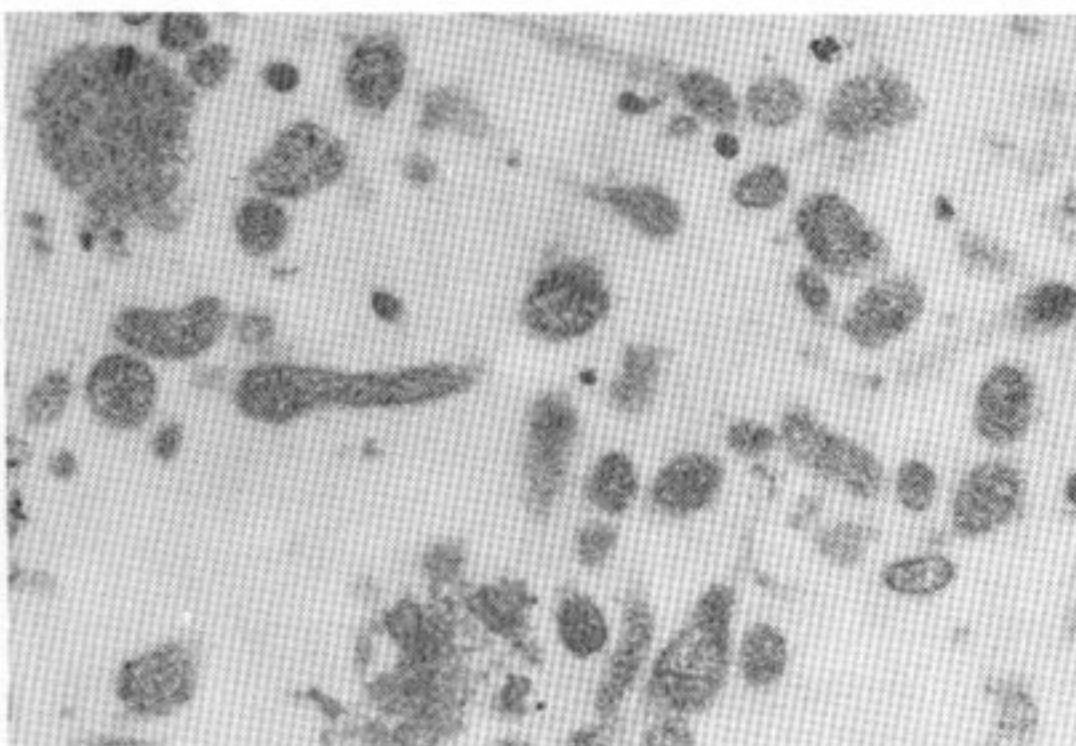
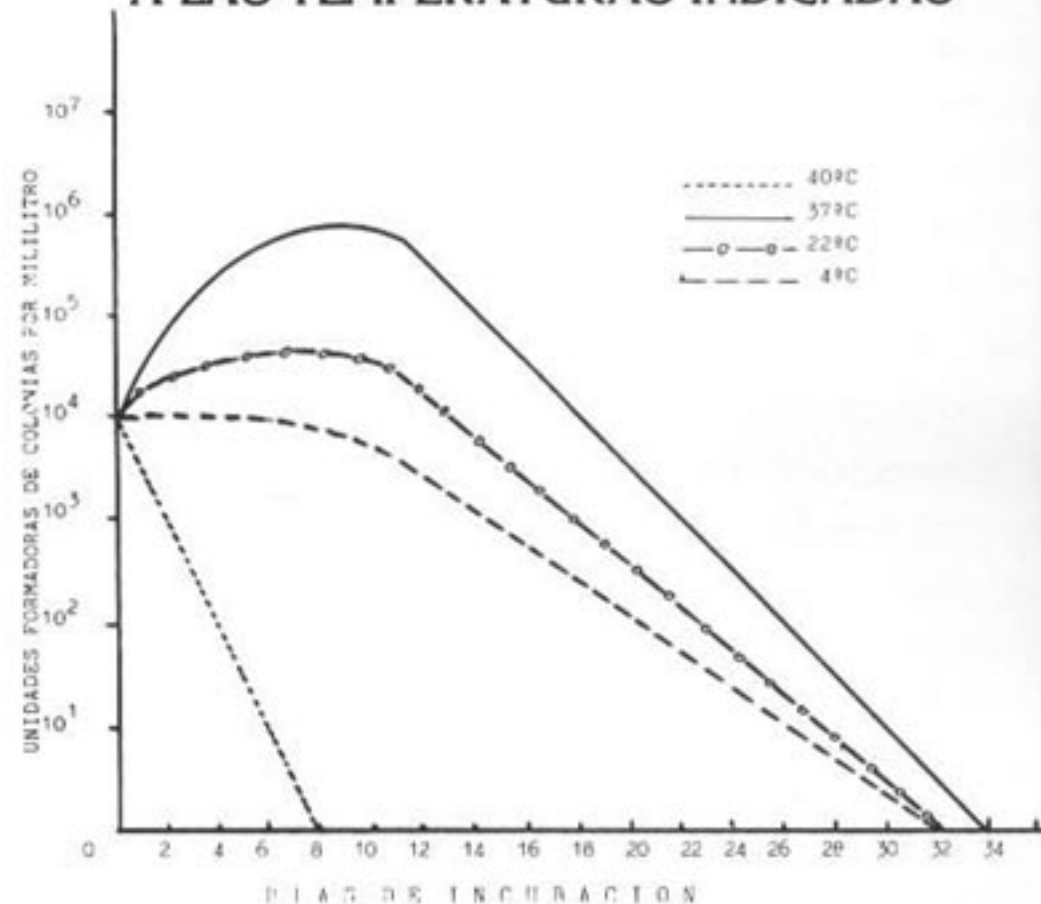


FOTO N° 2: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LA CEPA DE M. SALIVARIUM OD-87, MOSTRANDO LAS TÍPICAS ESTRUCTURAS, TANTO COCIDES COMO ALARGADAS, CON SU MEMBRANA TRILAMINAR (AUMENTO: 20.000X).

En relación a las curvas de supervivencia, comprobamos viabilidad de micoplasmas hasta el día 32° a temperaturas de 4 22 y 37°C, mientras que a 40°C solo sobrevivieron hasta el 8° día (Gráfico N° 1).

GRAFICO N° 1
CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE LA CEPA DE MYCOPLASMA SALIVARIUM OD-87 A LAS TEMPERATURAS INDICADAS



Finalmente, con ninguno de los agentes antisépticos evaluados se comprobó inhibición del crecimiento de la cepa de M. salivarium OD-87, comprobándose en cambio una amplia zona de inhibición alrededor del disco con tetraciclina que se empleó como control.

DISCUSION

En estudio previo (Perrone 1987) se había demostrado una incidencia de micoplasmas de 18 y 44% en sujetos con encía sana y periodontitis respectivamente, en muestras de hisopados gingivales tomadas de la zona anteroinferior de los incisivos, mientras que en este trabajo encontramos cifras mayores en saliva, con valores de 50 y 80% para cada caso. La diferencia quizás se debió al hecho de que en esta oportunidad el muestreo se realizó en los molares, donde las condiciones anaeróbicas son más estrictas, hallazgo corroborado por estudio previo (Uchida 1981b).

Estudios similares de otros autores reportan rangos de incidencia entre 32 y 82% para sujetos

con encía sana, y entre 57 y 100% en pacientes con enfermedad periodontal (Engel 1970, Kumagai 1971, Watanabe 1972, 1986). En estudios previos habíamos demostrado que la especie aislada con más frecuencia en cavidad bucal era *M. salivarium*, con un 96% (Perrone 1987, Bechara 1990), por lo que en este trabajo nos limitamos a determinar sólo el género *Mycoplasma*, sin identificar la especie.

No obstante consideramos que más importante que la incidencia de micoplasmas en saliva, es su cuantificación, habiéndose realizado muy pocos estudios en este sentido. Sin embargo hallazgos previos reportan resultados similares a los nuestros, pero en diferentes tipos de muestras, con rangos entre 1.09×10^2 y 1.75×10^5 en placa dental (Uchida 1981a), en enjuagues bucales valores entre 1.3×10^2 y 8.0×10^4 en sujetos con encía sana y entre 1.0×10^3 a 8.0×10^6 en periodontitis (Watanabe 1972). Un estudio más reciente señala cifras entre 6.8×10^3 y 4.6×10^6 para enfermedad periodontal y 1.0×10^2 y 6.1×10^4 en sujetos sanos, en muestras de saliva proveniente de toda la cavidad bucal (Watanabe 1986).

Como *M. salivarium* es la especie predominante, tanto en surco gingival como en placa dental (Kumagai 1971), se trata de determinar si juega un papel importante en la afección que nos ocupa. Las reacciones inflamatorias y las respuestas traumáticas, ocasionan migración extravascular de basófilos (polimorfonucleares ricos en histamina) al sitio del daño. Este fenómeno invita a la especulación de que *M. salivarium*, al ser fagocitado por dichos leucocitos, estimula la producción de histamina por parte de los que han migrado al tejido periodontal inflamado, hecho corroborado experimentalmente (Parkinson 1975a, 1975b). Queda así comprobado que los micoplasmas cooperarían a potenciar la producción de histamina por parte de los polimorfonucleares infectados, a la par que el resto de las bacterias reconocidas como periodontopatógenas.

Estudios posteriores, con la ayuda de la microscopía electrónica, demostraron una serie de mecanismos que contribuyeron a explicar algunas de las interacciones bacteria-hospedero, entre ellos cabe mencionar: aglutinación de eritrocitos en el área del saco gingival y de la encía misma, además de fenómenos de hemadsorción, hemaglutinación y hemólisis, reacciones que contribuyen al daño de la célula (Razin 1980, Newman 1984). Además se

comprobó vacuolización en las células epiteliales, tanto de la superficie como del saco gingival (Newman 1984). Esta estrecha asociación o adherencia física entre la membrana de los micoplasmas y la de las células, es un importante paso en la iniciación de la infección, protegiendo en parte al microorganismo de los mecanismos de defensa del hospedero. El metabolismo activo por parte de los micoplasmas adheridos a las células y demostrado por microscopía electrónica, es un requisito para que ocurra el daño tisular. También la motilidad ha sido demostrada en el género *Mycoplasma*, por lo tanto se supone que este pueda ser el mecanismo por el cual esta bacteria penetra los tejidos blandos periodontales, ocasionando deslizamiento de la estructura terminal (Newman 1984).

En casos de periodontitis juvenil se demostraron micoplasmas tanto en los dientes, como en el epitelio del saco gingival e invadiendo el epitelio y el tejido conectivo adyacentes a la encía (Newman 1984). También fueron observados en los espacios intercelulares del epitelio y dentro de algunos leucocitos, tanto en encía como en hueso alveolar (Carranza 1983). En la placa subgingival de un paciente con síndrome de Papillón-Lefèvre, se pudieron evidenciar, tanto por microscopía electrónica de barrido, como en preparaciones histológicas, microcolonias de microorganismos pequeños, rodeadas de espiroquetas, que por su morfología se deduce que pueda tratarse de micoplasmas (Jung 1981); en nuestro estudio la mayor concentración de ellos la obtuvimos precisamente en un paciente con dicho síndrome (Cuadro N° 2).

En exhaustivos estudios bacteriológicos de casos de periodontitis severa se encontraron dichas bacterias en el 43% de muestras provenientes de placa supragingival y en un 55% en placa subgingival, pero a muy bajas concentraciones (Moore 1982b), en cambio se encontró en un sólo caso de gingivitis experimental (Moore 1982a).

Está ampliamente demostrado que las especies de micoplasmas de la cavidad bucal degradan activamente la arginina por la vía enzimática de la deiminasa, ornitina-transcarbamilasa y carbamilfosfoquinasa, eliminando como desecho de esa acción el amoníaco, producto altamente tóxico para las células animales, elevando el pH de la región afectada y originando un ambiente favorable a la formación del cálculo dental, mecanismo estre-

chamente relacionado al origen de la enfermedad periodontal (Watanabe 1972). Además se ha podido demostrar presencia de actividad lipolítica en varias cepas de *M. salivarium*, teniendo también dicha enzima un efecto dañino sobre la membrana de las células (Watanabe 1972).

Los micoplasmas son cultivados normalmente en medios que contienen sueros animales, teniendo la propiedad, como ya se mencionó, de adherir diferentes sustancias a su membrana celular. Si llevamos esta situación al caso de *M. salivarium* multiplicándose en el surco gingival, su presencia pudiera estimular la producción de autoanticuerpos, no solamente contra componentes del suero sino además contra restos celulares de tejido periodontal destruido. Estudios recientes han demostrado que dicha especie, propagada en medio que contiene suero de conejo y luego inoculada en dicho animal, induce formación de autoanticuerpos IgM contra las IgG del mismo (Watanabe 1987). *M. salivarium* es un miembro de la microbiota propia del surco gingival, por lo tanto si se propaga en ese hábitat, su superficie quedará adherida con componentes, tanto del suero como de restos celulares del tejido del hospedador. Dichas sustancias serán reconocidas como extrañas desde el punto de vista inmunológico, por parte del hospedero, estimulando la producción de autoanticuerpos, mecanismo que será coadyuvado por la presencia de la placa dental y de algunos componentes celulares de las bacterias bucales, tales como lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Se considera por lo tanto que este mecanismo juega un papel muy importante en la destrucción de los tejidos periodontales.

En relación a la supervivencia de los micoplasmas ante factores adversos, tanto físicos como químicos es un hallazgo del cual ya teníamos ciertas evidencias. Estudios previos realizados con micoplasmas contaminantes crónicos de cultivos celulares, nos habían demostrado una notable resistencia de dichos microorganismos, hecho que corroboramos en este estudio, aunque en condiciones diferentes (Mazzali 1971, Mazzali de Ilja 1978, 1989). Ello probablemente sea debido a su estrecho contacto con las células epiteliales, a las cuales se adhieren firmemente mediante receptores específicos. Además se sabe que cuando las condiciones del medio le son adversas, pueden entrar a través de la membrana de la células hospedadora por pinoci-

tosis, alojándose en vacuolas, de donde salen nuevamente al exterior cuando las condiciones vuelven a serle favorables (Mazzali 1971).

A pesar de todas las evidencias, tanto cuantitativas, como ultraestructurales e inmunológicas, de la importancia de la presencia de micoplasmas en la enfermedad periodontal, consideramos que se requiere ahondar un poco más en el estudio del papel de estas bacterias en dicha patología.

CONCLUSIONES

1. Se comprobó que más importante que la incidencia de micoplasmas en saliva de pacientes con enfermedad periodontal, en relación con los sujetos sanos, es su concentración, lo que demuestra una estrecha asociación entre dicho microorganismo y la mencionada afección. Obviamente, recordando que se trata de una enfermedad con etiología multifactorial, donde los micoplasmas representan tan solo un Género dentro del amplio universo de la microbiota periodontopatogena.
2. Sólo temperaturas iguales o superiores a 40°C son capaces de inhibir el crecimiento de *M. salivarium*, en cambio ninguna de las sustancias antisépticas evaluadas tuvo acción contra la mencionada cepa, hecho que nos sorprende por tratarse de microorganismos que carecen de pared celular, generalmente muy lábiles ante diversos agente tanto físicos como químicos.

Estos dos hechos nos permiten explicar en parte que, pese a las condiciones adversas presentes en la cavidad bucal (cambios de temperaturas frecuentes durante la ingestión de alimentos) y la aplicación de sustancias antisépticas de diversa índole, los micoplasmas permanecen como colonizadores crónicos de la boca en un alto porcentaje de la población evaluada.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi más sinceras palabras de reconocimiento a las siguientes personas e Instituciones que hicieron posible, con su valioso aporte, la realización de este trabajo:

Profesores de la Cátedra de Periodoncia y estudiantes del Postgrado en esa especialidad, de la

Facultad de Odontología de la UCV, por su asesoramiento en la toma de las muestras.

Cátedra de Microbiología, por haberme permitido la realización de este trabajo.

Srta. Milagros Díaz y Sr. Raúl Colina, de la Unidad de Microscopía Electrónica "Dr. Raúl García Arocha", de esta Facultad, por su valiosa colaboración en el procesamiento del material mostrado en las microfotografías.

Al personal del Hospital Veterinario del Fuerte Tiuna, por haberme ofrecido las facilidades necesarias para la obtención del suero de caballo empleado en la preparación de los medios de cultivo para micoplasmas.

Departamento de Medios de Cultivo del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", por permitirme la preparación de algunos medios y soluciones utilizadas.

A mi marido e hijo, por la tolerancia y comprensión.

BIBLIOGRAFIA

1. Barile, M. F. y Sheingorn A... 1960. The isolation and cultivation of a filterable form resembling pleuropneumonia-like organisms from the human dental pulp. Report of a case. O.S., O.M., O.P. 13(6): 756-760.
2. Bechara, F. y Mazzali de Ilja R., 1990. Estudio acerca de la presencia de micoplasmas en la cavidad bucal. En preparación.
3. Burnet, G. W. y Gilmore, E., 1959. Incidence and distribution of oral PPLo and L-organism. J. Dent. Res. 38: 632-636.
4. Carranza, F.A. Jr., Saglie R. Newman M. G. y Valentín P.L., 1983. Scanning and transmission electron microscopic study of tissue invading microorganisms in localized juvenile periodontitis. J. Periodontol. 54 (10): 598-617.
5. Carranza, F.A. Jr., 1984. The role of microorganisms in periodontal disease; en: Glickmans's clinical Periodontology, 6ª edición. Philadelphia, W.B. Saunders.
6. Clyde, W.A., 1964. Mycoplasmas species identification based upon growth inhibition by specific antisera. J. Immunol. 92: 958-965.
7. Cole, B.C. Aldridge, K.E., Sullivan, G.J. y Ward, J. R., 1980. Mycoplasma-dependent activation of normal mouse lymphocytes: requirement for functional T lymphocytes in the cytotoxicity reaction mediated by Mycoplasma arthritidis. Infect. Immun. 30(1): 89-98.
8. Dajani A. y Ayoub E.M., 1969. Mycoplasmicidal effect of polymorphonuclear leucocyte extract. J. Immunol. 102 (3): 698-702.
9. Engel, L. D. y Kenny, G. E., 1970. Mycoplasma salivarium in human gingival sulci. J. Periodontol. Res. 5: 163-171.
10. Freedman, H. L., Listgarden, M. A. y Taichman, N. S., 1968. Electron microscopic features of chronically inflamed human gingiva. J. Periodontol. Res. 3:313-317.
11. Jung, J., Carranza, F. A. y Newman, M. G., 1981. Scanning electron-microscopy of plaque in Papillon-Lefèvre syndrome. J. Periodontol. 52 (10): 442-446).
12. Kumagai K., Iwabuchi T., Hinuma Y., Yuri K e Ishida N., 1971. Incidence, species and significance of mycoplasma species in the mouth. J. Infect. Dis. 123 (1): 16-21.
13. Matsuura M., Set K., Watanabe T. y Horkawa T., 1978. Observation of delayed and immediated hypersensitivity reactions in rabbits inoculated with Mycoplasma salivarium, M. orale and M. hominis. Pág. 58-63. En: Proceeding of the Japanese Society of Mycoplasmaology (V Annual Congress).
14. Mazzali R. y Taylor-Robinson D., 1971. Behaviour of T-mycoplasmas in tissue culture. J. Med. Microbiol. 4:125-138.
15. Mazzali de Ilja R., 1978. Comportamiento de una cepa de Mycoplasma orale tipo 1 contaminante de células HEp-2. Revista del Instituto Nacional de Higiene XI (1-2): 45-52.
16. Mazzali de Ilja R., 1989. Aspectos cualitativos y cuantitativos de la contaminación de cultivos celulares por micoplasmas. Presentado durante el IX Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica, Caracas 23-29 de abril. Resumen publicado en revista Bionotas, N° 10, 1989.
17. Moore, W.E.C., Holdeman L. V., Smibert, R. M., Good I. J., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. y Ranney, R. R., 1982a. bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. Infect. Immun. 38(2): 651-667.
18. Moore, W.E.C., Holdeman, L.V., Smibert, R.M., Hash, D.E., Burmeister, J.A. y Ranney, R.R., 1982b. Bacteriology of severe periodontitis in young adults humans. Infect. Immun. 38(3): 1137-1148.
19. Morton, H.E., Smith, P.F., Williams, N.B. y Eickenberg, C.F., 1951. Isolation of pleuropneumonia-like organisms from human saliva: a newly detected member of the oral flora. J. Dent. Res. 30 (3): 415-421.
20. Newman, M.G., Saglie, R., Carranza, F.A. Jr. y Kaufman, A.K., 1984. Mycoplasma in periodontal disease. Isolation in juvenile periodontitis. J. Periodontol. 55(10): 574-580.
21. Parkinson, C.F. y Carter, P.B., 1975a. Phagocytosis of Mycoplasma salivarium by polymorphonuclear leucocytes and monocytes. Infect. Immun. 11 (2): 405-414.
22. Parkinson, C.F., 1975b. Histamine release from human leucocytes when stimulated by Mycoplasma salivarium. Infect. Immun. 11 (3): 595-597.
23. Perrone, M. y Mazzali de Ilja R., 1987. Influencia de micoplasmas en la enfermedad periodóntica. Acta Odontol. Venezol. XXV (2): 259-267.
24. Razin, S., Michman y Shimshoni, Z., 1964. The occurrence of Mycoplasma (Pleuropneumonia-like organisms, PPLo) in the oral cavity of dentulous and edentulous subjects. J. Dent. Res. 43 (3): 402-405.
25. Razin, S., Banai M., Gamliel H., Polliack A., Bredt W. y Kahane, I., 1980. Scanning electron microscopy of mycoplasma adhering to erythrocytes. Infect. Immun. 30 (2): 538-546.
26. Sabelli, C.A. y Provano, S.H., 1985. Enfermedades periodontales. Etiología y mecanismos de agresión. Bacteriol. Clín. Argent. 2-4 (1-2-3): 22-28.
27. Saglie R., Newman, M.G., Carranza, F.A. y Pattison, G.L., 1982a. Bacterial Invasion in gingiva in advanced periodontitis in humans. J. Periodontol. 53: 217-222.
28. Saglie, R., Newman, M.G. y Carranza, F.A. 1982b. A scanning electron microscopic study of leucocytes and their intereaction with bacteria in human periodontitis. J. Periodontol. 53: 752-758.

29. Saglie, F.R., Carranza, F.A. Jr. y Newman, M.G., 1985. The presence of bacteria within the oral epithelium in periodontal disease. I. A. scanning and transmission electron microscopy study. J. Periodontol. 56 (10): 618-624.

30. Serene, T.P. y Anderson, D.L., 1967. Isolation of Mycoplasma from human root canals. J. Dent. Res. 46 (2): 396-399.

31. Shklair, I.L., Mazzarella, M.A., Gutekunst, R.R. y Kiggins, E.M., 1962. Isolation and incidence of pleuropneumonia-like organism from the human oral cavity. J. Bacteriol. 83:785-788.

32. Slots, J., 1982. Importance of black-pigmented Bacteroides in human periodontal disease, págs. 27-45. En: Host-parasite interactions in periodontal diseases. Eds. Genco, R.J. y Mergenhagen, S.E., A.S.M. (USA).

33. Socransky, S.S., 1977. Microbiology of periodontal diseases. Present status and future considerations. J. Periodontol. 48 (9): 497-505.

34. Uchida A., Horizawa T., Matsuura M., y Watanabe T., 1981a. A preliminary study on isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques: the effect of sonication on viability of oral mycoplasmas. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 28:111-116.

35. Uchida A., 1981b. Isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 28: 117-123.

36. Velleca, W.M., Bird, B.R. y Forrester, F.T., 1980. Laboratory Diagnosis of mycoplasmas infections. Course 8226-C. Publicado por el Center for Diseases Control, Atlanta, Ga. USA.

37. Watanabe, T., 1967. Biological and serological studies on oral mycoplasmas. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 28: 117-123.

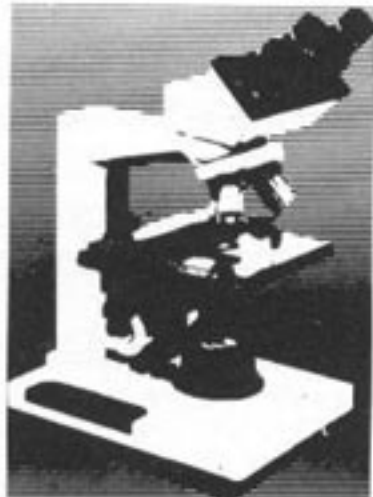
38. Watanabe, T., Mishima R., Fujita O., Horikawa T., Noguchi T., Ishizu T. y Kinoshita S., 1972. Possible role of mycoplasmas in periodontal disease. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 19:93-109.

39. Watanabe, T., Matsuura M. y Seto K., 1986. Enumeration, isolation and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (M. salivarium). J. Clin. Microbiol. 3 (6): 1034-1038.

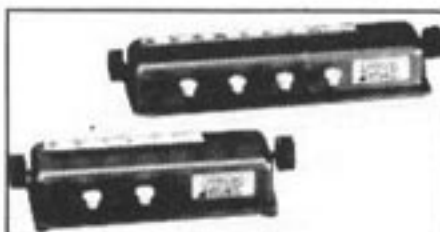
40. Watanabe, T., Shibata, K., y Hasegawa K., 1987. Production of immunoglobulin M (IgM) autoantibodies to IgG in rabbits inoculated with Mycoplasma salivarium cells grown in medium supplemented with rabbit serum. Infect Immun. 55 (1): 263-265.

Polylab c.a.


MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO




**Cambridge
Instruments**




CONTADOR
DE 5 y 9 TECLAS




MICRO CENTRIFUGA
PARA 24 PUESTOS




CENTRIFUGA MACRO
8 PUESTOS




ROTADOR
PARA VDRL




BAÑOS DE MARIA
TERMOSTATICOS




HORNO
ESTERILIZADOR



AGITADOR MIXER



MEZCLADOR
PIPETAS




SOPORTE WESTERGREN
CON PIPETAS DESCARTABLES

DISTRIBUIDOR EXCLUSIVO DE:

D.I.
CHEMROY

PREVIEW®

LEFECO DIAGNOSTICS



memmert

monoject

DIFCO

Dade

Av. El Parque, Qta. Salecor, Urb. Las Acacias, Teléfonos: 61.27.07 - 62.48.34 - 62.05.07 - 62.52.22 - Fax: (02) 62.48.33

ACETILACION EN ADULTOS: DETERMINACION DE LA VELOCIDAD

AUTORES:

Lic. Pina Balducci Silano¹
Dr. Víctor Balducci Silano²

TUTORA:

Dra. Eva E. de Bekler

RESUMEN:

A 124 adultos sanos (en su mayoría mestizos venezolanos), fue determinada su capacidad de acetilar SMZ (sulfametazina). Cada sujeto recibió SMZ por vía oral en cápsulas preparadas de 500 mgrs. y la SMZ libre y total fue estimada en suero y orina recolectadas a las 6 horas posterior a la ingesta de la droga.

En los histogramas se muestra un patrón bimodal de distribución del porcentaje de SMZ acetilada en suero y en orina, indicando la existencia de un polimorfismo genético como los observados en estudios previos.

Existe una correlación altamente significativa entre el porcentaje de SMZ acetilada en suero y el porcentaje de SMZ acetilada en orina. Un individuo puede ser clasificado como acetilador lento si el porcentaje de acetil SMZ es: menor que 27,5% en suero y/o menor que 66,5% en orina.

La incidencia del fenotipo acetilador rápido fue de 57,3 y la del acetilador lento de 42,7%

La aparición del alelo que controla la acetilación lenta (q) fue 0,65 +/- 0,04.

El estudio demuestra que la prueba con SMZ es fácil de realizar y que la determinación de SMZ acetilada en suero permite una mejor discriminación del fenotipo acetilador.

La aplicación práctica del trabajo consiste en predecir el efecto tóxico y terapéutico de las drogas de acuerdo a su acetilación.

INTRODUCCION:

Ha sido reconocido desde hace dos décadas que existe un polimorfismo genético hepático en el hombre para la acetilación con SMZ (11, 12, 36, 42, 43).

La acetilación es una reacción de conjugación a través de la cual el organismo metaboliza las drogas.

1. Cursante del Post grado de Inmunología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).
2. Médico Internista Adjunto al Departamento de Medicina Interna, Hospital General del Oeste, Los Magallanes de Catia, Caracas.

Este trabajo se realizó con la colaboración de las siguientes Instituciones:

- Servicio de Medicina Interna del Hospital "José Gregorio Hernández", de Los Magallanes de Catia.
- Laboratorio del Servicio de Medicina Interna II, del Hospital "José María Vargas" de Caracas.

Este trabajo se hizo acreedor al Premio: Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, año 1991.

Este proceso se realiza principalmente en el hígado, a través del sistema enzimático no microsomal de la N-acetil Transferasa, el cual no solo favorece la eliminación de la droga, sino que también produce, a menudo la inactivación del compuesto pero conservando sus potencialidades tóxicas. (6, 7, 19, 21, 35, 44).

La variabilidad en la velocidad de acetilación de la enzima o sistema enzimático entre los diferentes individuos de una misma especie permite diferenciar a una población de otra de acuerdo con la proporción de acetiladores lentos y rápidos que se determinen en ella. Así podemos establecer diferencias étnicas en el metabolismo de estas drogas atribuible principalmente a las diferencias en la actividad de la N-acetil-transferasa hepática. (13, 10).

La frecuencia del fenotipo acetilador en varios grupos étnicos ha sido investigada (5, 8, 16, 28, 33, 40, 42, 25) y se ha encontrado entre el rango del 90% de acetiladores rápidos para los esquimales canadienses, y cerca del 18% para los egipcios. Los individuos de origen caucásico tienen mayor porcentaje de acetiladores lentos, en cambio los individuos de origen asiático tienen mayor porcentaje de acetiladores rápidos. (8, 42).

Existen varias drogas de uso básico en la práctica médica con grupo amino aromático e hidrazinas que son metabolizadas principalmente por acetilación, entre ellas: Isoniazida, Hidralazina (23), Procaínamida (17, 18, 39), Sulfonamidas (44, 28), Sulfonas y Nitrazepam.

La utilidad del presente estudio consiste en predecir los efectos tóxicos y la eficacia terapéutica con el uso de estos compuestos dependiendo del estado acetilador de cada individuo (7, 28, 44). Los acetiladores lentos tendrán mayor riesgo de experimentar toxicidad a dosis estándar pero mayor eficacia terapéutica que los acetiladores rápidos.

En los últimos años la distribución del polimorfismo acetilador hepático ha sido estudiada en pacientes afectados con una gran variedad de enfermedades (15) y alguna relación ha sido sugerida entre enfermedades, tales como: Cáncer de vejiga (4, 20, 26, 32, 37); Diabetes mellitus tipo I (2); LES (22, 7); Enfermedad de Gilbert Polineuropatía periférica y Hepatitis tóxica inducida por INH. (1, 6, 30, 31).

La mayoría de los pacientes con enfermedades

inducidas por drogas y enfermedades agnógenicas son acetiladores lentos y consecuentemente una etiología común puede estar presente.

MATERIALES Y METODOS:

Un total de 124 adultos sanos, voluntarios, (86 hembras y 38 varones) constituidos por estudiantes de la Escuela de Medicina, personal médico, paramédico y obrero que labora en el Hospital José Gregorio Hernández, ubicado en Los Magallanes de Catia, fueron empleados para el estudio. Con un promedio de edad de 32 +/-8,7 años y un rango de edad entre 19 y 58 años; cuyo origen étnico fue determinado a través de la historia clínica y los datos aportados por el trabajo de investigación en la población mestiza venezolana del Proyecto Venezuela (29); por lo tanto de los sujetos estudiados: 112 fueron mestizos, 10 caucasoides latinoamericanos y 2 caucásicos.

Los criterios de exclusión fueron: 1) Historia de sensibilidad a las sulfonamidas. 2) Alcoholismo acentuado. 3) Enfermedad Hepática y Nefropatía. 4) Ingestión de drogas, tales como: anticoagulantes, hipoglicemiantes, hidantoínas, fenobarbital, anti-conceptivos, griseofulvina, y otros compuestos que puedan interferir con la farmacocinética de la droga, 5) Diabéticos, 6) Embarazadas, 7) Historia de cirugía gastrointestinal mayor, 8) Cualquier otra enfermedad severa.

Ninguno de los sujetos ingerían alguna droga por lo menos desde una semana previa al estudio.

La determinación rutinaria de creatinina sérica, proteínas totales y fraccionadas, bilirrubina total y fraccionada, transaminasas, fosfatasa alcalina, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina y examen simple de orina no revelaron anomalías.

A todos los sujetos se les pidió mantenerse en ayuna la noche de la ingestión de la SMZ. Se utilizó SMZ pura la cual fue suministrada desde E.E.U.U. a través de la Compañía Sigma.

Se prepararon cápsulas gelatinosas conteniendo cada una 500 mgrs de SMZ pura. A cada sujeto se le instruyó para ingerir la dosis de 500 mgrs. con un vaso de agua, a las 12 pm. Posterior a la ingesta y previo vaciamiento de la vejiga, se inició la recolección de la muestra de orina durante 6 horas en un frasco estéril y el volumen y pH urinario fueron me-

cidos. Se tomó una porción de la orina (aprox. 50 cc) y fueron congeladas a menos 15 grados C.

A las 6 horas después de la ingesta de la droga, se tomaron las muestras de sangre venosa (aprox. 10cc), se centrifugó y se separó el suero el cual también fue congelado a menos 15 grados C para ulterior análisis.

Las muestras congeladas fueron después descongeladas, y para asegurar que la droga y su acetil derivado estuvieran descongeladas completamente antes del análisis, la muestra de orina fue calentada por 5' en baño de María y el suero permaneció en una incubadora a 37 grados C por el lapso de una hora.

La SMZ libre y total en suero y en orina fue estimada por el método colorimétrico de Bratton-Marshall (3) modificado en relación al tiempo empleado para el calentamiento de las muestras (15" vs. 1 hora), antes de proceder a la determinación de la forma acetilada de la droga en suero y en orina.

PROCEDIMIENTO COLORIMETRICO:

De la solución madre de SMZ (200 mgrs/1) se obtuvieron los patrones. Esta fue conservada en nevera para evitar su cristalización. Los patrones que se tomaron a dilución de 0,02; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; mgrs/dl, los cuales fueron tratados igual que las muestras estudiadas.

Las lecturas fueron realizadas en el espectrofotómetro modelo Spectronic 20 (Baush and Lomb). La absorbancia fue medida a 547 nm. Se realiza la lectura en transmitancia y se obtiene la densidad óptica por la tabla.

Para determinar las formas libre y total de SMZ en suero se procedió a: Añadir a 0,6 cc de suero, 3,6 cc de ácido tricloroacético; se centrifuga por 15" y del sobrenadante se tomó 1,5 cc para cada tubo de prueba. Un tubo para determinar la forma total de SMZ (sometido a baño de maría durante 15") y el otro para determinar la forma libre de SMZ.

Para determinar las formas libres y total de SMZ en orina, se procedió a diluir la orina 1/10: se tomó 0,20 cc de orina y se añadió 1,8 cc de ácido tricloroacético (15%); más 0,5 de HCl (4N) y 7,5 cc de agua destilada, se mezcló bien y se tomaron 1,5 cc para cada tubo. Uno para la forma libre y el otro para la forma total.

Una vez que se enfriaron los tubos se procedió a la determinación de la SMZ, utilizando los reactivos para la coloración según el método colorimétrico de Bratton-Marshall. Posteriormente se efectuó la dosificación mediante la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro.

Una vez obtenidas las lecturas se procedió al cálculo de la forma acetilada, en suero y orina mediante la fórmula que expresa el índice de acetilación:

$$\frac{\text{SMZ total} - \text{SMZ libre}}{\text{SMZ TOTAL}} \times 100$$

ANALISIS ESTADISTICO:

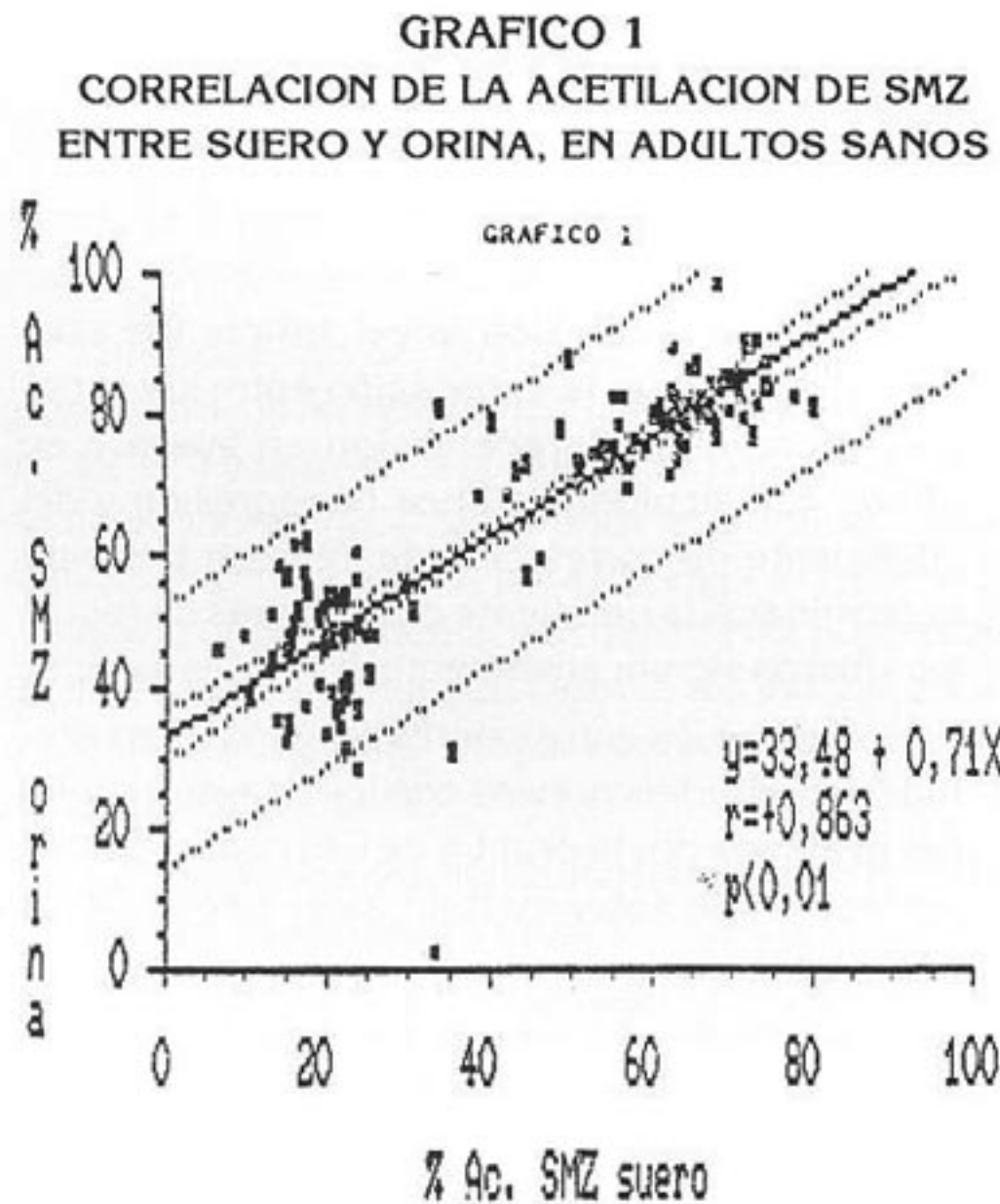
- El análisis de regresión lineal simple fue utilizado para evaluar la correlación entre las variables (porcentaje de acetilación en suero y en orina). El cálculo de la línea de regresión y del coeficiente de correlación de Pearson permitió determinar si la pendiente de las líneas de regresión fueron significativamente diferentes de cero.
- La comparación entre valores porcentuales obtenidos en estudios previos con los de este estudio fue evaluada por la prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates cuando fuese necesario.
- Los resultados de los valores cuantitativos vienen expresados en $X \pm DE$ y la de los valores cualitativos en porcentajes.
- La significancia estadística fue considerada para el criterio del 5%.
- La Prueba t de Student se utilizó para analizar las diferencias entre los valores promedios de acetiladores rápidos y lentos de SMZ en suero y orina.
- Se procedió a la tabulación y a graficar los datos obtenidos: histogramas de frecuencia de distribución para el porcentaje de acetilación de SMZ.
- Los cálculos estadísticos fueron obtenidos mediante el uso del programa estadístico para computadoras personales. STARTGRAPHICS (versión 2,0).

RESULTADOS Y ANALISIS:

Los adultos estudiados fueron clasificados de acuerdo con el porcentaje de SMZ acetilada en suero

y el porcentaje de SMZ acetilada en orina, en dos grupos: acetiladores rápidos y acetiladores lentos. Este porcentaje se obtuvo para cada individuo de la relación entre SMZ total y SMZ libre, previamente descrita.

Cuando en un mismo individuo el porcentaje de SMZ acetilada en sueros es graficado en función al porcentaje el fenotipo acetilador rápido y lento es obtenido. (Gráfico 1)



Vemos claramente que tales puntos tienden a agruparse alrededor de la línea y que el porcentaje de SMZ acetilada en orina aumenta cuando aumenta el porcentaje de acetil-SMZ en suero. Se evidencia una mutua relación entre las dos variables, por lo que podemos concluir que existe una correlación altamente significativa. ($r = 0,862$; p menor que $0,05$).

En los histogramas se muestra un patrón bimodal de distribución del porcentaje de SMZ acetilada en suero (Gráfico 2) y del porcentaje de SMZ acetilada en orina (Gráfico 3), podemos entonces establecer una línea divisoria entre los inactivadores rápidos y lentos. Estos hallazgos sugieren que un individuo puede ser clasificado como acetilador lento si el porcentaje de SMZ acetilada en suero es menor que

27,5% y/o en orina menor que 66,5% y en acetilador rápido si los valores son mayor que 27,5% en suero y/o mayor que 66,5% en orina.

GRAFICO 2
ADULTOS SANOS, SEGUN ACETILACION
DE SMZ EN SUERO

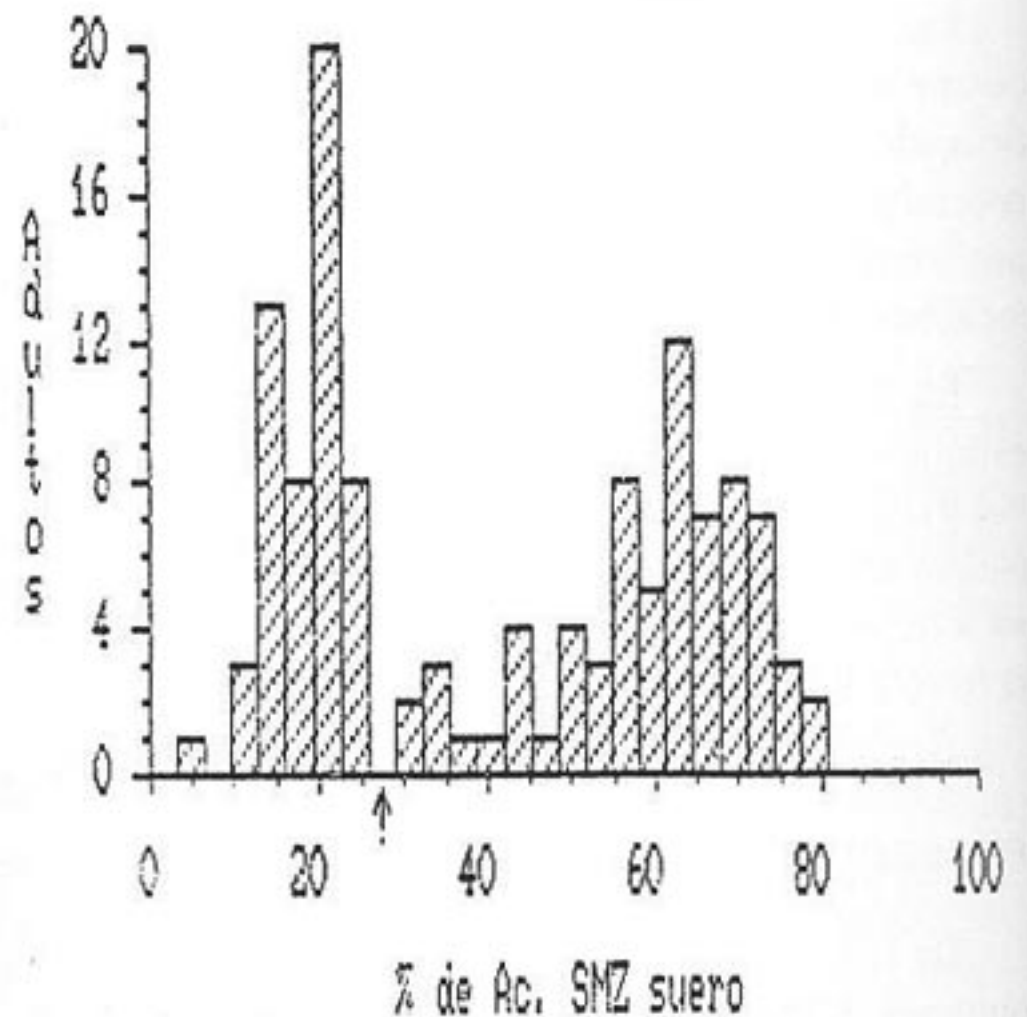
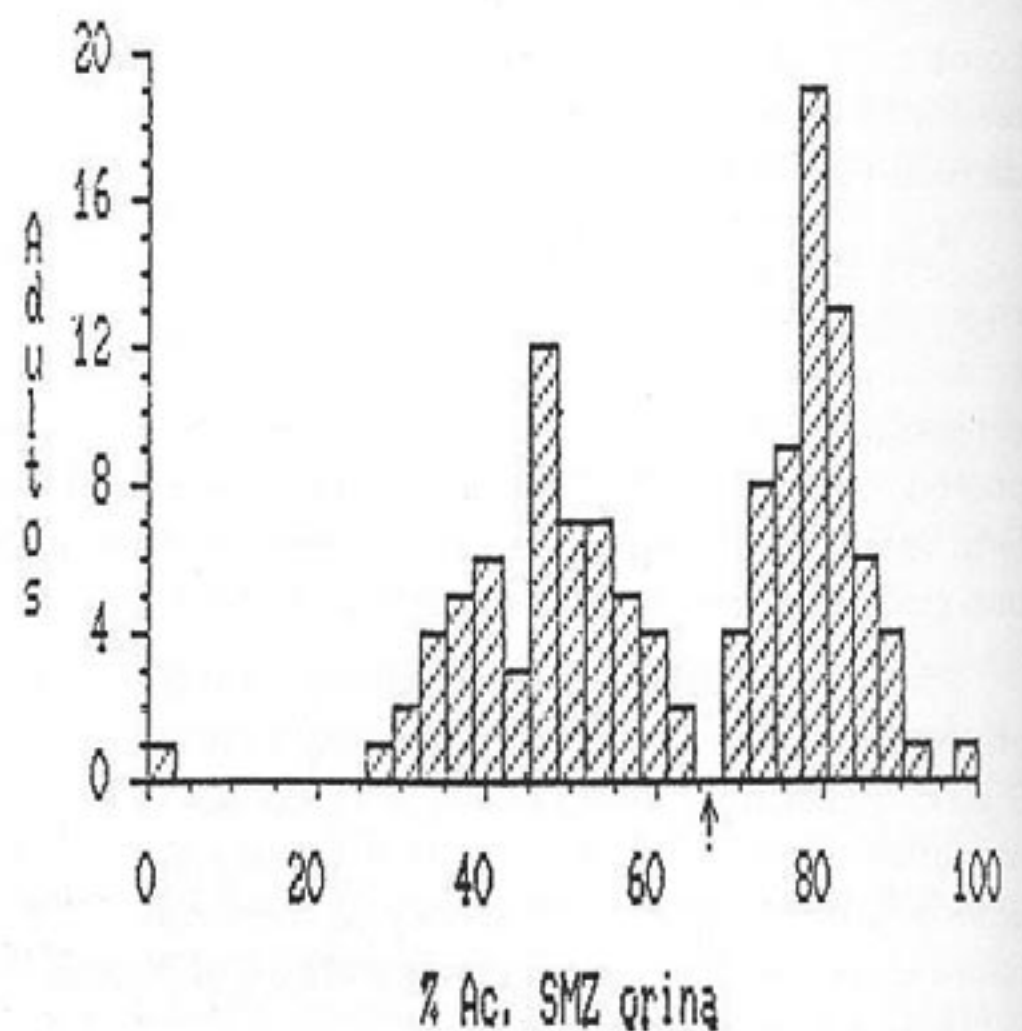


GRAFICO 3
ADULTOS SANOS, SEGUN ACETILACION DE SMZ
EN ORINA



De lo anteriormente expuesto, tenemos que, de los 124 adultos estudiados se observó para el suero una incidencia del fenotipo acetilador rápido (n=71) de 57,25% y para el acetilador lento (n= 53) de 42,75%; en cambio para la orina la frecuencia del acetilador rápido (n= 65) fue del 52,42% y la del acetilador lento (n= 59) de 47,58% (tabla 1).

Orina	Acetilación en suero		Total
	Rápidos	Lentos	
Rápidos	65	-	65
Lentos	06	53	59
Total	71	53	124
57,25%		42,75%	
$X^2 = 4,17; p < 0,01$			
Nota: Acetiladores rápidos en suero > 27,5%			
Acetiladores rápidos en orina > 66,5%			

Existe concordancia en los valores obtenidos para 118 (95%) de los sujetos estudiados; es decir que el mismo individuo fue clasificado como acetilador rápido o lento tanto en suero como en orina, mientras que en los 6 restantes no hubo concordancia siendo la clasificación del mismo sujeto en acetilador rápido en suero y acetilador lento en orina, (tabla 1). El análisis estadístico demostró que existe una diferencia significativa. ($X^2 = 4,17; p < 0,05$); lo que quiere decir que la discordancia observada tiene probabilidad de ser explicada por el solo azar.

Al analizar las diferencias de los valores promedios entre acetiladores rápidos y lentos de SMZ en suero y orina aplicando la prueba t de student (tabla 2), tenemos que en suero $t = 23,88$. Este es el valor estadístico de contraste; si se fija el nivel de significancia en 5% se encuentra que los valores críticos son $\pm 2,831$ (que permite un límite de confiabilidad del 95%) y por ser $t = +23,88$ es mayor que 2,381, por lo tanto la diferencia observada es altamente significativa y la hipótesis nula es rechazada; el azar tiene poca influencia sobre la clasificación entre acetila-

dores rápidos y lentos en suero igual ocurre con los valores promedio en orina, en donde se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa.

Con el fin de establecer qué factor o factores pudieron haber influenciado la discordancia obtenida, se correlacionaron los valores de pH, volumen y densidad urinaria obtenidas para cada sujeto contra los valores porcentuales de SMZ acetilada excretada en orina, siendo los coeficientes de correlación ($r = 0,12; r = 0,13; y r = 0,02$ respectivamente). Estos resultados demuestran que no existe correlación estadísticamente significativa entre los valores porcentuales de SMZ acetilada excretada en orina con cada una de las variables analizadas.

Fenotipo acetilador +				
Parámetros	Rápidos	Lentos	t*	P
Acetilación en suero	n=71 $59,62 \pm 11,9$	n=53 $18,67 \pm 4,25$	23,88	<0,05
Acetilación en orina	n=65 $79,35 \pm 5,77$	n=59 $46,15 \pm 10,2$	-22,6	<0,05

+ Clasificación del fenotipo acetilador basada en porcentaje de acetilación en suero y orina. Todos los valores se expresan como promedios \pm desviación estandar.
* La prueba t de Student se utilizó para analizar las diferencias entre los acetiladores rápidos y lentos.

Considerando lo anteriormente expuesto y basándonos en el análisis estadístico de los valores obtenidos tanto en suero como en orina podemos afirmar que los valores porcentuales en suero presentan una distribución más regular en relación a los de la orina, por lo tanto los valores obtenidos en suero son más confiables. Esta afirmación permitió establecer que de los 124 sujetos estudiados, 71 (57,25%) fueran considerados como acetiladores rápidos, y 53 (42,75%) fueran considerados como acetiladores lentos.

En la tabla 3, tenemos los fenotipos acetiladores según la edad. Observemos que 73 de 124 sujetos estudiados, les correspondió edades comprendidas

entre 25 y 34 años. El análisis estadístico mediante la ($X^2 = 0,15$; $p > 0,05$) permite concluir que la edad no tiene influencia sobre la ocurrencia de los dos fenotipos.

Edad (años)	Fenotipo acetilador				Total
	Ac. rápidos (n) (%)		Ac. lentos (n) (%)		
15-19	1	33,3	2	66,7	3
20-24	6	66,7	3	33,3	9
25-29	27	56,3	21	43,7	48
30-34	16	64,0	9	36,0	25
35-39	9	47,4	10	52,6	19
40-44	4	57,3	3	42,7	7
45-49	3	60,0	2	40,0	5
50-54	3	100,0	0	00,0	3
55-59	2	40,0	3	00,0	5
TOTAL	71		53		124
Nota: Acetilador rápido en suero > 27,5%					
25-29	27		21		48
30-34	16		09		25
TOTAL	43		30		73
$X^2 = 0,15$; $p > 0,05$					

Al analizar la variable sexo, se obtuvo la siguiente distribución: de 38 varones el 55,3% y de 86 hembras el 58,1% fueron clasificados como acetiladores rápidos. Al practicar el análisis estadístico de estos resultados ($X^2 = 0,01$; $p > 0,05$) podemos decir que la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo tanto se concluye que el sexo no tiene ningún efecto en la discriminación del acetilador rápido o lento, y que dichos resultados coinciden con estudios previos (tabla 4).

Al ser considerado el grupo étnico al cual pertenecen los adultos estudiados (tabla 5) tenemos que 112 (90%) son mestizos venezolanos y que solo 12 (10%) de estos sujetos fueron no mestizos (10 caucasoides latinoamericanos y 2 caucásicos).

Sexo	Fenotipo acetilador		Total
	Rápidos	Lentos	
Varones	21 (55,3%)	17	38
Hembras	50 (58,1%)	36	86
TOTAL	71	53	124
Nota: Acetilador rápido en suero > 27,5%			
$X^2 = 0,01$; $p > 0,05$			

Etnia	Acetilación en suero		Total
	Rápidos	Lentos	
Mestizo	63 (56,3%)	49	112
No mestizo	08 (66,7%)	04	12
TOTAL	71	53	124
Nota: Acetilador rápido en suero > 27,5%			

La influencia étnica de mayor predominio en el mestizaje correspondió a la europea (29%) principalmente constituida por españoles o italianos.

Según el lugar de nacimiento, observamos que 119 sujetos (96%) nacieron en el país, siendo la región capital $n=66$ y la región de Los Andes $n=15$ las regiones que agruparon el mayor número de sujetos. Sólo el 4% nació en el exterior pero con residencia en el país desde su infancia.

De los 71 acetiladores rápidos 63 fueron mestizos. Por otro lado, de los 112 mestizos el 56,3% fueron acetiladores rápidos, mientras que de los 12 restantes el 66,7% fueron acetiladores rápidos.

Considerando la hipótesis de que la acetilación de ciertas drogas en humano está controlada genéticamente por dos alelos autosómicos y que el inactivador lento es homocigoto recesivo (rr) tenemos que es posible determinar la frecuencia de

aparición del alelo recesivo (q) en el grupo estudiado, con la aplicación de la ley de Hardy Weimberg (33) $p + q = 1$. Donde la q calculada fue $q = 0,6538$ y $p = 0,3462$. Observamos que para la muestra estudiada la ocurrencia del alelo lento (q) es aprox. 2 veces mayor que para el alelo rápido (p). El valor de $q = 0,6538 \pm 0,04$ es similar al obtenido en poblaciones en donde la expresión genética del alelo que controla el carácter recesivo predomina sobre el acetilador rápido (Europa, Norte de Africa, Sur de la India).

Observamos en la tabla VI que al determinar la frecuencia porcentual de los genotipos acetiladores hay mayor porcentaje de acetiladores rápidos que lentos tanto para los adultos sanos como para los mestizos, y ciertas diferencias observadas al hacer la comparación entre este estudio y el realizado previamente por Melo y col, en Brasil. Por otro lado la frecuencia de heterocigotos (Rr) en este estudio es 3,7 veces mayor que la de homocigotos (RR) entre acetiladores rápidos.

dos formas: monomórfica y polimórfica (11, 12, 36, 43). La actividad polimórfica permite identificar a los acetiladores lentos y rápidos, y es acetil Co A dependiente.

Esta enzima transfiere un grupo acetilo desde la acetil Co A al sustrato. Parece que existe otra enzima, la N-O-Aryltransferasa (AHAT) la cual también transfiere grupos acetilos pero es acetil Co A independiente (44).

Es posible asumir que existen diferencias entre los acetiladores rápidos y lentos en relación con la actividad enzimática bien sea cualitativa, como lo es, la diferencia estructural de la NAT hepática y cuantitativa como lo son: la cantidad de enzimas idénticas y la existencia de un sistema enzimático con varias isoenzimas (21,43,44).

La demostración de una saturación parcial del sistema NAT expresada en términos de disposición cinética no lineal de la SMZ es importante particularmente cuando dos o más sustratos para el mismo sistema enzimático son administrados al mismo tiempo (9,34).

La variación individual en la velocidad de acetilación de SMZ está determinada genéticamente (10, 14, 20), sin embargo es posible que existan compuestos naturales los cuales son metabolizados en la misma vía que la SMZ; que pueden competir e interferir con ella, o que pueden acelerar o enlentecer el metabolismo de drogas con grupos aminos aromáticos e hidrazinas (20). La fuente más importante de sustancias químicas inductoras e inhibidoras de las enzimas se encuentran en los alimentos y drogas ingeridas; por lo tanto la composición de la dieta, los hábitos alcohólicos, tabáquicos, caféicos y el tipo de droga ingerida son factores que pueden alterar la cinética de acetilación de la SMZ siendo posible que la suma de sus efectos puede ser de magnitud suficiente como para tener importancia biológica en el individuo (10).

Se establece entonces la necesidad de determinar el fenotipo acetilador en pacientes con tuberculosis, Hansen, HTA, micosis, cuando en sus esquemas terapéuticos se introducen drogas cuya farmacocinética puede ser alterada por lo antes expuesto. Por lo tanto es fundamental el conocimiento del índice de acetilación para la prescripción de regímenes terapéuticos con aminos aromáticas (7,17). Por ejemplo: se sugiere la posibilidad que en los portadores de LES idiopático la afección puede ser desen-

TABLA 6

GENOTIPOS ACETILADORES, SEGUN GRUPOS DE ESTUDIO

Grupos	Frecuencia porcentual		
	Homocig. Ac. rápidos p (AA)	Heterocig. Ac. rápidos 2 p.q (Aa)	Homocig. Ac. lentos q (aa)
Melo y Col.	6,16%	37,34%	56,50%
Balducci (Adultos sanos)	11,98%	45,26%	42,75%
Balducci (Mestizos)	11,46%	44,78%	43,75%
	q=0,65	p=0,35	

DISCUSION:

Aunque la existencia de un polimorfismo genético en el hombre en general, y en un gran número de poblaciones en particular para la acetilación de SMZ es bien conocida, el presente estudio es el primero en realizarse en Venezuela.

La actividad de la N-acetil-transferasa (NAT) está presente en muchos órganos y tejidos, sin embargo es mayor en el hígado, donde puede asumir

cadena por sustancias hidrazinas similares presentes en el ambiente, (7, 32, 44) por lo que pudiera orientar una conducta preventiva y terapéutica de esta patología al tratar de conocer la causa precipitante del desorden inmunológico.

Podemos entonces decir que no solo los factores genéticos sino también los ambientales tienen un importante papel para determinar la velocidad y vías del metabolismo de las drogas y en consecuencia para influir sobre su eficacia y toxicidad.

En el método de Braton-Marshall, la hidrólisis es un paso esencial del cual depende el desarrollo del color, (3, 10, 12, 14). Hay que tener presente la posibilidad que cuando la concentración de acetil SMZ es menor que 10% tal como ocurre cuando la hidrólisis es incompleta y/o descomposición de la SMZ original, se realizará una subestimación de la concentración del metabolito acetilado y por ende una subestimación del porcentaje de acetilación. (41,45).

El presente estudio demuestra que aún con la reducción del tiempo de calentamiento de las muestras en baño de María a 15" es posible obtener una eficiente discriminación entre acetiladores rápidos y lentos; además provee evidencias que la determinación del fenotipo acetilador se puede realizar utilizando dosis bajas de SMZ y la factibilidad de practicar el estudio en corto tiempo (33,38).

La determinación de SMZ en suero permite una mejor discriminación del fenotipo acetilador que el análisis de la orina (13,38), los valores obtenidos en suero son más confiables. La orina como muestra presenta desventaja: el clearance de SMZ y su metabolito acetilado podría ser afectado por cambios en el pH y flujo urinario (43); además es posible que se obtengan valores diferentes de acuerdo con el tiempo de recolección de la muestra (45).

El 90% de los sujetos estudiados resultó ser mestizos venezolanos. Como sabemos el mestizaje de la población venezolana es el resultado de la fusión de tres grupos étnicos: indios latinoamericanos, caucásico europeo y negro africano. El mestizaje ha sido la fuerza integradora que ha generado diferencias con el resto del mundo, y está fundamentada en patrones de inmigración que permite cotejar hipótesis sobre diferentes eventos genéticos. Si recordamos que la frecuencia de aparición de alelo acetilador lento es dos veces mayor

que la del acetilador rápido y que el valor de q es muy similar al reportado para caucásicos, podemos sugerir que en el mestizaje de la población estudiada predomina el caucásico (lo cual coincide con los datos Proyecto Venezuela), sin embargo es de hacer notar que en los resultados obtenidos se evidenció un mayor número de acetiladores rápidos que de acetiladores lentos, por lo que no sólo el factor genético debería estar implicado en la velocidad de acetilación. Siendo así, debemos pensar en algunos de los factores ambientales antes descritos.

La vía, por la cual la latitud puede afectar la q (42,38) es desconocida pero podría ser el resultado, por ejemplo: de modificaciones ambientales físicas, tales como: temperatura, radiación y magnetósfera o en el medio ambiente químico. Una interpretación más lógica de la variabilidad geográfica puede ser posible si los sustratos naturales para el polimorfismo enzimático fuese conocido, pero hasta el presente no hay información definida al respecto.

En la práctica médica actual, se puede esperar que en los grandes centros médicos sea requisito el índice de acetilación ya que sólo conociendo su valor puede el clínico evitar tantos riesgos de reacciones adversas en acetiladores lentos como la poca respuesta al tratamiento en acetiladores rápidos.

Es de esperarse que trabajos futuros dirijan su atención en clarificar diferencias étnicas, las cuales parecen ocurrir en este sistema enzimático, en vista de su relevancia en términos farmacológicos y epidemiológicos.

CONCLUSIONES:

1. La prueba con SMZ para determinar la velocidad de acetilación es un método que se realiza fácil y rápidamente, con poco costo y de considerable utilidad.
2. La determinación en suero fue más confiable que la hecha en orina.
3. Existe un polimorfismo genético que permite una clara separación en acetiladores rápidos y lentos.
4. Ni la edad ni el sexo tuvieron influencia en la separación de ambos fenotipos.
5. El mestizaje venezolano implica la imbricación génica pero es notorio el predominio de la influencia caucásica.

6. La aparición del alelo recesivo homocigoto que controla a los acetiladores lentos sugiere la existencia de factores ecológicos.

RECOMENDACIONES:

- Debido a que los importantes efectos tóxicos, así como la respuesta terapéutica de las aminas aromáticas e hidrazinas son predecibles a través de la determinación de la velocidad de acetilación, basada en la prueba con SMZ. Esta es recomendable para ajustar las dosis en el tratamiento con hidrazina y la terapia incluye anti TBC con INH, entre otras.
- Se recomienda practicar este estudio en el resto del país, incluyendo las poblaciones indígenas venezolanas cuyo aislamiento sociocultural las hace diferentes desde el punto de vista genético-ambiental.

AGRADECIMIENTO:

Queremos dejar constancia de nuestro más sincero reconocimiento a la Lic. Sonia Celis de Celis, del Laboratorio de Medicina Interna II, del Hospital "José María Vargas" de Caracas, por su valiosa colaboración prestada durante la ejecución del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Black M., Mitchell J., Liver physiology and disease, Isoniazid-associate hepatitis in 114 patients. *Gastroenterology* 69 (2): 289-301, 1975.
- Bodansky, H., Durry, P. Acetylator phenotypes and type I diabetics with microvascular disease. *Diabetes* 30: 907-910, 1981.
- Bratton, C. Marshall, K., A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* 128: 537-550, 1939.
- Cartwright, R. et al. Role on n-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis. *Lancet*. 2: 842-845. 1982.
- Cartwright, R., Ahnad, P., Rogers. H. N-acetylation phenotypes in Iraqui and British population. *Hum. Her.* 34 (2): 101-104, 1984.
- Chapron, D., Dramer, P., Merick S. Kinetics discrimination of three sulphametazine acetylation phenotypes. *Clin. Pharmacol. Ther* 27 (1); 104-113, 1980.
- Drayer, D., Reidemberg, M. Clinical consequences of polymorphic acetylation of basic drugs. *Clinical Pharmacol. Ther.* 22(3); 251-258, 1977.
- Dufour, A., Knight R., Harris, H. Genetics of isoniazid metabolism in Caucasian, Negro and Japanese populations, *Science* 145: 391, 1964.
- Du Souich, P., Lalka, D. et. al. Mechanisms of nonlinear disposition kinetics of sulphametazine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 25(2); 172-183. 1979.
- Ellard, G.A., Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 19(5): 610-625, 1976.
- Evans, D.A. Manley, K. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br. Med. J.* 2: 485-491, 1960.
- Evans D. A. White, T.A. Human acetylation polymorphism. *J. Lab. Clin. Med.* 63:394-403, 1964.
- Evans, D., Genetic variations in the acetylation of isoniazid and others drugs. *Ann New York Academy Sciences.* 151: 723-733, 1968.
- Evans D., An improved and simplified method of detecting the acetylator phenotype. *J. Med. Genet.* 6: 405, 1969.
- Evans, P. Survey of the human acetylator polymorphism in spontaneous disorders. *J. Med. Genetic.*, 21:243-253, 1984.
- Eze, L., Obidoa, O. Acetylation of sulphametazine in a Nigerian population. *Biochem. Genetics.* 16 (11); 1073-1077, 1978.
- Giardina E. Stein R. Bigger, T. The relationship between the metabolism of procainamide and sulphametazine. *Circulation* 55(2): 388-393. 1977.
- Gibson, T., Matusik, J. et al. Acetylation of procainamide in man and its relationship to isonicotinic acid hidrazide acetylation phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther* 17 (4): 395-399. 1975.
- Gilman, A. et. al. The pharmacological basis of therapeutics VI Edition. New York Mc. Millan public. Co. p. 12-19, 799-801, 1106-1119, 1200-1215, 1980.
- Glowinski, I. et al. Genetic variation in n-acetylation of carcinogenic arylamines by human and rabbit liver. *Mol. Pharmacol.* 14:940-949, 1978.
- Hearse, D., Weber, W. Multiple N-acetyl transferase and drug metabolism, tissue, distribution, characterization, and significance of mammalian N-acetyltransferase. *Biochem. J.* 132: 519-526, 1973.
- Hess, E. Drug related Lupus, *N. Eng. J. Med.* 318(22), 1988.
- Jounelka, A. Pasanen, M. Mattila, M. Acetylator phenotype and the antihypertensive response to hidralazine. *Acta Med. Scand.* 197: 303-306, 1975.
- Karim, A., Ellerfart M., Evans, D. Human acetylator polymorphism: estimate of allele frequency in Libia and details of global distribution. *J. Med. Genetic*, 18: 325-330, 1981.
- Kukongviriyaph, V., Lulilanond, V. et al. N-acetyltransferase polymorphism in Thailand *Hum. Her.* 34(4): 246, 1984.
- Ladero, J., Fernández, M. Hepatic acetylator polymorphism in breast cancer patients. *Oncology* 44 (6): 341-344, 1987.
- Maynard, S. Penrose L., Smith, C. *Mathematical Tables for research workers in human genetics.* London. A. Churchill LTD. p. 1-2, 16-17, 1961.
- Melo, E., Melo, M. Índice de acetilacao e monitoragem da terapeutics com hidralazina, isoniazida, sulfonamidas e sulfonas. *Rev. Bras. Pat. Clin.* 17 (5): 167-171, 1981.
- Proyecto Venezuela. Análisis inmunogenético de la población venezolana. Julio 1989. Fundacredesa: Dr. Hernán Méndez Castellano y Dra. Mercedes López Contreras.

30. Mitchell Jr. et. al. Metabolic activation of drugs, toxic substances. *Gastroenterology* 68: 392, 1975.
31. Mitchell, J. et. al. Isoniazid liver injury: Clinical spectrum pathology. *Ann., Intern. Med.* 84: 181-92, 1976.
32. Mommsen, S., Aagard, J. Susceptibility in urinary bladder cancer; Acetyltransferase phenotypes. *Cancer Letters*. 32(2): 199-205, 1986.
33. Nachi Ch. Polymorphic acetylation of sulphametazine in a Zimbabwe Population. *J. Med. Genetic*, 25: 29-31, 1988.
34. Olson, W., Mitchell, J. Weber, W., Dose dependent changes in sulfametazine kinetics in rapid and slow isoniazid acetylators. *Clin. Pharmacol. Ther.* 23(2): 204-11, 1978.
35. Pacifici, G., Bencini, C., Rane, A. Acetyltransferase in humans: Development and tissue distribution. *Pharmacology* 32 (5): 283-291, 1986.
36. Peters, J. H., Gordon, G. Karat A. Polymorphic acetylation of the antibacterials, sulfamethazine and dapsone, in South Indian subjects. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 641-648, 1975.
37. Philip, P. Rogers, H. et. al. Acetylators status and its significance to breast cancer and other diseases of the breast. *Eur. J. Cancer Clin Oncol.* 23(11): 1703, 1987.
38. Rao, K. Mitchinson D., Nair N. Sulfadimidine acetylator tests for classification of patients as slow or rapid inactivators of isoniazid, *Br. Med. J.* 3: 495-497, 1970.
39. Reidemberg, M., Drayer D. et. al. Polymorphic acetylation of procainamide in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 17 (6): 722-730, 1975.
40. Sardas, S. Karakaya. A. Determination of the acetylator phenotype in a Turkish population. *Clin. Genetic.* 29 (2): 185-186, 1986.
41. Shroeder, H., Evans. D. The polymorphic acetylation of sulfapiridine in man. *J. Med. Genetic.* 9:168, 1972.
42. Sunhara, S. Urano M., Ogawa. M., Genetical and Geographical studies on isoniazid inactivation. *Science* 134: 1530-1532, 1961.
43. Vree. T., O'Reilly, W., et. al. Determination of the acetylator phenotype and pharmacokinetics of sulphonamides in man. *Clinical Pharmacokinetics* 5: 274-294, 1980.
44. Weber, W. Hein D., Acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol. REv* 37(1): 26-79, 1985.
45. Welpton, R., Watkins, G. Curry S. Bratton-Marshall and liquid chromatographic methods. Compared for determination of sulfametazine acetylators status. *Clin. Chem.* 27 (11): 1911-1914, 1981.



Amigo Bioanalista:

¿Tiene Ud. un fotómetro capaz de leer a las siguientes longitudes de onda: 400-410 nm y 470-510 nm?

Si es así, Ud. puede montar en su laboratorio pruebas como T3, T4, Tiroide Uptake, TSH, LH, FSH, Prolactina, Digoxina, Digitoxina, Teofilina, Fenitoina, Fenobarbital, Cortisol, Estriol, IgE,...sin necesidad de adquirir un costoso contador Gamma y sin tener que manipular reactivos radioactivos. Tampoco tendrá problemas con el vencimiento de los reactivos ya que éstos vienen listos para su uso y el vencimiento es el indicado en la etiqueta de la caja (8 - 12 meses).

¿Le interesa?...Llámenos y le daremos una explicación más detallada.

Teléfonos: (02) 239.13.48 - 34.27.68
35.87.00 - Fax: (02) 239.13.92

**Orientación Clínica y Diagnóstica
...Siempre algo más.**



ULTRALAB, C.A.

Felicita cordialmente a la
**Sociedad Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas**

*por el nacimiento
de su Publicación Científica,
por cuyo éxito y continuidad
expresa sus mejores deseos*

ULTRALAB:
Reactivos venezolanos
que merecen su confianza

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL EN POBLACION INFANTIL MENOR DE 5 AÑOS

AUTORES:

Lic. Milagros Portillo S.
Lic. María Enriqueta Maioriello V.

TUTORES:

Lic. Linda Blitz de Dorfman
Lic. Diana Callejas

RESUMEN

Existe en nuestro país una alta incidencia de enfermedades respiratorias agudas en pacientes pediátricos especialmente neumonías y bronquiolitis. Debido a la ausencia de información sobre el estado inmune de nuestra población y a la etiología de estas infecciones, se realizó un estudio para determinar la prevalencia de anticuerpos contra virus respiratorios Sincicial (VRS), como probable agente etiológico de estos cuadros infecciosos. Cincuenta y seis (56) muestras de suero provenientes de niños menores de 5 años de edad, de los diferentes hospitales públicos de la ciudad de Maracaibo, fueron analizadas por el método de Inmunofluorescencia indirecta; de los sueros estudiados, treinta y dos (32) de ellos resultaron seropositivos, representando un 57%, lo que indica una alta prevalencia de anticuerpos contra el VRS, pudiendo inferir que en nuestro medio el virus afecta el tracto respiratorio de niños a muy temprana edad.

INTRODUCCION

El Virus Respiratorio Sincicial (VRS) es el mayor agente patógeno respiratorio en infantes y niños

pequeños. (8). Pertenece a la familia paramixoviridae y está clasificado en el género del neumovirus. Es un virus de RNA que mide entre 120 y 300 nm. Posee proyecciones glicoprotéicas de 12 nm. de longitud y 10 nm. de ancho, dando una apariencia de brazo (5).

El nombre que inicialmente recibió el VRS fue el de agente productor de la Corisa del Chimpacés (ACC) desde que fue aislado en 1956 de una colonia de Chimpancés que estaban sufriendo de enfermedades respiratorias (1).

Ha sido reconocido en todas partes del mundo como el agente causante de neumonías y bronquiolitis en infantes y de traqueobronquitis e infecciones del trato respiratorio en jóvenes y adultos (5).

Los cultivos celulares infectados con VRS tienen características sinciciales con inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas (7).

El período de incubación de la enfermedad es de 3 a 6 días: con una fluctuación de 2 a 8 días. El agente viral penetra por los ojos, la nariz y ocasionalmente por la boca. La diseminación subsecuente del virus es a través del epitelio del tracto respiratorio, mayormente por transferencia de virus de célu-

* Este trabajo se hizo acreedor al Premio: "Profesora Franca Billi", otorgado por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, año 1990.

las a células, mediante los puentes intracitoplasmáticos. Este se disemina hacia el tracto respiratorio bajo, produciendo bronquiolitis y/o neumonía (5).

La enfermedad del tracto respiratorio inferior producida por este agente viral, parece estar limitada generalmente a los primeros 2 a 3 años de vida. Las infecciones a repetición tales como afecciones del tracto respiratorio superior o bronquitis pueden ocurrir posteriormente, resultando menos severas. La reinfección también puede ocurrir durante los primeros 3 años de vida y una segunda infección en este período puede ser más severa que la primera, por lo tanto la inmunidad no es perdurable (5).

La respuesta inmune normal a la infección del VRS ha sido mejor estudiada recientemente, pero aún se desconocen los componentes responsables de la protección. La infección primaria está asociada con una respuesta de anticuerpos específicos IgM la cual es transitoria. Alrededor de la segunda semana después de la infección pueden ser detectados anticuerpos IgG pero la cantidad disminuye después, entre 1 ó 2 meses (5).

Johnson K. M. y colaboradores demostraron que todos los niños mayores y adultos poseen anticuerpos neutralizantes para VRS; por lo que infecciones en estos grupos reflejan reinfecciones (6).

Gadner y colaboradores describieron una técnica de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFAi) para el diagnóstico rápido de VRS en especímenes clínicos, usada exitosamente en Inglaterra desde 1958. La IFAi fue seleccionada debido al incremento de la sensibilidad de esta técnica (7).

Esta técnica demuestra la presencia de anticuerpos IgG contra VRS en el suero humano, utilizándose como método diagnóstico de algunas infecciones virales humanas y de animales (2).

La prueba es sensible y específica y tiene un 92% de sensibilidad para especímenes positivos y un 94% de especímenes negativos (7).

En vista de la alta incidencia de infecciones respiratorias agudas, especialmente neumonías y bronquiolitis, en pacientes pediátricos y a la ausencia de información sobre el estado inmune de nuestra población a este agente viral específico, se inició un estudio en los hospitales públicos de la ciudad de Maracaibo para determinar la prevalencia de anticuerpos contra el VRS en niños pequeños menores de 5 años.

MATERIALES Y METODOS

El estudio consistió en recolectar 56 muestras de sangre obtenidas al azar de niños menores de 5 años, que asistieron al servicio de pediatría de diferentes hospitales públicos de Maracaibo (Chiquinquirá, Universitario, General del Sur, Centro Materno Infantil Raúl Leoni y Hospital de Niños), durante el período de marzo a mayo 1988. Para el momento de la toma de la muestra los pacientes no presentaban ningún tipo de afección respiratoria.

La toma de la muestra se hizo en dos formas:

— En niños menores de un (1) año se tomó la muestra de sangre de la vena femoral.

— En niños mayores de un (1) año se tomó la muestra de sangre de la vena mediana cefálica utilizando la técnica habitual. (Venocclisis).

Se obtuvieron 3 cc. de sangre en tubos previamente identificados y sin anticoagulante.

Una vez tomadas las muestras fueron remitidas al Laboratorio Regional de Referencia Viroológica del Instituto de Investigaciones Clínicas, para la obtención de los sueros correspondientes.

La sangre recolectada fue centrifugada a 1.000 rpm. durante 10'; utilizando pipetas Pasteur se separó el suero de cada una de las muestras, el cual posteriormente fue almacenado en viales a -20°C .

Antes de realizar la prueba, los sueros se colocaron en Baño de María a 56°C durante 30', con el fin de eliminar las reacciones inespecíficas e inactivar el complemento.

Se utilizó un kit de Inmunofluorescencia indirecta (Virgo Tm Reagents, manufacturado por Electronucleonics).

Láminas portaobjeto conteniendo células infectadas con el virus, fueron colocadas a temperatura ambiente.

Se procedió a cubrir cada hoyito de la lámina con una gota del suero de cada paciente diluido 1:8; fueron incluidos control positivo y control negativo. Se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 30'. Las láminas se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y se secaron con aire caliente.

Una gota del conjugado rehidratado fue colocada encima de cada orificio. Los controles fueron tratados de la misma manera. Las láminas se incubaron nuevamente en cámara húmeda a 37°C durante 30'. Se repitieron los pasos de lavado y secado,

y se agregaron 4 gotas de glicerol buferado sobre la parte media de cada lámina. Se cubrió con una lámina cubreobjeto y se observó al microscopio de fluorescencia (Zeiss MC-63) con el objetivo de 40x.

Se consideró la prueba positiva cuando se observó una fluorescencia verde manzana brillante en el citoplasma de las células infectadas, observándose también la formación de sincicio, es decir, agrupación de varias células gigantes multinucleadas (control positivo).

Se consideró la prueba negativa, cuando no se observó fluorescencia verde manzana brillante en las células infectadas, observándose el citoplasma de la célula de color rojo o naranja y el núcleo gris mate o negro (control negativo).

El fundamento del método descrito consiste en dos pasos reaccionantes:

1. El suero humano a ser probado es puesto en contacto con el sustrato antigénico; el anticuerpo si está presente en el suero se unirá al antígeno formando un complejo antígeno-anticuerpo, de lo contrario si no existen anticuerpos no se forma el complejo y todos los componentes del suero son lavados en el ciclo de enjuague.

2. Este paso incluye agregar un anticuerpo antihumano ligado con isotiocianato de fluoresceína; si se forma el complejo antígeno-anticuerpo, el anticuerpo fluorescente se unirá y dará una reacción positiva (2).

RESULTADOS

En los estudios realizados se obtuvo que de 56 sueros analizados, 32 de ellos resultaron seropositivos, lo que representa un 57%. (VER GRAFICO NUMERO 1).

En el GRAFICO N° 2 se muestra la presencia de anticuerpos contra el VRS por grupos etáreos. Se observa que en edades comprendidas entre 1 día y 6 meses de edad, fueron investigados un total de 20 casos de los cuales 11 resultaron seropositivos para un total de 55%; de 7 a 12 meses, de 9 casos investigados 1 resultó seropositivo (11%); de 13 a 24 meses, 3 resultaron seropositivos, significando un 30%; de 25 a 36 meses, 7 de los 7 casos fueron seropositivos, (100%); de 37 a 48 meses, 4 de los 4 casos resultaron seropositivos para un total de 100% y de 49 a 60 meses, 6 de los 6 casos estudiados resultaron seropositivos (100%).

Gráfico 1

Relación de casos positivos y negativos para virus respiratorio Syncicial en niños menores de 5 años

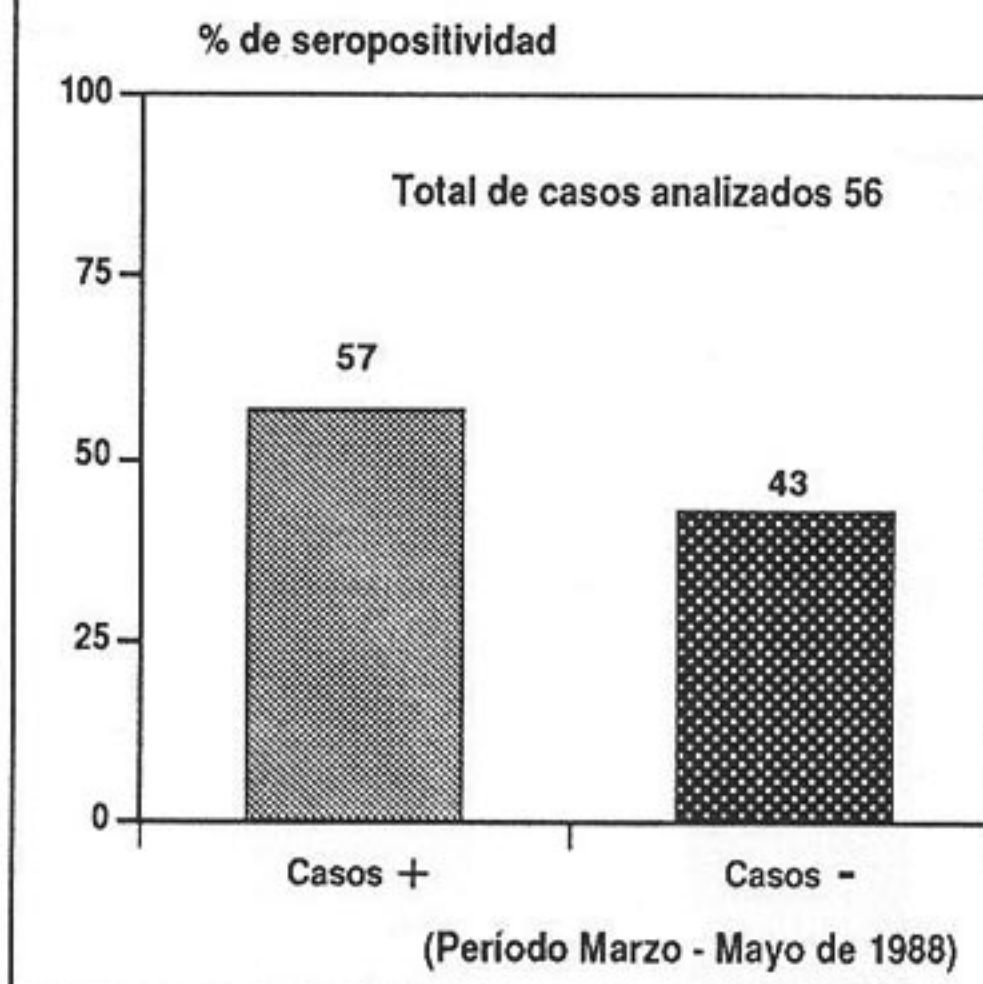
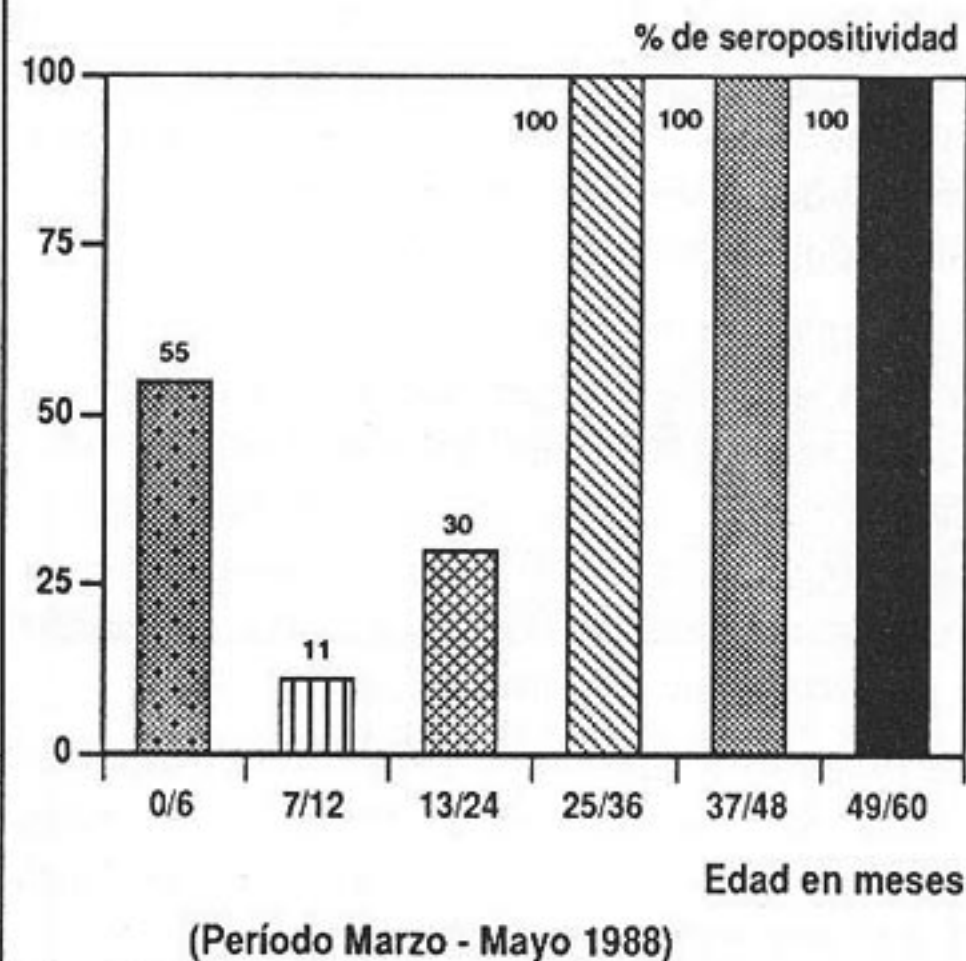
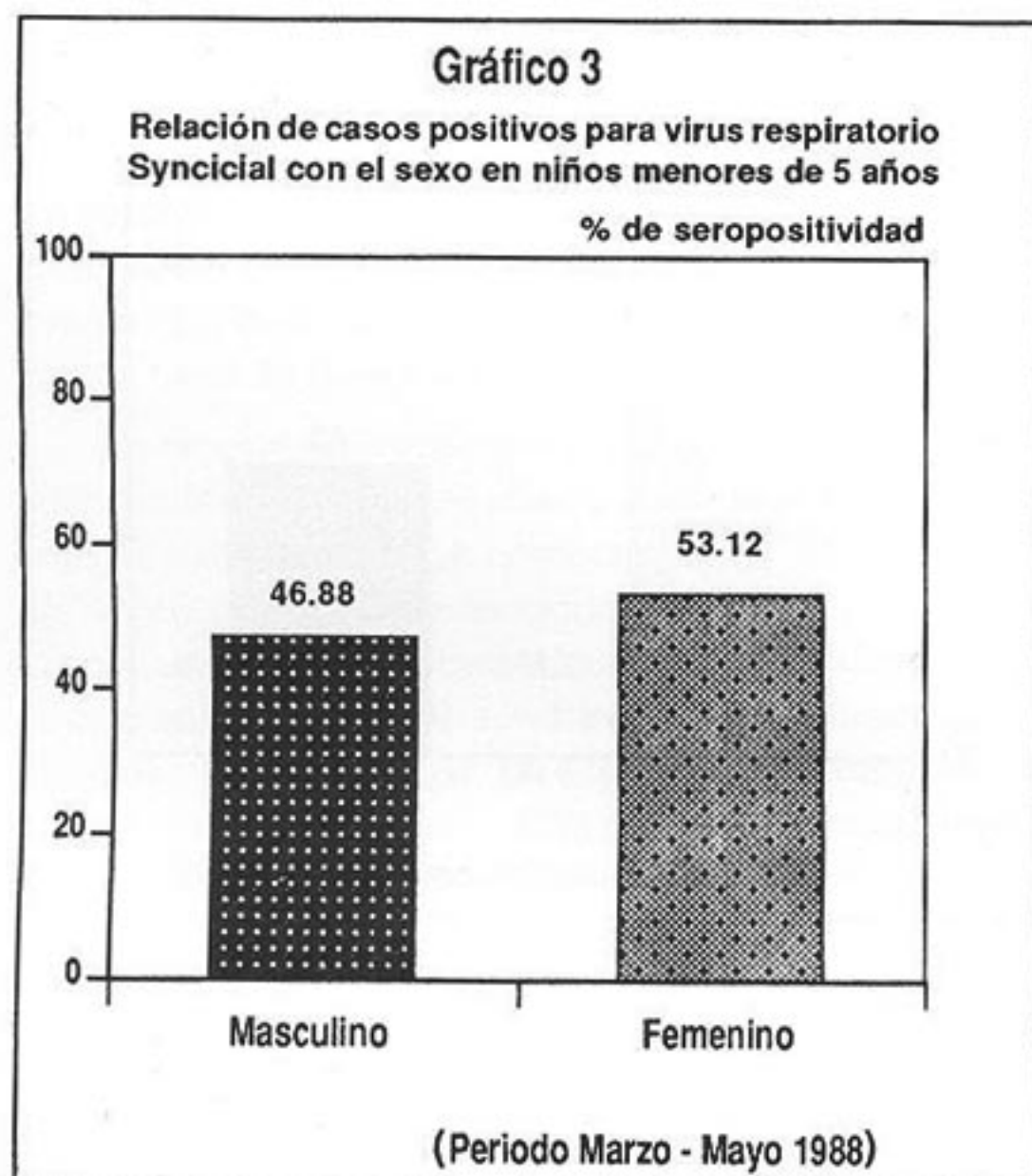


Gráfico 2

Presencia de anticuerpos de virus respiratorio Syncicial por grupos etáreos en niños menores de 5 años



En el GRAFICO N° 3 se relacionan los casos seropositivos para VRS con el sexo. Se observa que en el sexo femenino de 23 casos estudiados, 17 fueron seropositivos, significando un 53.12% y en el sexo masculino, de 33 casos estudiados, 15 resultaron seropositivos, representando un 46.88%.



DISCUSION

Desde que el VRS fue aislado por primera vez en el año 1956, se ha podido comprobar su asociación con enfermedades del tracto respiratorio bajo, que afectan mayormente a la población infantil en diversas partes del mundo (4).

El estudio de la prevalencia de anticuerpos contra VRS en muestras de población infantil de Maracaibo, resultó bastante complejo debido a una serie de factores que influyen en la recopilación de información; ya que hasta ahora en nuestro país no se han realizado estudios serios de esta índole que sirvan de base para esta investigación.

Los resultados obtenidos en otras investigaciones realizadas reportan que el 100% de los niños durante los primeros 5 años de vida, poseen anticuerpos contra VRS (3).

En una investigación realizada en Rusia, el 50% de los niños estudiados fueron seropositivos (9).

Lo obtenido en nuestro trabajo demuestra una alta prevalencia de anticuerpos séricos contra VRS en nuestro medio (57%), aunque inferior al porcentaje obtenido en Estados Unidos; esto se debe a que probablemente en USA durante la época de invierno, los individuos tienden a hacinarse en lugares cerrados, lo que induce a pensar que el virus es fácilmente transmisible de un miembro a otro de la familia. En algunos casos los niños re infectados, miembros de la familia o de la comunidad, sirven como elemento vector de infecciones para el resto de la población infantil susceptible. En Venezuela no tenemos este período de invierno, sin embargo las bajas condiciones socioeconómicas que presentan los pacientes estudiados, nos induce a pensar que estos viven en condiciones de hacinamiento; de allí el alto porcentaje de seropositividad obtenido.

Con respecto al porcentaje de seropositividad por grupos etáreos tenemos que en Pennsylvania, USA, Mc Clellan y colaboradores encontraron que en niños cuyas edades comprendidas entre 6 y 11 meses, hubo un 6% de seropositividad para VRS y en niños mayores de 1 año, un 16% de seropositividad (4).

En Manchester, Inglaterra, el 38 a 41% de niños en edades comprendidas entre 7 meses y 2 años, tienen anticuerpos (4).

En Londres, Inglaterra el 8% de niños entre 6 a 12 meses; el 38% de niños entre 1 a 2 años tienen anticuerpos (4).

Estudios seroepidemiológicos efectuados en Estados Unidos y Japón, han revelado que en niños entre 1 y 2 años de edad, del 50% al 75%, tienen anticuerpos circulantes contra el VRS y niños de 4 años de edad por lo menos de 53% al 93%, han desarrollado anticuerpos (1).

Nuestros resultados guardan relación con lo obtenido en las anteriores investigaciones; ya que se observa un elevado porcentaje de anticuerpos séricos contra el virus (55%), en edades comprendidas entre 0 y 6 meses. Esto se debe probablemente a la presencia de anticuerpos maternos, además de los que ya se han formado en el individuo por el mismo proceso de infección viral.

Se conoce que los anticuerpos contra VRS aparecen temprano en la vida del individuo. Se han detectado anticuerpos maternos en niños hasta los 4 meses disminuyendo su aparición en los próximos meses de vida (4).

También se aprecia una disminución de los títulos de anticuerpos entre 7 y 12 meses (11%), con un relativo aumento a partir de los 13 meses (30%), el cual puede persistir a lo largo de la vida del individuo, quizás mantenido por reinfecciones las cuales se tornan leves.

Una de las características importantes de la enfermedad, es que la reinfección ocurre muy frecuentemente en ausencia de cambios antigénicos significativos, ya que la presencia de anticuerpos no confiere inmunización total.

Otro dato significativo es el hecho de que la técnica utilizada en esta investigación es más sensible y específica que otros métodos utilizados (fijación de complemento, Elisa, etc.), ya que tiene un 92% de sensibilidad para especímenes positivos y un 94% de sensibilidad para especímenes negativos.

En cuanto al sexo, en las bibliografías revisadas, no se encontró ninguna relación entre el sexo del paciente y la prevalencia de anticuerpos, sin embargo en esta investigación notamos que a pesar de ser mayor la población masculina estudiada, el porcentaje de seropositividad fue menor (46,8%) con respecto al sexo femenino (53,2%).

Para establecer la relación entre prevalencia de anticuerpos y el sexo del paciente, es necesario realizar estudios posteriores con mayor número de pacientes donde se tome en cuenta el sistema inmunológico de éstos.

RECOMENDACION

Debido a que nuestro trabajo constituye un inicio en el estudio de los anticuerpos séricos contra VRS en nuestro medio, se hacen indispensables estudios subsecuentes para completar y ampliar la información.

Cabe destacar que realizando estudios seroepidemiológicos longitudinales desde la temprana infancia, tomando muestras en fase aguda y convaleciente de la enfermedad, podremos entender mejor la inmunidad producida contra las infecciones del VRS.

AGRADECIMIENTO

Al personal médico y de enfermería que laboran en los Servicios de Pediatría de los Hospitales: Universitario, Chinququirá, General del Sur; Hospital de Niños y Centro Materno Infantil "Raúl Leoni".

Nuestro reconocimiento a la Lic. Linda Blitz de Dorfman, Lic. Diana Callejas, Bio. Hugo Hernández; al Personal Técnico de la Sección de Virología, del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Medicina especialmente al Dr. Florencio Añez.

Agradecemos al Dr. Ferdinando Liprandi del IVIC y al personal bibliotecario de este Instituto.

A la Sra. Lisbeth Portillo nuestras gracias por su valiosa colaboración.

BIBLIOGRAFIA

1. BELSE, R.; BERNSTEIN, J. and DANSBY, K. (1984). *Respiratory Syncytial Virus*. Textbook of Human virology Company IWC. Littleton. Masachusset. 361-377.
2. BRACHO, D. (1985). *Manual de Inmunodiagnóstico. Fundamentos y aplicaciones*. EDILUZ. Universidad del Zulia. 15-16.
3. CATE, T.R. (1986). *Respiratory tract Infections in Virology in Medicine*. Ed by Henry Rothschild & Craing Cohen. Oxford University. Press, New York. 119.
4. DOGGETT, J. (1965). *Antibodies to Respiratory Syncytial Virus in Human Sera from Different Regions of the World*. Bull. Org. Mond. Santé; Bull. Wld. Hlth Org. 32: 849-853.
5. HALL, C.B. (1987). *Respiratory Syncytial Virus in Principles and Pratices of Clinical Virology*. Edited by A.J. Zuckerman. L.E., Banatvalia and J.R. Pattison; John Wiley & Sons. 239-249.
6. JONHSON, K.M.; BLOOM, H.H.; MUFSON, M.A. and CHANOK, P.M. (1962). *Natural reinfection of adults by Respiratory Syncytial Virus. Possible relation to mild upper Respiratory Disease*. N. Engl. J. Med. 267: 68-72.
7. KAUL, A.; SCOTT, R.; GALLANGHER, M.; SCOTT, M.; CLEMENT J. and OGRA P. (1978). *Respiratory Syncytial Virus Infection*. Am I Dis Child. 132: 1088-1090.
8. POTHIER, P.; NICOLAS, J.C.; DE SAINT MAUR, G.P.; GHIM, S.; KASMIERCZAK, A. and BRICOUT, F. (1985). *Monoclonal Antibodies Against Respiratory Syncytial Virus and their use for rapid detection of Virus in Nasopharyngeal Secretions*. J Clin Microbiol. 21: 286-287.
9. YANKEVICH, O.D.; DREINZIN, R.S.; MAKHLINOVSKAYA, N.L.; GRODNITSKAYA (1976). *Viraemia in Respiration Virus Infection (In Russian)*. Abstrat on Hygiene. 51: 996.

Laboratorio Bártoli

Domingo Bártoli
Director

**Avenida La Estrella, Edif. Ulises, P.B.,
San Bernardino, Caracas**
Teléfonos: 52.17.06 - 52.12.79

EL CANCER DE PROSTATA Y SU DETECCION

ABBOTT LABORATORIES, C.A.

DIVISION DIAGNOSTICOS

Lic. CARMEN ALICIA RUIZ, MSc

La próstata, es una glándula sexual del tamaño de una nuez, ubicada justo debajo de la vejiga urinaria rodeando parte de la uretra, siendo su principal función parte del fluido necesario para la eyaculación.

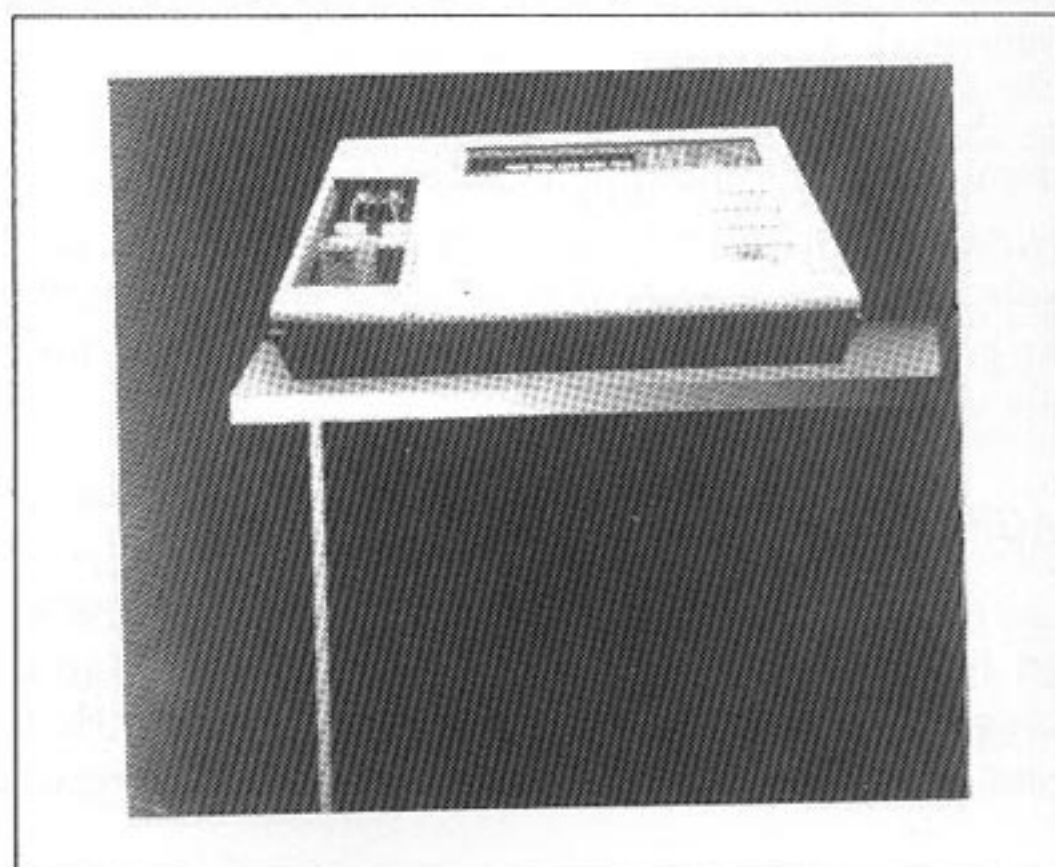
Según datos del Registro Central de Cáncer del M.S.A.S., en Venezuela el cáncer prostático es la tercera causa de muerte en el hombre y la número uno en incidencia. Se puede estimar, en forma conservadora, que para 1992 en nuestro país existen cerca de 46.200 hombres con posibilidad de padecer esta enfermedad (30% se encontrarían en estadios tempranos y el 70% restante en estadios avanzados). El riesgo de contraer cáncer de próstata se incrementa con la edad, por lo que es recomendable que todos los hombres de 40 años o mayores se sometan a un chequeo médico anual que incluya un examen prostático.

Los síntomas del cáncer de próstata están usualmente asociados con una condición denominada hipertrofia prostática benigna (excesivo crecimiento de la zona más interna de la glándula), pero no es cáncer. En cuanto a la presencia del tumor prostático, los síntomas más comunes incluyen la presencia de sangre o pus en la orina o en el semen y eyaculación dolorosa. Dado que este tipo de cáncer se disemina a los nódulos linfáticos cercanos y al sistema óseo, muchos pacientes experimentan dolor en los huesos y articulaciones.

El método más utilizado para la detección del cáncer de próstata es el examen dígito-rectal, el cual toma muy poco tiempo e involucra un mínimo de molestia para el paciente. Existe una prueba sanguínea que mide la presencia de la fosfatasa ácida prostática, enzima producida por los tejidos prostáticos normales y a medida que la enfermedad avanza, su producción se incrementa, pero niveles altos son generalmente encontrados en pacientes con estadios avanzados.

Actualmente, existe otro procedimiento que junto al examen dígito-rectal permite detectar la enfermedad en los estadios tempranos. El mismo consiste en otra prueba sanguínea que permite detectar los niveles del antígeno prostático específico, PSA ("Prostatic Specific Antigen", por sus siglas en inglés).

El PSA, constituye la herramienta más moderna desarrollada para la detección del cáncer de próstata. Su gran importancia radica en una de sus características principales, dicho antígeno es producido exclusivamente por el tejido prostático, así en etapas muy tempranas de la enfermedad, su nivel comienza a aumentar y ya es detectable, lo cual permite al médico determinar cambios que no pueden ser evidenciados con otras pruebas serológicas o por el examen dígito-rectal por sí sólo; contribuyendo además al establecimiento de la respuesta a la terapia que pueda estar recibiendo un paciente en tratamiento.



ESTUDIO CLINICO-MICOLOGICO DE MICOSIS SUPERFICIALES DE UNA COMUNIDAD MILITAR EN PUERTO AYACUCHO, TERRITORIO FEDERAL AMAZONAS

AUTORES:

Lic. Rosanna Martín Angelucci
Lic. María de los Angeles Rivas García

TUTORA:

Lic. María Milagros Tremarias*

RESUMEN

Estudios previos han demostrado que existe una alta incidencia de infecciones micóticas superficiales en las Comunidades Militares. Estas micosis aunque no son debilitantes o amenazadoras para la vida, pueden en el caso de las dermatofitosis, producir incapacidad temporal en el personal de servicio y constituyen un grave problema de salud en estas instituciones.

El objetivo principal del presente trabajo fue determinar la incidencia de infecciones micóticas superficiales en el Comando Ribereño de la Infantería de Marina (CRIM) situado en la ciudad de Puerto Ayacucho, Territorio Federal Amazonas, donde no existían estudios previos que señalaran la magnitud de este problema.

El CRIM contaba para ese momento con una población de 150 Infantes de Marina, de los cuales fueron escogidos al azar 120, del sexo masculino,

con edades comprendidas entre 18-25 años y un tiempo de servicio en la Armada de 1 semana a 3 años.

El diagnóstico clínico de las lesiones era realizado por el médico que se encontraba para ese momento en el CRIM. De los 120 Infantes examinados se encontraron 119 (99.17%) con clínica presuntiva de micosis superficiales. Para comprobación diagnóstica micológica se utilizó el examen directo (KOH+tinta Parker y Clorazol Black-E) y cultivo en medios especiales para hongos (Agar Mycosel y Lactrimel). Los resultados en la investigación micológica indicaron que 114 Infantes (95.8%) estaban afectados por micosis superficiales: 85 con dermatofitosis (74.56%), 7 con pitiriasis versicolor (6.14%), 22 con dermatofitosis pitiriasis versicolor (19.30%).

El estudio demostró que hay un alto porcentaje de dermatofitosis, siendo las más frecuentes la Tinea pedis con 103 casos (82.4%) y la tinea unguis

* Profesora de la Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Este trabajo se hizo acreedor al Premio "Profesora Franca Billi", año 1991, otorgado por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas.

con 15 casos (12%). Los principales agentes etiológicos aislados fueron el *Trichophyton mentagrophytes* seguido por el *Trichophyton rubrum*, aunque no se observaron diferencias significativas entre ambos hongos.

El único agente causal aislado de los 29 casos de pitiriasis versicolor fue *Malassezia furfur*; 22 casos presentaron fluorescencia con la luz de Wood y 7 casos no.

Entre los factores predisponentes que favorecen la alta incidencia de micosis superficiales en Comunidades Militares tenemos: el tipo de calzado utilizado (botas), el tiempo de permanencia con las mismas, el intercambio de las prendas de vestir (pantalones, botas, etc.), las condiciones climatológicas de la zona, los viajes que realizan los Infantes denominados períodos de campo sin guardar las medidas adecuadas de higiene, el uso de agentes comunes y la predisposición del hospedero.

INTRODUCCION

Estudios previos (Cuauro, I., 1987; Molero de Lara, M. y col., 1987; Guanipa-Urbina, O. y col., 1985; Guanipa Urbina, O. y col., 1989) han demostrado que existe una alta incidencia de infecciones micóticas superficiales en las comunidades militares.

Estas micosis aunque no son debilitantes o amenazadoras para la vida, pueden en el caso de las dermatofitosis, producir incapacidad temporal en el personal de servicio y constituyen un grave problema de salud en estas instituciones.

Factores asociados con el uso de ambientes comunes en condiciones higiénicas no adecuadas, el uso de calzado cerrado que favorece la humedad y maceración de la piel, un clima que propicia una sudoración excesiva y la predisposición del hospedero se correlacionarían para el establecimiento de estas micosis en las comunidades militares (Guanipa Urbina, O. y col., 1987).

El comando Ribereño de la Infantería de Marina (CRIM) "AF. Manuel Echeverría", está ubicado en la ciudad de Puerto Ayacucho. Quincenalmente, el médico que se encuentra de guardia en el CRIM, realiza una revista sanitaria al personal de tropa, donde se ha evidenciado una alta incidencia de

dermatofitosis, sumado a que también se han reportado condiciones de poca higiene en las duchas y en las formas de lavar y almacenar las prendas de vestir.

Esta situación despertó el ánimo de investigación en torno a variables como: ¿Cuáles serán los agentes etiológicos de estas micosis superficiales? ¿Habrán adquirido la infección en el Comando? ¿Se requerirá de algún tratamiento masificado? La identificación del o los agentes etiológicos permitiría indicar un tratamiento específico más efectivo, evitando así los más costosos de "amplio espectro".

Con este fin se instaló un laboratorio de Micología en la Unidad Médico-Odontológica del CRIM incluyendo un cuarto oscuro para la exploración con la lámpara de Wood, donde se examinaron ciento veinte (120) individuos del personal de tropa, de este Comando.

Para este trabajo de investigación se agruparon dentro de las micosis superficiales a todas las infecciones causadas por el parasitismo de hongos en la piel, pelos y uñas, que incluyen las siguientes enfermedades: pitiriasis versicolor, dermatofitosis, candidiasis cutánea y piedras.

A continuación presentamos las características de las micosis evaluadas:

1. PITIRIASIS VERSICOLOR

La pitiriasis versicolor es una micosis superficial producida por el parasitismo de *Malassezia furfur* (*M. furfur*) *Malassezia ovalis* (*M. ovalis*) sobre la piel, que se caracteriza por la aparición de lesiones pequeñas, descamativas, de diferentes colores, hipercrómicas o hipocrómicas, casi siempre descamantes localizadas en el tronco, cuello, cara y brazos, muy raramente en piernas y cabeza. Estas lesiones pueden confluír cubriendo grandes áreas y son generalmente fluorescentes bajo la luz ultravioleta de Wood.

El Dr. Dante Borelli, describió un nuevo agente de la pitiriasis versicolor, el cual denominó *Malassezia ovalis*; de acuerdo a su experiencia, este nuevo agente es el causante de la sexta parte de los casos de pitiriasis versicolor en Venezuela; se trata de una micosis de distribución universal, afecta el 50% de la población general que habita en las áreas tropicales y sólo al 0.5% de la población de las áreas templadas. Aunque la enfermedad ocurre a cualquier

edad, la de máxima incidencia es la comprendida entre los 20 y 25 años.

El *Pityrosporum orbiculare* y el *Pityrosporum ovale*, son habitantes de la flora normal de la piel; cambian de su forma saprófita de levadura, a su forma patógena de micelio, bajo la influencia de varios factores tales como transpiración, embarazo, obesidad, diabetes, etc.

El contagio de la pitiriasis versicolor puede ser directo o indirecto a partir de otros enfermos. Las lesiones clínicas son muy fáciles de diagnosticar, el color varía de acuerdo a la pigmentación normal de la piel del paciente, el área de exposición al sol y a la severidad de la enfermedad.

Las manchas son descritas como hipocrómicas si la lesión presenta una coloración más clara que la pigmentación normal de la piel del paciente, y son descritas como hiperocrómicas cuando son más oscuras que la piel.

Las lesiones a veces pueden presentarse como pequeñas pápulas-vesículas, diseminadas: tienen una alta tasa de recurrencia y pueden aparecer después del tratamiento con corticoesteroides. Las escamas de las lesiones se desprenden fácilmente al rasparla con las uñas o bisturí.

M. furfur y la *M. ovalis* impiden la pigmentación de la piel puesto que producen un ácido dicarboxílico, el cual es un inhibidor de la tirosinasa que altera la pigmentación epidérmica.

A nivel histológico se ha observado que las hifas y las levaduras gemantes están restringidas a las capas más externas del estrato córneo.

El diagnóstico diferencial debe hacerse con la pitiriasis rosada o podría ser con sífilis secundaria, en casos acromiantes diferenciarlas de la pitiriasis alba y la lepra indeterminada.

2. DERMATOFITOSIS

Las dermatofitosis constituyen un grupo de micosis causadas por hongos taxonómicamente relacionados que afectan los tejidos queratinizados: piel, cabello y uñas en el humano. Estos hongos pertenecen a numerosas especies agrupadas en tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.

Los dermatofitos son hongos capaces de digerir la queratina, una escleroproteína, la cual es utilizada

raramente en la naturaleza como sustrato nutritivo debido a que éste es altamente insoluble. Constituyen el grupo más importante entre los hongos productores de micosis superficiales.

Las dermatofitosis afectan a hombres, mujeres y niños, sin distinción de raza. Las lesiones que producen son llamadas comúnmente tineas o tiñas, pudiendo localizarse en diferentes regiones del cuerpo. En base a esto se han clasificado en: tinea capitis (cuero cabelludo), tinea barbae (barba y bigote), tinea corporis (piel lampiña), tinea cruris (pliegues inguinales, crurales y glúteos), tinea pedis (pies) y tinea unguis (uñas).

La edad desempeña un papel preponderante en la epidemiología de esta afección, así la tinea de la cabeza es casi exclusiva de niños y suele desaparecer espontáneamente al llegar a la pubertad, cuando las glándulas sebáceas estimuladas por las hormonas sexuales producen ácidos grasos saturados, inhiben el crecimiento del hongo.

En cambio, la tinea de los pies es prevalente en el adulto, lo cual se cree sea debido a una mayor oportunidad de infección (piscinas, baños públicos, etc.). El uso de calzado cerrado especialmente de botas, favorecen el incremento de la tinea de los pies, cuyos síntomas suelen ser más intensos en verano cuando por efecto del calor la sudoración es mayor. Taplin y cols, observaron una incidencia mayor del 80% entre los soldados norteamericanos en Vietnam. La tinea de los pies es prácticamente inexistente entre los indígenas que no usan calzado.

En la tinea, como en la mayoría de las micosis superficiales, el signo casi siempre constante es la descamación, que puede o no estar acompañada de otros signos como son: eritema, vesículas o vesículo pústulas y ampollas, formando manchas o placas aisladas o confluentes, de diferentes tamaños, de bordes bien delimitados, casi siempre más activos en la periferia que en el centro.

El síntoma presente, casi siempre es el prurito y en lesiones inflamatorias puede existir dolor.

Los dermatofitos pueden clasificarse de acuerdo a su afinidad por el sustrato como:

1. Geofilicos: afinidad por la tierra, ejemplo: *Microsporum*, *gypseum*, *Trichophyton terrestre*.
2. Zoofilicos parásitos primarios de animales que pueden transmitirse al hombre, ejemplo: *Micro-*

porum canis, *Trichophyton*, *Mentagrophytes* variedad granulosa.

3. Antropofílicos: parásitos primarios del hombre, ejemplo: *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* variedad vellosa.

OBJETIVOS:

1. Estudiar la incidencia de micosis superficiales en una comunidad militar de Puerto Ayacucho, Territorio Federal Amazonas.
2. Identificar los diversos agentes etiológicos responsables de las infecciones micóticas encontradas en la población estudiada.
3. Estudiar la afinidad de los diferentes dermatofitos por ciertas áreas corporales.
4. Identificar la fuente de infección de acuerdo al tipo de micosis superficial encontrada.
5. Estudio comparativo de la efectividad entre el examen directo micológico y el cultivo en el diagnóstico de las infecciones micóticas superficiales.
6. Estudio comparativo de la efectividad entre el Clorazol-Black-E y el KOH con tinta Parker, como sustancias aclarantes para el examen directo.

MATERIALES Y METODOS

1. Población estudiada

Se realizó el estudio clínico-micológico en el Comando Ribereño de la Infantería de Marina (CRIM), situado en la ciudad de Puerto Ayacucho, Territorio Federal Amazonas. Este contaba para el momento del estudio, con una población constituida por 150 Infantes de Marina, de los cuales fueron escogidos al azar 120 del sexo masculino, con edades comprendidas entre 18 y 25 años y en un tiempo de servicio en la Armada de 1 semana a 3 años.

La etiología micótica de las lesiones se confirmó mediante examen directo y/o cultivo de 206 muestras clínicas tomadas a estos pacientes.

A todos los individuos estudiados, se les realizó una encuesta, con el fin de determinar las posibles fuentes de infección.

2. Toma de muestra

La toma de la muestra era una de las fases más importantes del examen micológico, ya que de ella dependía el hallazgo o no del hongo, en el examen directo y/o cultivos. Previo a ello se interrogó al paciente sobre la utilización de tratamiento local, el cual podría interferir en los resultados. Si éste era el caso se recomendaba suspenderlo durante un tiempo no menor de ocho días antes de la toma de la muestra.

La muestra se tomó de los sitios más típicos y más activos de la lesión, guardando las debidas condiciones de asepsia, con instrumentos y envases estériles para eliminar la contaminación.

La cantidad de muestra era crítica para el aislamiento de hongos. De no recolectarse material suficiente, se prefirió realizar el examen directo, para visualizar las formas parasitarias en el tejido, antes que utilizar el material para el cultivo.

Al sitio escogido se le practicó asepsia con alcohol etílico al 70%, para destruir algunos de los microorganismos que con frecuencia contaminan la muestra. Para tal efecto, se utilizó gasa en lugar de algodón, para no dejar hebras adheridas a la piel, las cuales podrían ser confundidas con hifas, al realizar el examen directo.

Según se recomienda en la literatura especializada cuando se sospecha de candidiasis y se desea hacer cultivo, no debe lavarse con alcohol, porque éste mata la levadura. En el presente estudio no se observaron lesiones de candidiasis cutánea.

2.1 Escamas epidérmicas

Se tomaron muestras de escamas epidérmicas cuando se sospechaba de dermatofitosis o pitiriasis versicolor, teniendo ya una orientación clínico-epidemiológica.

a. Pitiriasis versicolor

Si se sospechaba de una pitiriasis versicolor, la muestra a elegir eran las escamas epidérmicas, tomando la muestra con cinta adhesiva transparente (método de Porto, 1953). Generalmente no se acostumbra en estos casos, cultivar la muestra.

Con la ayuda de la lámpara de Wood, en la oscuridad, se localizaron aquellas lesiones de pitiriasis, que presentaban una fluorescencia amarilla. Para la toma de la muestra con cinta adhesiva se esco-

gieron preferencialmente las lesiones que fluorescían, sin embargo, hay que tener en cuenta que no todos los pacientes con pitiriasis versicolor presentaban lesiones que fluorescían con la luz de Wood.

Se escogió una lesión (hiper o hipocrómica) descamante (si no hay escamas, no puede haber micosis superficial y tampoco pitiriasis versicolor).

Se tomó una lámina portaobjetos limpia, nueva. Se cortaba un trozo de cinta adhesiva transparente, que excedía el tamaño de una lámina portaobjetos (aprox. 10 cms). Se tomó la cinta por los extremos y se le aplicó con el pulgar, fuertemente a la lesión escogida para que las escamas se adhirieran y luego se arrancó con un movimiento rápido. Se colocó el adhesivo sobre la lámina portaobjetos, doblando los extremos de la cinta hacia la cara posterior del mismo. La forma de la lesión se veía claramente, a simple vista, reproducida en una huella blanquecina estampada en el adhesivo, esa mancha es la que se enfocó para investigar la presencia del hongo.

Se colocó de un lado de la cinta adhesiva una gota de KOH al 20% y una gota de tinta Parker azul, dejando que estas sustancias penetraran por capilaridad.

Se examinaron al microscopio, con bajo y medio aumento. (Basado en la metodología descrita por Rorelli, D. 1960; Fossaert y col. 1990).

b. Dermatofitosis

Cuando se sospechaba la presencia de tiñas, la toma de la muestra por raspado, era el método adecuado para practicar el examen directo y el cultivo.

Se desinfectó el área de la lesión con una gasa humedecida en alcohol de 70, dejándola secar.

Se raspaba con un bisturí estéril de las zonas más activas de la lesión (periferia o borde), donde la infección está activa y el hongo viable.

2.2 Uñas

Tinea unguis

Antes de tomar la muestra, se limpió el área con alcohol de 70%, para disminuir la presencia de microorganismos contaminantes.

La muestra se tomó mediante onicotomía con pinza Gubia de Luer estéril, tomando trocitos de la

uña, teniendo cuidado de descartar los primeros fragmentos externos, generalmente contaminados con bacterias y hongos saprofitos.

Estos trocitos de uñas, se utilizaron para el examen directo (KOH y/o Clorazol Black E) y el cultivo (LACTRIMEL, MICOSEL).

3. Reactivos empleados

a. Medios de cultivos:

- Agar micosel, BBL 11461
- Lactrimel
- Agar urea, DIFCO 0283-01-7

Como control positivo se utilizó una cepa de referencia de *T. mentagrophytes* y como control negativo el *T. rubrum*, ambos para la correcta interpretación de los cultivos en el medio Agar-Urea.

b. Líquidos de Montaje

- Hidróxido de potasio (KOH) 20%
- KOH-Tinta Parker
- Agua glicerinada
- Azul de lactofenol
- Clorazol "Black-E"

4. Procedimientos

Para la preparación de medios comerciales se utilizaron las recomendaciones de los fabricantes; el LACTRIMEL se elaboró de acuerdo a la fórmula recomendada por Borelli (1962).

En relación a los líquidos de montaje, se emplearon los procedimientos descritos, para las pruebas del KOH al 20% y AZUL DE LACTOFENOL; (Campbell y Stewart, 1980).

Para la tinción clorazol Black-E se utilizó el método de Villanueva y cols. (1986); para el KOH-Tinta Parker y agua glicerinada se siguieron las recomendaciones empleadas en la Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis (UCV).

5. Identificación del agente etiológico

Los tres géneros de dermatofitos presentan la misma forma parasitaria al examen directo de la muestra clínica.

La identificación de los agentes etiológicos en las diversas dermatofitosis se basó en las características macroscópica de las colonias (aspecto, color, pigmento difusible, etc.) y en la morfología microscópica: tipo de hifas, forma y abundancia de las macroconidias, forma y abundancia de las microconidias. (Rebell y Taplin, 1979); esto fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones de Micología de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV.

Se llevó a cabo como prueba adicional para la diferenciación entre *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*; la prueba de hidrólisis de la urea. El agar urea utilizado en esta prueba contiene rojo de fenol, el cual sirve como un indicador de la reacción alcalina que se produce cuando la urea más rápidamente de lo que lo hacen otros dermatofitos. *T. rubrum* da una reacción negativa (Campell y Stewart. 1980).

Al realizar el examen microscópico directo de las colonias, con azul de lactofenol, y observar sus estructuras fúngicas se podía distinguir entre los tres géneros:

1. *Trichophyton*: presentó escasas macroconidias alargadas, en forma de lápiz, de pared lisa y delgada. Forma abundantes microconidias, las cuales eran esféricas en la especie *mentagrophytes* y en forma de lágrimas en la especie *rubrum*. Además *T. mentagrophytes* presentaba abundantes hifas en espiral.
2. *Microsporum*: presentó abundantes macronidias, generalmente fusiformes a elípticas, de pared rugosa y gruesa. La microconidias no son abundantes ni diagnósticas.
3. *Epidermophyton*: presentó abundantes macroconidias en forma de raqueta o dedos de guantes, de pared lisa y gruesa, con una base de inserción a la hifa ancha. Este género no forma microconidias. También se observaron hifas en espiral.

RESULTADOS

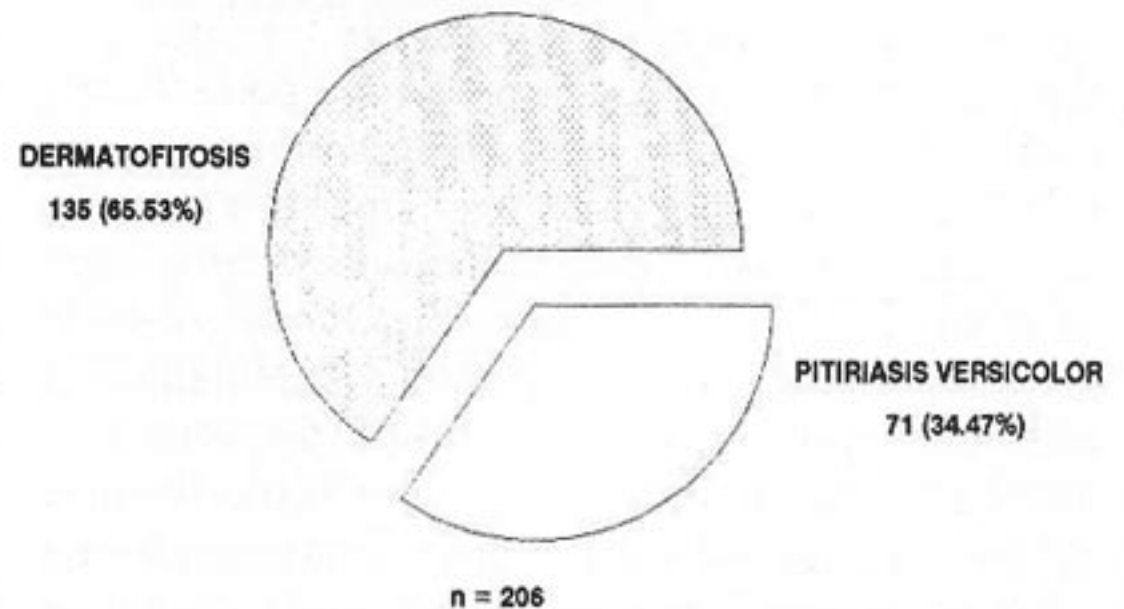
De los 120 pacientes escogidos, con diagnóstico presuntivo de infección micótica superficial 119 fueron positivos al examen clínico (99,17%), de ellos 114 (95,8%) resultaron positivos al examen micológico.

En el gráfico N° 1 observamos que la proporción de dermatofitos fue del 65,53% y de pitiriasis versi-

color del 34,47%. En el gráfico N° 2 presentamos la distribución de los diferentes dermatofitos aislados.

GRAFICO No. 1

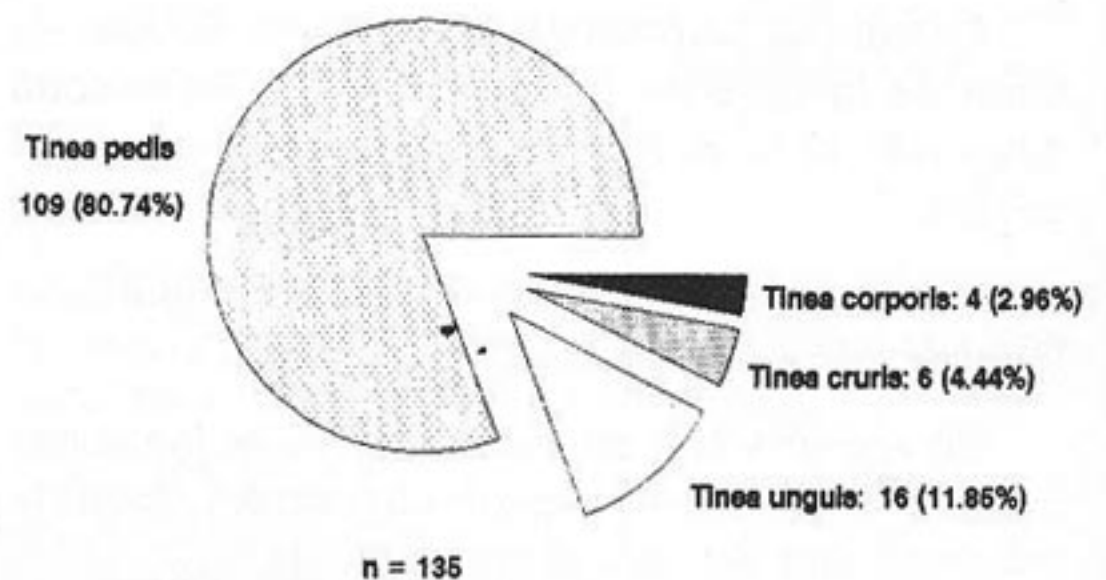
Muestras recolectadas de pacientes con clínica presuntiva de micosis superficiales



En este gráfico, podemos observar que la mayor proporción de muestras recolectadas corresponden a dermatofitosis.

GRAFICO No. 2

Distribución de las muestras recolectadas de pacientes con sospecha clínica de dermatofitosis



Analizando este gráfico, podemos evidenciar que el mayor número de las muestras recolectadas de dermatofitosis corresponden a tinea pedis (109), seguida por las de tinea unguis (16)

De los 109 casos sospechosos de Tinea pedis, el 94,50% resultó positivo al examen micológico. Mientras que para Tinea unguis fue del 93,75%, en 16 casos, para Tinea cruris del 50,00%, en 6 casos y para Tinea corporis, del 100% en 4 casos.

Para la pitiriasis versicolor de las 71 muestras presuntivas clínicamente, sólo se logró confirmación micológica en 29 (40,85%).

En el cuadro N° 1, presentamos la correlación obtenida entre el examen directo y el cultivo, en los casos de dermatofitosis, no demostrándose diferencia significativa entre los 2 procedimientos.

Similares resultados comprobamos en la comparación entre el KOH+Tinta Parker y el Clorazol Black- E (cuadros 2 y 3).

En el gráfico N° 3 presentamos la distribución de las micosis superficiales investigadas, por entidades clínicas; en el gráfico N° 4 están representados los diferentes tipos de dermatofitos detectados.

En el cuadro N° 4 se demuestra la distribución de los diferentes tipos de dermatofitos, en relación a su localización corporal.

En los gráficos N° 5, 6, 7 y 8 observamos los agentes etiológicos comprobados en los casos de Tinea pedis, unguis, corporis y cruris, respectiva-

CUADRO N° 1

RELACION ENTRE EL EXAMEN DIRECTO Y EL CULTIVO EN LAS DERMATOFITOSIS

Exámenes Directos (n = 135)
Positivos: 107 (79.26%)
Negativos: 28 (20.74%)

Cultivos (n = 118)
Positivos: 90 (76.27%)
Negativos: 28 (23.73%)

Examen Directo \ Cultivo	Positivos	Negativos	No se realizó cultivo	Total
	Positivos	72	22	13
Negativos	18	6	4	28
Total	90	28	17	135

Observamos que no existe diferencia significativa de la efectividad entre el examen directo y el cultivo en el diagnóstico micológico.

CUADROS Nos. 2 y 3
RELACION DE LA EFECTIVIDAD ENTRE EL KOH CON TINTA PARKER Y EL CLORAZOL BLACK-E

CUADRO N°2

	Positivos	Porcentaje (%)	Negativos	Porcentaje (%)	Total
KOH + tinta Parker	89	65.93	46	34.07	135
Clorazol Black-E	92	68.15	43	31.85	135

CUADRO N° 3

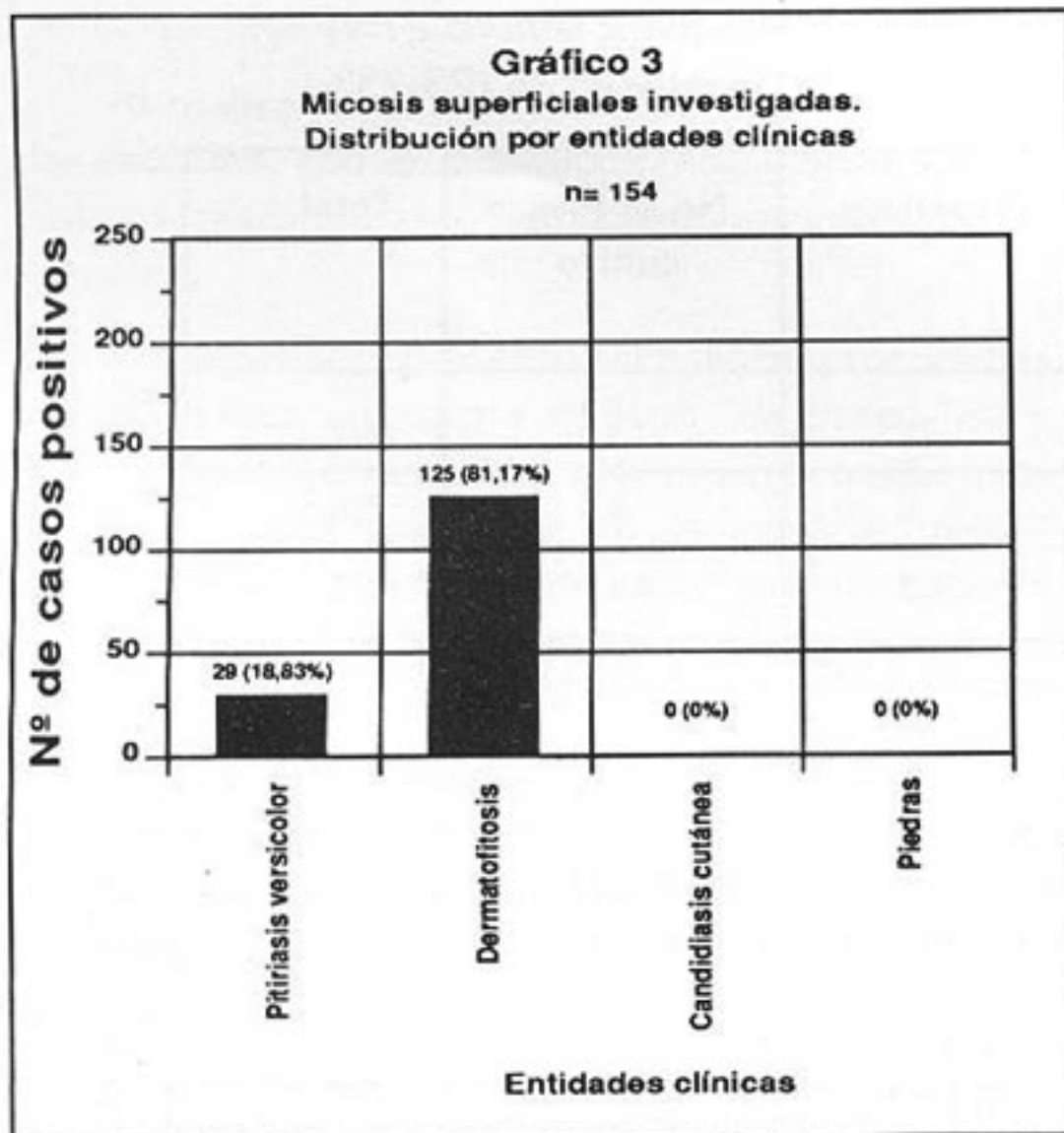
KOH + tinta Parker \ Clorazol Black-E	Positivos	Negativos
	Positivos	74
Negativos	19	28

Podemos evidenciar que la efectividad entre el Clorazol Black-E y el KOH con tinta Parker no tiene diferencias significativas.

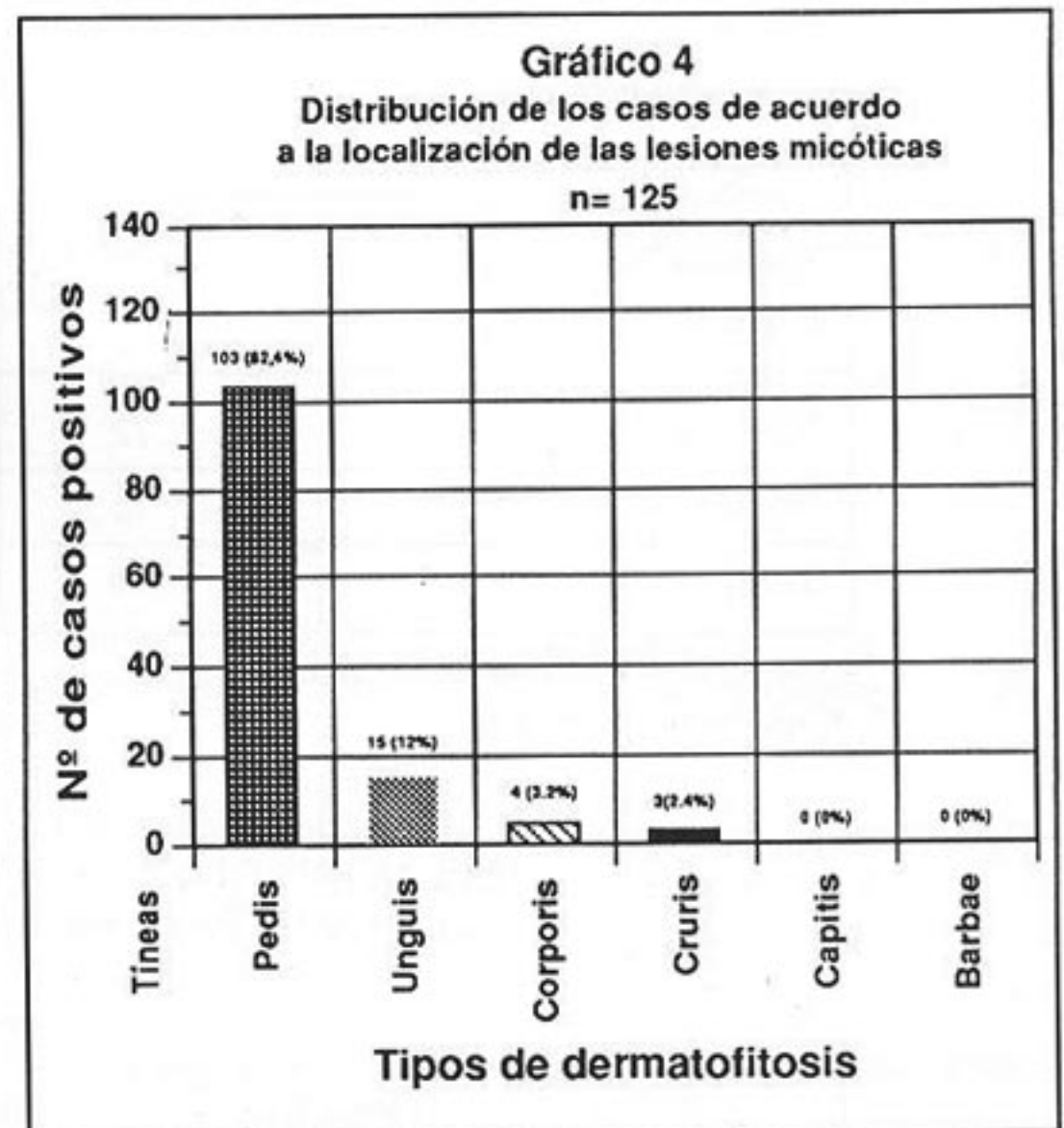
CUADRO No. 4
Distribución de los casos de dermatofitosis
por localización corporal y agentes etiológicos

Localización Corporal	T. m.	T. r.	E.f.	T.m./T.r.	T.m/T.r./	E.f.No Indicados	Total
Pedis	34	27	7	6	1	28	103
Unguis	6	3	-	2	-	4	15
Corporis	-	2	-	1	-	1	4
Cruris	-	-	1	-	-	2	3
Total	40	32	8	9	01	35	125
Porcentaje	32	25,6	6,4	7,2	0,8	28	100

T. m.: T. mentagrophytes; T. r.: T. rubrum; E. f.: E. floccosum



En este gráfico, observamos que de todas las micosis superficiales a investigar inicialmente (pitiriasis versicolor, dermatofitosis, candidiasis cutánea y piedras) sólo se encontraron casos de pitiriasis versicolor y dermatofitosis.



Observamos que la dermatofitosis de mayor incidencia es la tinea pedis con 103 casos que representan el 82,4%, seguida por la tinea unguis con 15 casos (12%).

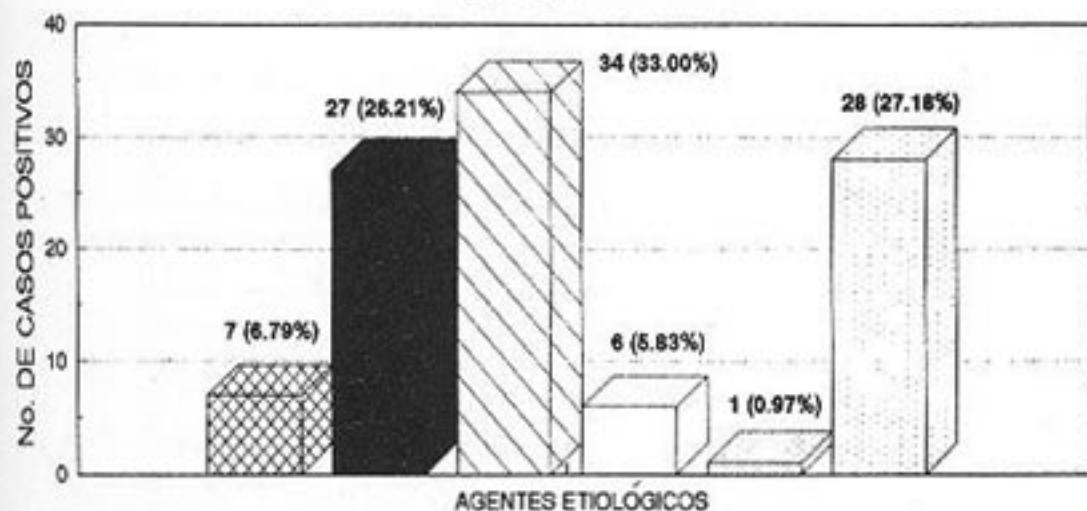
mente. En el gráfico N° 9 puede verse la distribución de los diferentes agentes etiológicos, aislados en las dermatofitosis evaluadas; finalmente en los cuadros 5 y 6 se presenta la distribución de los casos de micosis superficiales simples y mixtos.

No se encontraron casos de candidiasis cutánea, así como tampoco de lesiones en pelos, debidas a los agentes etiológicos de las piedras (*Piedraia hortae* y *Trichosporon beigeli*).

GRAFICO No. 5

Tinea pedis. Agentes etiológicos aislados

n = 103



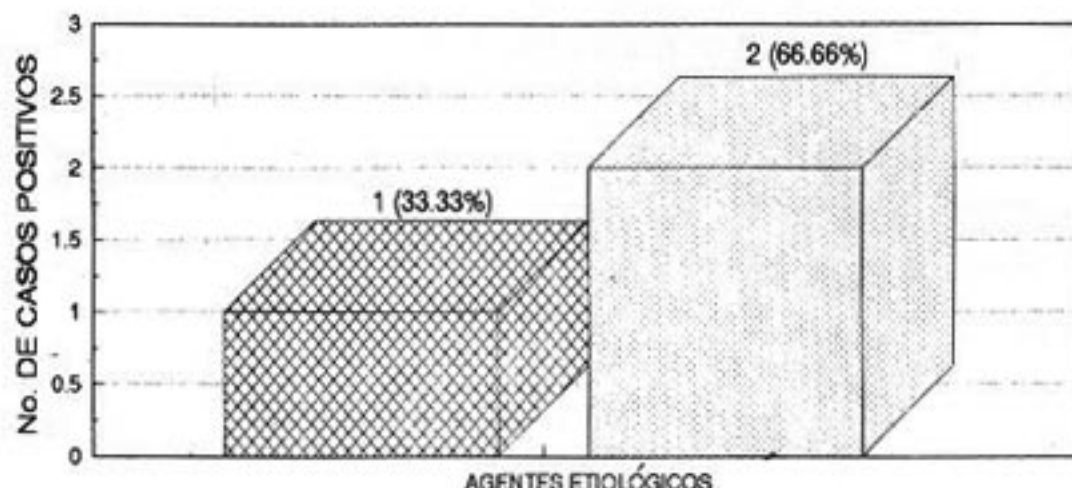
■ E. f. ■ T. r. ▨ T. m. □ T. m. / T. r. ▤ T. m. / T. r. / E. f. □ N. i.

T. m.: T. mentagrophytes; T. r.: T. rubrum;
E. f.: E. floccosum; N. i.: No identificados

GRAFICO No. 8

Tinea cruris. Agentes etiológicos aislados

n = 3



▨ E. f. □ N. i.

E. f.: E. floccosum; N. i.: No identificados

GRAFICO No. 6

Tinea unguis. Agentes etiológicos aislados

n = 15



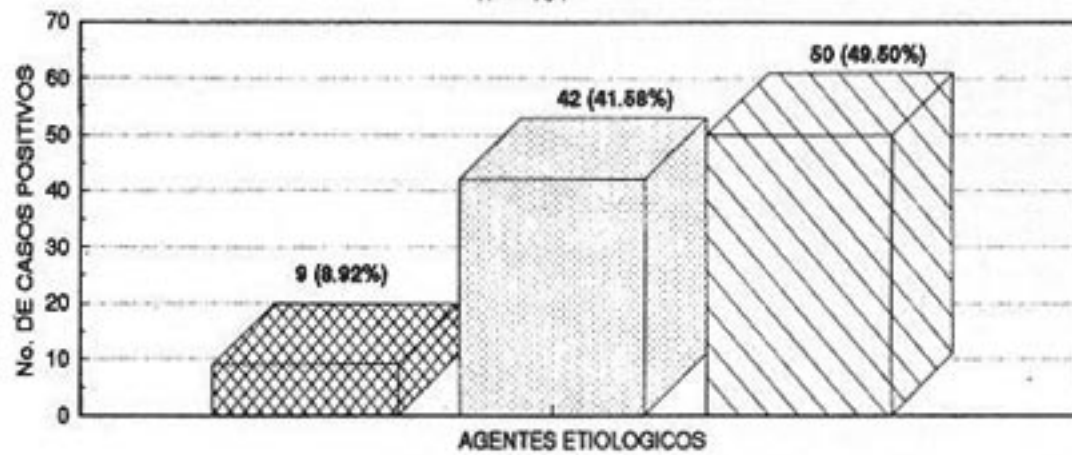
▨ T. r. □ T. m. ▤ T. m. / T. r. □ N. i.

T. m.: T. mentagrophytes; T. r.: T. rubrum; N. i.: No identificados

GRAFICO No. 9

Distribución de los agentes etiológicos aislados en las dermatofitosis

n = 101



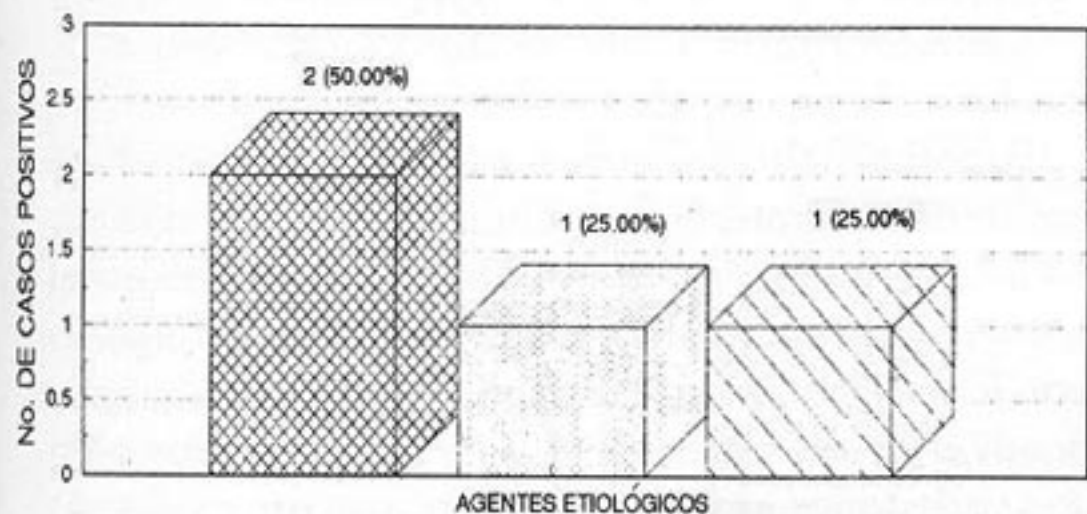
▨ E. f. □ T. r. ▤ T. m.

T. m.: T. mentagrophytes; T. r.: T. rubrum; E. f.: E. floccosum
En este gráfico, notamos que el agente etiológico aislado con mayor frecuencia fue el T. mentagrophytes seguido por el T. rubrum. Cabe mencionar que en nuestro estudio no se encontró ninguna dermatofitosis producida por hongos del género Microsporum.

GRAFICO No. 7

Tinea corporis. Agentes etiológicos aislados

n = 4



▨ T. r. □ T. m. / T. r. ▤ N. i.

T. m.: T. mentagrophytes; T. r.: T. rubrum; N. i.: No identificados

CUADRO Nº 5
DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS DE MICOSIS SUPERFICIALES SIMPLES Y MIXTOS

No. infecciones micóticas	No. Casos Positivos	Porcentajes (%)
1	79	69.30
2	31	27.19
3	3	2.63
4	1	0.88
Total	114	100,00

En este cuadro, podemos observar que un alto porcentaje de los pacientes estudiados (69.30%) tienen sólo una infección micótica, pero cabe resaltar que el 27.19% de éstos, presentan dos infecciones micóticas coexistentes.

CUADRO N° 6
DISTRIBUCION DE LOS CASOS DE MICOSIS SUPERFICIALES
SIMPLES Y MIXTOS POR ENTIDADES CLINICAS

No. Infecciones Micóticas	No. Casos Positivos	Porcentajes (%)
T.p.	68	59.65
P.v.	7	6.14
T.u.	3	2.63
T.cr.	1	0.88
T.p./P.v.	18	15.79
T.p./T.u.	10	8.78
T.p. T.or.	2	1.75
T.p./T.co.	1	0.88
T.p./T.co/P.v.	2	1.75
T.p./T.u./P.v.	1	0.88
T.p./T.co./T.u./P.v.	1	0.88
Total	114	100.00

T.p.: Tinea pedis; T.u.: Tinea unguis; T.cr.: Tinea cruris; T.co.: Tinea corporis; P.v.: Pitiriasis versicolor. En este cuadro observamos que dentro de las micosis superficiales simples, la de mayor frecuencia es la t. pedis (59.65%) seguida por la pitiriasis versicolor (6.14%) y dentro de las mixtas la de mayor incidencia fue la t.pedis/pitiriasis versicolor (15.79%) seguida por la t.pedis/t.unguis (8.78%).

V. DISCUSION

En nuestro estudio realizado en el CRIM, ubicado en Puerto Ayacucho, Territorio Federal Amazonas, corroboramos la alta incidencia de micosis superficiales existentes entre el personal militar (95.8%).

Dentro de las micosis superficiales observadas, la de mayor frecuencia fue la tinea pedis, seguida de la pitiriasis versicolor. La alta incidencia de tinea pedis encontrada en el personal de tropa está favorecida por el tipo de calzado utilizado (botas), el tiempo de permanencia de las mismas, el uso de ambientes comunes tales como duchas, el intercambio de prendas de vestir principalmente de las botas, el corto tiempo del cual dispone el personal de tropa para su aseo personal, que conlleva al no adecuado secado de los pies y por consiguiente: la humedad sumada a las altas temperaturas de la zona y la susceptibilidad del individuo, favorece considerablemente el desarrollo de infecciones micóticas en los pies. Además ellos cumplen con una actividad conocida como período de campo, en el cual los Infantes realizan diversas acciones de

entrenamiento militar, como cruce de ríos, escalamiento de montañas, etc., en los cuales permanecen de dos a tres días con las botas húmedas puestas, lo cual favorecen el crecimiento fúngico y agrava las lesiones ya existentes.

En el trabajo reportado previamente (Molero de Lara, M. y col. 1907) se encontró que el *T mentagrophytes* era el agente causal más frecuente de tinea pedis. Otros estudios demostraron que esta incidencia había cambiado (Guanipa-Urbina, O. y col. 1985; Guanipa Urbina col., 1987; Cuaro, I., 1987), y que ahora no era *T. mentagrophytes* sino el *T. rubrum* el agente más frecuente de tinea pedis, lo cual podía deberse a que es el dermatofito más resistente al tratamiento antimicótico. En nuestro estudio encontramos que el *T mentagrophytes* era el principal agente etiológico de la tinea pedis seguido por *T. rubrum*, aunque esta diferencia no fue significativa. Como sabemos el *T. mentagrophytes* tiene dos variedades, una zoofílica (parásito de roedores) y una antropofílica. La variedad antropofílica tiene una colonia de aspecto veloso y la zoofílica pre-

senta una colonia de aspecto granuloso, esta última fue la que con mayor frecuencia se observó en nuestro estudio. Una posible explicación a la alta incidencia de tinea pedis por *T. mentagrophytes* variedad granulosa (zoofilica) puede deberse a la gran cantidad de roedores que existen en la Ciudad de Puerto Ayacucho.

Según Rippon, 1982, la variedad granulosa de *T. mentagrophytes*, que fue la encontrada en nuestros cultivos, se caracteriza por producir inflamación y por la rápida resolución de la infección. Por lo tanto, posiblemente en los Infantes de Marina examinados, la alta incidencia de tinea pedis por *T. mentagrophytes* se deba, además de la abundancia de roedores en la región, a la reinfección entre el personal más que a las recaídas, por una continua exposición de los pies en los ambientes comunes tales como duchas y sanitarios, donde quedan residuos de material córneo contaminados por estos hongos.

Entre los pacientes que presentaron tinea pedis encontramos que en seis casos coexisten *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* como agentes causales de dicha dermatofitosis; estos casos aunque se han encontrado con anterioridad, no son frecuentes.

En nuestro estudio encontramos un caso de tinea pedis producida por tres agentes etiológicos distintos: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *E. floccosum*. En la bibliografía revisada no encontramos descrito ningún caso de tinea pedis de triple etiología, lo cual nos llama mucho la atención por ser éste un hallazgo excepcional.

Otro caso interesante fue un paciente que presentó una tinea unguis por *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* e igualmente una tinea corporis por *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Además este paciente presentó una tinea pedis producida por *T. mentagrophytes*, y una pitiriasis versicolor.

El agente etiológico aislado con mayor frecuencia en la tinea unguis fue el *T. mentagrophytes* seguido por *T. rubrum*, en la tinea corporis el *T. rubrum* en la tinea cruris fue el *E. floccosum*.

El único agente causal aislado de todos los casos de pitiriasis versicolor fue *Malassezia furfur*. No se encontró ningún caso con *Malassezia ovalis*. Esto corrobora la teoría de Borelli que señala que *M. furfur* es el agente etiológico más frecuente en pitiriasis versicolor, que en personas con edades comprendidas entre 20 y 30 años es el agente casual

más frecuente, y que prevalece en la parte superior del tronco. De los 29 casos de pitiriasis versicolor, 22 presentaron fluorescencia con la luz de Wood y 7 casos no.

Todos los individuos con pitiriasis versicolor presentaron lesiones hipocrómicas.

Nuestro estudio nos permitió evidenciar que un buen examen micológico directo es más efectivo que el cultivo en el diagnóstico de las infecciones micóticas superficiales porque aunque no hubo diferencia significativa en cuanto a la efectividad entre ambos, si se realiza un buen examen directo es suficiente para diagnosticar una infección micótica, en cambio el cultivo presenta varias desventajas, puede contaminarse con facilidad y encubrir el agente etiológico y además en las zonas rurales, estos medios de cultivos micológicos no son fácilmente accesibles. La realización de un buen examen directo cobra mayor importancia cuando los pacientes presentaban lesiones poco descamativas, de las que se obtenía escaso material, preferimos realizar el examen directo en vez del cultivo, porque con él únicamente se puede diagnosticar una micosis superficial aún cuando no se logra identificar el agente causal, en cambio si se hubiese utilizado el cultivo se corría el riesgo de que el hongo no creciera, por ser el material a cultivar insuficiente.

Nuestro estudio confirma trabajos anteriores (González y Sayegh 1988) donde concluye que el examen directo de la muestra clínica es un método sensible para el diagnóstico de las dermatofitosis.

En nuestro estudio comparativo de la efectividad entre el Clorazol Black E y el KOH + tinta Parker utilizados como sustancias aclarantes para el examen micológico directo, encontramos que no hubo diferencia significativa entre ambos.

Particularmente, preferimos el Clorazol Black-E porque las estructuras fúngicas se visualizan con mayor facilidad, haciendo más rápido el diagnóstico de micosis superficial al examen directo.

En un principio pensamos que los Infantes adquirirían la infección micótica una vez que ingresaban a la Armada, pero entre los pacientes estudiados se encontraba un grupo de 12 infantes con sólo una semana en el comando, de los cuales 11 presentaron infecciones micóticas; esta alta incidencia de micosis superficiales nos indican que los infantes no adquieren la enfermedad en la Armada, sino que

ingresan con ésta, y las lesiones que ellos presentan se agravan por las inadecuadas condiciones higiénicas, el clima, etc.

La importancia de definir cuál es el agente etiológico y su naturaleza (antropofílica, zoofílica o geofílica) radica en determinar la posible fuente de infección, esto con fines epidemiológicos.

CONCLUSIONES

1. Existe una alta incidencia de micosis superficiales, principalmente de dermatofitosis, en las comunidades militares, lo que constituye un problema de salud pública en las mismas.
2. La alta incidencia de dermatofitosis en la población estudiada estaría determinada por las condiciones higiénicas no adecuadas, existentes en el lugar.
3. En comunidades con elevada frecuencia de dermatofitosis, es posible observar inusuales casos de infecciones micóticas, de doble y triple etiología en un mismo paciente.
4. Las micosis superficiales que prevalecieron fueron la tinea pedis y la pitiriasis versicolor.
5. La alta incidencia de tinea pedis como infección micótica estaría influenciada por las continuas reinfecciones a nivel interpersonal y no por las recaídas.
6. El principal agente causal de tinea pedis fue el *T. mentagrophytes* seguido por el *T. rubrum*.
7. Se confirma que *Malassezia furfur* es el principal agente etiológico de la pitiriasis versicolor, en edades comprendidas entre 20 y 30 años, además ésta se presenta con mayor frecuencia en la parte superior del tronco y en general la incidencia de *M. furfur* es mayor que la de *M. ovalis*.
8. No existe diferencia significativa de la efectividad entre el examen directo y el cultivo en el diagnóstico micológico.
9. Un buen examen directo micológico por sí solo, permite hacer el diagnóstico de una infección micótica.
10. Para realizar el examen directo se puede utilizar indistintamente KOH+Tinta Parker y/o Clorazol Black E, ya que los resultados obtenidos con uno u otro aclarante fueron muy similares.
11. Generalmente el personal militar no adquiere la infección micótica durante el servicio, sino que antes de su ingreso ya es portador de la misma.

12. Nuestro estudio concluye, que para descartar o no una micosis superficial es necesario realizar el diagnóstico de laboratorio, a través del examen directo y el cultivo, ya que ni los síntomas que presenta el paciente ni el examen físico son suficientes.

RECOMENDACIONES

Con fines de prevención y curación de las dermatofitosis se recomienda lo siguiente:

1. Realizar una exploración clínico-micológica sobre la posible existencia de micosis superficiales, al personal que recién ingresa al Comando, con el fin de prevenir las infecciones por contacto interpersonal.
2. Desinfectar con soluciones yodadas tipo povidine, dos o tres veces a la semana los ambientes de uso común tales como sanitarios y duchas.
3. Utilizar calzado adecuado para el baño. No ducharse con los pies descalzos.
4. Es imprescindible secarse bien los pies entre los dedos después de la ducha diaria y posteriormente aplicarse talcos y cremas antimicóticas, cuando exista una tinea pedis.
5. No utilizar las duchas para el lavado de las prendas de vestir.
6. No intercambiar las prendas de vestir, para evitar la propagación interpersonal de las tineas, al estar en contacto directo con fomites infectados provenientes de otras personas.
7. Cuando no sea necesario utilizar las botas, cambiar éstas por calzados abiertos tales como sandalias de cuero, de tal forma que el pie se ventile.
8. Utilizar calzado de cuero y no zapatos de goma mientras esté presente la tinea pedis, así como tampoco zapatos deportivos de goma, los cuales favorecen la humedad del pie.
9. Rociar diariamente con talcos antimicóticos el calzado cerrado.
10. Utilizar medias de algodón, las cuales absorben parte de la humedad y no medias de material sintético, las cuales favorecen la humedad del pie y consecuentemente las infecciones micóticas.
11. Al irse a dormir, aplicarse la crema antimicótica y luego ponerse una media de algodón, de tal

forma que el medicamento esté en contacto con la piel durante toda la noche.

12. Las medias deben ser cambiadas a diario.
13. Debe haber constancia en la aplicación del tratamiento antimicótico mientras exista la infección, de cualquier naturaleza (tinea pedis, tinea cruris, pitiriasis, etc.)

BIBLIOGRAFIA

1. BBL Manual of Products and Laboratory Procedures. (1973), Fifth Edition. p. 128.
2. Borelli, D. (1960). Diagnóstico y tratamiento de la Pityriasis Versicolor. Acta Médica Venezolana. Vol. 8. pp. 81-86.
3. Borelli, D. (1962). Medios caseros para Micología. Archivos Venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica. Vol. IV. 301-310.
4. Campbell, M.; Stewart, J. (1980). The Medical Mycology Handbook, pp. 163-173. A Wiley Medical Publication. New York Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore. John Wiley & Sons, Inc.
5. Cuaro, I. (1987). Estudio de Laboratorio sobre Micosis Superficiales en el personal de Tropa de la Base Naval Falcón (B.N.F.A.) Las Micosis en Venezuela. Boletín No. 8. pág. 9.
6. Fossaert, G.; Morales, J.; Mizrachi, R.; Llovera, V. (1990). Manual de Micología. I Curso Internacional sobre técnicas avanzadas de diagnóstico rápido de las enfermedades transmisibles. Caracas-Venezuela, pp. 116.
7. González, M.I.; Sayegh, R. (1988). Estudio de la efectividad del examen micológico directo para la detección de dermatomycosis. Las Micosis en Venezuela. Boletín No. 10. pp. 19-20.
8. Guanipa-Urbina, O.; Pérez-B. M.; Ruiz-Medina, E. (1985). Trichophyton Rubrum y Malassezia Furfur en una Comunidad Militar en Coro, Falcón. Las Micosis en Venezuela. Boletín No. 3. Año I. pp. 7-10.
9. Guanipa-Urbina, O.; Pérez, B., M.; Fernández-Zeppenfeld, G. (1987). Dermatofitosis y Pitiriasis Versicolor: Alta frecuencia en el personal de Tropa del Ejército en Coro, Falcón. Las Micosis en Venezuela. Boletín No. 3. Año III. pp. 7-8.
10. Koneman, E.; Roberts, G. 1987. Micología. Práctica de Laboratorio. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 221.
11. Molero de Lara, M.; Vargas, H.; Vargas, N.; Valero, S.; Meza, L. (1987). Tinea pedis en un establecimiento militar. Las Micosis en Venezuela. Boletín No. 3. Año III. pág. 16.
12. Rebell, G.; Taplin, D. (1979). Dermatophytes. Their recognition and identification. Fourth Printing. University of Miami. Press. pp. 124. Coral Gables, Florida.
13. Rippon, J. (1982). Dermatophytosis and Dermatomyco-sis. Chapter No. 8. Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Second Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia. London. Toronto. Mexico City. Rio de Janeiro. Sidney. Tokio.
14. Villanueva, E.; Mendoza, M.; Cavazza, M. E.; Torres, E.; Serrano, H.; Alvarez, M. T. y Albornoz, M. B. (1986). Coloración con Clorazol Black-E aplicado al diagnóstico directo de las micosis profundas. Las Micosis en Venezuela. Boletín No. 6. p. 28.



EQUIP, C.A.

Representante de las Líneas: AMERSHAM & BECKMAN

AMERSHAM

- Sistema de inmunoensayo de luminiscencia intensificada Amerlite
- Sistema no radiactivo
- Uso de anticuerpos monoclonales
- Determinaciones hormonales, marcadores hepáticos
- Reporta 96 resultados por minuto
- Período de incubación entre 1/2 y 1 hora

BECKMAN

- Analizadores de química sanguínea: Equipo multicanal modular Synchron Astra
- Espectrofotómetro digital sistema 100 con celda de flujo continuo
- Analizadores modulares de creatinina, bun y glucosa
- Contrato por consumo de reactivo tipo "Leasing"
- Nefelómetro cinético para determinar proteínas y drogas terapéuticas

Avenida Venezuela • Torre América • Oficina 314 • Bello Monte
Telfs. (02) 762.29.50 / 762.09.18 / 762.27.62 / 762.68.75 • Fax (02) 762.17.12 Télex:
28.114 GLOAR VC • Correos 47247 Caracas 1041-A, Venezuela

EFICACIA DIAGNOSTICA DE LA REACCION INDIRECTA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA EL ESTUDIO DE LA ESQUISTOSOMIASIS MANSONI*

AUTORES:

Lic. Jacqueline Serra Hernández
Lic. Eyra Damelys Rangel Escalante
Lic. Zulay Rached Utrera
Lic. Lizbeth Cecilia Rengel R.

ASESORES:

Dr. Renzo Nino Incani**
Econ. José A. García***

RESUMEN

En este trabajo se aplicó la Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes, a una población de 225 pacientes del Barrio Bicentenario III de Valencia con la finalidad de evaluar la eficacia diagnóstica de dicho método para el estudio de la esquistosomiasis mansoni. Dicha población había sido estudiada por otros autores mediante la prueba de ELISA obteniéndose una prevalencia de 37,9%, y la técnica de Precipitación Circumoval (PPCO) utilizando este último como método de referencia cuya prevalencia fue de 18,4%.

Los antígenos utilizados fueron cortes de vermes adulto y cortes de hígado de hamster infectados con la cepa brasileña BH de *Schistosoma mansoni*. La reacción se pone en evidencia utilizando un conjugado anti IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína.

La evaluación serológica de la RIAF se llevó a cabo a través de los patrones para cada uno de los antígenos de vermes e hígado mediante los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, valor predictivo de la prueba positiva, valor predictivo de la prueba negativa, falsos negativos de la prueba negativa, exactitud y prevalencia. Todos los parámetros anteriormente citados tanto para la RIAF vermes como para la RIAF hígado revelaron resultados semejantes: destacando la mayor utilidad de los antígenos vermes e hígado en su totalidad en relación a una mayor eficacia para los parámetros sensibilidad, falsos negativos y valores predictivos de la prueba negativa.

Es importante destacar que la utilización de patrón intestino reúne la mayoría de las condiciones necesarias para la obtención de resultados confiables que aportan un mejor criterio diagnóstico.

* Este trabajo se hizo acreedor al Premio: "Profesora Franca Billi", otorgado por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, año 1992.

Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento de Parasitología, Escuela de Bioanálisis.

** Profesor del Departamento de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

*** Profesor del Departamento de Salud Pública.

INTRODUCCION

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria producida por un vermes trematode perteneciente al género *Schistosoma* donde hasta ahora se conocen cinco (5) especies a nivel mundial que parasitan al hombre, siendo el único agente etiológico de la esquistosomiasis en Venezuela la producida por el *S. mansoni*.

En Venezuela la esquistosomiasis mansónica constituye un problema de salud pública, siendo el área Centro-Norte la más afectada (Otero y Col 1986). Por lo tanto se hace necesario buscar medidas más eficaces para su control.

En relación al diagnóstico de individuos infectados se ha presentado problemas en encontrar un método que sea lo suficientemente sensible, específico, económico, y fácil de realizar, todos estos requisitos han sido difíciles de agrupar en un solo método.

En vista de estas circunstancias se hace necesario resolver el problema de la eficacia diagnóstica, de allí los estudios realizados a varias técnicas serológicas, con la finalidad de hacer un diagnóstico precoz de la infección y con ello contribuir al control de las esquistosomiasis. Esta actividad es crucial para nuestra situación epidemiológica, donde los métodos coprológicos convencionales se muestran ineficaces.

Es necesario aumentar la especificidad y sensibilidad de estas técnicas serológicas y revisar la necesidad de utilizar combinaciones de técnicas serológicas, no sólo para un diagnóstico más certero, sino para definir el estado de evolución o forma clínica de la enfermedad (R.N. Incani, 1985). Se ha planteado el problema de la manera siguiente:

Las infecciones por *S. mansoni* recientes, crónicas, de baja intensidad y tratadas, dificultan el diagnóstico coprológico.

Cuando las medidas de control están dirigidas al tratamiento del individuo enfermo ésta no tiene una total efectividad, por lo tanto hay que recurrir a nuevas técnicas diagnósticas que reflejan la prevalencia real de la situación, cosa que en estos últimos años ha sido subestimada (Noya y Noya, 1981; Dávila y Aguiar, 1983).

El problema se plantea cuando se estudió una población de transmisión activa del Barrio Bicentenario III donde previamente se había realizado estudios coprológicos (Kato) y serológicos (ELISA), mostrando una gran diferencia de prevalencia.

Se pretende con este trabajo comparar los resultados obtenidos por las técnicas ELISA y PPCO esta última como prueba de referencia realizada por otros autores y ensayar la RIAF como una técnica más práctica que la anterior y cuya importancia se realza, si notamos que la experiencia nacional en relación al uso de métodos serológicos para el diagnóstico en estas parasitosis es precaria.

MATERIALES Y METODOS

Población y Muestra: La población seleccionada corresponde al sector III del Barrio Bicentenario, ubicado al Sur de Valencia, Edo. Carabobo. La muestra representada por 225 individuos escogidos mediante selección aleatoria de 8 manzanas sobre un total de 40 que constituyen el Barrio.

Análisis Estadístico: Sólo mediante el cálculo de los parámetros de sensibilidad, especificidad, el porcentaje de falsos positivos y negativos, los valores predictivos, la exactitud y la prevalencia, podemos establecer la utilidad diagnóstica de los procedimientos empleados.

Sueros: La sangre fue obtenida mediante punción venosa con venoject donde después de la coagulación se separó el suero por centrifugación; las diluciones utilizadas para la técnica fueron 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 con PBS; fueron separadas en alícuotas y conservados en congelación a -20 grados centígrados, hasta el momento de la ejecución de la técnica, previa inactivación a 56 grados centígrados por 30 minutos.

Ciclo del parásito en el laboratorio: El ciclo de *S. mansoni* se mantiene en el laboratorio mediante pases sucesivos entre hamsters y caracoles *B. Glabrata*. La cepa brasileña BH del parásito fue la utilizada en este estudio, caracoles de aproximadamente 1 cm de diámetro fueron expuestos a cinco miracidios y treinta días después se comienza a obtener al exponer lotes de caracoles a luz artificial por una o dos horas, a objeto de infectar los hamsters (Cesari y B. Alarcon de Noya, 1987).

Obtención del Ag (Vermes adultos y Granulomas hepáticos): Se sacrificaron hamsters con ocho semanas de infección, para luego por perfusión del Sistema porto-mesentérico con SSC a través del ventrículo izquierdo, previa ruptura de la vena porta. Los vermes adultos quedaban retenidos en una rejilla metálica, donde posteriormente se lavaban mediante tres cambios de SSF. El hígado era extraído del animal y se procedía a obtener trozos del mismo de unos diez milímetros cúbicos, para luego congelarlo y obtener los cortes con granulomas. Posteriormente se procedían a hacer bloques con resina OCT (cien vermes por cada bloque aproximadamente); que posteriormente eran conservados a -70 grados centígrados para su uso posterior y realizar los cortes en criostato de 6-7 micras de espesor—. Los cortes son colocados dentro de la pintura impresa en las láminas del porta-objeto (cuatro cortes por láminas), fijados y mantenidos congelados hasta su procesamiento.

Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes: Se utilizó la técnica de (Coudert y Col, 1967), modificada por (Kanamura, 1978). El conjugado utilizado fue una Anti IgG específica para cadena Gamma de IgG, marcado con isotiocianato de fluoresceína (marca Sigma y ATAB).

Se cubren los cortes con las diluciones seriadas del suero del paciente con la finalidad de formar el complejo Ag-Ac, que posteriormente será evidenciado con el conjugado utilizado, cuya positividad se hace evidente por la fluorescencia de las estructuras antigénicas, al ser observados en el microscopio de luz U.V., la Reacción negativa se caracteriza por una tinción parda o rojo ladrillo. También se toma en cuenta el tipo de patrón de fluorescencia (focal o difuso) y su localización intestino, tegumento y/o parénquima. Cada vez que se realizaba la técnica se montaba controles positivos y negativos de sueros provenientes del mismo barrio.

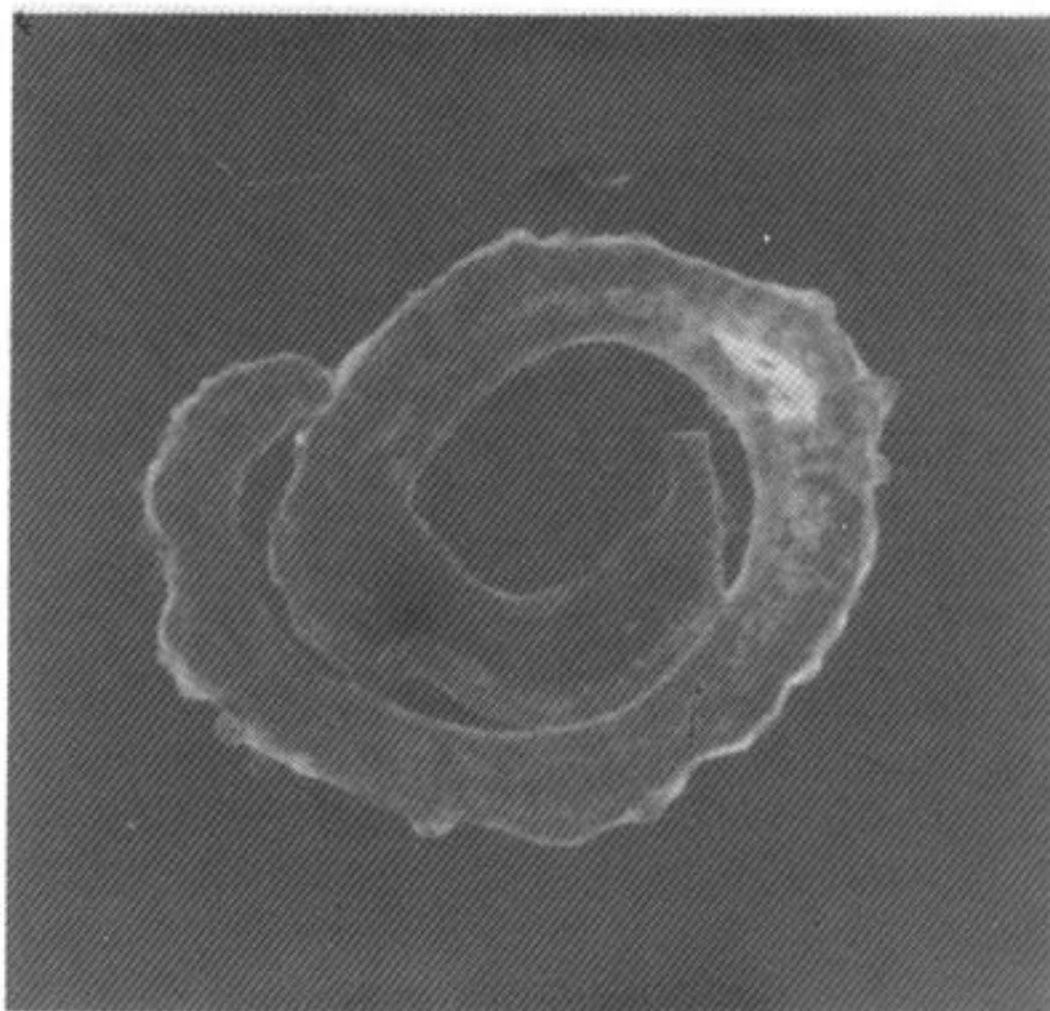
Título del Conjugado: Para cada dilución del suero se utilizó varias diluciones seriadas del conjugado en azul de Evans.

Se escoge como título del conjugado aquella dilución en la cual se puede detectar positividad con el suero positivo en su máxima dilución; y que a su vez no detecte fluorescencia con el suero negativo. El patrón de fluorescencia utilizado fue parénquima ya que es el primero que cae al hacer las diluciones seriadas del suero.

RESULTADOS

1. TITULACION DE LOS SUEROS PARA ESTABLECER EL CRITERIO DE POSITIVIDAD

Se determinó que a la dilución 1:40 fue donde la fluorescencia mostró su mayor porcentaje de positividad, correspondiendo para tegumento 15.1% parénquima 12.9%, intestino 10.7%, granuloma 16.0% y cáscara del huevo con 18.7% (Fig. N° 1). Esta dilución se tomó como punto de corte para definir positividad y negatividad en todas las subsecuentes observaciones. Estos porcentajes se obtuvieron del total de las diluciones realizadas para los 225 pacientes que representan el 100% de la población.



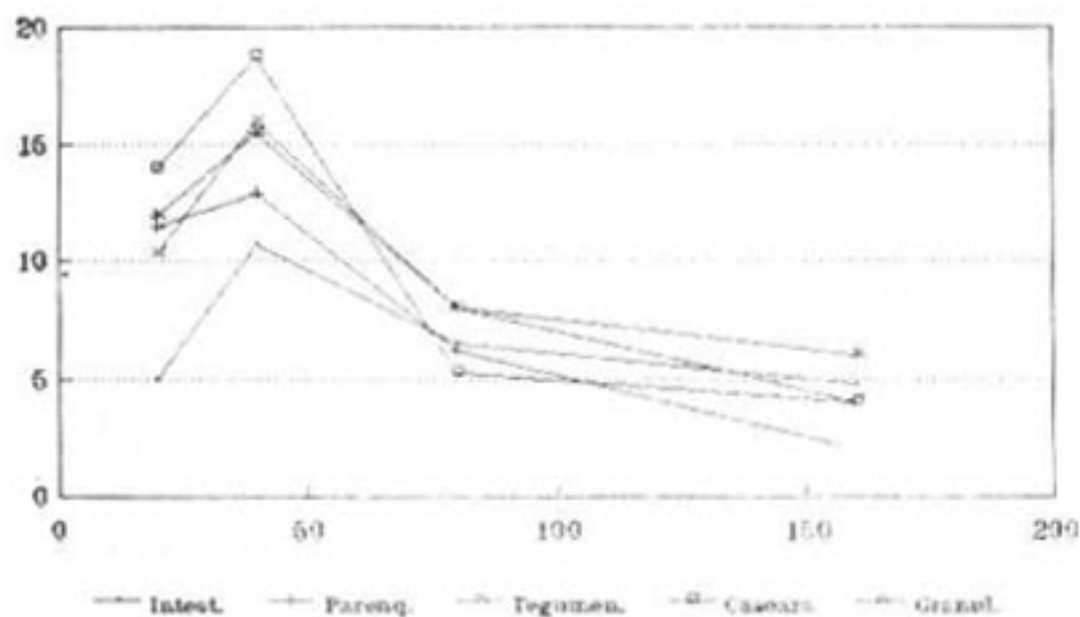
FLUORESCENCIA MENOS INTENSA EN EL PARENQUIMA DEL GUSANO (Fluorescencia difusa) y REACCIONES MAS INTENSAS EN TUBO DIGESTIVO Y TEGUMENTO. (Fluorescencia focal) 100x

2. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS SEGUN DIFERENTES PATRONES DE FLUORESCENCIA PARA VERMES ADULTO Y CORTES DE HIGADO

2.1 Comportamiento de los patrones intestino, tegumento y parénquima de vermes adultos

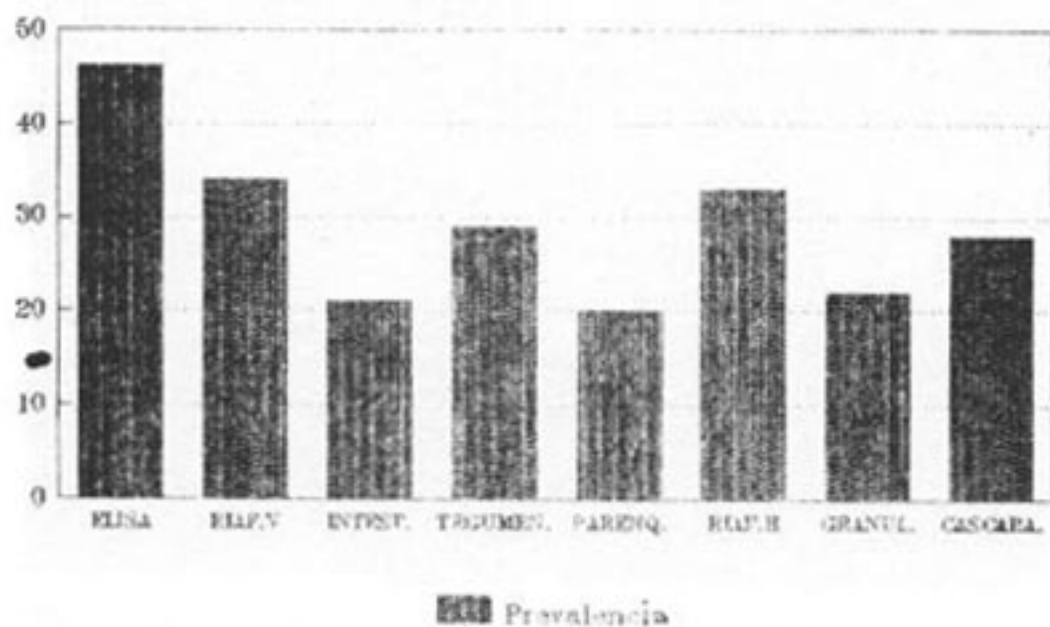
En la Fig. 2 se observa que el patrón tegumento fue el que presentó mayor porcentaje de positividad con 29.5%, seguido del patrón intestino con

FIGURA N° 1
RELACION % DE POSITIVIDAD
Según Diluciones



Barrio Bicentenario III Val. 89-90.

FIGURA N° 2
PORCENTAJE DE PREVALENCIA
Según Métodos Diag. y patrones



Barrio Bicentenario III Val 89-90.

21.4%, y parénquima con 20.1%; estas dos últimas cifras no parecen ser diferentes. Es importante señalar que los porcentajes obtenidos por los patrones intestino y parénquima reflejan valores de prevalencia cercanos a aquellos de la PPCO, prueba serológica de referencia. Los valores en porcentaje anteriormente mencionados resultan del total de casos positivos para cada uno de los patrones estudiados en el 100% de la población.

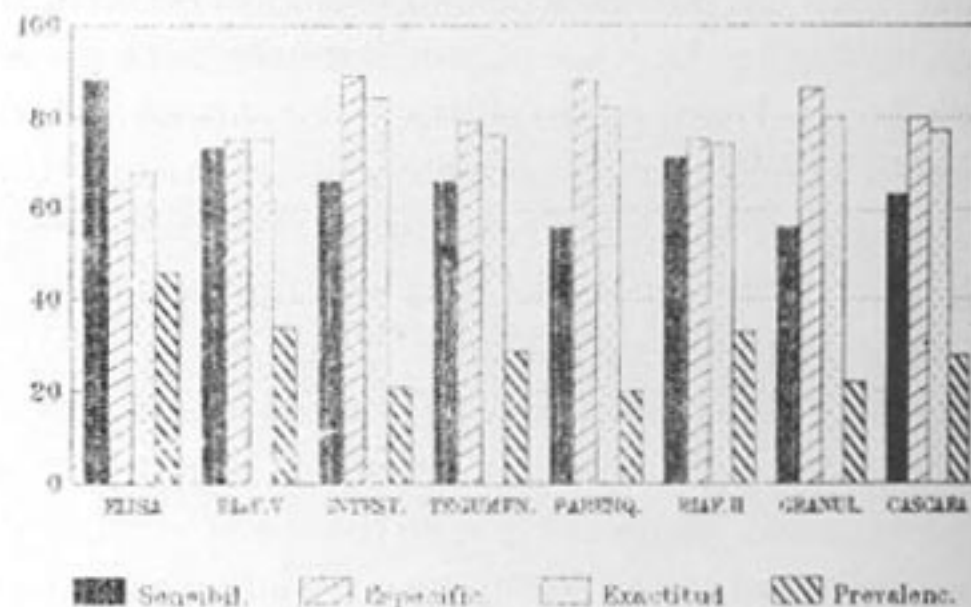
2.2 Comportamiento de los patrones granuloma y cáscara al utilizar como antígeno secciones de hígado de hamster infectado.

En la Fig. 2 se observa que el mayor porcentaje de lecturas positivas estuvo representado por el patrón cáscara del huevo con 27.7%, mientras que la positividad obtenida por el patrón granuloma fue de 21.9%. El porcentaje reflejado por el patrón granuloma es el que se asemeja al valor obtenido por la PPCO.

3. DISTRIBUCION DE LOS CASOS ESTUDIADOS SEGUN LAS TECNICAS DE ELISA, PPCO, Y RIAF (vermes adulto e hígado)

En la Fig. 3 se pueden observar los diferentes valores obtenidos en los casos estudiados al aplicar las técnicas diagnósticas siendo la más sensible la prueba de ELISA con un 45.9% de positividad seguido de la RIAF con un 33.9% para vermes adulto y 33.5% para secciones de hígado. Estas dos últimas cifras no parecen ser diferentes. La PPCO mostró una prevalencia de 18.5%.

FIGURA N° 3
% DE: SEN. ESPEC. EXACT. PREVAL.
Según Métodos Diag. usados



Barrio Bicentenario III Val 89-90.

4. SENSIBILIDAD DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO ELISA Y RIAF (vermes e hígado) Y SUS CORRESPONDIENTES PATRONES DE FLUORESCENCIA.

En la Fig. 3 se señala que el método de ELISA mostró ser la más sensible con un 88%, siendo la menos sensible la RIAF con los patrones parénquima de vermes y granuloma del hígado con un 56% para

ambos. Es importante destacar que la mayor sensibilidad en la RIAF se observó con los patrones intestino y tegumento con 66%, seguido del patrón cáscara con 63%.

Los antígenos de vermes e hígado vistos como un todo, mostraron valores similares de sensibilidad con 73% y 71% respectivamente.

5. ESPECIFICIDAD DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO ELISA Y RIAF CON ANTIGENOS DE VERMES E HIGADO

Se mostró una mayor especificidad para el patrón intestino con 89% seguido del patrón parénquima con 88% y granuloma con un 86%; siendo en valor para cáscara de 80% y tegumento 79%. Hay que señalar que la especificidad para los antígenos vermes e hígado en su totalidad fue de 75% para ambos. El porcentaje más bajo de especificidad correspondió a la técnica de ELISA con 64% (Fig. 3).

6. VALORES DE FALSOS POSITIVOS Y FALSOS NEGATIVOS PARA LA DETERMINACION DE LA EFICACIA DIAGNOSTICA DE LOS DIFERENTES METODOS UTILIZADOS.

6.1 Falsos positivos obtenidos según las diferentes pruebas

Este parámetro muestra aquellos casos que son incluidos en el diagnóstico de esquistosomiasis mansoni como casos positivos pero que en realidad no presentan infección en relación a la prueba de referencia PPCO. En este caso el porcentaje mayor de falsos positivos está representado por la técnica de ELISA con un 36%, lo cual se corresponde con la baja especificidad de dicha técnica seguido de la RIAF con 25% tanto para vermes como para hígado. Al analizar los patrones de fluorescencia de la RIAF en detalle observamos cifras de falsos positivos para tegumentos 21.1%, para cáscara 20%, granuloma 14%, parénquima 12% e intestino 11%. Los tres últimos patrones muestran mayor especificidad.

6.2 Falsos negativos obtenidos según las diferentes pruebas.

Este parámetro muestra aquellos casos que son excluidos de la infección y son clasificados como no poseedores de la misma, cuando en realidad sí la tienen.

La prueba que da resultados más falsamente negativos corresponde a la RIAF con los patrones parénquima y granuloma (hígado) con un 44% lo que indica su relación con la menor sensibilidad que ellos presentan.

El valor de falsos negativos por ELISA fue menor, con un 12%, seguido del obtenido por los antígenos RIAF vermes 27%, RIAF hígado 29%, patrón intestino y tegumento con un 34% y el patrón cáscara con un 37%.

Esto indica que la interpretación de la totalidad de los antígenos utilizados para la RIAF (vermes e hígado) reportan menos falsos negativos que la utilización o interpretación de sus correspondientes patrones de fluorescencia.

7. IMPORTANCIA DEL VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA POSITIVA Y DE LA PRUEBA NEGATIVA PARA ESTABLECER LA EFICACIA DIAGNOSTICA.

7.1 Variaciones observadas en relación al valor predictivo de la prueba positiva.

Este parámetro establece la probabilidad de que la condición que se busca esté presente cuando la prueba sea positiva. Los parámetros más fidedignos en lo que respecta a este valor predictivo son para la RIAF con antígeno vermes el patrón intestino con un valor de 56%, seguido del patrón parénquima con un 51% y para la RIAF con cortes de hígado el patrón granuloma con 47%.

La prueba de ELISA con un 35% se muestra menos eficiente en este sentido seguido de RIAF hígado con 39%, RIAF vermes 40%, patrón tegumento 41%, patrón cáscara 42%. Es importante señalar que la evaluación de patrones en RIAF por separado muestra una mayor confiabilidad que la observada en el conjunto de sus antígenos correspondientes.

7.2 Variaciones observadas en relación al valor predictivo de la prueba negativa.

Este parámetro muestra la probabilidad de que el resultado negativo de la prueba ocurre en aquellos

casos que realmente no existe la condición buscada. Se observa que en la prueba de ELISA presentó un valor predictivo de la prueba negativa de un 96% más alto que los correspondientes a los demás métodos. Esto es importante ya que sólo un 4% de las determinaciones realizadas por ELISA escapan de la condición buscada (no infección). La RIAF vermes se muestra con un 93%, la RIAF hígado y el patrón intestino con un valor de 92%, tegumento y cáscara con un 91% y finalmente parénquima y granuloma con un 90%. Observamos que en este sentido la utilización del antígeno vermes en su totalidad refleja un mayor porcentaje del valor predictivo negativo, seguido del antígeno hígado. En relación a los patrones estudiados el patrón intestino muestra un valor más aceptable.

8. IMPORTANCIA DE LOS FALSOS POSITIVOS Y LOS FALSOS NEGATIVOS DE LAS PRUEBAS POSITIVAS Y NEGATIVAS RESPECTIVAMENTE PARA ESTABLECER SU VALOR DIAGNOSTICO.

8.1 *Importancia de los falsos positivos de la prueba positiva según los diferentes métodos de diagnóstico*

Este parámetro refleja la proporción del total de

pruebas positivas que no poseen la cualidad que es detectada por la prueba, observamos lo siguiente: ELISA con un 65% resultó ser la prueba que refleja el porcentaje más alto seguido de la RIAF hígado con 61%, RIAF vermes 60%, patrón tegumento con 59%, cáscara con 58%, granuloma con 53%, parénquima con 49% y finalmente intestino con un 44%, quien presentó una mejor eficacia para la condición buscada, resaltando así su mayor valor diagnóstico.

8.2 *Importancia de los falsos negativos de la prueba negativa según los diferentes métodos*

Esta condición muestra la proporción sobre el total de pruebas negativas que poseen la propiedad buscada y no son detectados.

En este sentido por su mayor sensibilidad observamos que la prueba de ELISA no es capaz de detectar casos positivos sólo en un 4%, seguido de RIAF vermes con 7%, RIAF hígado y patrón intestino con 8%, tegumento y cáscara con 9% y finalmente parénquima y granuloma con 10%; mostraron no ser tan sensibles ya que es el valor más alto donde se escapan casos verdaderamente positivos.

EFICACIA DIAGNOSTICA PARA ESTUDIO DE ESQUISTOSOMIASIS

METODOS	PARAMETROS (%)									
	S	E	F+	F-	VPP	VPN	FPPP	FNPN	Ex	P
ELISA	88	64	36	12	35	96	65	4	68	46
RIAF.V	73	75	25	27	40	93	60	7	75	34
RIAF.H	71	75	25	29	39	92	61	8	74	33
INTESTINO	66	89	11	34	56	92	44	8	84	21
TEGUMENTO	66	79	21	34	41	91	59	9	76	29
PARENQUIMA	56	88	12	44	51	90	49	10	82	20
GRANULOMA	56	86	14	44	47	90	53	10	80	22
CASCARA	63	80	20	37	42	91	58	9	77	28

LEYENDA
S =Sensibilidad
E =Especificidad
F+ =Falsos Positivos
F- =Falsos Negativos

VPP =Valor Predict. Prueba Positiva
VPN =Valor Predict. Prueba Negativa
FPPP =Falsos Posit. Prueba Positiva
FNPN =Falsos Neg. Prueba Negativa
Ex =Exactitud. P =Prevalencia

casos que realmente no existe la condición buscada. Se observa que en la prueba de ELISA presentó un valor predictivo de la prueba negativa de un 96% más alto que los correspondientes a los demás métodos. Esto es importante ya que sólo un 4% de las determinaciones realizadas por ELISA escapan de la condición buscada (no infección). La RIAF vermes se muestra con un 93%, la RIAF hígado y el patrón intestino con un valor de 92%, tegumento y cáscara con un 91% y finalmente parénquima y granuloma con un 90%. Observamos que en este sentido la utilización del antígeno vermes en su totalidad refleja un mayor porcentaje del valor predictivo negativo, seguido del antígeno hígado. En relación a los patrones estudiados el patrón intestino muestra un valor más aceptable.

8. IMPORTANCIA DE LOS FALSOS POSITIVOS Y LOS FALSOS NEGATIVOS DE LAS PRUEBAS POSITIVAS Y NEGATIVAS RESPECTIVAMENTE PARA ESTABLECER SU VALOR DIAGNOSTICO.

8.1 *Importancia de los falsos positivos de la prueba positiva según los diferentes métodos de diagnóstico*

Este parámetro refleja la proporción del total de

pruebas positivas que no poseen la cualidad que es detectada por la prueba, observamos lo siguiente: ELISA con un 65% resultó ser la prueba que refleja el porcentaje más alto seguido de la RIAF hígado con 61%, RIAF vermes 60%, patrón tegumento con 59%, cáscara con 58%, granuloma con 53%, parénquima con 49% y finalmente intestino con un 44%, quien presentó una mejor eficacia para la condición buscada, resaltando así su mayor valor diagnóstico.

8.2 *Importancia de los falsos negativos de la prueba negativa según los diferentes métodos*

Esta condición muestra la proporción sobre el total de pruebas negativas que poseen la propiedad buscada y no son detectados.

En este sentido por su mayor sensibilidad observamos que la prueba de ELISA no es capaz de detectar casos positivos sólo en un 4%, seguido de RIAF vermes con 7%, RIAF hígado y patrón intestino con 8%, tegumento y cáscara con 9% y finalmente parénquima y granuloma con 10%; mostraron no ser tan sensibles ya que es el valor más alto donde se escapan casos verdaderamente positivos.

EFICACIA DIAGNOSTICA PARA ESTUDIO DE ESQUISTOSOMIASIS

METODOS	PARAMETROS (%)									
	S	E	F+	F-	VPP	VPN	FPPP	FNPN	Ex	P
ELISA	88	64	36	12	35	96	65	4	68	46
RIAF.V	73	75	25	27	40	93	60	7	75	34
RIAF.H	71	75	25	29	39	92	61	8	74	33
INTESTINO	66	89	11	34	56	92	44	8	84	21
TEGUMENTO	66	79	21	34	41	91	59	9	76	29
PARENQUIMA	56	88	12	44	51	90	49	10	82	20
GRANULOMA	56	86	14	44	47	90	53	10	80	22
CASCARA	63	80	20	37	42	91	58	9	77	28

LEYENDA
S =Sensibilidad
E =Especificidad
F+ =Falsos Positivos
F- =Falsos Negativos

VPP =Valor Predict. Prueba Positiva
VPN =Valor Predict. Prueba Negativa
FPPP =Falsos Posit. Prueba Positiva
FNPN =Falsos Neg. Prueba Negativa
Ex =Exactitud. P =Prevalencia

9. VALOR DE LA EXACTITUD PARA LA EFICACIA DIAGNOSTICA EN RELACION A LOS DIFERENTES METODOS UTILIZADOS

Este es un índice donde se consideran en forma conjunta las predicciones correctas tanto positivas como negativas sobre el total de los casos estudiados siendo el patrón más exacto el intestino con un 84%, seguido de parénquima con un 82%, granuloma 80%, cáscara 77%, tegumento 76%, RIAF vermes y RIAF hígado con un 75% y 74%, respectivamente. ELISA fue la prueba con una menor exactitud 68% (Fig. 3), esto es debido a su poca especificidad y su tendencia a valores aumentados de falsos positivos.

10. PREVALENCIA DE LA ESQUISTOSOMIASIS MANSONI SEGUN LOS DIFERENTES METODOS

Es aquí donde se muestra el número de casos portadores de la condición buscada (infección) sobre el total de casos estudiados. Se observa una discrepancia en lo que respecta a prevalencias obtenidas según los métodos realizados y la interpretación de sus correspondientes patrones. Siguiendo un valor de referencia obtenido por PPCO con un 18.4% de prevalencia, la mayoría de los resultados están fuera de este valor como los obtenidos en la prueba de ELISA con un 46% seguido de RIAF vermes 34%, RIAF hígado 33%, tegumento 29%, cáscara 28%. Las cifras de prevalencia que reflejan un valor más cercano al de referencia fueron obtenidos por los patrones granulomas 22%, intestino 21% y finalmente parénquima con un 20% (Fig. 3).

DISCUSION

En el presente trabajo se realizó la evaluación de una prueba diagnóstica, la Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes (RIAF) a los habitantes de un foco de esquistosomiasis en el Barrio Bicentenario III de Valencia al cual previamente se le había reportado una prevalencia de bilharziasis de 2.02% a través de la prueba coprológica de Kato y un 37.9% por la técnica serológica de ELISA (Zona II de Malariología y el Grupo de Investigación en esquistosomiasis 1987-1989).

Diversas técnicas como éstas la Reacción Periovascular, la RIAF, la ELISA, la Hemaglutinación e Inmunodifusión se han utilizado, tanto a nivel experi-

mental, como en humanos con la finalidad de resolver el problema de la baja sensibilidad de los métodos parasitológicos en pacientes con poca carga parasitarias en las heces de aquellos que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad.

La aplicación de la técnica RIAF como alternativa a la utilización de una técnica serológica se debió a la gran importancia en relación a la respuesta humoral proporcionada por el antígeno vermes adulto de *S. mansoni* (Smithers y Terry, 1969) que fue confirmada experimentalmente por (Pacheco de Montesinos, 1986).

Así mismo la cercaria y los huevos de *S. mansoni* contienen sustancias antigénicas capaces de estimular la producción de anticuerpos detectables por los métodos serológicos (Chieffi y Kanamura, 1978).

La Reacción de Anticuerpos Fluorescentes fue aplicada por primera vez en el diagnóstico de la esquistosomiasis por (Sadun y Col., 1960) y varios autores como (Anderson y Col., 1961), (Sadun y Col., 1961), (Pellegrinos., 1963), (Camargo y Col., 1965), (Kagan., 1965) y (Kagan., 1968); han estudiado diferentes aspectos de la prueba tales como la sensibilidad, la especificidad, tipo de antígeno más útil y modificaciones para hacer la técnica más sencilla. De esa experiencia se deduce que la RIAF presenta una sensibilidad entre 75% y 95%, según los autores y que en relación a la especificidad requería más estudios debido a la aparición de falsos resultados positivos (Moore y Col, 1968). También han sido señaladas reacciones cruzadas, particularmente en títulos bajos, de 1:10 por (Hoshino y Col, 1978). Es por ello que en el trabajo realizado las diluciones empleadas fueron a partir de la dilución 1:20.

Tomando la dilución 1:40 como límite para establecer positividad o negatividad; se obtuvo en nuestros resultados patrones de fluorescencia que mostraron mayor porcentaje de casos positivos, descartándose todos los valores por debajo de esta dilución, para con ello evitar los posibles falsos positivos o reacciones cruzadas que puedan alterar o enmascarar los resultados obtenidos por la RIAF.

Se han introducido modificaciones en la técnica de la RIAF entre ellas la propuesta por (Pothier y Xavier, 1969) ampliamente estudiadas por (Coudert y Col, 1974) la cual consiste en utilizar cortes de

adulto de *Schistosoma* obtenido bajo congelación. Según los autores, este antígeno es más estable y mantiene durante más tiempo la elevada sensibilidad y especificidad de la RIAF, siendo esto un aspecto importante en la realización de la técnica, uno de los antígenos para analizar la eficacia diagnóstica de la RIAF, fueron cortes de vermes adultos congelados con Tissue-Tek OCT.

La prueba de Precipitación Circumoval (PPCO) se utilizó como referencia debido a su alta sensibilidad y especificidad (Alarcón de Noya, 1987).

Debido a las múltiples desventajas que presenta la PPCO como son la dificultad en la obtención del antígeno (huevos viables del parásito) el mantenimiento del ciclo de *S. mansoni* en el laboratorio, la dificultad para la preservación del antígeno, el tiempo requerido para leer la reacción e interpretación de los resultados (2 días), han desalentado su uso como rutina de trabajo.

Se ha intentado utilizar la RIAF con corte de vermes adultos y cortes de hígado de hamster infectados como antígenos sustitutos de PPCO, ya que la RIAF carece de las desventajas mencionadas, en este sentido cabe destacar que se ha reportado la presencia de antígenos comunes entre parásito adultos y huevo (Hanna y Hillyer, 1984) anteriormente, además presenta una gran sensibilidad y especificidad (Wilson y col, 1974; Ruiz-Tiben y Col, 1979). También permiten identificar reacciones inespecíficas por la simple observación de la localización topográfica de la coloración fluorescente (Kanamura, 1985).

En nuestro trabajo adoptamos los criterios de patrones focal y difuso, para describir las diferentes respuestas obtenidas por la Reacción de Anticuerpos Fluorescentes (Van Helden y Col, 1975; Kanamura y Col, 1979). Estos últimos autores relacionando también la presencia de diferentes clases de inmunoglobulinas para los patrones de reacción, detectaron la presencia de anticuerpos específicos de las clases de IgA, IgM, IgG e IgE, correspondientes al tipo focal en pacientes con esquistosomiasis aguda, así como anticuerpos IgG para este mismo patrón en casos crónicos.

La fluorescencia de tipo difuso fue observada sólo en pacientes crónicos y correspondía a una respuesta de anticuerpos específicos IgG. Por otra parte, (Nkya, 1983), coincide con (Van Helden y

Col, 1975), al conseguir el patrón focal en el grupo más joven de pacientes por él estudiado. Debido a esto podemos observar que el anticuerpo que está siempre presente en mayor o menor proporción es el IgG, es por ello que se decidió en el presente trabajo la utilización del conjugado anti IgG humana, marcada con isotiocianato de fluoresceína.

(Kanamura y Col., 1979), también observaron que en algunos sueros de pacientes con infección crónica, la tinción fluorescente del vermes se modificaba a medida que aumentaba la dilución del suero y que la primera en desaparecer era la coloración del parénquima, luego el tegumento y finalmente el intestino.

Es por ello que para la determinación del título del conjugado se tomó como patrón de fluorescencia el parénquima. En nuestro estudio al comparar los resultados de los patrones de fluorescencia correspondientes al vermes adulto se observó lo siguiente: que el patrón tegumento con un 29.5% fue el valor más alto de positividad, seguido del intestino 21.4% y parénquima 20.1%; cabe señalar que éstas proporciones probablemente se deban al efecto de la dilución sobre los patrones, en especial a la desaparición del parénquima (Kanamura y Col., 1979).

(Hawazoe y Col, 1981); establece que la utilización del granuloma desarrollado en hígado como antígeno constituye un buen índice para la evaluación clínica y seroepidemiológica con resultados satisfactorios al ser aplicados en la RIAF.

CONCLUSIONES

1. La prevalencia obtenida con la Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes (RIAF) en la población estudiada varió de acuerdo a la fuente de antígeno utilizada, así como de acuerdo a los patrones de fluorescencia detectado en cada antígeno. Se obtuvieron valores de 34% con secciones de vermes adulto y 33% con secciones de hígado de hamsters infectados, cifras intermedias en relación a la prueba de ELISA, con 46% y PPCO con 18.4%, ésta última utilizada como prueba de referencia (ELISA y PPCO realizada por otros autores). La prevalencia obtenida de acuerdo a los patrones de fluorescencia fue de 29% para tegumento, 20% para parénquima, 21% para intestino, 28% para cáscara de huevo y 22% para granuloma.

2. La sensibilidad de la RIAF fue similar utilizando antígenos de vermes (73%) o de Hígado de hamsters infectado (71%), siendo estos valores inferiores a la ELISA (88%). La especificidad fue similar para ambos antígenos (75%) mostrándose superior a la ELISA (64%).

3. Los antígenos de intestino se muestran como los mejores candidatos para un diagnóstico más fidedigno.

4. Se puede establecer que es notable la similitud de los resultados obtenidos para cada uno de los antígenos vermes adulto e hígado, desde el punto de vista de su capacidad diagnóstica.

5. Finalmente consideramos que es importante establecer criterios de lectura; para sensibilidad la utilización del antígeno vermes adulto en su totalidad muestra ser de mayor utilidad y para condiciones de especificidad, falsos positivos, exactitud y prevalencia se demostró que la utilización del patrón intestino refleja con mayor veracidad los parámetros antes señalados.

AGRADECIMIENTOS

Se expresa sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una manera u otra con su valiosa colaboración hicieron posible la realización de este trabajo.

Dr. Renzo Nino Incani, Profesor del Departamento de Parasitología de la Universidad de Carabobo, que con su asesoría y apoyo constante nos ha brindado la oportunidad de emprendernos en el camino de la investigación.

Econ. José A. García, del Departamento de Salud Pública.

Ing. Carlos Balzán, Jefe de la Sección de Esquistosomiasis de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental (Maracay).

Sres. Pedro Gómez y Luis Hernández, de la Zona II de Malariología y Saneamiento Ambiental (Valencia).

Grupo de Estudiantes de Medicina, del XI Semestre (1990).

Lic. Carmela Violante (Técnica RIAF).

Técnico Sinecio Rivas, encargado del Bioterio de la U.C.

Departamento de Parasitología de la U.C.

Histotecnólogo. Mirlan Remanton, Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Oncológico de Valencia.

Técnico César Matos, del Centro de Microbiología y Biología Celular del I.V.I.C.

Lic. Rosalina González, Coordinadora del Programa Docente de Pasantías II. Escuela de Bioanálisis.

Lic. Dilcia de Peña, Profesora de Pasantías II. (Rural)

Grupo Nacional de Investigaciones en Esquistosomiasis (Resultados métodos de ELISA).

Muy especialmente, a la población del Barrio Bicentenario III, porque sin ellos no hubiese sido posible la realización de este trabajo

REFERENCIAS

- ALARCON DE NOYA., B. (1988). Estudio en una población endémica de Esquistosomiasis *Mansoni* en Venezuela: Diagnóstico parasitológico e inmunológico. Trabajo de Ascenso para profesor agregado. Facultad de Medicina. Escuela Luis Razetti. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- AMBROISE-THOMAS., P. (1976). Immunofluorescence in the diagnostic, therapeutic follow-up and sero-epidemiological studies of some parasitic diseases. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 70:107-112.
- AMBROISE-THOMAS., P. & ANDREWS., P. (1976). Development of fluorescent antibodies directed against larval stages, eggs and adults of *Schistosoma mansoni* in mice harbouring unisexual or bisexual infections. *Tropenmedizin und Parasitologie* 87: 483-488.
- AMBROISE-THOMAS., P. & GRILLOT., R. (1980). L'hémagglutination indirecte dans la diagnostic des bilharzioses. Comparaison a l'immuno-fluorescence indirecte dans l'étude de 3624 serums humains. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 277-288.
- ANDERSON, R.I; SADUN, E.H. & WILLIAMS, J.S.A. (1961). Technique for the use of minute amounts of dried blood in the fluorescent antibody test for Schistosomiasis. *Exp. Parasit.* 11: 111-116.
- ANDRADE., Z. & SADIGURSKY., M. (1978). Immunofluorescence studies of *Schistosoma* structures which share determinants with circulating schistosome antigens. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72: 316-317.
- BRUIJNING., C. (1965). The fluorescent antibody test for Schistosomiasis in experimentally infected mice. *Tropical and Geographical Medicine*, 17: 325-328.
- CAMARGO., M. E., HOSHINO-SHIMIZU., S. DA SILVA., L.C. (1965). A slide fluorescent antibody technique with adult worm antigen for the serological diagnostic of *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 7: 327-331.

- CAMUS., Carlier, Y. CAPRON, M. BINA, J., FIGUEREIDO, J. PRATA, A. & CAPRON, A. (1977). Immunological studies in human schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 26: 482-488.
- CASTRO., L. GARCIA., M.E., RIERA., A.R., TAMI., A. VEGAS., R.A. & YSCADAR., P.M. (1990). Evaluación epidemiológica, clínica y diagnóstico pre y post-tratamiento de un foco de Esquistosomiasis, Barrio Bicentenario III. *Requisito para aprobar la Asignatura de Medicina Preventiva y Social II*. Dpto. de Salud Pública. Universidad de Carabobo.
- CESARI., I.M., & ALARGON DE NOYA., (1987). Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni* en: *Esquistosomiasis mansoni Diagnóstico y Control. Manual de Campo y Laboratorio*. (Cesari, I.M. & Alarcón de Noya, b., Edict). Centro de Estudios Avanzados, I.V.I.C., Caracas.
- COLLEY., D. GARCIA., A. LAMBERTUCCI, J. PARRA, J. KATZ., N. ROCHA, R. & GAZZINELLI, G. (1986). Immune responses during human schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35: 793-802.
- COMITE ASESOR DE ESQUISTOSOMIASIS. (1987-1988). Dirección de Endemias Rurales. *Dirección General Sectorial de Malaria y Saneamiento Ambiental*. Venezuela. Documento.
- COUDERT., J. GARIN., J.P. AMBROISE-THOMAS., P. POTHIER., M. A. & THAI., K. T. (1968). Diagnostic serologique for Immunofluorescence sur coupes a la congelation d infections a *Schistosoma mansoni*. *S. haematobium et S. intercalatum*. *Acta trop.* 2: 109-132.
- COUDERT., J. GARIN., J. P. AMBROISE-THOMAS P. & POTHIER., M. A. (1967). Premier resultats a propos du diagnostic serologique de la bilharziose por immuno-fluorescence sur coupes a la congelation de *Schistosoma mansoni*. *Ann Parasitol.* 42: 483-492.
- CHIEFFI., P. & KANAMURA., Y. (1978) Diagnóstico laboratorial de esquistosomiasis mansonica. *Revista brasileira de Malaria e Doenzas Tropicais*. 30 77-97.
- DAVILA DE BRIGGS., I. (1986). Epidemiología y diagnóstico de un foco de esquistosomiasis. *Area de Parasitología. Trabajo de Ascenso para Profesor Asistente. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo*. Valencia.
- DEELDER., A. EL-DOSOKY. I VAN MARCK., E. A. & QIAN., Z. (1985). Immunofluorescent localization of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen in tissues of infected mice using monoclonal antibody. *Z. Parasitenkd.* 71: 317-323.
- DEELDER., A. & KORNELIS., D. (1981). Immunodiagnosis of recently acquired *Schistosoma mansoni* infection. A comparison of various immunological techniques. *Tropical and Geographical Medicine*. 33: 36-41.
- DIAS., L. C. S., CAMARGO., M. E., HOSHINO., S., RAMOS., A. S., PIZA., J. T. & SILVA., L. C. (1971). Inqueritos popacionais de esquistosomose mansoni por técnicas serológicas de immunofluorescencia e de hemaglutinacao. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 13: 37-44.
- FILHO., A. KRUPP., I. & MALEK., E. (1965). Localization of antigen and presence of antibody in tissues of mice infected with schistosoma mansoni as indicated by fluorescent antibody techniques. *Departament of Tropical Medicine and Public Health, Tulane University School of Medicine and the Seamen s Memorial Laboratory of the V. S. Public Health Service Hospital, New Orleans, Louisiana*. 84-97.
- GRAY., D. F. (1969). *Curso de Inmunología*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- HANNA, R. E. B. & HILLYER, G. (1984). Fasciola hepatica and Schistosoma mansoni: immuno-fluorescent localization and cross-reactivity. *Exp. Parasitol.* 57: 1-14.
- HEJDEN., H. TERPSSTRA., W. OKOT-KOBTER., B. & EYAKUZEN., V. (1975). Are there stage characteristic immunofluorescence patterns in schistosomiasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 69: 309-311.
- HOSHINO-SHIMIZU, S., CAMARGO, M. E. & NAGASSE, T. K. (1978). A stable polysaccharide reagent for the diagnosis of acute or recen T. cruzi infections. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 20: 208-212.
- KAGAN., I. G. (1985) Evaluation of routine serologic testing for parasitic diseases. *American Journal Public. Health*. 55: 1820-1829.
- KAGAN., I. G. (1968). Serologic diagnosis of Schistosomiasis. *Bulletin New York Academy Medicine*. 44: 262-277.
- KANAMURA-KAWADA., H. Y. (1985). Antigenos de diferentes formas evolutivas de *Schistosoma mansoni* para diagnóstico e acompanhamento serologico de pacientes submetidos a quimioterapias. *Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidad de Sao Paulo, para obtencao do grau de Doutor em Ciências*. (Inmunologia).
- KANAMURA., H. HOSHINO-SHIMIZU., S. & SILVA., L. (1978). Pattern of class specific fluorescent antibodies according to the infection in human schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 20: 76-81.
- KANAMURA., H. HOSHINO-SHIMIZU. S., CAMARGO., M. & DA SILVA., L. C. (1979). Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic schistosomiasis mansoni. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28: 242-248.
- NKYA., W. M. M. (1983). The effect of age on the specific immunoglobulin levels and immunofluorescence patterns in patients infected with *Schistosoma mansoni*. *East african Medical Journal*. 60: 669-675.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. (1985). Control de la Esquistosomiasis. Informe de un Comité de Expertos de la O.M.S., Series de Informes Técnicos. 728. Ginebra.
- PACHECO DE MONTESINOS., M. (1986). Serología de la Esquistosomiasis experimental: influencia de la intensidad e interrupción de la infección sobre los títulos de anticuerpos. *Trabajo de ascenso para Profesor Asistente. Dpto. de Parasitología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo*. Valencia.
- PELLEGRINO., J. I. (1963). Estado comparativo entre as reacoes de floclulacao, de immunofluorescencia e de fixacao do complemento. *Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo*. 5: 147-153.
- POTHIER., M. A. & XAVIER., M. L. S. (1969). Premiers resultats a propos du diagnostic serologique de la bilharziose par immunofluorescence sus coupes a la congelation de *Schistosoma haematobium*. *Ann. Parasitologic*. 44: 387-390.
- RUIZ-TIBEN., E. HILLYER., G., KNIGHT., W. GOMEZ DE RIOS., I. & WOODALL., J. (1979). Intensity of infection with *Schistosoma mansoni*: its relationship tom the sensitivity and specificity of serological test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28: 230-248.

SADUN., E. H. WILLIAMS., J. S. & ANDERSON., R. I. (1960).
Fluorescent antibody technique for the serodiagnosis of
Schistosomiasis in humans. *Pro. Soc. Exper. Bio. Med.* 105:
289-291.

SADUN., E. H. ANDERSON., R. I. & WILLIAMS., J. S. (1961).
Fluorescent antibodies test for the laboratory diagnosis of
Schistosomiasis in humans by using dried blood smears
on filter paper. *Exp. Parasit.* 11: 117-120.

SANTIAGO., N. SROUR., S. VARGAS., Y. & VIOLANTE., C.
(1988). Reacción indirecta de anticuerpos fluorescentes en
pacientes infectados con schistosoma mansoni y tratado
con drogas esquistosomiasis: Oxamniquine o Praziquantel.
*Requisito para aprobar la Asignatura de Pasantía II de la
Escuela de Bioanálisis. Universidad de Carabobo. Facultad
de Ciencias de la Salud. Valencia.*

SMITHERS., S. R. & TERRY., R. J. (1969). The immunology of
Schistosomiasis in: *Adv. Parasit. Ed. B. Dawes. Volumen 7
Pd. 41 Academy Press, London.*

TORREALBA., W. J. PEREZ., A. & ALFARO., O. (1976). Reac-
ción de anticuerpos fluorescentes en el diagnóstico de la
esquistosomiasis mansoni. *Boletín de la Dirección de Ma-
lariología y Saneamiento Ambiental. Vol. XVI. 4: 320-332.*

VAN HELDEN., H.-P. T. TERPSTRA., W. J., OKOT-KOBTER., B.
M. & EYAKUZE., V. M. (1975). Are there stage-characte-
ristic immunofluorescence patterns in Schistosomiasis.
*Transaction of The Royal Society of Tropical Medicine and
Hygiene.* 69. 309-311.

WILSON., M. SÜLZER., A. J. & WALLS., K. W. (1974). Modified
antigens in the indirect immunofluorescence test for
schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine
And Hygiene.* 23: 1072-1076.



INPREBIO
Instituto de Previsión Social
del Bioanalista

Trabajamos armoniosamente para el bienestar de nuestros afiliados...

- Seguro de Vida
- Seguro de Accidentes Personales
- Seguro de Hospitalización, Cirugía y Maternidad
- Seguro de Amparo Global para Laboratorios
- Seguro de Amparo Global para Vehículos
- Préstamos Personales
- Créditos Educativos
- Becas de Estudios para hijos de bioanalistas
- Proveeduría
- Planes turísticos (casas en Bahía de Plata)
- Planes culturales



**Vargas
Lab Supply C.A.**



Venta - Instalación
Servicio técnico
de instrumentos científicos

PCR, Espectrofotómetro, Electroforesis
Cromatógrafos centrífugos y todo para su
laboratorio

**Calle La Joya • Edificio Cosmos • Piso 9
Oficina 9-J • Chacao •
Teléfono: 261.62.56 • Fax: 261.72.80**

NORMAS PARA LA PUBLICACION DE TRABAJOS EN EL ACTA CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS

Como todas las colaboraciones recibidas serán enviadas a las personas encargadas de su evaluación, nombradas por el Comité de Redacción de la Revista, se agradece seguir al pie de la letra estas normas, lo cual facilitará la tarea de publicación. Gran parte de estas recomendaciones, con ciertas modificaciones, fueron extraídas de las empleadas en el Acta Bioquímica Latinoamericana, pues consideramos que son las que más se adaptan a nuestros fines.

I. GENERALIDADES

El Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas se publicará semestralmente, bajo la dirección de un Comité de Redacción elegido por la Junta Directiva de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas siendo el órgano de divulgación de ésta. La presentación de trabajos en esta Revista implica de parte del autor, el compromiso de que el material entregado, no ha sido, ni será publicado en otros medios de difusión ni nacionales ni extranjeros. Las colaboraciones deberán ser entregadas personalmente o enviadas por correo certificado, a la siguiente dirección:

Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas,
Avenida Principal de Los Chorros, entre Transversal Alfredo Jhan y Alvarez Michaud 13-01, Caracas.

Esta Revista publicará colaboraciones científicas aplicables directa o indirectamente a cualquiera de las áreas del Bionálisis: bioquímica, microbiología, hematología, salud pública, docencia, genética, Biología celular, etc. En los trabajos originales, por lo menos, uno de los Autores, deberá ser un profesional del Bionálisis.

II. TIPOS DE COLABORACION

Se recibirán trabajos originales, comunicaciones preliminares, actualizaciones, fichas técnicas, comentarios bibliográficos, cartas a la redacción, etc.

Se aceptarán investigaciones que hayan sido utilizadas como trabajos de postgrado, ascenso o cualquier

otro fin siempre y cuando cumplan con las normas de redacción de la Revista.

III. EVALUACION DE LAS COLABORACIONES

Las colaboraciones serán sometidas a una evaluación preliminar por parte del Comité de Redacción, el cual designará dos evaluadores con amplia experiencia en el tema.

El Comité, una vez que reciba las respectivas evaluaciones, procederá a elaborar el informe sobre el cual se fundamentará la conducta a seguir:

- a. Aprobación del trabajo.
- b. Solicitud de modificación al o los autores.
- c. Rechazo.

De ser rechazada la colaboración el autor recibirá una copia del informe que produjo la decisión, éste tendrá todo el derecho de apelar, fundamentando por escrito su discrepancia.

IV. PREPARACION DE LOS TRABAJOS

Las colaboraciones deberán ser presentadas en papel bond tamaño carta, a doble espacio, escrita con máquina preferiblemente eléctrica, numeradas en el ángulo superior derecho.

Junto con el trabajo original se anexarán 2 fotocopias completas, incluyendo cuadros, tablas, ilustraciones y bibliografía.

V. PRIMERA PAGINA

Esta presentará la siguiente información:

- Título: Este deberá ser conciso e informativo. Se tratará de no exceder los 100 caracteres, incluidos los espacios. Si no fuera posible ajustarse a estos requerimientos, se tratará de dividirlos en títulos y subtítulos. No utilizar abreviaturas, ni símbolos ó fórmulas químicas, salvo para indicar un compuesto marcado.

- Nombre completo del autor/es acompañado por su grado académico más alto.
- Dirección completa del lugar/es donde se ha realizado el trabajo.
- Dirección completa hacia quién deberá dirigirse la correspondencia.

VI. SEGUNDA PAGINA

a. Resumen:

En esta página se incluirá un resumen de no más de 200 palabras.

Deberá redactarse concisamente, limitándose a describir los siguientes tópicos:

- a. Objetivo del estudio.
- b. Qué se realizó y métodos científicos utilizados.
- c. Principales resultados.

d. Conclusiones más importantes. Deberá recordarse que el resumen de un trabajo es su parte más leída y debe informar suficientemente al lector como para decidir si le interesa leerlo totalmente. Además facilita el trabajo de las publicaciones especializadas en resumen es analíticos. Debe evitarse comentarios que no se refieran a los tópicos enunciados más arriba, a menos que resulte estrictamente indispensable. Deberá suponer que el lector posee cierto conocimiento del tema, pero que no ha leído el artículo y no necesitaría recurrir a él para saber de qué se trata. No se debe abusar del punto y aparte y debe ser redactado impersonalmente.

b. Palabras Claves:

A continuación del resumen se enunciará hasta 10 palabras claves, las cuales deberán ser elegidas teniendo en cuenta que por palabra clave se entiende un elemento gramatical (palabra o grupo de palabras) que transmiten el tema discutido en un documento. Esto permite clasificar con facilidad dicho documento a fines de confeccionar un sistema de indización.

El hecho de solicitar varias palabras claves (hasta 10) se justifica, ya que en un trabajo dado pueden confluír varios temas representativos. Las palabras claves serán ordenadas teniendo en cuenta la importancia decreciente que tenga el trabajo, el tema al que se refiera cada una; se usará un asterisco como separador entre palabras o grupos de palabras claves.

VII. TEXTO

El número total de páginas no deberá exceder de 30. Se recomienda el siguiente orden de presentación:

- Introducción.
- Materiales y métodos.
- Resultados.
- Discusión y conclusiones.
- Bibliografía.

Los trabajos extensos pueden dividirse en subsecciones. La redacción deberá ser gramaticalmente correcta, sin utilizar neologismos ni frases o palabras vulgares. La experiencia indica que esto no Siempre se cumple y en ciertos casos produce inconvenientes muy difíciles de salvar en el sentido de que la corrección se torna imposible. Deberá evitarse la redacción con lenguaje florido y pasajes extensos. Deberá mantenerse la coherencia, la forma gramatical y el tiempo del verbo a lo largo de todo el texto. Se debe tener siempre presente que se trata de comunicar información científica y para este objeto son necesarias precisión, claridad y sencillez en las expresiones.

VIII. INTRODUCCION

Debe especificarse aquí el propósito e importancia del trabajo y será razonablemente extenso como para presentar un panorama del estado actual del tema, referencias más importantes y problemas que se intentan resolver. Una introducción muy extensa debido a información no relevante hace que el lector pase al punto siguiente, obviando su lectura.

IX. MATERIALES Y METODOS

Aquí se debe comunicar todo lo que sea necesario saber para reproducir la experiencia con iguales o similares resultados.

Debe resultar posible, con esa, información hacer un listado de lo necesario incluyendo números de catálogos o artículos para las drogas o reactivos, tipo y marca de aparatos o instrumentos y accesorios.

Citar los métodos utilizados y aclarar con detalles las posibles modificaciones si las hubiere. No se aceptarán como originales los trabajos que estén basados en comunicaciones personales o información secreta. El tratamiento estadístico debe explicitarse mencionando el número de observaciones, tests utilizados y nivel de significancia.

X. RESULTADOS

Se expresarán con claridad, sencillez y en orden lógico. Podrán incluirse tablas, gráficos, figuras y fotografías.

La ubicación de las tablas, figuras, gráficos y fotografías deben indicarse claramente en el texto. Estos se presentarán por separado numerados correlativamente.

- a) **TABLAS:** Deberán ser inteligibles sin necesidad de recurrir al texto. El título deberá ser descriptivo.
- b) **FIGURAS:** Cuando fuere necesario, deberán ser elaboradas por un dibujante. Se presentarán en blanco y negro, debiendo matizarse con gamas de grises realizadas sobre la base de densidad de puntos. Se presentarán de tamaño adecuado, para que al reducirse no se pierdan detalles o el texto resulte muy pequeño.
- c) **GRAFICOS:** No se deberán realizar sobre papel milimetrado. Se dibujarán sobre fondo blanco, con trazos negros. El objeto del gráfico es ejemplificar el comportamiento determinado de variables. Debe ser sencillo e ilustrativo. Se recuerda que los gráficos con muchas curvas pierden claridad. Trazar, pues, sólo las significativas. Conviene que sean realizados por dibujantes especializados. No se admitirán gráficos hechos a mano alzada. Las leyendas al pie serán suficientemente explicativas, y se utilizarán, si son necesarios, símbolos claros para identificar puntos especiales o que requieren ser individualizados.
- d) **FOTOGRAFIAS:** Se aconseja que sean tomadas por expertos, y copiadas sobre papel brillante en blanco y negro. Se aceptarán en color cuando se justifique su utilización.

XI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

No repetir resultados descritos anteriormente. Resaltar los principales hallazgos y las conclusiones que de ellos derivan. Cotejarlos con los obtenidos por otros autores. Correlacionar los resultados con el objetivo del estudio y evitar conclusiones que no estén debidamente avaladas por la experiencia realizada.

XII. EVALUACION DE METODOS ANALITICOS

Los trabajos científicos que correspondan a métodos analíticos originales o modificaciones de originales, incluirán una sección que corresponda a la evaluación de dichos métodos. Se aconseja que tal sección comprenda, como mínimo, los siguientes estudios:

a) Precisión:

Dentro de una misma serie (repetibilidad).

Entre series (reproductividad).

b) Exactitud:

Esta debe ser evaluada idealmente contra un método de referencia cuando lo hubiere. En caso contrario se deberán realizar estudios de recuperación.

c) Linealidad:

Debe abarcar el rango de importancia clínica.

d) Estudio de la Especialidad.

e) Estudio de las Interferencias.

XIII. UNIDADES

Se requieren que los datos expresados se ajusten estrictamente al Sistema Internacional de Unidades. Se recuerda a los señores autores, que usamos numeración española, por lo tanto, los decimales se indicarán con una coma y los miles con un punto; cuidar que así aparezcan tanto en texto como en los cuadros, tablas y gráficos. Además hacemos hincapié en usar tal como el sé lo indica, los símbolos y no las abreviaturas para las unidades. Así ser 5,2 ml y no 5,2 mlts.; 5,3 ? y no 5,3 cm.; 0,5 pg y no 0,5 pgr.

XIV. AGRADECIMIENTO

Deberán ser breves y concretos.

XV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Las referencias bibliográficas se presentarán al finalizar el trabajo y se citarán con un número correlativo al orden con que aparecen en el texto asignándole el número 1 a la primera.

Si en el texto una referencia debe citarse más de una vez, deberá mantenerse el menor número de orden, que corresponde a la primera cita de dicha referencia. Se pide que el número de referencia en el texto, se subraye y se ponga entre paréntesis.

No se aceptarán citas de trabajos que no vayan a ser publicados, informes verbales o comunicaciones personales.

Se aceptarán aquellas comunicaciones personales que estén avaladas por una nota autorización para usar esa comunicación y esté disponible para el interesado.

XVI. PUBLICACIONES PERIODICAS Y LIBROS

En general, las abreviaturas usadas deberán ser las aceptadas internacionalmente. Los apellidos deben escribirse completos y de los nombres sólo anotar las iniciales.

Cuando haya concurrencia de autores se utilizarán punto y coma para separarlos y el último se unirá con la conjunción correspondiente al idioma de la cita "y", "and"; "und"; "et".

PUBLICACIONES PERIODICAS:

Apellidos e iniciales del autor, subrayados como indica el ejemplo a) mecanografiado; título del artículo

entre comillas, nombre de la revista con letra bastardilla, volumen con letra negrita (ver el ejemplo "a" como se indican), página y año; cada enunciación separada por coma.

Ejemplo:

a) Mecanografiada y con marcación convenida:

5. SADUN, E. H; ANDERSON, R.I. and WILLIAMS.

J. S., "Fluorescent antibody test for the serological diagnosis of Trichinosis". *Exp. Parasitol*, 12, 423-433, 1962.

LIBROS:

Apellidos e iniciales del autor, nombre completo del libro con letra bastardilla, empresa editorial y sede de la misma, volumen, página, año; cada enunciación separada por coma.

Ejemplo:

a) Mecanografiada y con marcación convenida:

28. WHURMAN, F. Y WUNDERLEY, Ch., *Las proteínas sanguíneas en el hombre*. Ed. Científico Médica, Barcelona, 1954.

XVII. ACTUALIZACIONES

Se consideran dentro de esta categoría las colaboraciones que reúnan, analicen y discutan informaciones ya publicadas, referidas a un tema en particular.

XVIII. COMENTARIOS BIBLIOGRAFICOS

Es una comunicación breve sobre el contenido de una obra, generalmente un libro.

Tiene por objeto la difusión de la información, así como servir de apoyo para la selección bibliográfica. Puede ser de carácter descriptivo o crítico, según el criterio del autor. Consta de tres partes: 1) encabezamiento, 2) texto y 3) autoría.

El encabezamiento es la descripción bibliográfica de la obra, que de ser posible debe incluir:

- Título propiamente dicho.
- Primer lugar de publicación, editorial, fecha de publicación.
- Número de volúmenes o páginas, ilustraciones, dimensiones.
(Título de serie/responsable de serie, ISBN de serie, numeración de subserie).
- Notas especiales.
- Precio.

El texto debe tener una extensión de no más de 400 palabras. La autoría debe indicarse según la siguiente modalidad:

- Nombre y apellido completo.
- Lugar de trabajo.
- Ciudad.
- Provincia.

XIX. FICHAS TECNICAS

Se publicarán con esta denominación las colaboraciones que presenten un método de trabajo con el cual el autor tenga experiencia. En general se pretende que la ficha, además de contener toda la información necesaria para llevarla a la práctica, esté acompañada de comentarios que tiendan a facilitar el desarrollo metodológico de la técnica presentada.

Deberá estar acompañada de los datos completos del autor, cita original del método y bibliografía pertinente.

XX. CARTAS AL DIRECTOR

Esta sección podrá utilizarse para presentar a la consideración de los lectores, puntos de vista referentes a trabajos ya publicados o comentar experiencias científicas personales que el autor considere de interés para otros profesionales.

No sobrepasarán las 400 palabras y se enviarán acompañadas con los datos completos del autor.