

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas



Volumen 9, N° 2

Año 2006

Revista arbitrada dedicada a estudios humanos, animales y de laboratorio relacionados con la investigación biológica y clínica.

Publicada semestralmente por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Caracas, República Bolivariana de Venezuela.

Dirección: Av. Ppal de Los Chorros entre transversal Alfredo Jahn y Alvarez Michaud, Qta. Colegio de Bioanalistas. Caracas, Venezuela.

ISSN: 1315-1746

Depósito Legal: pp 199202DF899

Suscrita a Lilacs, Asereme Bireme

Consejo Directivo

Editora

Dra. Ana Monzón de Orozco

Gerencia Editorial

MSc Rosa Pabón de Santiago

Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas (S.V.B.E)

Junta Directiva

Presidente

Dr. Axel Rodolfo Santiago

Dirección General

MSc Eudomario Alcantara

Dirección Científica

Dra. Ana Monzón de Orozco

Dirección Administrativa

MSc Priscila Bastidas

Dirección de Proyectos y Divulgación Científica

Dr. Julio Cesar González

Comisión de Estudio de Credenciales

Lic. Ludovina Guerra de Barreto (Coordinadora)

Lic. Milagros Cárdenas

Dra. Cristina Gutiérrez

Comisión para otorgar unidades crédito

Lic. Josefina Guariguata (Coordinadora)

Lic. Graciela Maggi

Comité de Redacción

Prof. Antonio Velásquez

Lic. Eliud Marín

Lic. Gabriel González

Lic. Mery Bell Maldonado

Esp Rosa Pabón

EDITORIAL

La Junta Directiva de la SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS, nuevamente le hace entrega de este nuevo número de ACTA CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS esperando que tenga la misma aceptación que los números anteriores.

Como siempre, el equipo editorial dirigido por la Dra. Ana Monzón de Orozco, haciendo gala de su constancia y arduo trabajo, han logrado una vez más, la publicación de esta, nuestra Revista, donde podrán contar con diversos artículos científicos publicados por Bioanalistas y profesionales de otras áreas de Salud.

Nos sentimos orgullosos de formar parte del brazo ejecutor de las políticas de educación, ciencia y tecnología de la FEDERACION DE COLEGIOS DE BIOANALISTAS DE VENEZUELA. Esta publicación, es un ejemplo de ello, con todas las acreditaciones para ser considerada una revista científica internacional, es una muestra del empeño de la directiva de la SOCIEDAD de mantenerlos informados con artículos meritorios, escritos para su divulgación, al mundo científico nacional e internacional, pero en especial a todos los profesionales del Bioanálisis.

Desde ya, queremos seguir incorporando a colegas Bioanalistas que desarrollan un importante papel en la formación de nuestros futuros profesionales que publiquen en nuestra revista, consideramos que es un deber hacerlo, invitamos igualmente a todos los profesionales del área de la Salud, a continuar realizando sus contribuciones científicas.

En el mundo actual un profesional científicamente informado, estará a la altura que desee. Qué desees tú?

Dr. Axel Rodolfo Santiago S.
Presidente
Sociedad Venezolana
de Bioanalistas Especialistas



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENIDO

Editorial	1
Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas Rivas Jomar, Redondo Carlos, Alonso Guillermina	3
Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia en pacientes procedentes del Laboratorio del Hospital de Clínicas Caracas Cecilia Varnagy Gabay, Noel Silva	8
La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) coinfectados con sífilis Delsa D. Delgado Chacón, Anselmo Rosales, Patricia Mantilla, Ana Monzón de Orozco	21
Prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra <i>Helicobacter pylori</i> en pacientes con urticaria crónica Jusmelys Millán de Vilorio, Patricia Mantilla, Dayana Delgado.....	35
Prevalencia de <i>Norovirus</i> en muestras de heces procedentes del laboratorio del Hospital José Gregorio Hernández. Catia, Caracas Llumey Martínez Chang, Noel Silva	43
<i>Candida</i> en el Departamento de Neonatología de la Maternidad “Concepción Palacios”. enero-junio de 2006 Garmendia Yolanda, Vergara Vivian, Rodríguez Yun, Benítez Edelmira, Morales María, López Rayza, Torres Luís	53
Expresión de gp 120 como marcadores de progresión en la infección por VIH E. Escobar Guevara, A. Monzón de Orozco, P. Mantilla Guevara, M. Ochoa Díaz, M. E. Pacheco y E. Marcano de Herass	58
Información para los autores	63

Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas*

Rivas Jomar ¹, Redondo Carlos ^{1,2}, Alonso Guillermina ¹

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales pueden ser producidas por microorganismos resistentes a la acción de los antimicrobianos que han sido seleccionados por el mal uso ó el uso indiscriminado de los antibióticos en el ámbito hospitalario. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que han representado un avance importante en el estudio de las enfermedades infecciosas, siendo muy útiles al permitir diferenciar serotipos estrechamente relacionados y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, debido a su gran poder discriminatorio. En Venezuela, son pocos los estudios de epidemiología molecular de las infecciones intrahospitalarias, y por esta razón nos propusimos genotipificar cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* provenientes de aislados nosocomiales de cuatro centros de salud del área metropolitana (Hospital "Dr. José María Vargas", Hospital "Dr. Domingo Luciani", Centro Médico de Caracas y Policlínica Metropolitana) con la finalidad de determinar la relación clonal existente entre estas cepas. El uso de ERIC-PCR permitió relacionar parcialmente las especies de *E. coli* aisladas en los cuatro centros de salud, sin embargo la técnica de REP-PCR permitió discriminar entre los patrones de bandas similares, mostrando un poder de resolución mayor. El uso de ERIC-PCR y REP-PCR no permitió tipificar la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas en los cuatro centros de salud en estudio. En el Centro Médico de Caracas se identificaron dos aislados clonales provenientes de diferentes áreas del hospital, Unidad de Terapia de Adultos y Hospitalización. En la Policlínica Metropolitana se identificaron tres aislados clonales, dos en la unidad de Terapia y uno en Hospitalización. En el Hospital "Dr. Domingo Luciani" y en el Hospital "Dr. José María Vargas" no se identificaron clones. Estos resultados proporcionan un aporte a los programas de vigilancia y control de las infecciones bacterianas, que contribuyen al establecimiento de medidas eficientes que conlleven a disminuir el número y costo de las infecciones nosocomiales.

Palabras clave: ERIC-PCR, REP-PCR, Clones, diseminación clonal, métodos genotípicos, infección nosocomial.

Genotyping of enterobacterias strains from 4 healthcare centers in Caracas*

SUMMARY

Nosocomial infections can be produced by microorganisms resistant to antimicrobial agents, and they have been selected by the bad use or abuse of antibiotics in the hospital environment. Recently, new molecular typing techniques have been developed, based on polymerase chain reaction (PCR). These techniques represent an important advantage the study of infectious diseases; they are able to discriminate related closed serovars and groups of nonrelated isolates due to its great power discriminatory. In Venezuela, there is a small number of molecular epidemiology researches. The goal of the present study is genotyping *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated of nosocomial infected patients from four healthcare centers in the metropolitan area (Hospital "Dr. José María Vargas", Hospital "Dr. Domingo Luciani", Centro Médico de Caracas, y Policlínica Metropolitana) in order to investigate the clonal relationship between the isolates. ERIC-PCR allowed us to correlate *E. coli* isolates however REP-PCR shows greater resolution. The use of both ERIC-PCR and REP-PCR, did not permit us typing *K. pneumoniae* isolates. Two clonally related isolates from Centro Medico of Caracas were identified. Three clonally related isolates from the Policlínica Metropolitana were identified. No clones were identified in samples from Hospital "Dr. Domingo Luciani" and the Hospital "José María Vargas". These results contribute to monitoring programs, to improve the control of the bacterial infections, helping to establish efficient procedures and reduce nosocomials infections.

Key words: ERIC-PCR, REP-PCR, clons, clonal dissemination, genotyping methods, nosocomial infections.

* Trabajo presentado en poster, ganador del premio "Josefina Guariguata" en el XI Congreso Venezolano de Bioanálisis, mayo de 2006.

1. Laboratorio de Biología de Plásmidos, Instituto de Biología Experimental. U.C.V.
2. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

Las infecciones nosocomiales representan hoy en día una de las complicaciones más comunes que afectan el ambiente hospitalario, generalmente estas infecciones son ocasionadas por microorganismos que han acumulado determinantes de resistencia mediante un acelerado proceso selectivo, ejercido por el uso y el abuso de los antimicrobianos como agentes terapéuticos y profilácticos dentro del recinto hospitalario (1).

Un aspecto importante de la epidemiología de las infecciones nosocomiales es comprender como se diseminan las cepas bacterianas involucradas y los determinantes de resistencia, dentro de un hospital e incluso en hospitales de un área determinada, la determinación de la relación genética entre los patógenos nosocomiales ha sido utilizado para la vigilancia epidemiológica (2).

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que han representado un avance importante en el estudio de las enfermedades infecciosas, siendo muy útiles al permitir discriminar serotipos estrechamente relacionados y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, debido a su gran poder discriminatorio.

Los métodos genotípicos epidemiológicos están basados en el estudio del ADN, cromosómico o extracromosómico. En la tipificación molecular se comparan las secuencias nucleotídicas de los microorganismos de manera directa e indirecta, permitiendo determinar la relación clonal entre cepas de una misma especie bacteriana. Una alternativa para genotipificar son las técnicas basadas en la amplificación de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (3).

El genoma de las enterobacterias contiene dos tipos de secuencias cortas, repetidas y esparcidas, llamadas ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) y secuencias REP (Repetitive Extragenic Palindromic), las cuales han sido usadas ampliamente en tipificación, análisis genético y en la identificación de brotes infecciosos bacterianos (4-6). Estos análisis están basados en la amplificación de las secuencias de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores específicos para cada tipo de secuencia. El polimorfismo detectado resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones del ADN. Usando estas secuencias ha sido posible, discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie, y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, ya que poseen un gran poder discriminatorio (4).

El objetivo de este trabajo consistió en genotipificar mediante

REP-PCR y ERIC-PCR, cepas de *E. coli* y de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de aislados nosocomiales de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas.

Materiales y métodos

Aislados bacterianos y métodos bacteriológicos

Se recolectaron 60 cepas de *Escherichia coli* y 26 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes hospitalizados en cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas: Hospital "Dr. José María Vargas" Hospital "Dr. Domingo Luciani", "Centro Médico de Caracas" y "Policlínica Metropolitana".

Susceptibilidad antimicrobiana: se empleó el método de difusión en disco siguiendo los lineamientos propuestos para enterobacterias por la CLSI. La cepa *E. coli* ATCC (25922) fue utilizada como control de calidad de las pruebas de susceptibilidad.

Lisados celulares de las cepas nosocomiales: como templado para la reacción de PCR, se utilizó ADN total proveniente de la preparación de lisados celulares obtenido mediante el método de Levesque *et. al.* (5).

Genotipificación de las cepas nosocomiales

ERIC-PCR: se emplearon iniciadores que hibridan las secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (secuencias ERIC). Las secuencias de los iniciadores son: ERIC1 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' y ERIC2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'. Se utilizaron condiciones estándar en la PCR. Los parámetros empleados fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridación a 45°C por 1 minuto, y una extensión a 72°C por 2,5 minutos, con una extensión final a 72°C por 7 minutos (4).

REP-PCR: se empleó un iniciador que hibrida con las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) cuya secuencia es REP 1: 5'-GCG CCG ICA TGC GGC ATT-3'. Se utilizaron condiciones estándar en la PCR. Los parámetros empleados fueron: desnaturalización de 95°C por 1 minuto, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 38°C por 1 minuto y 65°C por 8 minutos, con una extensión final de 65°C por 15 minutos (6,7) (Figura 1).

Criterios de interpretación:

Las cepas fueron agrupadas según las relaciones clonales, establecidas por ambas técnicas. Se utilizó la clasificación de interpretación establecida por Tenover *et al.* Fundamentada en los eventos genéticos como mutaciones puntuales, inserciones ó deleciones que pueden ocurrir de manera espontánea y al azar que pueden alterar el patrón de bandas (8).

Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas

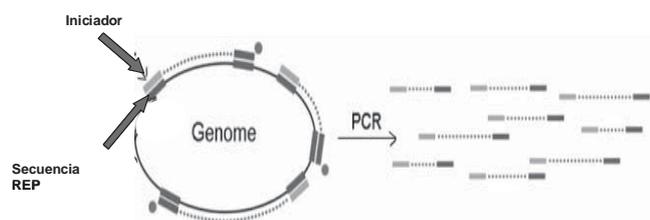


Figura 1. Iniciador REP- PCR hibrida específicamente con secuencias REP distribuidas aleatoriamente en el cromosoma bacteriano. Múltiples fragmentos de diferentes longitudes son amplificados. Los fragmentos amplificados son separados por tamaño y carga, obteniéndose un único perfil REP-PCR, el cual contiene múltiples bandas de varios tamaños e intensidad.

Resultados

En el Centro Médico de Caracas se determinó que 4 cepas las 25,35,40 y 43 eran clones genéticamente relacionados (Figura 2-A), todas estas cepas fueron aisladas de pacientes ubicados en el área de hospitalización y 3 asociadas a sepsis. El perfil de resistencia de estas cepas relacionadas genéticamente es variable (Tabla 1).

En la Policlínica Metropolitana se encontraron un grupo de clones de *E. coli* estrechamente relacionados, éstos son la 51,52,57,58 y 59. Las cepas 51 y 52, fueron clasificadas como aislados genéticamente indistinguibles, al igual que las cepas 57 y 58 (Figura 2-B). Los perfiles de resistencia entre las cepa 51/52 y 57/58 son idénticos. Las cepas fueron aisladas en pacientes ubicados en las áreas de Hospitalización, Unidad de Terapia Infantil y Unidad de Terapia de Adultos. Los perfiles de resistencia entre las 5 cepas, varían por la presencia de resistencias a Trimetoprima/Sulfametoxazol en las cepas 51 y 52, y la falta de resistencia a Ampicilina/Sulbactam de la cepa 59 (Tabla 1).

Tabla 1: Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* con relación clonal, establecidos por REP-PCR y ERIC-PCR, pertenecientes a 4 centros de salud del área metropolitana de Caracas.

Genero	Nº Cepa	Origen de los aislados	Tipo de muestra	Centro de salud	Perfil de resistencia
<i>E. coli</i>	25	HP	Sangre	C.M.C	AMP, ATM, CAZ, CTX, CRO
<i>E. coli</i>	35	HP	Orina	C.M.C	AMP, SXT, CIP
<i>E. coli</i>	40	HP	Sangre	C.M.C	AMP, ATM, CAZ, CTX, CRO, SAM, MEN, SXT, CIP
<i>E. coli</i>	43	HP	Sangre	C.M.C	CIP
<i>E. coli</i>	51	HP	Bilis	P.M	AMP, CAZ, CTX, KF, PIP, SAM, SXT, CIP
<i>E. coli</i>	52	HP	Sec.Herida operatoria	P.M	AMP, CAZ, CTX, KF, PIP, SAM, SXT, CIP
<i>E. coli</i>	57	UTIN	Lavado bronquial	P.M	AMP, CAZ, CTX, KF, PIP, SAM, CIP
<i>E. coli</i>	58	UTA	Secreción endotraqueal	P.M	AMP,CAZ,CTX,KF,PIP,SAM,CIP
<i>E. coli</i>	59	UTIN	Sonda de Foley	P.M	AMP, CAZ, CTX, PIP, KF, CIP
<i>E. coli</i>	159	UCIN	Sonda	H.D.L	AMP, ATM, CTX, KF, C, TE
<i>E. coli</i>	162	UCIN	Secreción	H.D.L	AMP, ATM, CTX, KF, SXT, CIP, TE
<i>E. coli</i>	182	UCIN	Liq. Peritoneal	H.D.L	AMP, ATM, KF, C, SXT, TE
<i>E. coli</i>	196	HP	Orina	H.D.L	AMP, SXT, CIP,TE
<i>E. coli</i>	198	HP	Orina	H.D.L	AMP, SXT, CIP, TE, C
<i>K. pneumoniae</i>	101	UTA	Secreción	H.J.M.V	AMP, ATM, CAZ, CTX, FEP, KF
<i>K. pneumoniae</i>	112	CIR	Secreción	H.J.M.V	AMP, ATM, CAZ, CTX, FEP, KF

HP: hospitalización; UTIN: Unidad de Terapia Infantil; UTA: Unidad de Terapia de Adulto; UCIN: Unidad de Cuidados Intermedios; CIR: Cirugía. AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftazidima; CTX: Cefotaxime; CRO: Ceftriaxone; KF: Cephalotin; PIP: Piperacilina; SAM: Ampicilina/Sulbactan; FEP: Cefepime; CIP:Ciprofloxacina; MEN: Meropenen; SXT: Sulphamethoxazole/Trimethoprim ; C: Cloranfenicol; TE: Tetraciclina C.M.C: Centro Médico de Caracas; P.M: Policlínica Metropolitana; H.D.L: Hospital "Dr. Domingo Luciani"; H.J.M.V: Hospital "Dr. José María Vargas".



Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas

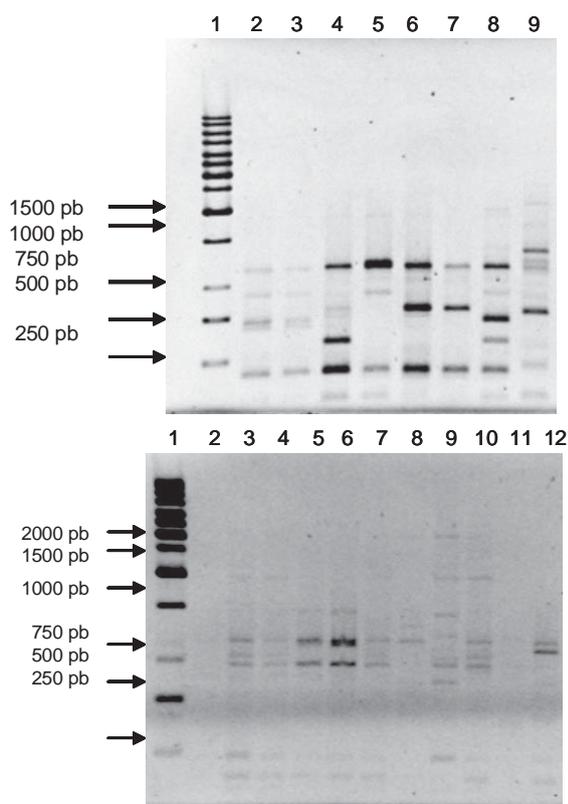


Figura 2-A. Patrones de bandas obtenidas con ERIC-PCR, de los aislados provenientes de la Policlínica Metropolitana de Caracas. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb; carril 2: *E. coli* 51; carril 3: *E. coli* 52; carril 4: *E. coli* 54; carril 5: *E. coli* 55; carril 6: *E. coli* 57; carril 7: *E. coli* 58; carril 8: *E. coli* 59; carril 9: *E. coli* 60; carril 10: *E. coli* 61.

Figura 2-B. Patrones de bandas obtenidas a través de REP-PCR, de los aislados nosocomiales de la Policlínica Metropolitana de Caracas. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb; carril 2: control negativo; carril 3: *E. coli* 51, carril 4: *E. coli* 52; carril 5: *E. coli* 57; carril 6: *E. coli* 58; carril 7: *E. coli* 59; carril 8: *E. coli* 60; carril 9: *E. coli* 61; carril 10: *E. coli* 62; carril 11: *E. coli* 55; carril 12: *E. coli* 64.

En el Hospital “Dr. José María Vargas” se encontraron cepas de *Klebsiella pneumoniae*, cepas 101 y 112 que presentaron una estrecha relación clonal. El fenotipo de resistencia entre ambas es idéntico, indicativo de su relación clonal (Tabla 1).

En el Hospital “Dr. Domingo Luciani” se encontraron 3 cepas de *E. coli* 182, 196 y 198 clasificadas por ERIC-PCR como relacionados clonalmente y por REP-PCR como aislados con una posible relación clonal. Los perfiles de resistencia entre las tres cepas varían por la resistencia a cefalotina, aztreonam,

cloramfenicol, cepa 182 y ciprofloxacina, 196 y 198. Estas cepas fueron aisladas de la Unidad de Cuidados Intermedios (U.C.I.) y de Hospitalización. Así mismo se encontraron 2 cepas de *E. coli*, cepas 159 y 162 clasificadas por ERIC-PCR como de una estrecha relación clonal y por REP-PCR como con una posible relación clonal. Estas 2 cepas fueron aisladas de la U.C.I. y presentaron un perfil de resistencia similar, a excepción de las resistencias a cloramfenicol, trimetropina/sulfametoxazol y ciprofloxacina (Tabla 1).

Discusión

Cuando varios aislados son clasificados como genéticamente indistinguibles, mediante un método de tipificación molecular, se puede asumir que estos derivaron recientemente de un ancestro común, a través de una cadena de eventos relacionados.

Según nuestros resultados, la tipificación molecular reveló una considerable variabilidad genética entre las cepas de la misma especie. No se detectó diseminación de clones bacterianos entre los hospitales que conformaron nuestro estudio.

En el Centro Médico de Caracas y en la Policlínica Metropolitana se encontraron clones en diferentes servicios, sugiriendo la diseminación de clones bacterianos dentro de los centros de salud.

Nuestros resultados nos permiten inferir como se están diseminando los determinantes de resistencia. La mayoría de las cepas analizadas presenta variabilidad en sus perfiles de resistencia y en su mayoría presentan variabilidad genética cromosomal. Ambos resultados sugieren, que en los cuatros centros hospitalarios, la diseminación de los determinantes de resistencia principalmente no es por la propagación de clones bacterianos sino por vía horizontal.

Así mismo, las cepas relacionadas clonalmente presentan diferencias en los fenotipos de resistencia, sugiriendo una adquisición de los determinantes de resistencia por vía horizontal, posiblemente vía plásmidos conjugativos portadores de genes de resistencia. Las cepas clonalmente relacionadas encontradas en el Centro Médico de Caracas, que poseen perfiles de resistencia diferentes, representan una prueba que apoya nuestra proposición.

- La tipificación molecular reveló una considerable variabilidad genética entre las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*
- En el Centro Médico de Caracas y en la Policlínica Metropolitana se encontraron clones diseminados en diferentes servicios de los centros de salud.
- En los cuatros centros hospitalarios, la diseminación de los determinantes de resistencia no pareciera ser por la propagación de clones bacterianos sino por transferencia horizontal.

Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas

Agradecimientos

A los Licenciados, Alberto Calvo y Nicolás Rodríguez (Policlínica Metropolitana), Adela Rizzi (Centro Médico de Caracas), José Luís Rodríguez (Hospital “Dr. José María Vargas”), Ninoska Montilla (Hospital “Dr. Domingo Luciani”); y al Dr. Manuel Guzmán, por el apoyo brindado para la realización de este estudio. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) a GA (03-33-5417-2004 y 03-33-5416-2004)

Referencias

1. Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infections: practicality and costs. *Emerging Infectious Diseases*. 2001;7: 312-318
2. Tosin I, Silbert S, Sader H. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative in Brazilian hospitals. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2003;7:360-369.
3. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004;22:355-360.
4. Versalovic J, Koeuth T, Lupski J. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacterias and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1991;19:6823-6831.
5. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995;39:185-188
6. Rademaker JLW, Louws FJ, De Bruijn FJ. Characterization of diversity of ecologically important microbes by REP-PCR genomic fingerprinting. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Pp. 1-26. Kluwer Academic publishers dordrecht.1997.
7. Horcajada J, Vila J, Moreno-Martinez J., et al. Molecular Epidemiology and evolution to resistance to quinolones in *Escherichia coli* after prolonged administration of ciprofloxacin in patients with prostatitis, *Journal of Microbial Chemotherapy* 2002;49:(55-59)
8. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE., Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995;33:2233–2239.



Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia en pacientes procedentes del laboratorio del Hospital de Clínicas Caracas

Cecilia Varnagy Gabay ¹, Noel Silva D.², Nirsén García ², José Luis Bello ¹, Samuel Malka Abbo ³, Ana Monzón de Orozco ⁴

RESUMEN

La sepsis es una enfermedad severa que puede afectar a cualquier miembro de la población, causando graves consecuencias e incluso la muerte si no es tratada a tiempo. Está presente en un alto porcentaje en la población mundial y es la causa de muerte #23 en nuestro país, por ésta razón es de gran relevancia hacer un diagnóstico rápido y seguro de la enfermedad y así proporcionar tratamiento a la población afectada. El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad, especificidad y exactitud de BRAHMS PCT®-Q, siendo éste una prueba para determinación de niveles de procalcitonina en sangre de manera semicuantitativa, para el diagnóstico precoz de sepsis y comparándolo con los resultados obtenidos por el hemocultivo y la impresión diagnóstica médica, siendo ésta última la prueba de referencia para el diagnóstico de sepsis bacteriana. A partir de esto establecer la utilidad, así como los beneficios de un marcador de sepsis como la BRAHMS PCT®-Q en nuestro país. Para lograr esto se utilizó muestras de 102 pacientes que asistieron al Hospital de Clínicas Caracas, cuya sintomatología indicó que era recomendable realizar hemocultivo y determinación de procalcitonina. A estos pacientes se les hizo una toma de muestra para hemocultivo y en la misma punción se tomó una muestra de sangre sin anticoagulante. El hemocultivo fue procesado por el servicio de Bacteriología del Laboratorio del Hospital de Clínicas Caracas y el suero se utilizó para la determinación de procalcitonina. Una vez obtenidos ambos resultados se cotejaron y compararon. A partir de los datos obtenidos se pudo concluir que la sensibilidad de BRAHMS PCT®-Q es mayor al 80%, la especificidad es de 90% y presenta una exactitud de 90%. Por lo tanto es una prueba que puede ser utilizada para el diagnóstico precoz de sepsis, pero es aún más recomendada para el descarte de ésta. Es de gran ventaja el uso de ésta prueba en nuestro país, sobre todo, en poblaciones remotas donde no poseen los medios para un mejor diagnóstico y donde es requerido obtener resultados en cortos períodos de tiempo.

Palabras clave: Sepsis bacteriana, procalcitonina, hemocultivo.

Study of the BRAHMS PCT®-Q assay for the early diagnosis of sepsis caused by bacteremia in patients of the laboratory of the Hospital de Clínicas Caracas

SUMMARY

Sepsis is a serious disease that may affect any member of the population and can have important consequences, including death, if not treated in time. It is present in a high percentage of the World population and is the 23rd cause of death in our country; it is therefore extremely relevant to diagnose the disease quickly and reliably and thus provide treatment to the affected population. The objective of this study consisted in determining the sensitivity, specificity and accurateness of the BRAHMS PCT®-Q, as a test to determine the levels of blood procalcitonin in a semi-quantitative manner for the early diagnosis of sepsis and comparing it with the results of the blood culture and medical impression, which is the benchmark test for the diagnosis of bacterial sepsis. And based on this, to establish the usefulness, as well as the benefits, of a sepsis marker, such as the BRAHMS PCT®-Q, in our country. To do so, samples of 102 patients, who visited the Hospital de Clínicas Caracas, were used; their symptomatology indicated that it was advisable to conduct a blood culture and determine procalcitonin. Of these patients a sample was taken for the blood culture, and with the same puncture a blood sample was taken without anticoagulant. The blood culture was processed using the services of the Bacteriological Department of the Hospital de Clínicas Caracas, and the serum was used to determine procalcitonin. Once both results were in, they were cross-tabulated and compared. Based on the data that was obtained, it could be concluded that the sensitivity of BRAHMS PCT®-Q is greater than 80%, its specificity is 90% which represents an accurateness of 90%. It is therefore a test that can be used for the early diagnosis of sepsis, but it is even more recommended to rule out the same. It is extremely advantageous to use this test in our country, above all, in remote populations that do not possess the means for a better diagnosis, and where it is needful to obtain results in short periods of time.

Key words: Bacterial sepsis, procalcitonin, blood culture.

1. Laboratorio Hospital de Clínicas Caracas.

2. Laboratorio de Producción y Control de Calidad Corpodiaagnostica C.A.

3. Servicio de Emergencia Pediátrica del Hospital de Clínicas Caracas.

4. Instituto de Oncología y Hematología Universidad Central de Venezuela.

Introducción

La sepsis es una enfermedad severa que puede afectar a cualquier miembro de la población, causando graves consecuencias e incluso la muerte si no es tratada a tiempo.

La sepsis está presente en un alto porcentaje en la población mundial y es la causa de muerte #23 en nuestro país, por esta razón es de gran relevancia hacer un diagnóstico rápido y seguro de la enfermedad y así proporcionar tratamiento a la población afectada (1).

El método más común de diagnóstico actualmente es el hemocultivo. La principal desventaja de este método es que los resultados pueden tardar hasta una semana. Debido a lo imperativo de iniciar el tratamiento lo más pronto posible sería de gran beneficio contar con un método diagnóstico más rápido y específico.

La presencia de procalcitonina en sangre es indicativo de infección bacteriana en el torrente sanguíneo y la BRAHMS PCT®-Q permite detectar rápidamente (30 minutos) y de manera semicuantitativa, los niveles de procalcitonina en sangre, para así diagnosticar un cuadro de SIRS debido a sepsis (2).

Este trabajo pretende evaluar la efectividad y eficiencia de la prueba BRAHMS PCT®-Q para el diagnóstico de sepsis a través de la comparación de sus resultados con el hemocultivo y la impresión diagnóstica, este último considerado como el método actual de referencia.

Como una ventaja adicional, la prueba BRAHMS PCT®-Q dado su sencillez (ya que no requiere complejos y costosos equipos) en comparación con el hemocultivo, es que podría abaratar los costos de diagnóstico de sepsis. Aunque la prueba no es económica, es más accesible a la población donde la infraestructura hospitalaria es limitada, pudiéndose incluso realizar en poblaciones remotas del país, donde no cuentan con complejos equipos.

En esta investigación se trata de estimar con determinaciones de procalcitonina mediante el método de BRAHMS PCT®-Q, la sensibilidad y especificidad de esta prueba, comparándola con los resultados obtenidos en los hemocultivos procesados por el BacT/Alert Blood Culture System, que es un equipo de monitoreo continuo creado en Estados Unidos por Industrias BioMérieux y la impresión diagnóstica de los médicos de la institución.

Debido a que la sepsis es una enfermedad que puede afectar a cualquier miembro de la población de nuestro país, sin importar sexo, edad o nivel socioeconómico y considerando que es una enfermedad de difícil y lento diagnóstico a partir de

hemocultivos únicamente y una gran proporción de ellos muestran resultados negativos, es importante poder acceder a otros medios que nos ayuden a diagnosticar, tratar y hacer seguimiento de esta enfermedad. Por esta razón es válido evaluar nuevas pruebas como el BRAHMS PCT®-Q para el diagnóstico de sepsis de forma más rápida y con un alto nivel de especificidad y sensibilidad para poder implementar tratamiento de inmediato ante la ocurrencia de dicha patología.

Basados en estos hallazgos nos propusimos:

1. Determinar la sensibilidad y especificidad de BRAHMS PCT®-Q, comparándolo con los resultados obtenidos en los hemocultivos y la impresión diagnóstica de los médicos tratantes.
2. Correlacionar la edad y sexo de los pacientes con los resultados de BRAHMS PCT®-Q y el hemocultivo para conocer la prevalencia de sepsis en la comunidad que asiste al Hospital de Clínicas Caracas.

La sepsis, también conocida como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), es una enfermedad severa causada por la infección del sistema sanguíneo por algún microorganismo, a saber: parásitos, virus, hongos o bacterias (3). La sepsis pudiese ser de carácter reversible, si se diagnostica tempranamente, pero de no ser así se puede llegar a un shock séptico, el cual se caracteriza por el daño y disfunción de algunos órganos vitales y conduce a la muerte del individuo (3).

En el presente trabajo se enfoca la sepsis que es causada por agentes etiológicos bacterianos exclusivamente, introduciendo este término como definición operativa para el presente estudio, pudiéndose encontrar escrito “sepsis” o “sepsis bacteriana” indistintamente.

Causas de sepsis

Generalmente, la sepsis es causada por una infección bacteriana (principalmente por los clasificados como “Gram negativo”) originada en cualquier parte del cuerpo (infección primaria), donde el sistema inmune no pudo controlar la infección y evitar la diseminación. Los sitios más comunes de infección primaria son: riñón (infección del tracto urinario), hígado o vesícula biliar, apéndice (peritonitis), piel (celulitis), pulmón (neumonía bacteriana), líquido cefalorraquídeo (meningitis), y otros.

En pacientes hospitalizados algunos sitios comunes de infección son: Vías intravenosas, heridas, drenajes quirúrgicos, y otros.

Población susceptible a sepsis

La población más susceptible a contraer sepsis son:
- Personas en edades extremas (muy joven o muy viejo) debido al pobre desarrollo ó envejecimiento, respectiva-



mente del sistema inmune.

- Pacientes con enfermedades inmunodeficientes.
- Pacientes hospitalizados y posquirúrgicos en unidad de cuidados intensivos.
- Personas con infecciones preexistentes a consecuencia de quemaduras o heridas de bala.
- Personas con tendencia genética a sepsis.

Incidencia de sepsis

La incidencia de la sepsis a nivel mundial es muy importante. Hasta 1999 se reportaron 1.500.000 casos al año en el mundo y se espera que el número aumente con el paso de los años (1).

Prevalencia en Venezuela

En los últimos datos epidemiológicos reportados en Venezuela en el anuario de epidemiología y estadística vital del año 1995. La sepsis es la causa número 23 de mortalidad a nivel nacional habiendo una mayor prevalencia en el estado Zulia (16.3%), siguiéndolo el Distrito Federal (15.6%) y Miranda (14.5%) (4). Por otro lado es la 8va causa de muerte infantil y la 11ava en menores de 28 días de nacido (4). La incidencia es mayor en el sexo masculino que en el femenino independientemente de la edad (4).

Por otro lado en Estados Unidos se registran más de 700.000 casos al año de sepsis severa. Aproximadamente dos tercios (2/3) de los casos de sepsis ocurren en pacientes hospitalizados (3).

A manera resumida, podemos esquematizar el proceso de sepsis de la siguiente manera:

- la infección,
- liberación de las endotoxinas y otros productos de origen bacteriano,
- liberación de los mediadores de la inflamación (ej. Citoquinas),
- sepsis con o sin fallas en múltiples órganos,
- síndrome séptico con o sin fallas en múltiples órganos,
- shock séptico con o sin fallas en múltiples órganos,
- recuperación o muerte.

Una vez conocida esta información en referencia a la sepsis, es importante conocer lo que es la Procalcitonina (PCT), su función y comportamiento en la presencia de sepsis (2).

Procalcitonina

La Procalcitonina es una proteína de 116 aminoácidos que comparte una secuencia idéntica de 32 aminoácidos con la calcitonina, la cual es una prohormona, y es su precursor (7-2).

En condiciones normales, la calcitonina que es hormonalmente activa es producida y secretada por las células C de la glándula tiroidea, después de la proteólisis intracelular de la procalcitonina a calcitonina, kalcina y un residuo N-terminal. Normalmente toda la procalcitonina es clivada y no es liberada a la sangre, por lo tanto los niveles de procalcitonina son indetectables (<0.1 ng/ml) en humanos normales. Sin embargo en presencia de infecciones severas con manifestaciones sistémicas, los niveles de procalcitonina pueden llegar a aumentar por encima de 100 ng/ml. En estos casos no se observa aumento en los niveles de calcitonina en plasma, ni actividad de la misma. A manera comparativa la vida media de la calcitonina es de 10 minutos y la de la procalcitonina es de 25 a 30 horas. La procalcitonina en el plasma es muy estable y no es degradada a calcitonina hormonalmente activa (2-7).

Concentraciones esperadas en suero

Niveles elevados de procalcitonina indican infección bacteriana acompañada por una respuesta inflamatoria sistémica. La producción de procalcitonina puede ser inducida por endotoxinas bacterianas, exotoxinas y citoquinas. En algunos pacientes con malaria e infecciones sistémicas de origen fúngico también se pueden presentar altos niveles de procalcitonina (2-7-9).

Procalcitonina en neonatos y prematuros

Es importante conocer además que los valores de procalcitonina normales esperados en neonatos y bebés prematuros, son totalmente diferentes al de los adultos. Fisiológicamente hay aumento de los niveles de procalcitonina en los primeros días de vida. Los rangos de valores para los primeros 2 días de vida cambian en horas y se usan los rangos de adulto después de 3 días de nacido (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de referencia de procalcitonina en neonatos y prematuros (25).

Edad en horas	PCT [ng/ml]
0-6	2
6-12	8
12-18	15
18-30	21
30-36	15
36-42	8
42-48	2

Variedad de autores han concluido que independientemente de estos valores, la sensibilidad y especificidad de procalcitonina en el diagnóstico de sepsis es del 100%, tomando en cuenta estos rangos de referencia para comparar (2).

Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

En neonatos que presentan una infección, se observa un aumento importante de la concentración de procalcitonina, sin importar si la enfermedad inicia en las primeras 48 horas de vida o después.

Materiales y métodos

Población en estudio

Se evaluaron un total de 102 muestras de sangre venosa de pacientes del Laboratorio del Hospital de Clínicas Caracas.

Recolección e identificación de muestras de sangre

La sangre de los pacientes sospechosos de presentar una sepsis, fue recolectada en tubos sin anticoagulante al momento de la toma de muestra para el hemocultivo. Estas fueron debidamente identificadas con nombre, edad, sexo del paciente y fecha de recolección.

Transporte y preservación de la muestra

Las muestras fueron centrifugadas y separadas en el laboratorio del Hospital de Clínicas Caracas. Los sueros identificados y refrigerados inmediatamente. Se recogieron los sueros y fueron transportadas al laboratorio de producción y control de calidad en una cava refrigerada (2-8 grados centígrados) y preservadas en un congelador a -20 grados centígrados hasta el momento de su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron descongeladas y procesadas por el método de BRAHMS PCT®. Esta es una prueba de tipo semicuantitativa que nos permite tener una concentración aproximada de procalcitonina, además se puede obtener estos valores a manera rápida ya que presenta solo 30 minutos de incubación. Otras ventajas que esta prueba presenta es que se puede realizar en cualquier lugar y a relativo bajo costo.

La lectura de la prueba es suficientemente precisa para el diagnóstico de sepsis aguda así como otros diagnósticos y propósitos terapéuticos (2).

Se puede distinguir entre un paciente normal y con valores elevados, con un rango límite de 0.5 ng/ml, así como entre ligera y marcadamente elevado (2 a 10 ng/ml).

El kit que es usado solo para pruebas *In vitro* contiene:

- 25 pruebas individuales
- 25 tarjetas de referencia
- 1 manual de instrucciones

Cada prueba individual presenta

- 1 prueba
- 1 pipeta plástica desechable
- 1 bolsa antihumedad

Este kit debe ser guardado en las bolsas individuales sin abrir entre 4 y 30 grados centígrados.

Técnica de medición (25)

BRAHMS PCT®-Q es una prueba de inmunocromatografía para la detección semicuantitativa de procalcitonina. No necesita calibración ni equipos complicados y se puede usar suero o plasma.

La prueba usa un anticuerpo monoclonal de ratón anti-calcitonina conjugado con oro coloidal (marcador) y un anticuerpo policlonal anti-calcitonina de oveja, siendo esta la fase sólida.

Se debe tomar la muestra del paciente y centrifugar, tomar con la pipeta plástica la muestra, ya sea suero o plasma y colocar 6 gotas, que es correspondiente a 300 µl aproximadamente, colocar en la cavidad redonda y dejarlo incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez colocada la muestra, ésta migra por el soporte inmunocromatográfico, el marcador se une a la procalcitonina presente en la muestra y marca el complejo antígeno-anticuerpo que se forma. Este complejo se moviliza por capilaridad a través del sistema y en el proceso pasa a través de la línea de prueba, donde el complejo marcado antígeno-anticuerpo se une a los anticuerpos de anti-procalcitonina y forma un complejo tipo sándwich, evidenciándose de manera macroscópica por una línea rosada, donde la intensidad de esta es directamente proporcional a la concentración de procalcitonina presente en la muestra y esta es relacionada a los rangos de la concentración, con ayuda de la tarjeta de referencia (2) (Figura 1).

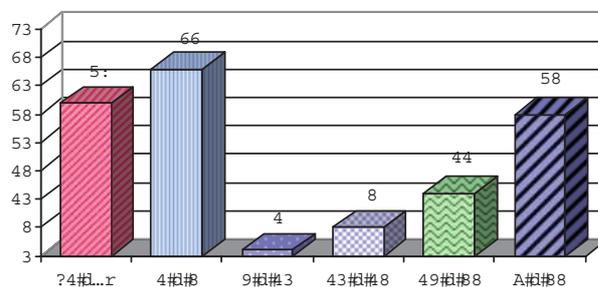


Figura 1. Distribución por edad de la muestra en estudio.



Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

Concentración mayor a 10 ng/ml, es muy probable que el paciente presenta una sepsis severa o shock séptico, así como alto riesgo de presentar disfunción de múltiples órganos.

Características del ensayo

Precisión. Debido a que es una prueba semicuantitativa es posible que los valores de procalcitonina son solo aproximados y no exactos como en la prueba LUMItest® PCT (método de referencia para medir PCT), ya que en la prueba rápida usamos una intensidad de color para obtener un rango de concentración (2).

Linealidad. Altas dosis de procalcitonina, hasta 4000 ng/ml no causan efecto en la correlación de los rangos de concentraciones (2).

Interferentes. Muestras severamente hemolizadas no deben usarse para la medición de procalcitonina por medio de la prueba rápida de BRAHMS PCT®-Q debido a que restringe la lectura.

Por otro lado los lípidos y la bilirrubina no interfieren en la prueba.

Lectura. La lectura de la prueba se debe hacer a los 30 minutos con un tiempo máximo de 45 minutos. Una vez pasado este tiempo la prueba no es válida para determinar el rango de concentración de procalcitonina en la muestra (2).

La validez de la prueba es sumamente importante, por esta razón presenta una línea de control que esta ubicada por encima y de manera paralela a la de la muestra. Cuando la banda de control (que no es más que procalcitonina en altas concentraciones) no aparece la prueba no es válida, se debe descartar y volver a realizarla. Si la banda de control aparece se puede proceder a realizar la lectura de la concentración según la intensidad de color de la línea. Si la línea de la muestra no aparece, entonces la muestra es negativa.

Muestra. La procalcitonina es una proteína muy estable, por lo tanto si la muestra ha sido colocada a temperatura ambiente es posible recuperar un 80% o más de la concentración inicial de procalcitonina en la muestra después de 24 horas. Si la muestra ha sido debidamente almacenada a 4 grados centígrados se recupera más del 90% (2).

Sensibilidad y especificidad. BRAHMS PCT®-Q presenta una sensibilidad entre 90 y 92% y la especificidad es de 92 a 98% en comparación con el LUMItest®.

Debido a la comparación que se va a realizar entre los resultados de BRAHMS PCT®-Q y el hemocultivo es importante

conocer como realizar el hemocultivo desde la toma de la muestra hasta el diagnóstico final, así como saber el funcionamiento de los equipos electrónicos para hemocultivos.

Toma de muestra

Debido a que la mortalidad debido a septicemia es de 40% es muy importante el tiempo correcto de la recolección de la bacteria en la sangre (bacteriemia) para el diagnóstico y pronóstico del paciente.

Toda precaución que minimice la posibilidad de contaminación de la muestra se debe hacer. Es recomendable que todo laboratorio microbiológico realice estadísticas de las muestras contaminadas. Menos del 3% de las muestras es aceptable que sean contaminadas. Bates estima que una muestra contaminada conlleva a un aumento del 20 al 39% en los costos de hospitalización de los pacientes debido a la prolongación de la estadía en el hospital para la antibiótico y en terapia intravenosa así como para realizar exámenes adicionales (10). También recomienda que se realicen cultivos en pares para así saber si la muestra es contaminada o no, ya que si el microorganismo se reproduce en una sola de las muestras entonces es un contaminante, sin embargo si es positivo para ambos cultivos con el mismo microorganismo, entonces es el causante de la enfermedad.

Para reducir la posibilidad de contaminación por microorganismos de la piel se recomienda que la venipuntura se realice de la siguiente manera:

- 1.- Limpiar la zona con agua y jabón
- 2.- Enjuagar con agua esterilizada
- 3.- Aplicar yodo y dejar secar por 1 a 2 minutos
- 4.- Retirar el yodo con alcohol al 70%

Los últimos 2 pasos son indispensables para asegurar la correcta toma de la muestra, por lo tanto es recomendable palpar la vena antes de aplicar el yodo (6-11).

Si el yodo a usarse es yodo povidínico el último paso se puede omitir, sin embargo hay que estar seguro que la solución esta totalmente seca antes de realizar la extracción.

La mayoría de los investigadores concuerdan en que es recomendable obtener tres juegos de botellas para hemocultivo en un rango de 24 horas, pero hacer más de esto no aumenta la probabilidad de obtener cultivos positivos. En los casos comprobados que son positivos, el 80% son positivos para el primer set de muestras, 90% para el segundo y 99% para el tercero. Por lo tanto un mínimo de 2 botellas por set debe ser tomado por cada extracción. Schiffman y col. estima que 18000 episodios de bacteriemia son pasados por alto debido a no cumplir con estas pautas (12-13).

Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

La toma de la muestra se debe realizar, si es posible, antes de iniciar tratamiento con terapia de antimicrobiales sistémicos. Sin embargo el hecho que el paciente ya haya sido tratado no significa que no se le puede realizar la prueba, pero debe ser considerado este factor en la interpretación de resultados.

El mejor momento para tomar la muestra es media hora antes del pico febril, ya que en este momento es cuando hay mayor concentración bacteriana en circulación sanguínea. Pero en algunos casos no se sabe cuando va a ocurrir el pico febril por esta razón hay que tomar otras recomendaciones, a saber:

- En casos de fiebre aguda como meningitis o neumonía bacteriana, cuando la antibiótico terapia es necesaria que sea inmediata o en pacientes con enfermedades infecciosas que van a ser sometidos a cirugía, es recomendable tomar 2 muestras separadas inmediatamente, en brazos opuestos y al mismo tiempo.
- En casos de síndrome febril de origen desconocido, 2 hemocultivos pueden ser inicialmente tomados con un intervalo de 45 a 60 minutos entre uno y otro. La razón de este intervalo de tiempo es para determinar si la bacteriemia es intermitente o continua. Si dos botellas sucesivas con solo unos minutos de diferencia son positivas, significa que es el mismo episodio de bacteriemia y por lo tanto es menos significativo que dos o más botellas que hayan sido extraídas con una hora o más de diferencia, lo que significa una bacteriemia recurrente de un sitio de infección. Dos o más sets de botellas pueden ser extraídos 24 a 48 horas después, si es necesario.
- En endocarditis infecciosa aguda, 3 hemocultivos deben ser realizados durante la primera o segunda hora de evaluación y deben ser tomado por separado en 3 sitios diferentes, para así poder comenzar la terapia.

Existen dos tipos de botellas: aeróbicas que tiene 5 a 10% de CO₂ y anaeróbicas que favorecen el crecimiento de bacterias estrictamente anaerobias. Muchos autores recomiendan que el set de botellas sean 2 aeróbicas ya que este es más probable, y solo se recomienda intentar aislar anaerobios cuando es realmente sospechado por el médico (2).

El volumen de sangre a ser extraído en un adulto debe ser de 10 a 30 ml por cada venipuntura. Esto es muy importante ya que se ha demostrado que cuando el volumen tomado es menor de 10 ml la posibilidad de tener el cultivo positivo es mucho menor. En los infantes el volumen recomendado es de 1 a 5 ml. Lo más importante es saber que se debe agregar tanta sangre sea necesario en la botella para poder obtener una de 1:5 o 1:10 para así evitar el efecto de cualquier antibiótico.

El medio de cultivo que se usa en las botellas de hemocultivo, se puede usar para aislar cualquier microorganismo y es enri-

quecido con soya tripticasa, peptona, infusión cerebro-cora-zón, entre otros. Estos medios se pueden conseguir de manera comercial y según la marca puede variar el contenido de la botella y las proporciones (6-11).

BacT/Alert Blood Culture System

Hoy en día tenemos la posibilidad de examinar los hemocultivos de manera manual o automatizada. En este trabajo se va a comparar los resultados obtenidos de la prueba BRAHMS PCT®-Q (con muestras que han sido tomadas al mismo tiempo que el hemocultivo) con los hemocultivos que han sido analizados automáticamente con el sistema de BacT/Alert Blood Culture System Classic que usa actualmente en el Hospital de Clínicas Caracas. Los resultados de los hemocultivos fueron reportados por el servicio de Bacteriología del Hospital de Clínicas Caracas.

El BacT/Alert Blood Culture System es el primer sistema de monitoreo continuo de hemocultivos creado en Estados Unidos y ha sido muy utilizado desde entonces en innumerables laboratorios clínicos en todo el mundo (6).

Análisis estadísticos

Con estas variables se determinó la sensibilidad y especificidad del método, calculando los verdaderos positivos y verdaderos negativos utilizando como referencia la prueba de hemocultivo o la impresión diagnóstica.

Para evaluar la realización entre dos variables se utilizó el Chi cuadrado, todos estos valores fueron calculados para un intervalo de confianza de 95% de probabilidad.

Análisis de resultados

El Hospital de Clínicas Caracas obtuvo un total de 102 muestras a las que se le realizó hemocultivo y procalcitonina. Estos pacientes fueron procesados de la manera estandarizada y habiendo analizado un grupo control negativo para procalcitonina de 10 pacientes, cuya salud se encontraba en buen estado, se obtuvieron los siguientes resultados.

En esta tabla se puede observar los datos de cada uno de los pacientes, estos incluyen su edad (en años, meses (M) o días (D)), el sexo (masculino (M) o femenino (F)), resultados de los hemocultivos (positivo (1) o negativo (0)), valores de procalcitonina (positivo, es decir, concentraciones igual o mayor a 10 ng/ml (1) o negativo, cuando la concentración es menor a 10 ng/ml (0)) y la impresión diagnóstica (IDx) del médico (paciente con sepsis, que puede ser de cualquier origen (1) o paciente no séptico (0)).



Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

Tabla 2. Resultados de los pacientes analizados para el estudio estadístico.

Nº de Px.	Edad	Sexo	Hemocultivo	PCT	IDx	Nº de Px.	Edad	Sexo	Hemocultivo	PCT	IDx	
1	27D	M	0	0	0	55	68	F	0	0	0	
2	37D	M	0	0	0	56	70	F	0	0	0	
3	9M	M	0	0	0	57	70	F	0	0	0	
4	13M	M	0	0	0	58	4	M	0	0	0	
5	19M	F	0	0	0	59	64	M	0	0	0	
6	1	F	0	0	0	60	76	F	0	1	0	
7	3	F	0	0	0	61	2	M	1	0	1	
8	22M	F	0	0	0	62	3	M	0	0	0	
9	21M	F	0	0	0	63	28D	M	1	0	1	
10	89	F	1	1	1	64	65	F	0	1	0	
11	4	F	0	0	0	65	2	F	1	1	1	
12	11M	F	0	0	0	66	7M	F	0	0	0	
13	15M	M	0	1	0	67	61	F	0	0	0	
14	21	M	0	0	0	68	3	F	0	0	0	
15	7M	F	0	0	0	69	2	F	0	0	0	
16	10M	M	0	0	0	70	18M	M	0	0	0	
17	29	F	0	1	1	71	33	F	0	0	0	
18	2	M	0	0	0	72	33	M	0	0	0	
19	4	F	0	0	0	73	8M	F	0	0	0	
20	34	F	0	0	0	74	1	M	0	0	0	
21	33	M	1	1	1	75	57	F	1	1	1	
22	85	F	0	0	0	76	2	M	0	0	0	
23	34D	M	1	1	1	77	20D	M	0	0	0	
24	72	M	0	0	0	78	8	M	0	0	0	
25	5	F	0	0	0	79	7M	F	0	0	0	
26	22M	F	0	0	0	80	6M	M	0	0	0	
27	15M	M	0	0	0	81	59	F	0	0	0	
28	40	M	0	0	0	82	67	M	0	0	0	
29	66	M	0	0	0	83	15M	F	0	1	0	
30	5	F	0	0	0	84	13M	F	0	0	0	
31	8M	M	0	1	0	85	3D	M	0	0	0	
32	22	F	0	0	0	86	16D	M	0	0	0	
33	71	F	0	0	0	87	39D	M	0	0	0	
34	5	F	0	0	0	88	64	F	0	0	0	
35	15M	F	0	0	0	89	76	M	0	0	0	
36	85	M	1	1	1	90	13	F	1	1	1	
37	60	F	1	1	1	91	24	F	0	0	0	
38	88D	F	0	0	0	92	14	M	0	0	0	
39	5D	M	0	1	0	93	12	M	0	0	0	
40	1D	F	0	0	0	94	84	F	0	0	0	
41	2	F	0	0	0	95	75	F	0	0	0	
42	9M	F	0	0	0	96	75	M	0	0	0	
43	2	F	0	0	0	97	82	F	0	0	0	
44	40	F	0	0	0	98	11	M	0	0	0	
45	2	M	0	0	0	99	2	F	0	0	0	
46	7M	F	0	0	0	100	11	M	0	0	0	
47	2	F	0	0	0	101	2	F	0	0	0	
48	4M	F	0	0	0	102	19D	M	0	0	0	
49	73	F	0	0	0							
50	5D	M	0	0	0							
51	31	F	1	1	1							
52	2	M	0	0	0							
53	82	F	0	0	0							
54	1	F	0	0	0							
									Totales	11	16	12

A continuación se presentan unos gráficos para conocer la distribución de la muestra analizada (Figuras 2, 3 y 4).

Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

El primer análisis que se debe realizar es la comparación entre los datos usados como referencia para el diagnóstico de sepsis, estos son el hemocultivo y la impresión diagnóstica del médico tratante. Cabe destacar que la impresión diagnóstica cuando

se refiere a sepsis, incluye la sepsis de cualquier origen no sólo cuando es bacteriana (viral, micológico, parasitario, inflamatorio, etc.).

Tabla 3. Comparación de la prueba de hemocultivo y la impresión diagnóstica para el diagnóstico de sepsis.

Referencia:

Prueba:	IDx		Total
	+	-	
Hemocultivo	11	0	11
	1	90	91
Total	12	90	102

	Resultado	Límite Inferior	Límite Superior
Proporción de Verdaderos Positivos	10,80%	4,80%	16,80%
Proporción de Verdaderos Negativos	88,00%	82,00%	94,50%
Falsos Positivos	0,00%	0,00%	0,00%
Falsos Negativos	1,00%	0,00%	2,90%
Exactitud	99,00%	97,10%	100,00%
Sensibilidad	91,67%	76,00%	100,00%
Especificidad	100,00%	100,00%	100,00%
J Youden	0,92	0,76	1,07
Chi Cuadrado (Probabilidad)	0,00%		

Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

Aquí se puede observar que la exactitud, sensibilidad y especificidad entre ambos parámetros es alta, lo que significa que son similares entre ellas. De ésta manera se demuestra lo buena que es la técnica del hemocultivo para el diagnóstico de sepsis, aunque sea una prueba costosa y los resultados no sean de inmediato, sigue siendo una prueba indiscutible de referencia para el diagnóstico de sepsis causado por bacteriemia.

Por otro lado la impresión diagnóstica nos hace observar la alta calidad de los médicos tratantes de éstos casos y además es un método rápido para tratar de dar al paciente el tratamiento adecuado lo más rápido posible. También hay que saber que los síntomas de sepsis son similares al de otras patologías y

sólo el hemocultivo puede ayudar a hacer un diagnóstico seguro de la enfermedad. Además éstas dos variables pueden nos ser independientes una de la otra, ya que el médico pudo haber utilizado como factor de referencia el hemocultivo, pero éste tipo de información es difícil de obtener, ya que habría que entrevistar a cada uno de los médicos tratantes al momento que esto sucedió.

El siguiente análisis es para comparar la prueba en estudio de procalcitonina (BRAHMS PCT®-Q) y el hemocultivo, y encontrar la impresión diagnóstica. Es de esperar, como ya se explicó que el hemocultivo y la impresión diagnóstica son similares entre ellos entonces los valores estadísticos cuando éstos son comparados con la prueba BRAHMS PCT®-Q también lo sean.

Tabla 4. Comparación de la prueba BRAHMS PCT®-Q y el hemocultivo.

		Referencia: IDx		Total
		+	-	
Prueba: PCT	+	10	6	16
	-	2	84	86
Total		12	90	102

	Resultado	Límite Inferior	Límite Superior
Proporción de Verdaderos Positivos	9,80%	4,00%	15,60%
Proporción de Verdaderos Negativos	82,00%	75,00%	89,80%
Falsos Positivos	6,00%	1,30%	10,40%
Falsos Negativos	2,00%	0,00%	4,70%
Exactitud	92,00%	86,90%	97,40%
Sensibilidad	83,33%	62,20%	100,00%
Especificidad	93,33%	88,20%	98,50%
J Youden	0,77	0,55	0,98
Chi Cuadrado (Probabilidad)	0,00%		

Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

Tabla 5. Comparación de la prueba BRAHMS PCT®-Q y la impresión diagnóstica.

		Referencia:		
		Hemocultivo		
Prueba:		+	-	Tota
PCT	+	9	7	16
	-	2	84	86
Total		11	91	102

	Resultado	Límite Inferior	Límite Superior
Proporción de Verdaderos Positivos	8,80%	0,33%	14,30%
Proporción de Verdaderos Negativos	82,00%	75,00%	89,80%
Falsos Positivos	7,00%	2,00%	11,80%
Falsos Negativos	2,00%	0,00%	4,70%
Exactitud	91,00%	85,70%	96,70%
Sensibilidad	81,82%	59,00%	100,00%
Especificidad	92,31%	86,80%	97,80%
J Youden	0,74	0,51	0,98
Chi Cuadrado (Probabilidad)	0,00%		

Al comparar la prueba para determinar los valores de procalcitonina BRAHMS PCT®-Q contra el hemocultivo y la impresión diagnóstica, se puede observar que la sensibilidad de la prueba BRAHMS PCT®-Q es mayor al 80% en ambas comparaciones. Lo que implica que el paciente que padece de la enfermedad tiene un 80% de probabilidades de ser diagnosticado como paciente con sepsis por los valores de procalcitonina medidos por la prueba BRAHMS PCT®-Q. En el caso de sepsis por ser una patología grave y que requiere tratamiento lo antes posible se busca que los valores de sensibilidad sean los más altos posibles, ya que es preferible dar tratamiento a pacientes que tal vez no lo requieran que dejar de dárselo a los que lo necesitan de manera urgente. Además se puede realizar otras mediciones de procalcitonina a las 24 horas después de haber

colocado el tratamiento, de ésta manera nos puede ayudar al monitoreo del paciente y es recomendable utilizar otros indicadores para el diagnóstico definitivo. De todas maneras el tratamiento no es tan costoso por lo tanto es mejor prevenir en los casos en los que hay altas sospechas de sepsis.

Con respecto a la especificidad se puede observar que es mayor al 92%, éste es un número muy favorable ya que nos indica que la prueba BRAHMS PCT®-Q es una herramienta de gran utilidad para hacer descarte de sepsis en los pacientes cuyos síntomas sean similares a los de ésta enfermedad. Ya que la patología es severa es bueno que en 30 minutos el médico pueda saber con 92% de seguridad que no se trata de sepsis y así comenzar a pensar en otras opciones.

Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

La exactitud en ambas comparaciones es mayor a 91%, lo que indica que esa es la probabilidad de que el resultado obtenido sea el verdadero. Este porcentaje es elevado, por lo tanto es indicador de que la prueba es confiable.

La J de Youden indica la poca probabilidad de error que pueda presentar una prueba para realizar diagnóstico, y mientras más cercano a la unidad, mejor es la prueba. En el caso de BRAHMS PCT®-Q éste valor fue de 0.74 y 0.77. Estos valores aunque son bastante elevados, se podrían maximizar, para así recomendar la prueba como una excelente vía para hacer diagnóstico rápido de sepsis.

En la prueba de chi cuadrado, se demuestra que las probabilidades de azar son del 0.0%. Por lo tanto da seguridad de que los valores obtenidos, aunque pueden tener algún error, no son producto del azar, demostrando entonces, la validez de los mismos.

Se puede observar que los intervalos de confianza en los valores calculados son sumamente amplios. Esto preocupa debido a que las conclusiones expresadas en éste trabajo pudieran ser distintas, aún dentro de los intervalos de confianza. Para poder reducir los intervalos de confianza es recomendable utilizar un mayor número de muestras, que en caso del presente trabajo no pudo obtenerse por las limitaciones del mismo.

Conclusiones

Se pudo determinar que la prueba de BRAHMS PCT®-Q, una vez correlacionada con el hemocultivo y la impresión diagnóstica, presenta una exactitud muy alta (mayor al 90%), una sensibilidad aceptable de 80% y una especificidad de 90%, lo que indica que es una prueba buena, donde el factor del azar no está presente, pero es mucho mejor y más recomendada para el descarte de sepsis, que para el diagnóstico de ella.

El tiempo para poder hacer un diagnóstico de sepsis a través de BRAHMS PCT®-Q, tomando en cuenta su sensibilidad, es muy favorable, ya que con una sencilla muestra de sangre y en tan sólo treinta minutos se puede obtener resultados con una exactitud mayor al 90%. En cambio si usamos únicamente el hemocultivo, aunque sea la prueba de referencia hay que esperar entre veinticuatro horas y hasta siete días para poder conocer el diagnóstico del paciente. Por otro lado utilizando la impresión diagnóstica como única fuente se pueden cometer errores, debido a que la sintomatología es similar a la de otras patologías, pudiéndose pasar por alto la sepsis.

Ya que en nuestro país hay población en lugares remotos, donde incluso puede faltar la electricidad y otros medios necesarios para el diagnóstico de sepsis, entonces es muy recomendable utilizar la prueba de BRAHMS PCT®-Q, ya que con una

simple muestra de sangre que puede ser plasma o suero, se puede hacer un diagnóstico de sepsis y ofrecer tratamiento al paciente de inmediato de ser esto necesario o descartar con mayor seguridad la enfermedad.

Se determinó que los pacientes diagnosticados de sepsis por hemocultivo fueron negativos un 89% y positivos un 11%, de los cuales el 55% fue de sexo femenino y 45% masculino. La edad predominante en estos casos fueron los pacientes mayores a 55 años.

En los pacientes diagnosticados por los valores de procalcitonina, el 84% fue negativo y 16% positivo, de los cuales 62% fue de sexo femenino y 38% masculino. La edad predominante en estos casos fueron los pacientes mayores a 55 años.

Es importante destacar que en el presente trabajo no se incluyó ningún filtro para descartar las sepsis de Origen no bacteriano dentro de los diagnósticos realizados por el médico (impresión diagnóstica), y para los cuales la procalcitonina no presenta sensibilidad reconocida, por otro lado, aunque para los fines comparativos de este trabajo hemos tomado como métodos referenciales a la impresión diagnóstica médica y al hemocultivo, no utilizamos ningún criterio evaluador para depurar dichas metodologías de falsos positivos o negativos, por carecer del tiempo, logística y recursos necesarios para tal fin.

Como se expuso al inicio de este trabajo, el método de determinación de procalcitonina mayormente utilizado en las validaciones y estudios científicos ha sido el LUMitest® de BRAHMS, método que lógicamente es mucho más sensible que el BRAHMS PCT®-Q por ser realizado bajo la técnica de quimioluminiscencia, comparado con el BRAHMS PCT®-Q cuya técnica es inmunocromatográfica con lectura visual.

Sería interesante y hasta necesario implementar una depuración de los métodos de impresión diagnóstica y hemocultivo, realizados por el médico y el laboratorio respectivamente, que busque eliminar los falsos positivos y negativos que pudiesen existir dado el error humano e instrumental siempre existentes bajo cualquier punto de vista; Sin embargo se necesitarán estudios ulteriores para determinar si los resultados de sensibilidad y especificidad de la BRAHMS PCT®-Q podrían ser aún mejores de los encontrados, comparados con la “verdadera condición clínica del paciente” .

Los resultados de nuestro trabajo se constituyen hoy día, como los primeros que se realizan en Venezuela con la procalcitonina y su importancia como herramienta diagnóstica en la sepsis bacteriana, debido a que la prueba no lleva más de 1 año de introducida comercialmente en el país, por lo cual seguramente este trabajo formará parte, en futuro cercano del gran número



Estudio de la prueba BRAHMS PCT®-Q en el diagnóstico precoz de sepsis causada por bacteriemia

de publicaciones que actualmente existen acerca de la procalcitonina en otros países, y que certifican la valiosa utilidad que tiene este parámetro en el diagnóstico “rápido” de la sepsis.

Trabajos con técnicas más sensibles como la quimioluminiscencia y/o fluorimetría de resolución temporal, son requeridos para lograr una evaluación más completa y real de la sensibilidad, especificidad y exactitud de la procalcitonina como herramienta diagnóstica en la sepsis bacteriana.

También es conocido a nivel mundial, el uso de la procalcitonina como herramienta de monitoreo del tratamiento y mejoría del paciente con sepsis, lo cual es un uso muy apreciado por la disminución de costos hospitalarios que pudiese generar, sin embargo, debido a no disponer de mayor tiempo y acceso a la información, dicha característica no pudo ser evaluada en el presente trabajo, siendo necesario trabajos ulteriores venezolanos que soporten los hallazgos de otros trabajos en distintos países, y puedan sensibilizar a las autoridades sanitarias en la adopción de la procalcitonina como parámetro de medición en los centros de salud estatales, en aras de optimizar los costos y mejorar la disponibilidad de camas de terapia intensiva en los hospitales y otros centros de salud.

Referencias

1. Republica de Venezuela. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital Ano 1995. Octubre 1997. Agosto 2006. <http://www.msds.gov.ve/msds/direcciones_msds/Epidemiologia/Estadistica/Anuarios/Anuario95.pdf>
2. Meisner, Michael. Procalcitonin (PCT). Thieme Publishers. 2000.
3. Isselbacher, K.J., et al. Clinical Syndromes Community Acquired. Harrison's Principle of Internal Medicine. 13ava. Edición. Volumen 1. International Edition. 1994;83:511-5.
4. Cleveland Clinic. Sepsis. Agosto 2005. Cleveland Clinic. Agosto 2006.
5. <<http://www.clevelandclinic.org/health/health-info/docs/3800/3887.asp?index=12361>>
6. Gómez, José Luís. Sepsis: lo que usted debe saber. Society of Critical Care Medicine. Agosto 2006.
7. <http://www.sccm.org/patient_family_resources/support_brochures/documents/SepsisS.pdf>
8. Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., et al. Diagnostic Microbiology. Lippincott-Raven Publishers. 1997;3:157-8.
9. Hart, Jacqueline, M.D. Medical Encyclopedia. ADAM. Agosto 2006. Medline Plus. Septiembre 2006.
10. <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000666.htm#Definition>>
11. Organización Panamericana de la Salud. Venezuela. Organización Mundial de la Salud. Agosto 2006. <<http://www.paho.org/english/sha/venrstp.htm>>
12. Meisner, M., Tschaikowsky, K., Palmaers, T., Spiegel, K. Procalcitonin (PCT) and CRP: Comparison of plasma concentrations at different SOFA-scores during the course of sepsis and MODS. Shock (Abstract). 1997;8:47.
13. Bates, D.W., Goldman, L., Lee, T.H. Contaminant Blood Cultures and Resource Utilization: The true consequences of false-positive results. JAMA. 1991;265:365-9.
14. Levinson, Warren; Jawetz, Ernest. Medical Microbiology and Immunology. Laboratory Diagnosis. 7ma. Edición. Lange Medical Books/ McGraw Hill. 2002;9:53-8.
15. Bartlett, R.C., Ellner, P.D., Washington, J.A. II: Cumitech 1: Blood Cultures. Coordinating ed., JC Sherris. Washington DC. American Society for Microbiology. 1974.
16. Reller, R.B., Murray, P.R., MacLowry, J.D. Cumitech 1: Blood Cultures II. Washington DC. American Society for Microbiology. 1982
17. Sabat, R., Hoflich C., Docke W.D., Oppert, M., Kern, F., Windrich, B., Rosenberger, C., Kaden, J., Volk, H.D., Reinke, P. Massive elevation of procalcitonin plasma levels in the absence of infection in kidney transplant patients treated with pan-T-cell antibodies. Institute of Medical Immunology, Charite, Humboldt University Berlin, Germany. PubMed. 2001. Agosto 2006.
18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11497157&dopt=Abstract.

La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) coinfectados con sífilis

Delsa D. Delgado Chacón ¹, Anselmo Rosales ², Patricia Mantilla ¹, Ana Monzón de Orozco ¹

RESUMEN

La coinfección con sífilis en el paciente infectado con VIH-1 ha aumentado en los últimos años. La sífilis se ha asociado con activación inmunológica, pero el efecto de la misma sobre los parámetros inmunovirológicos en esta población aún son controversiales. El objetivo es evaluar el efecto de la sífilis en el conteo de células TCD4+ y la carga viral del paciente VIH+. Se realizó un estudio retrospectivo, multicéntrico, de casos y controles, extrayendo de las historias clínicas de los pacientes VIH+ que asistieron a control en los últimos 10 años, los reportes de conteo de células TCD4+ y carga viral, antes, durante y después del diagnóstico de sífilis para compararlos entre sí y con un grupo control. 48 pacientes VIH+ diagnosticados con sífilis conformaron el grupo de estudio y 56 sin sífilis, el grupo control. 14 (29%) pacientes con sífilis secundaria, 33 (69%) latente y 1 (2%) primaria. 38 (80%) recibían TARV en el momento de la sífilis. 24 (70%) elevaron sus valores de TCD4+ durante la enfermedad y 27 (59%) posterior a ella, con una media de elevación de 19,41 células x mm³ (p=0,43) y 23,74 células x mm³ (p=0,28) respectivamente. Las determinaciones de carga viral se elevaron durante la enfermedad en 8 (38%) pacientes con una media de elevación de 64688 copias ARN-VIH/ml (4,96 log₁₀) (p=0,03), y disminuyeron en 13 (45%) con una media de -1163 copias de ARN/ml (3,06 log₁₀) (p=0,99) posteriormente. La sífilis en el paciente VIH+ estuvo asociada a elevaciones significativas en la carga viral y a cambios no significativos en el conteo de células TCD4+ durante la enfermedad.

Palabras clave: VIH, sífilis, conteo de células TCD4+, carga viral VIH.

The viral load and TCD4+ cells in human immunodeficiency virus (HIV) infected patients coinfecting with syphilis

SUMMARY

Syphilis co-infection in HIV-1 patients has increased in recent years. Syphilis has been linked to immunoactivation, however, its effect on immunovirological parameters in this population is still controversial. Objective evaluate the effect of syphilis on the TCD4+ cell count and viral load of the HIV+ patient. A retrospective, multicenter case-control study was conducted by extracting the TCD4+ cell counts and viral load before, during, and after diagnosis of syphilis, from the clinical records of HIV+ patients who attended check-ups in the past 10 years, in order to compare them among themselves and against a control group. Seroprevalence of HIV/Syphilis co-infection was 18%. 48 HIV+ patients diagnosed with syphilis formed the study group, while 56, without syphilis, the control group. 14 (29%) had secondary, 33 (69%) latent and 1 (2%) primary syphilis. 38 (80%) received ART at the time of their syphilis. Of 24 (70%) the TCD4+ values increased during illness, and of 27 (59%) they increased subsequently, with a mean increase of 19.41 cell/mm³ (p=0.43) and 23.74 cell/mm³ (p=0.28) respectively. Measurements of the viral load increased in 8 (38%) patients during the disease with a mean increase of 64,688 HIV RNA copies/ml (4.96 log₁₀) (p=0.03); and in 13 they decreased subsequently (45%) with a mean of -1,163 RNA copies/ml (3.06 log₁₀) (p=0.99). Syphilis in the HIV+ patient was linked to significant increases in the viral load and to non-significant changes in the TCD4+ cell count during the disease.

Key words: HIV syphilis, TCD4+ cell count, HIV viral load.

1. Instituto de Oncología y Hematología. Universidad Central de Venezuela.

2. Centro de Inmunología. Instituto Venezolano del Seguro Social.

Introducción

En las últimas décadas se ha evidenciado un dramático incremento de la incidencia de casos diagnosticados de sífilis alrededor del mundo. Han ocurrido numerosos casos entre hombres homosexuales coinfectados con el virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). El porcentaje reportado de coinfección varía entre 20-70% en los Estados Unidos y 54% en el Reino Unido. La relación entre VIH y Sífilis es compleja, debido a que ambas infecciones son transmitidas sexualmente y las úlceras genitales presentes en la sífilis facilitan la transmisión del virus, por lo que no es inusual que ambas infecciones coexistan (1).

Es conocido ampliamente que estas úlceras genitales en la sífilis son cofactores importantes para la transmisión sexual de el VIH, para ello se han definido dos hallazgos que probablemente expliquen la tendencia de las mismas a aumentar la transmisión del virus:

- 1.- Ruptura de la barrera protectora epitelial que crea o bien, una puerta de entrada para el virus en una persona no infectada por el VIH o la exposición a fluidos corporales provenientes de la persona portadora del virus por parte de su pareja sexual no infectada
- 2.- Presencia de gran cantidad de macrófagos, linfocitos activados y quizás células dendríticas en las úlceras sifilíticas de una persona no infectada por el VIH que podría facilitar la adquisición del virus al tener contacto sexual con una pareja portadora debido a que ello provee un medio rico en células inmunológicas que expresan receptores para el virus; y por otro lado, la transmisión del virus desde una persona portadora y además coinfectada con sífilis hacia su pareja sexual sana, puede ser promovida por crear una concentración local elevada del virus producto de células mononucleares activadas infectadas presentes en las úlceras sifilíticas de la persona coinfectada hacia su pareja sexual (2).

En años recientes ha surgido controversia en el estudio de esta comorbilidad tan compleja, debido a que diversos autores en sus investigaciones han tratado de dilucidar hipótesis que sugieren el aumento de la infectividad del VIH durante la coinfección con Sífilis debido a su probable efecto en exacerbar el grado de inmunosupresión del paciente e incrementar la carga viral del VIH (3) encontrándose discordancia entre los resultados de dichas investigaciones, las cuales han generado polémica e interrogantes que aún no se han dilucidado completamente. A este respecto, algunas investigaciones han enfocado su evaluación en el estudio de la coinfección VIH-Sífilis particularmente el estado generalizado de sífilis secundaria, que al igual que muchas infecciones agudas en el paciente infectado por el VIH, puede disminuir los niveles de

células TCD4+ e incrementar el ARN Viral del VIH en plasma y semen (3).

Los mecanismos patogénicos moleculares que explican el rol del *Treponema pallidum* (agente bacteriano, causal de la Sífilis, perteneciente a la familia de las espiroquetas) (4), en facilitar este efecto aún no han sido dilucidados completamente; pero a pesar de ello, la sífilis en el paciente VIH+ se ha relacionado con un incremento en la activación inmunológica del huésped, afectando la producción de citoquinas, incluyendo TNF- α fomentando la transcripción de factores tales como el kappa-B (NF κ B), por lo que se impulsa la entrada al ciclo celular, y por ende se incrementa la replicación del VIH (5). Actualmente, existe suficiente evidencia derivada de modelos de experimentación tanto *in vivo* como *in vitro* que soportan la teoría que lipoproteínas de la espiroqueta son activadores potentes de linfocitos B, células endoteliales, monocitos y macrófagos. Conjuntamente, los monocitos y macrófagos estimulados secretan gran cantidad de citoquinas (TNF- α , IL-1b e IL6) las cuales pueden inducir la expresión genética del VIH (2). Así mismo estudios publicados evidenciaron que lipoproteínas del *T. pallidum* ó la activación inducida por sus lipopéptidos constituyentes sobre líneas celulares de monocitos afectaban la movilización del factor de transcripción NF κ B, esta información en conjunto con la reconocida importancia de este factor de transcripción en estimular la expresión genética del VIH conduce a la hipótesis de que el *T. pallidum* y/o sus lipoproteínas constitutivas pueden ser capaces de inducir la expresión genética del virus a través de mecanismos dependientes del NF κ B (2,6).

De igual manera, se han estudiado ciertos mecanismos relacionados con el tropismo del VIH durante la coinfección con sífilis que podrían explicar por qué personas con sífilis, además, son más susceptibles de adquirir la infección por VIH, en ello se han implicado entonces, ciertos mecanismos relacionados con la regulación promotora que favorece la expresión genética del correceptor CCR5 posiblemente inducido por lipoproteínas del *T. pallidum*, dicho correceptor va a facilitar la entrada del VIH a los monocitos y macrófagos; y desde allí dirigirse a las células TCD4+ con la consiguiente depleción de las mismas y por ende acelerar la progresión de la enfermedad. No obstante, la evidencia de estos efectos de la sífilis en el paciente infectado por el VIH han sido divergentes (7).

Referente a ello, Buchacz y colaboradores (5) reportan un estudio donde evaluaron 52 pacientes coinfectados con VIH y sífilis primaria o secundaria, de los cuales 58% estaban recibiendo Terapia Anti Retroviral (TARV) y compararon niveles de carga viral de VIH y conteo de células CD4+ durante la coinfección con sífilis antes y después del tratamiento. Ellos observaron incremento significativo de la

La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

carga Viral durante la infección con sífilis y disminución de los niveles de células CD4+ comparado con los encontrados previos a la enfermedad (5). En forma similar Palacios y colaboradores (8) publican su estudio donde evalúan 118 pacientes con VIH que fueron diagnosticados con sífilis temprana encontrando niveles de células T CD4+ más bajos durante y después del tratamiento de la sífilis y una carga viral VIH incrementada en un 27,6% de los casos durante la coinfección (8).

Por otra parte, Manfredi y colaboradores (9) publican un estudio, donde cuestionan el reporte publicado por Buchacz y colaboradores, alegando que éstos últimos evaluaron 52 pacientes, de los cuales sólo 38% recibían TARV, por lo que la gran mayoría restante no recibían tratamiento; por ello es posible inferir que este grupo puede haber sufrido un agravamiento de la enfermedad durante y después de la coinfección con sífilis. Ellos por su parte reportan entonces un estudio prospectivo de 38 pacientes infectados con VIH (36 con TARV) identificados como nuevos casos de sífilis, los cuales recibieron tratamiento adecuado y fueron seguidos por 18 meses; les fué realizado evaluación virológica con Carga Viral e inmunológica con conteo de células CD4+ y fué reportado no diferencia significativa en estos parámetros antes, durante y después del tratamiento (9). Igualmente, Sadiq y colaboradores (3) en un estudio retrospectivo de casos-controles evaluaron Carga Viral en muestras de sangre y semen, así como también niveles de células TCD4+ en 43 pacientes diagnosticados con sífilis temprana; antes, durante y después del diagnóstico y tratamiento de la sífilis; y los compararon con un grupo control de 104 pacientes VIH+ con enfermedad de transmisión sexual aguda no sistémica, detectando que no hubo asociación entre sífilis temprana y cambios en carga viral y niveles de células TCD4+ en sangre y semen (3).

El grado de inmunosupresión en el momento de la coinfección puede ser un factor importante en la presentación clínica y respuesta inmunológica de la enfermedad. El sistema inmunológico desempeña un papel importante en la protección contra la sífilis. La Deficiencia en la inmunidad tanto celular como humoral en la infección por el VIH puede limitar las defensas del huésped contra el *Treponema pallidum*, de tal modo que puede alterar las manifestaciones clínicas o el curso natural de la sífilis. En modelos animales, la deficiencia selectiva de la inmunidad celular acorta el periodo de incubación de la sífilis, aumenta el número y extensión de las lesiones, y retarda el tiempo de curación de las mismas (10) A pesar de ello, sólo pequeñas series y reporte de casos sugieren que la historia natural y manifestaciones clínicas, con progresión rápida de la enfermedad a sífilis secundaria es modificada por la infección concomitante con VIH y los datos que soportan estas hipótesis son limitados debido a la variabilidad de manifestaciones clínicas de la sífilis y la falta

de estudios amplios y recientes en estos pacientes (11). Paralelamente, estudios realizados en pacientes coinfectados han evidenciado un incremento del número de formas clínicas asintomáticas de la sífilis en el paciente con VIH (12).

Al mismo tiempo, el diagnóstico de sífilis puede ser más complicado en pacientes infectados por el VIH debido a los resultados serológicos falsos positivos y falsos negativos en las pruebas treponémicas y no treponémicas para la sífilis y a las presentaciones clínicas atípicas y más frecuentemente asintomáticas en presencia de la infección por el VIH. Pese a ello, las pruebas serológicas parecen ser exactas y confiables en el diagnóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento de la sífilis en muchos pacientes infectados con el VIH. El médico debe buscar evidencia confirmatoria del diagnóstico de alguna fuente disponible que incluya historia clínica del paciente, hallazgos físicos, examen directo de material de las lesiones en busca de las espiroquetas y pruebas serológicas para sífilis (10).

Las pruebas serológicas para sífilis son las pruebas claves en el diagnóstico de la infección no tratada. Independientemente del estadio clínico de la infección por el VIH (10). Las pruebas no treponémicas tales como el RPR (Rapid Plasma Reagin) y el VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), son utilizadas como pruebas de detección o "screening" y las pruebas treponémicas como la TP-PA (Treponema Pallidum Particle Agglutination) y la FTA-Abs (fluorescent treponemal antibody absorbent) son utilizadas para confirmar el diagnóstico y detectan anticuerpos específicos treponémicos (13).

Es importante resaltar que en pacientes infectados con el VIH y sífilis se han reportado respuestas serológicas inusuales. Algunos reportes demuestran títulos de pruebas serológicas más altos de lo esperado, pero por otro lado, resultados falsos negativos y retardo en aparición de seroreactividad también han sido obtenidos, aunque raramente (10). En 1987 Rompalo y colaboradores (8) observaron que los promedios de títulos de pruebas serológicas para sífilis fueron más altas en pacientes coinfectados con VIH quizás reflejando activación policlonal no específica de producción de anticuerpos por este retrovirus humano. Igualmente la incidencia de falsos positivos biológicos en pruebas serológicas no treponémicas de pacientes infectados con VIH se han reportado en un 3,8% de los casos, comparado con <1% en la población general. Dos mecanismos potenciales han sido sugeridos que expliquen este incremento: el estado hipergammaglobulinémico que ocurre en infección temprana con VIH ó la presencia de anticuerpos anticardiolipina asociados con infección con VIH (14). Es así como una prueba RPR o VDRL positiva puede ser FPB si el confirmatorio es negativo y no representa una sífilis activa. Del mismo modo, existe un estado denominado por algunos

La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

autores como “*serofast*” el cual no resulta tan infrecuente entre personas infectadas con el VIH (menos del 5%) (15) y se refiere a la persistencia de pruebas para sífilis no treponémicas usualmente de 1:16 ó menos con una variación no menor de 1 a 2 diluciones en el tiempo, a pesar de terapia adecuada y sin evidencia de reexposición (10,16). No obstante, la reinfección puede ser difícil de excluir en algunos pacientes y además la reactivación o recaída de una infección previamente tratada en un paciente con elevación repentina de los títulos de las pruebas serológicas puede considerarse posible en una persona con el VIH (10).

De la misma forma, una prueba de RPR o VDRL negativa en un paciente infectado con el VIH no debe descartar la sífilis si el paciente es clínicamente probable y epidemiológicamente susceptible. Aunque la sensibilidad de estas pruebas serológicas en el diagnóstico de sífilis secundaria es generalmente alta, se han descrito reportes de casos de sífilis secundaria seronegativa en pacientes infectados con el VIH sugiriendo que algunos pacientes fallan en el desarrollo de anticuerpos en respuesta al *T. pallidum* (10) o adicionalmente, que un fenómeno de prozona, principalmente en la sífilis secundaria donde la gran cantidad de antígenos treponémicos no permiten detectar la formación de los complejos antígeno-anticuerpo (16). Así mismo, la prueba de FTA-Abs, puede ser negativa debido a la inmunosupresión; reportándose en un 10% de los casos no reactividad (17). Por ello deberían ser hechas las pruebas en campo oscuro de muestras apropiadas en un paciente el cual se sospeche sífilis, aún teniendo pruebas serológicas negativas.

Aún así, hasta que no hayan más datos disponibles, los clínicos deben considerar la sensibilidad de las pruebas treponémicas como altamente sensibles en pacientes infectados con el VIH sin antecedente de infección previa ni tratamiento administrado. El clínico debería utilizar las pruebas treponémicas con el fin de descartar la sífilis en todos los pacientes infectados con el VIH en forma rutinaria, periódicamente y en general, cada 6 meses; con el precepto además que los reportes de las pruebas no treponémicas deberían ser cuantitativos con el fin de describir la dilución más baja (título) en la cual el resultado fue reactivo, y así por consiguiente, dicha titulación puede ser utilizada en el diagnóstico y en el seguimiento de la respuesta al tratamiento (10).

Justificación del estudio

Con el actual resurgimiento de la sífilis a nivel mundial en esta última década y a partir del año 2000, observándose un alto porcentaje de pacientes coinfectados con el VIH, las investigaciones se han orientado hacia afrontar el desafío que implica el más adecuado conocimiento del manejo de esta compleja comorbilidad. En Venezuela existen pocos datos publicados acerca de la prevalencia de este fenómeno y las

escasas investigaciones se fundamentan en series pequeñas de pacientes.

De igual manera, los estudios realizados y publicados acerca de los efectos de la Sífilis sobre el conteo de células TCD4+ y la carga Viral del paciente coinfectado con VIH resultan controversiales y actualmente no hay disponibles estudios nacionales que se comparen a los descritos en la literatura mundial.

El conocimiento de los diferentes patrones de respuesta serológica y las variaciones en los parámetros inmunológicos y virológicos del paciente coinfectado con VIH y sífilis, los cuales son utilizados en el control y seguimiento de los pacientes VIH+ y de aquellos pacientes que reciben TARV, constituyen un fundamento imprescindible en el manejo clínico de estos pacientes coinfectados. Gracias a ello, el clínico puede contar con una herramienta basada en la evidencia que le permita discernir si ciertas variaciones en los parámetros utilizados en el control de los pacientes revelan una tasa incrementada de falla a tratamiento entre pacientes coinfectados, o bien, podría además ser el resultado de diferencias en la respuesta inmunológica que no estarían relacionadas con respuesta al tratamiento.

Debido a esto y por lo previamente expuesto, se ha decidido la investigación de la comorbilidad de estas dos patologías y la repercusión de la sífilis sobre los parámetros inmunológicos y virológicos utilizados en el control y seguimiento de los pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Humana; y de igual forma comparar los resultados obtenidos con los descritos en la literatura mundial.

Objetivos:

Evaluar el efecto de la infección por sífilis en el conteo de Células TCD4+ y Carga Viral del paciente con infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana.

Determinar prevalencia de comorbilidad VIH y Sífilis.

Correlacionar parámetros inmunológicos a través de medición de conteo de células TCD4+ previo, durante y posterior al diagnóstico y tratamiento de la sífilis; y compararlos con un grupo control.

Correlacionar parámetros de laboratorio virológicos a través de medición de carga Viral del VIH previo, durante y posterior al diagnóstico y tratamiento de la Sífilis, y compararlos con un grupo control.

Correlacionar el estado de inmunosupresión por medio del conteo de células TCD4+ de los pacientes infectados con el

La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

VIH en el momento del diagnóstico de la sífilis y las pruebas serológicas reactivas (diluciones de VDRL).

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo, multicéntrico, de casos y controles.

Población y muestra

Se revisaron 2379 historias clínicas de los pacientes con infección por el VIH que acudieron a la consulta de Inmunología del Instituto de Oncología y Hematología (IOH) de la Universidad Central de Venezuela (UCV) y del Centro de Inmunología del IVSS San Bernardino en los últimos 10 años.

Grupo de pacientes de estudio

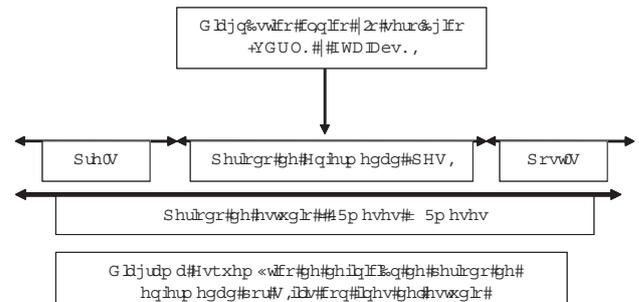
En este grupo fueron incluidos 48 pacientes VIH positivo, a quienes les fue diagnosticado sífilis según consta en los registros médicos. El diagnóstico de la Sífilis se basó en resultados positivos de pruebas serológicas que incluían tanto pruebas no treponémicas (VDRL) como pruebas treponémicas específicas (FTA.Abs). Para su clasificación clínica se usaron las definiciones diagnósticas según los criterios estándar de sífilis primaria y secundaria, así como latente temprana y tardía: aquellos asintomáticos con pruebas serológicas positivas, precedido de un periodo de tiempo <2 años y >2 años respectivamente, en el cual las pruebas diagnósticas para sífilis (VDRL) son reportadas como no reactivas (4).

Para cada paciente del grupo estudio se definió un periodo de tiempo llamado “periodo de enfermedad por sífilis” (PES) en el momento del diagnóstico clínico y/o serológico; así como también uno inmediatamente previo y posterior al periodo de enfermedad (pre-S y post-S). El PES fue determinado con el fin de reflejar un periodo de tiempo lo suficientemente amplio para incluir los resultados de las determinaciones de Carga Viral y conteo de células TCD4+, pero lo suficientemente estrecho como para incluir sólo el tiempo en el cual la replicación del VIH pueda ser afectada por la sífilis.

El PES incluyó así como lo describe Sadiq y col (3) en su reporte: el tiempo estimado en que fue incubada la sífilis (primaria: 30 días, Secundaria: 90 días y latente:120 días), el período desde el desarrollo de los síntomas a su diagnóstico en la consulta, el tiempo desde el diagnóstico al cumplimiento del tratamiento de la sífilis y un intervalo de dos meses después del tratamiento. Este último espacio de tiempo es elegido debido a que se ha evidenciado que posterior al tratamiento

de infecciones agudas sistémicas en pacientes con el VIH-1 (tales como Neumonía Bacteriana o Malaria), la Carga Viral persiste elevada por 1 mes regresando a su nivel basal a los 3 meses (18) (Anexo1).

Anexo 1



Criterios de inclusión

- Pacientes con infección por el VIH mayores de 18 años de edad.
- Pacientes infectados con el VIH con clínica y pruebas serológicas diagnósticas positivas para sífilis (VDRL Reactivo y FTA.Abs positivo).
- Paciente con VIH y sífilis, esté o no recibiendo Terapia Antirretroviral (TARV).
- Paciente infectado con VIH y sífilis con asistencia regular al control por la consulta, con mediciones de Carga Viral y Contaje de células TCD4+ cercano al momento del diagnóstico (no mayor de 30 días) y al menos una medición adicional antes y/o después del diagnóstico de sífilis en los periodos de tiempo establecidos en este estudio.

Criterios de exclusión

- Pacientes Infectados con el VIH con pruebas de VDRL no reactivas; o reactivas pero con ausencia o negatividad de prueba FTA.Abs
- Pacientes coinfectados con VIH y sífilis con enfermedad aguda concomitante, inmunizaciones reportadas en la historia clínica y cambios o inicio de TARV dentro del período de estudio.
- Pacientes coinfectados con VIH y sífilis, con menos de dos determinaciones de Carga Viral y conteo de células T CD4+ durante el período de estudio establecidos.

Grupo control

En este grupo se seleccionaron 56 pacientes controles con infección por el VIH, que reportaron pruebas de VDRL no reactivas, sin enfermedad concomitante asociada ó no al VIH y con mínimo 2 determinaciones de Carga Viral y Contaje de



La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

células T CD4⁺ en un período de tiempo similar al grupo estudio (12meses±2meses). Los pacientes del grupo control presentaron características semejantes al grupo estudio en cuanto a clasificación clínica de la infección por el VIH, cantidad de pacientes recibiendo TARV, tiempo de tratamiento y tiempo de diagnóstico de la infección con el VIH.

Mediciones de carga viral y subpoblaciones linfocitarias

Los datos correspondientes a las determinaciones de Carga Viral (copias ARN VIH/ml y log₁₀) de los grupos de estudio y control, fueron extraídos de la historia clínica a partir de los reportes del laboratorio del Departamento de Virología del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR).

En forma similar, el inmunofenotipaje con conteo de células TCD4⁺ fue extraído de los reportes de los laboratorios del INHRR y del IOH de la UCV.

Para fines de facilitar su análisis estadístico, las mediciones de carga viral de los pacientes de estudio y controles reportadas como indetectables, es decir, por debajo de 400 y 50 copias de ARN VIH/ml (<400 y <50) fueron asignadas por sus valores absolutos como 400 y 50 copias respectivamente; igualmente, aquellas reportadas como mayores de 500.000 o mayores de 750.000 copias de ARN VIH/ml (>500.000 y >750.000) se asignaron en sus valores absolutos como 500.000 y 750.000 copias de ARN VIH/ml respectivamente.

Análisis estadístico

Se estudiaron cada una de las variables, en cada uno de los grupos de pacientes y controles; estimando las tendencias centrales: Medianas y Medias Aritméticas con sus respectivas medidas de dispersión.

Se calculó la prevalencia en porcentaje de casos reportados en las historias revisadas.

En vista de apreciarse que las Medias Aritméticas de las determinaciones de Carga Viral y conteo de células T CD4⁺ no tenían una distribución normal, se decidió utilizar pruebas no paramétricas como la prueba de U-Mann Whitney con el fin de comparar las distintas variables entre e intra grupos de estudio y controles; y así determinar la significancia estadística entre ellas; para ello se tomó como valor de referencia una $p < 0,05$.

Se evaluaron por separado para cada grupo de pacientes en estudio y controles (intragrupa), las variaciones entre las determinaciones de Carga Viral y conteo de células TCD4⁺ en cada periodo de enfermedad en los pacientes de estudio; y entre cada valor obtenido durante el tiempo de estudio en los controles. Dichos cambios se calcularon en sus valores absolutos y a estos le fueron calculados las medias aritméticas, modas y

medianas con el fin de realizar el análisis estadístico. Para la discusión de los resultados, en el caso de la carga Viral, estos valores fueron posteriormente convertidos en función logarítmica de base 10 (log₁₀). Estas medias de cambios en los valores obtenidos fueron posteriormente comparados entre ambos grupos de estudio y controles (intergrupos). Para ello se utilizaron las pruebas de *t* de student y no paramétricas de U-Mann Whitney, determinando significancia estadística con una $p < 0,05$.

Se realizaron pruebas Fisher para confirmar significancia estadística entre las frecuencias de ascensos y descensos observadas en cada grupo.

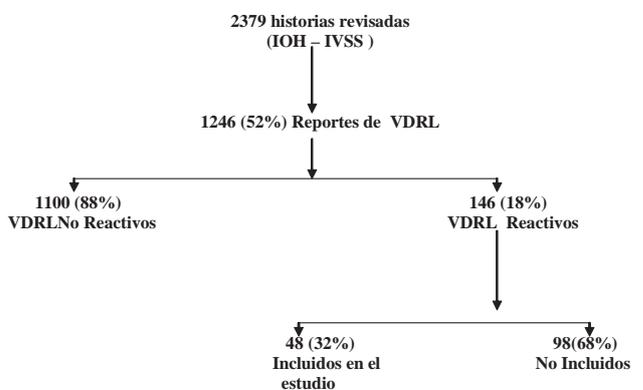
Con el fin de determinar Correlación estadística entre las variables se utilizó la prueba de Correlación de Pearson, con una significancia determinada por una $p < 0,05$.

Resultados

De un total de 2379 historias revisadas, 1246 (52%) tenían reportes de VDRL; 1100 (88%) fueron reportados como no reactivos y 146 (18%) como reactivos. De estos reportes reactivos, por falta de continuidad de asistencia al control regular del paciente; por ausencia de pruebas confirmatorias (FTA-ABs) y de determinaciones necesarias en el período de tiempo estipulado para el estudio, sólo 48 pacientes (32%) con sífilis cumplieron los criterios de inclusión previamente establecidos en el grupo de estudio (Figura 1).

De los 48 pacientes con sífilis que conformaron el grupo de estudio, 1 (2%) fué catalogado como sífilis primaria, 14 (29%) como sífilis secundaria y 33 (69%) como sífilis latente tardía. Otros casos de sífilis no fueron reportados (Tabla 1). En los pacientes en estudio 44 (92%) pacientes recibieron tratamiento con dosis estándar de Penicilina Benzatínica y 4 (8%) de ellos recibieron Ceftriaxone por alergia referida a la Penicilina.

Figura 1. Proceso de selección de la muestra en el grupo de pacientes de estudio.



La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

Tabla 1: Distribución en frecuencias y porcentajes según clasificación clínica de la sífilis en el grupo de estudio.

	N°	%
Primaria	1	2
Secundaria	14	29
Latente Tardía	33	69

Desde el punto de vista de características de la población: en el grupo de los pacientes de estudio los pacientes se encontraron en un rango de edad entre 22 y 64 años en el momento de

diagnóstico de la sífilis (promedio: 39 años) y en el grupo control el rango fue entre 23 y 66 años (promedio 41 años) para el momento que fueron realizadas las determinaciones de Carga Viral y conteo de células TCD4+. En los pacientes con sífilis 44 (92%) eran del sexo masculino y 4 (8%) del sexo femenino, en los pacientes controles 47 (84%) eran del sexo masculino y 9(16%) del sexo femenino. En el grupo de casos 35(73%) eran homosexuales, 10(21%) eran heterosexuales y 3 (6%) bisexuales. En el grupo control 25 (45%) eran homosexuales, 20 (36%) heterosexuales y 11 (19%) bisexuales (Tabla 2).

Tabla 2. Características generales de cada grupo.

CARACTERISTICAS	CONTROLES	CASOS
Número de pacientes (n)	56	48
Edad X (rango)	41 (23-66años)	39 (22-64años)
	n (%)	n (%)
SEXO	47 (84%)	
Masculino	9 (16%)	44 (92%)
Femenino		4 (8%)
CONDUCTA SEXUAL	25 (45%)	35 (73%)
Homosexuales	20 (36%)	10 (21%)
Heterosexuales	11 (19%)	3 (6%)
Bisexuales		
CLASIFICACION CLINICA VIH	14 (25%)	10 (20%)
CASOS SIDA	42 (75%)	38 (79%)
CASOS NO SIDA		
TIEMPO DX VIH	32 (57%)	27 (56%)
0-5años	19 (34%)	16 (33%)
6-10años	5 (9%)	5 (10%)
>10años		
TRATAMIENTO ARV	8 (15%)	10 (20%)
Sin tratamiento	48 (85%)	38 (80%)
Con tratamiento	12 (26%)	12 (23%)
NRTIs+NNRTIs	34 (71%)	23 (46%)
NRTIs+IPs	0 (0%)	2 (4%)
NRTIs	2 (4%)	1 (2%)
NNRTIs+IPs		
TIEMPO DE TTO ARV	30 (62%)	23 (60%)
1-3años	13 (28%)	13 (34%)
4-7años	5 (10%)	2 (6%)
>8AÑOS		

X: media, NRTIs: Inhibidores de la transcriptasa reversa nucleósidos, NNRTIs: Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos
IPs: Inhibidores de la proteasa.

En cuanto a clasificación clínica del VIH, tiempo de diagnóstico y tiempo recibiendo terapia ARV las características fueron similares en ambos grupos (Tabla 2).

Al realizar la comparación de los valores de células T CD4+ y carga viral entre los grupos de estudio y controles, en cada periodo de estudio (comparación de medias intergrupo), se

encontraron que las medias de valores de células TCD4+ y Carga Viral en el periodo previo a la enfermedad (pre-S) en los casos de sífilis no tuvieron diferencias estadísticas significativas con respecto al grupo control. Igualmente, los valores de conteo de células TCD4+ en los periodos PES y post-S en los pacientes con sífilis fueron similares estadísticamente a los controles. Por el contrario, al establecer



La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

la comparación entre las determinaciones de las cargas virales durante la sífilis (PES) y posterior a la misma (post-S) con el

grupo control, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,02$ y $p=0,0001$) (Tabla 3).

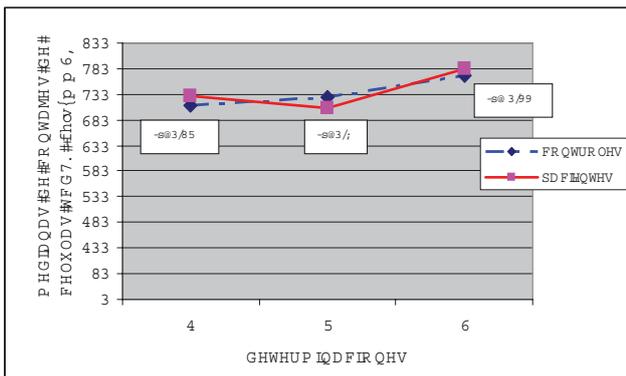
Tabla 3. Contaje de células TCD4+ y Carga Viral en pacientes con el VIH y sífilis durante los distintos periodos de enfermedad, comparados con un grupo control (comparación intergrupo).

	Valores de p					
	*	**	*	**	*	**
PACIENTES	Pre-S y PES		PES y Post-S		Pre-S y Post-S	
Contaje de TCD4+	0,91	0,38	0,36	0,82	0,58	0,29
Carga Viral	0,21	0,61	0,25	0,09	0,79	0,05
CONTROLES	Det 1y2		Det 2y3		Det 1y3	
Contaje de TCD4+	0,79	0,38	0,98	0,82	0,37	0,29
Carga Viral	0,14	0,61	0,34	0,09	0,05	0,05

Det: Determinaciones 1,2,3 en grupo control, Pre-S:previo a sífilis, PES:durante la sífilis y Post-S:posterior a la sífilis.
 X ±SD: Media aritmética ± Desviación Standard; Md: Mediana.
 * significancia estadística $p<0,05$ (t student).
 ** significancia estadística $p<0,05$ (U-Mann Whitney).

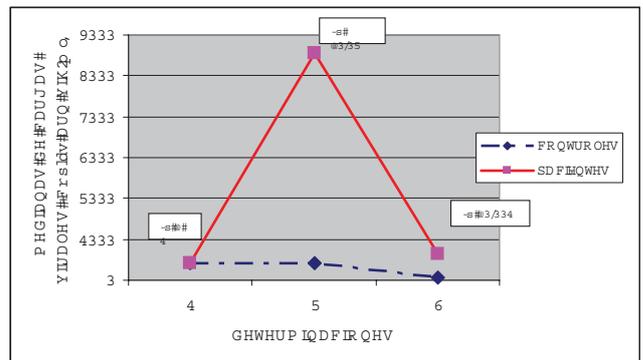
Al graficar los promedios de los valores obtenidos en cada determinación de contaje de células TCD4+ (Figura 2) y carga viral (Figura 3) de los pacientes y los controles, se obtienen curvas para cada grupo, que superpuestas, permiten apreciar tanto el comportamiento de las mismas durante el estudio, como la relación entre ambas. Las significancias estadísticas se expresan en las gráficas.

Figura 2. Contaje de células TCD4+ en pacientes y controles durante los distintos periodos de estudio.



Determinaciones: 1: Pre-S en pacientes y 1 en controles; 2: PES en pacientes y 2 en controles; 3: Post-S en pacientes y 3 en controles.
 Significancia estadística $*p<0,05$ (U-Mann-Whitney).

Figura 3. Carga Viral en pacientes de estudio y controles durante los distintos periodos de estudio.

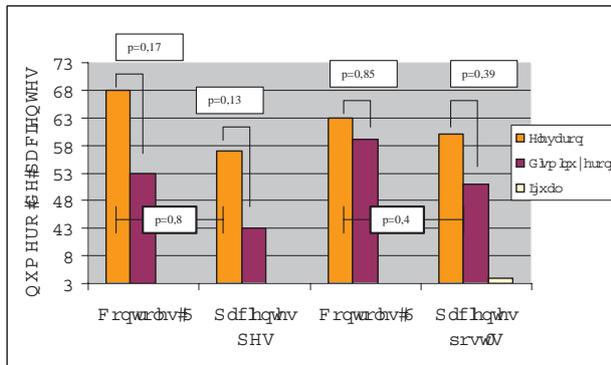


Determinaciones: 1: Pre-S en pacientes y 1 en controles; 2: PES en pacientes y 2 en controles; 3: Post-S en pacientes y 3 en controles.
 Significancia estadística $*p<0,05$ (U-Mann-Whitney).

En el grupo de casos con sífilis, en los pacientes que contaban con mediciones de células TCD4+ en los periodos pre-S y PES; 24 pacientes (70%) elevaron su contaje de células TCD4+ en el periodo PES; y 10 (30%) descendieron estos valores. Igualmente, en el periodo post-S en el grupo en estudio: 27 (59%) de los pacientes elevaron los valores de células TCD4+ para el periodo post-S; 18 (39%) disminuyeron y 1(2%) permaneció igual Al compararlos con el grupo control estas frecuencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 4). Se utilizaron para ello los valores de las frecuencias (n) ya que por ser el tamaño de la muestra en cada subgrupo muy pequeño, los porcentaje no resultan los más idóneos.

La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

Figura 4. Comportamiento de los pacientes de estudio y controles en cuanto a conteaje de células TCD4+ en PES y Post-S; y en 2 y 3 respectivamente.



Contaje de células TCD4+ en determinaciones 2 y 3 en controles; y PES: durante y post-S: posterior a la sífilis en grupo estudio. Nivel de significancia $p < 0,05$ (prueba de Fisher).

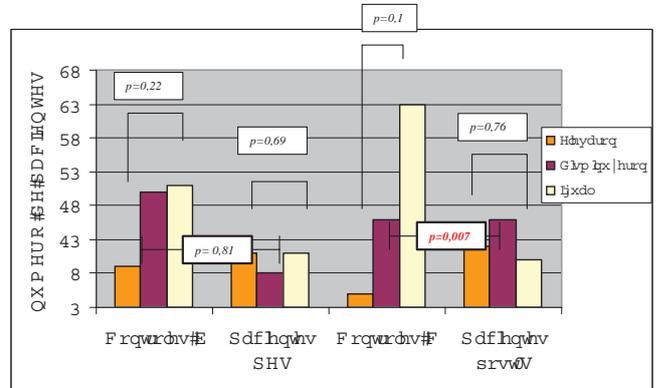
En cuanto a las mediciones de carga viral, en el grupo de estudio, para aquellos pacientes que disponían de las determinaciones en el periodo pre-S y PES: 8 (38%) elevaron sus cargas virales, 5 (24%) disminuyeron y 8 (31%) permanecieron igual. De igual forma, durante el período PES hasta el post-S: 13 pacientes (45%) disminuyeron su Carga Viral, 9 (31%) la elevaron y 7 (24%) permanecieron igual. Al realizar las pruebas de comparación de frecuencias entre ambos grupos, durante el periodo post-S, se aprecia que separando los pacientes que modificaron y los que permanecieron igual, la diferencia entre el grupo de estudio y control fue estadísticamente significativa ($p=0,007$). En cambio, cuando se compararon los que modificaron (ascensos y descensos) del grupo estudio con los pacientes que elevaron y disminuyeron sus valores en el grupo control, éstas no resultaron significativas ($p=0,14$) (Figura 5).

Tabla 4. Contaje de células TCD4+ y carga viral en las distintas determinaciones de los periodos de estudio para cada grupo (intragrupo).

	CONTROLES			PACIENTES			Valor de p	
	Det	X ±SD	Md	Det	X ±SD	Md	*	**
CONTAJE DE TCD4+	1	428 ± 282	379	Pre-S	480 ± 295	396,5	0,41	0,52
	2	473 ± 269	394	PES	470 ± 292	374,5	0,95	0,8
	3	474 ± 256	437	Post-S	510 ± 299	450,5	0,51	0,66
CARGA VIRAL	1	37226 ± 118027	400	Pre-S	32605 ± 96145	400	0,86	1
	2	11111 ± 41285	400	PES	72687 ± 145068	5550	0,006	0,002
	3	5015 ± 20054	71	Post-S	38940 ± 100627	634,5	0,02	0,0001

Det: Determinaciones Pre-S: previo., PES: durante y Post-S: posterior a la sífilis en el grupo estudio. 1, 2 y 3 en grupo control. * Nivel de significancia estadística $p < 0,05$ (t student). ** Nivel de significancia estadística $p < 0,05$ (U-Mann Whitney).

Figura 5. Comportamiento de los pacientes de estudio y controles en cuanto a carga viral en PES y Post-S y en determinaciones 2 y 3 respectivamente.



Carga Viral 2 y 3 en controles; y PES: durante y post-S: posterior a la sífilis en grupo estudio. Nivel de significancia $p < 0,05$ (prueba de Fisher).

De 12 pacientes con sífilis que comenzaron el estudio con cargas virales indetectables, 9 de ellos figuraron con reportes en los tres períodos y de éstos pacientes, 5 (56%) permanecieron indetectables durante todo el estudio, 2 (22%) elevaron su carga viral durante el PES para disminuirla luego en el post-S y 2 (22%) permanecieron igual durante el PES y elevaron su carga viral durante el post-S. Estas frecuencias no resultaron estadísticamente significativas.

Al ser analizadas las medias y medianas de las determinaciones de conteaje de células TCD4+ y carga viral en cada periodo de estudio establecido para cada grupo por separado (comparación de medias intragrupo); se demostró que éstas no variaban significativamente, en ninguno de los dos grupos de estudio y controles (Tabla 4).



Tabla 5. Cambios en conteaje de células TCD4+ en pacientes con sífilis infectados con el VIH-1. Comparación con un grupo control.

Categoría	CONTROLES						PACIENTES							
	Determinaciones 1 a 2			Determinaciones 2 a 3			Pre-S a PES			PES a Post-S				
	n	X±SD	MD	n	X±SD	MD	n	X±SD	MD	p*	n	X±SD	MD	p*
Cambios en Contaje de células T CD4 (cel/mm³)														
Todos	56	41,53±141	44	56	-4,8±142	12	34	19,41±11 0	24,5	0,43	46	23,74±126	13	0,28
Clasif Sífilis														
Primaria		No aplica			No aplica		1	No aplica			1	No aplica		
Secundaria		No aplica			No aplica		10	21,2±158	39		14	15±103	8,5	
Latente		No aplica			No aplica		23	25,86±81	24	0,91	31	21,12±137	14	0,88
Clasif VIH														
SIDA	14	41,57±105	73	14	22,64±86	30,5	7	-27,57±65 31,59±11	2	0,13	9	6,44±120	13	0,71
NO SIDA	42	41,52±152	22,5	42	-14±157	-2	27	6	36	0,77	37	27,35±131	13	0,21
Uso de TARV														
No	8	52,8±90	47,5	8	-118,3±123	-124	4	-42±102 27,6±109,	-41	0,13	10	12,4±135	-7	0,05
Si	48	39,64±148,5	35	48	14,08±138	27,5	30	9	24,5	0,7	36	26,27±128	13,5	0,68
Años de TARV														
1a3años	30	61,73±143	72	30	28,13±118	72	20	-5,3±116	4,5	0,11	31	42,85±145	13	0,69
4a7años	13	-39,69±145	3	13	23,46±169	3	12	70,5±98	56	0,03	13	-3,76±103	13	0,62
>8años	13	113,4±125	100	4	-94,6±106	-52	12	34±86	34	0,44	2	47,5±90	47,5	0,23

Determinaciones: Pre-S, PES y Post-PES; previo, durante y después de la sífilis en el grupo estudio. A, B y C en grupo control. n: cantidad de pacientes para cada categoría, con esas determinaciones en ese periodo.
 X±SD: Media aritmética ± Desviación estándar. Md: Mediana. p* Nivel de significancia < 0,05 (U-Mann-Whitney).

Tabla 6. Cambios en carga viral (copias de ARN/ml) en pacientes con sífilis infectados con el VIH-1. Comparación con un grupo control.

Categoría	CONTROLES						PACIENTES							
	Determinaciones A a B			Determinaciones B a C			Pre-S a PES			PES a Post-S				
	n	X±SD	Md	n	X±SD	Md	n	X±SD	Md	p*	n	X±SD	Md	p*
Cambios en CV (copias de ARN/ml)														
Todos	41	-28396±123031	0	45	-1163±7508,1	0	21	64688±172293	0	0,03	29	-1348±115978	0	0,99
Clasif Sífilis														
Primaria	No aplica			No aplica			0	0	0	0	0	0	0	0
Secundaria	No aplica			No aplica			6	122022±252407	6151		9	-2826±20045	-54	
Latente	No aplica			No aplica			15	96740±208164	4610	0,85	20	-683±140184	0	0,96
Clasif VIH														
SIDA	11	-84613±227711	-7911	12	1976,5±7760	0	4	-11199±31145	0	0,54	7	-50008±124830	0	0,16
NO SIDA	30	-7783±36874	0	33	-2305±7194	0	17	82543±187472	0	0,01	22	14133±11543	-27	0,4
Uso de TARV														
No	2	No aplica		3	-3053±8183	0	1	No aplica			4	-51646±8183	-9262	0,24
Si	39	-25434±124644	0	42	-1736,8±6327	0	20	47040±156085	0		25	9129,6±115813	0	0,6
Años de TARV														
1 a 3 años	20	-4313±28084	-13	20	-1761±7543	0	10	138461±312567	6151,5	0,01	13	6373,2±23865	0	0,77
4 a 7 años	12	-2874±28976	0	11	-228,9±2389	0	8	1790,4±3060	0	0,23	9	-13461±32976	-513	0,2
>8 años	9	-11732±84368	-116	4	-56,8±2378	0	2	-21139±48954	-21139	0,68	2	-6426,5±23674	-6426,5	0,12

Determinaciones: Pre-S, PES y Post-PES; previo, durante y después de la sífilis en el grupo estudio. A, B y C en grupo control. n: cantidad de pacientes para cada categoría, con esas determinaciones en ese período. X±SD: Media aritmética ± Desviación estándar. Md: Mediana. p* Nivel de significancia < 0,05 (U-Mann-Whitney).

La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

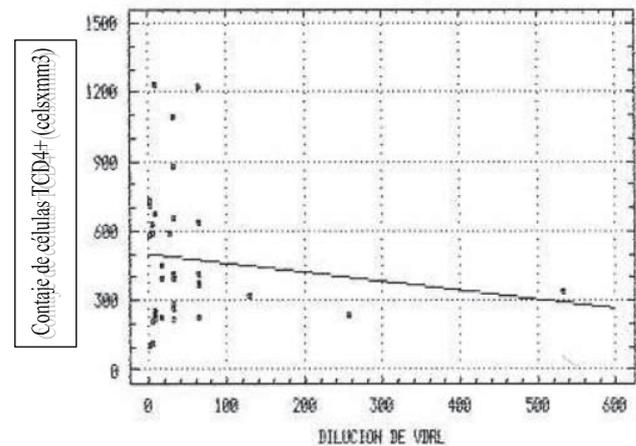
Al evaluar sólo las diferencias o variaciones (medias de diferencias) de los ascensos y descensos en el contejo de células TCD4+ y carga viral, para el momento de la enfermedad y posterior a la misma en el caso del grupo estudio y en las determinaciones 2 y 3 del grupo control, referente a sus respectivos valores previos; se pudo apreciar que en lo referente al contejo de células TCD4+ en los casos de sífilis, la media de la variación observada en el período PES fue positiva (elevación media de 19,41 cel x mm³) pero al ser comparados con la media de la variación en el grupo control la diferencia no fué significativa. Para el período post-S en forma similar en los pacientes con sífilis se observó una media de variación positiva de 23,74 cel x mm³ que comparada con la media de variación del grupo control no resultó estadísticamente significativa. Igualmente, al evaluar los pacientes del grupo estudio en forma separada, por clasificación clínica del VIH, estadio de la sífilis y uso de TARV no hubo diferencia significativa, excepto al apreciar la elevación del contejo de células TCD4+ en el periodo PES en aquellos pacientes que recibían TARV desde 4 a 7 años donde se evidenció que la elevación de contejo de células TCD4+ durante este periodo fué estadísticamente significativa ($p=0,03$) comparada con sus similares en el grupo control (Tabla 5).

En Relación a las determinaciones de Carga Viral se encontró que la media de la variación de estos valores absolutos en los pacientes con sífilis durante el periodo PES fue de 4,81 log₁₀ (64688 copias ARN VIH /ml) por encima del valor previo y al ser comparadas con la variación en el grupo control, ésta resultó estadísticamente significativa ($p=0,03$), durante el periodo posterior (post-S) se encontró una elevación media de 4,96 log₁₀ (93084 copias de ARN VIH/ml) aunque esta última elevación no fué estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Al separar el grupo estudio por clasificación clínica de la infección por VIH ésta demostró que en los pacientes catalogados como NO SIDA, la elevación de la carga viral durante el período PES fué significativa en comparación con el grupo control ($p=0,01$). Igualmente en aquellos pacientes con sífilis que recibían TARV desde hace más de un año y menos de 3 años, la elevación de la carga viral durante el período PES fué significativa en comparación con sus equivalentes en el grupo control ($p=0,01$). Por otro lado, al separar los pacientes de estudio por clasificación clínica de la sífilis, se pudo apreciar que en el caso de la sífilis secundaria, ésta presentó la mayor elevación de carga viral durante el periodo PES, sin embargo al compararla con la elevación de carga viral en los casos de sífilis latente, no fué estadísticamente significativa (Tabla 6).

Finalmente, con el propósito de evaluar la relación existente entre el contejo de células TCD4+ y los valores obtenidos en las diluciones del VDRL de los pacientes en el grupo estudio al momento del diagnóstico y en aquellos reportes de pruebas

de VDRL control coincidentes con reportes de contejo de células TCD4+, se realizaron pruebas de correlación de variables, encontrándose un coeficiente de correlación negativa de -0,12, con un nivel de significancia no estadísticamente significativo ($p=0,46$) (Figura 6).

Figura 6. Correlación entre contejo de células TCD4+ y diluciones de la prueba VDRL reactiva.



Nivel de significancia $p<0,05$ (correlación de Pearson).

Discusión

En este estudio se evaluó el impacto de la infección por sífilis en el contejo de células TCD4+ y en la Carga Viral de los pacientes coinfectados con el VIH-1, por un estudio retrospectivo de casos y controles.

La prevalencia expresada en porcentaje de reportes de pruebas de VDRL reactivas en la población estudiada fué de 18%; lo que equivale al porcentaje expresado en estudios anteriores de casos de sífilis en pacientes infectados con el VIH-1 (15), sin embargo, este valor puede estar subestimado o sobreestimado por falta de control posterior y seguimiento regular de los pacientes.

Los contejos de células TCD4+ en los casos de sífilis fueron similares a las obtenidas en los controles. Más de dos tercios de los pacientes elevaron sus valores de células TCD4+ durante la enfermedad y posterior a la misma. No obstante, la variación media de este ascenso no fué estadísticamente significativa, siendo este hallazgo consistente con el reportado por Manfredi y col. (9). Sin embargo, al separar este grupo de pacientes de estudio, se pudo apreciar que fué mayor el ascenso en los pacientes que estaban recibiendo TARV y específicamente resultó significativo en aquellos que tenían de 4 a 7 años con TARV, en comparación con sus similares en el grupo control.

La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

Es interesante resaltar que al considerar las medias y medianas de estos valores absolutos de conteo de células TCD4+ por separado en el período de la enfermedad y en el posterior, se distingue una media menor durante la sífilis para luego elevarse en el siguiente periodo, por el contrario, cuando se consideran las variaciones (diferencias) entre las tomas y sus medias, se obtiene un valor positivo en ambos lapsos de tiempo; esta incongruencia puede explicarse por las altas medidas de dispersión encontradas en los conteos absolutos de células TCD4+. Este hallazgo sorpresivo difiere de los obtenidos en otros estudios reportados donde la sífilis se ha asociado a un descenso de las células TCD4+ (3,8).

Durante el periodo de la sífilis se evidenció un incremento en la carga viral en los pacientes infectados con el VIH y sífilis; 38% de los pacientes elevaron sus mediciones durante el periodo de la enfermedad. Esta elevación fue mayor en los pacientes con sífilis secundaria, que es una forma generalizada de sífilis que según lo descrito en estudios *in vivo* e *in vitro*, puede conducir a una mayor activación inmunológica y por ello al aumento de la replicación del VIH en células blanco (TCD4) lo que puede expresarse con un aumento de la viremia (2,6,18). Aunque en este estudio la diferencia entre la elevación de carga viral en pacientes con sífilis secundaria y latente no fue significativa. Por otro lado, esta elevación fue significativa en aquellos pacientes catalogados como NO SIDA y en aquellos que tenían de 1 a 3 años recibiendo TARV, hallazgos que coinciden con los reportados por Sadiq y col (3) y por Palacios y col (8).

Al igual que los estudios publicados por otros autores, (3,5,8) se demostró una reducción de la carga viral que no fue significativa en el periodo posterior de la enfermedad, lo cual puede estar relacionado la replicación constante del VIH.

Al valorar la relación entre el estado de inmunosupresión del paciente VIH+ determinado en este caso por el conteo de células TCD4+ al momento del diagnóstico de la sífilis y su repercusión en las pruebas serológicas reportadas como reactivas (VDRL), se determinó que hubo correlación negativa, es decir, a mayor depresión del sistema inmunológico (menor conteo de células TCD4+); Por ello, pacientes con valores más bajos de células TCD4+ se presentaron con pruebas de VDRL con diluciones más altas, esta correlación sin embargo, no resultó estadísticamente significativa. No obstante, este hallazgo se ajusta a lo descrito por Rompalo y col (8) el cual observó en su estudio que los promedios de títulos de las pruebas serológicas no treponémicas son más altas en los pacientes con VIH+ reflejando activación policlonal no específica a consecuencia de la infección por el VIH.

Al interpretar los resultados obtenidos en este estudio resulta importante tomar en cuenta las características del diseño del

mismo, por tratarse de un estudio exploratorio retrospectivo, se utilizaron datos existentes en las historias clínicas de los pacientes, consistentes en características generales y reportes de resultados de laboratorio, por lo que existe limitación en controlar algunos factores que podrían influenciar estos resultados, así como interurrencias virales e inmunizaciones cercanas a toma de las muestras, que pueden en sí mismas afectar la carga viral y el conteo de células TCD4+. Igualmente, al catalogar el estadio de la sífilis en los pacientes de estudio, es relevante considerar que como es conocido, en pacientes infectados con el VIH ocurren presentaciones atípicas y asintomáticas más frecuentemente (10,12), hecho que influye en la caracterización de la sífilis en esta población y en consecuencia, en la determinación de los períodos de la enfermedad estipulados en este estudio, ya que los períodos de incubación estipulados en cada caso, para algunos, puede haber resultados muy amplios y para otros, muy cortos.

Por otra parte, el tamaño de la muestra en este estudio puede haber limitado el análisis por subgrupos de pacientes, a causa de lo pequeño de la misma. Al mismo tiempo, no en todos los pacientes incluidos en el grupo de estudio, se disponían de la totalidad de reportes requeridos en cada periodo de enfermedad establecidos. De los 48 pacientes incluidos en el grupo de estudio sólo 32 (66%) contaron con conteo de células TCD4+ y 19 (40%) con Carga Viral en los tres periodos de la enfermedad.

Conclusiones

1. La prevalencia de la sífilis en pacientes infectados con el VIH-1 fue de 18% similar a lo reportado en otros estudios.
2. Los valores de células TCD4+ no se modificaron en los pacientes con infección por el VIH durante la sífilis.
3. Durante la infección por Sífilis en el paciente VIH hubo un incremento significativo en la determinación de la carga viral, durante la enfermedad, principalmente en el caso de la sífilis secundaria, en aquellos pacientes catalogados como NO SIDA y aquellos que recibían TARV entre 1 a 3 años. Sin embargo, este estudio por limitaciones de tamaño de la muestra no es suficiente para ser concluyente al respecto.
4. El conteo de células TCD4+ en el paciente infectado con el VIH+ no se correlacionaron significativamente con los títulos obtenidos en las pruebas de VDRL reactivas durante la sífilis.

Recomendaciones

1. Promover el correcto reporte de las historias clínicas y la inclusión obligatoria de la prueba VDRL en el panel de estudio del paciente con infección por el VIH, así como las pruebas confirmatorias de llegar a resultar éstas reactivas.



La carga viral y células TCD4+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

- Llevar a cabo estudios de tipo prospectivo que seleccione pacientes infectados con el VIH en el momento del diagnóstico de la sífilis tomando en cuenta los distintos factores que pudieran estar influenciando en las variables estudiadas y asegurando el seguimiento del paciente.
- Realizar estudios con períodos de tiempo más largos posterior a la enfermedad por sífilis con el fin de evaluar la posibilidad de la persistencia de la activación inmunológica con el descenso lento de la Carga viral en esta población.
- Promover programas de educación en el paciente infectado con el VIH que lo incentive a la asistencia regular a la consulta de control y al cumplimiento apropiado de la solicitud de exámenes y conductas terapéuticas del médico tratante.

Referencias

- Musher D, Hamil R. Effect of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection on the course of Syphilis and on the response to treatment. *Ann Intern Med* 1990; 113:872-881.
- Theus S, Harrich D, Gaynor R, *Treponema pallidum*, Lipoproteins, and Synthetic Lipoprotein Analogues Induce Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression in Monocytes via NFkB Activation. *The Journal of Infectious Diseases* 1998;177:941-50.
- Sadiq S, McSorley J, Copas A. The effects of early syphilis on CD4 counts and HIV-1 RNA viral loads in blood and semen. *Sex Transm Inf.* 2005;81;380-385.
- LaFond R and Lukehart S. Biological Basis for Syphilis. *Clin Microbiol Rev*, 2006;19(1):29-49.
- Buchacz K, Patela P. Syphilis increases HIV viral load and decreases CD4 cell counts in HIV-infected patients with new syphilis infections. *AIDS* 2004; 18: 2075-2079.
- Duh E, Maury W, Folks T. Tumor necrosis factor α activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kB sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1989;86: 5974-5978.
- Sellati T, Wilkinson D, Sheffield J. Virulent *Treponema pallidum*, Lipoprotein, and Synthetic Lipopeptides Induce CCR5 on Human Monocytes and Enhance Their Susceptibility to Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journ Infect Dis* 2000;181:283-93.
- Palacios R., Jiménez F., Aguilar M., Impact of Syphilis Infection on HIV Viral Load and CD4 Cell Counts in HIV-Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;44:356-359.
- Manfredi R, Sabbatani S, Pocaterra D. Syphilis does not seem to involve virological and immunological course of concurrent HIV disease. *AIDS* 2006; 20: 301-315.
- Christopher H, Gail B. Syphilis and HIV. *HIV InSite Knowledge* [serie en internet] citado en Junio 2006. Disponible en: <http://hivinsite.ucsf.edu/search>.
- Hutchinson C, Hook E. Altered Clinical Presentation of Early Syphilis in patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Ann Intern Med* 1994; 121: 94-99.
- Cohen C, Winston A, Asboe D. Increasing detection of asymptomatic syphilis in HIV patients. *Sex Transm Inf* 2005;81;217-219.
- Lab 18: Serology, Part2-Indirect Serologic Testing (serie en internet) Disponible en: <http://student.ccbcind.edu/courses/bio141/labmanual/lab18/slepos.html>.
- Rusnak J, Butzin C. False positive Rapid Plasma Reagin Tests in Human Immunodeficiency Virus Infection and Relationship to Anticardiolipin Antibody and Serum Immunoglobulin Levels. *The Journal Infect Dis.* 1994; 169: 1356-1359.
- Lynn W, Lihtmann S. Syphilis and HIV: a dangerous combination. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 456-466.
- Hall C., Klausner J, Bolan G. Managing Syphilis in the HIV-infected Patient. *Curr Infect Dis Reports* 2004, 6:72-81.
- Haas J, Bolan G, Larsen S. Sensitivity of Treponemal Tests for detecting Prior treated Syphilis during Human Immunodeficiency Virus Infection. *The Journal Infect. Dis.* 1990; 162: 862-6.
- Sulkowski M, Chaisson R, Karp C. The effect of acute infectious illnesses on plasma human immunodeficiency virus (HIV) type 1 load and the expression of serologic markers of immune activation among HIV-infected adults. *J Infect Dis* 1998;178:1642-8.

Prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica

Jusmelys Millán de Viloría¹, Patricia Mantilla¹, Dayana Delgado¹

RESUMEN

La urticaria está caracterizada por vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular de la piel que aparecen como múltiples placas o ronchas edematosas muy puriginosas de color rojo. Existe evidencia que la Urticaria Crónica puede ser de origen autoinmune en un 30-50% de los casos, el resto corresponde a urticarias físicas, vasculitis urticarianas y las denominadas pseudoalergias. Se ha asociado la infección por *H. pylori* en el tracto gastrointestinal superior como agente causal de la UC. Sin embargo existe gran controversia con este hecho lo cual no permite llegar a una conclusión definitiva de la posible relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y su asociación con Urticaria Crónica Autoinmune. En este estudio se evalúan 20 pacientes adultos con diagnóstico de Urticaria Crónica y 40 adultos normales como grupo control. Se determinaron las concentraciones de anticuerpos IgG e IgA contra *H. pylori* en el suero de ambos grupos, para esto se utilizó un inmunoensayo enzimático (EIA). Se demostró que la prevalencia de IgG e IgA contra *H. pylori* en el grupo control y en el grupo de pacientes fue similar 40% de IgG positiva en el grupo control versus 42.5% en el grupo de pacientes. Los valores de IgA fueron 45% positivo en los pacientes y 67,5% en el grupo control asimismo los anticuerpos IgG e IgA de los pacientes fueron asociados con la prueba de suero autólogo, encontrando que IgG e IgA es más frecuentemente positiva en el grupo de pacientes con PSA positiva ($p < 0.05$). La prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra *H. pylori* es similar en los pacientes con Urticaria Crónica y sin Urticaria Crónica, la presencia de anticuerpos contra *H. pylori* está asociada con Urticaria Crónica Autoinmune.

Palabras clave: Urticaria crónica, *Helicobacter pylori*, anticuerpos IgG e IgA.

Antibodies IgG and IgA against *Helicobacter pylori* in patients with chronic urticaria

SUMMARY

Urticaria is characterized by vasodilatation and an increase of vascular permeability of the skin which show as multiple, very itchy, edematous patches or hives, red in color. There is evidence that Chronic Urticaria could have an autoimmune origin in 30-50% of the cases; the rest corresponds to physical urticaria, urticarian vasculitis, and the so-called pseudo-allergies. Infection of the superior gastrointestinal tract with *H. pylori* has been associated as a causal agent of CU. However, there exists a great controversy regarding this fact, which does not allow for a definite conclusion on the possible relation between the infection with *Helicobacter pylori* and its relationship with Autoimmune Chronic Urticaria. In this study 20 adult patients, diagnosed with Chronic Urticaria, were evaluated; with 40 normal adults as control group. The concentrations of serum antibodies IgG and IgA against *H. pylori* were determined for both groups, for which an Enzymatic Immunoassay (EIA) was used. The prevalence of IgG and IgA against *H. pylori* in the control group and the group of patients was shown to be similar — 40% of IgG positive in the control group versus 42.5% in the group of patients. The values of IgA were 45% positive among the patients and 67.5% among the control group; in the same manner, the antibodies IgG and IgA of the patients were tied in with the autologous serum test, finding that IgG and IgA is more often positive in the group of patients that test positive for PSA ($p < 0.05$). The prevalence of antibodies IgG and IgA against *H. Pylori* is similar in patients with Chronic Urticaria and without Chronic Urticaria, the presence of antibodies against *H. Pylori* is linked with Autoimmune Chronic Urticaria.

Key words: Chronic urticaria, *Hlicobacter pylori*, antibodies IgG and IgA.

1. Instituto de Oncología y Hematología. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

La Urticaria está caracterizada por vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular de la piel, aparece como múltiples placas o ronchas edematosas bien demarcadas muy pruriginosas, presentan color rojo y se hacen blancas al presionar (1). Las lesiones individuales varían en diámetros desde unos pocos milímetros hasta muchos centímetros, pueden ser localizadas, como en el caso de la Urticaria de contacto, generalizadas o confluentes, circulares o serpiginosas (1). La duración de las lesiones puede variar desde 30 minutos hasta algunos días.

De acuerdo al tiempo de evolución la Urticaria se ha clasificado en: Urticaria aguda de evolución menor de 6 semanas, más frecuente en niños; es una condición común y ocurre aproximadamente en un 20% de la población mundial y sus causas son generalmente identificadas (2). Hasta un 50% de los casos puede deberse a una reacción de hipersensibilidad inmediata desencadenada por alimentos; también es frecuente la reacción a fármacos (opiáceos, antibióticos), medios de radiocontraste y algunas infecciones virales agudas o parasitarias primordialmente (2).

Urticaria crónica (UC) de evolución mayor de 6 semanas. En este grupo encontramos Urticaria Física que se define en función del estímulo físico inicial. Las lesiones aparecen a los pocos minutos del estímulo (Ej. dermatografismo, presión, colinérgica, Frío, Solar, Acuagénica); Vasculitis Urticariana que afecta vasos de pequeño calibre y se encuentra asociada a enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico (LES); Urticaria Autoinmune desencadenada por autoanticuerpos dirigidos contra receptor de alta afinidad de IgE (Fc ϵ RI) o contra la porción Fc de inmunoglobulina E (IgE); frecuentemente asociada con enfermedad tiroidea, infecciones crónicas tales como Hepatitis C y *Helicobacter pylori*, también se han asociadas a Urticaria crónica (3); por último las Urticarias Idiopáticas donde el agente etiológico no se logra identificar.

Solo se conocen algunas formas por las cuales los mastocitos se estimulan y degranulan en la UC, como es en el caso de la activación dependiente de IgE donde ocurre el entrecruzamiento de IgE unida al receptor del mastocito por un anticuerpo dirigido contra la porción Fc de la IgE (4). También ocurre degranulación por mecanismos independiente de IgE, es decir por anticuerpos dirigidos contra el Fc ϵ RI y por compuestos como los ionoforos de calcio que aumentan la permeabilidad en la célula provocando la degranulación (4). Otras drogas como codeína, morfina y hormona adrenocorticotrópica también intervienen en este mecanismo (4-6).

La fase inmediata de esa activación se debe principalmente a la liberación de mediadores preformados tales como histamina, triptasa e hidrolasas ácidas almacenadas en los gránulos de los mastocitos (2,4). Esta fase se caracteriza macroscópicamente por eritema, edema localizado en forma de roncha y prurito. En la fase tardía hay reclutamiento de células inflamatorias: eosinófilos, neutrófilos y linfocitos (1,3).

El *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es considerado el microorganismo más común en infecciones bacterianas crónicas en humanos y juega un papel etiológico en el desarrollo de gastritis crónica, úlceras pépticas, malignidad gástrica (7). Más recientemente, otras publicaciones han propuesto al *H. pylori* como causante de UC (2,3,7).

El *H. pylori* es un bacilo Gram negativo, ureasa positivo, característica que le confiere protección de los ácidos gástricos; coloniza la mucosa gástrica e induce una potente respuesta inflamatoria con liberación de varias sustancias citotóxicas tanto por parte de la bacteria como por el huésped (8).

El papel de *H. pylori* en patologías cutáneas aun permanece en enigma, pero se especula que componentes estructurales (flagelina, adhesina) o productos derivados del *H. pylori* (ureasa, proteasa, fosfolipasa y citocinas) están involucrados en el desarrollo de la urticaria (9).

La relación entre la colonización del *H. pylori* y la inflamación de la mucosa ha sido descrita en la modulación de procesos inmunológicos que involucran la piel (9). Muchas observaciones han mostrado una alta prevalencia de la infección de *H. pylori* en pacientes con UC (7) y remisión ocasional de los signos cutáneos y síntomas después de la terapia de erradicación (8) sugiriendo un posible papel etiopatogénico del *H. pylori* en algunos casos a pesar de que numerosas publicaciones han presentado fallos en esta relación (10,11). La asociación directa de *H. pylori* con UC aun sigue siendo controversial.

Bakos y col, determinaron la asociación de Acs. IgG e IgA contra la lipoproteína 20 de *H. pylori* en pacientes con UC y observaron una prevalencia del 93,9% Y 46,1% para IgG e IgA respectivamente en el grupo de UC contra 21,2% y 6,3% para IgG e IgA en el grupo control ($p < 0,0001$ y $p < 0,0029$ para cada caso) (12). Este estudio avala la asociación de UC con *H. pylori*. Estos resultados son apoyados por Hizal y col. quienes obtuvieron 41 % de positividad para IgG contra *H. pylori* en pacientes con UC versus 26,6% en el grupo control ($p=0,005$) (13).

En contraste con los resultados anteriores Hook-Nikanne y col, evaluaron la prevalencia de la infección por *H. pylori* en pacientes con UC y observaron similitud entre el grupo en

Prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica

estudio y la población normal (25% contra 31,4%). Además, la erradicación de la bacteria no modificó el curso de la enfermedad (10). Resultados similares fueron arrojados por el estudio de Bulbul y col., quienes observaron que la frecuencia de infección por *H. pylori* era del 70% tanto para el grupo estudios como para el grupo control (11). Estos resultados niegan la asociación del *H. pylori* con UC.

La erradicación de la bacteria esta asociada con remisión de los síntomas de Urticaria en algunos estudios. Di Campli y col encontraron que el 81% de los pacientes en quienes la bacteria fue erradicada presentaron una remisión total de los síntomas de urticaria mientras que el 19% tuvieron remisión parcial. La incomodidad causada por los síntomas clínicos de urticaria fue significativamente reducida después de la erradicación del *H. pylori* en todos los pacientes (14). Similares conclusiones han sido apoyadas por Federman y col donde la remisión de urticaria de *H. pylori* fue de 30.9% comparada con 21,7% cuando el *H. pylori* no fue erradicado (15). Estos estudio demuestran que la erradicación de la bacteria esta asociada con la remisión de los síntomas de la urticaria.

Por otro lado Daudén E. y col hallaron que solo el 4% de los pacientes con UC mostró remisión completa de los síntomas de Urticaria y el 8% remisión parcial (7). De manera similar otros estudios han encontrado que el 27% de los pacientes tratados con erradicación del *H. pylori* mostraron remisión de los síntomas, no obstante el 60% de los pacientes en quienes el *H. pylori* no fue erradicado por tratamiento también mostraron remisión de los síntomas (10). Estos estudios manifiestan una carencia de la asociación entre la infección de *H. pylori* y UC. Rigazzi y col., proponen que el estímulo inmunológico crónico determinado por la infección mediante la liberación de mediadores de la inflamación o por el consecuente aumento de la permeabilidad gástrica, seguida por un incremento del pasaje a la circulación de alérgenos alimentarios, sería el mecanismo patogénico para explicar la asociación de UC con infección por *H. pylori* (16).

La Prueba de Suero Autólogo (PSA), determina la presencia de factores liberadores de histamina presentes en la sangre. Hoy en día se conoce que estos factores liberadores de histamina están representados por autoanticuerpos dirigidos contra los Fc ϵ RI que originan el entrecruzamiento de los mismos suscitando la activación y degranulación del mastocito con la consecuente liberación de aminas vasoactivas. Estas aminas, esencialmente la histamina inician los síntomas de la Urticaria Crónica Autoinmune (UCA) (17).

Aproximadamente el 30-60% de los pacientes con UC reaccionan a la inoculación de suero autólogo (18). La PSA contribuye al diagnóstico de UCA. El 65,4% de los pacientes con UC e infección por *H. pylori* confirmada exhiben PSA positiva (18).

Hizal y col, valoraron la asociación de *H. pylori* y PSA en pacientes con UC observando que en los pacientes con UC y *H. pylori* es más frecuente la PSA positiva (40%), en comparación con pacientes con UC y *H. pylori* negativo (13,64%) (13).

Otros autores están en desacuerdo con la asociación entre UCA y *H. pylori*. Los resultados obtenidos por Bulbul B. y col, no son estadísticamente significativos, ya que solo el 6% de los pacientes con *H. pylori* fueron positivos para la PSA (11). Estos hallazgos sugieren que la infección con *H. pylori* parece no tener correlación en la producción de autoanticuerpos en pacientes con UCA.

La incoherencia de los estudios citados anteriormente no permite llegar a una conclusión definitiva sobre la posible relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y su asociación con Urticaria Crónica y Urticaria Crónica Autoinmune. Es posible que la variabilidad de metodología aplicada para la evaluación de la infección por *H. pylori* en diferentes estudios y la inconstancia en la prevalencia de la infección en diferentes áreas, contribuyan a la controversia.

El estudio que se propone a continuación tiene por finalidad precisar la asociación entre *Helicobacter pylori* y Urticaria Crónica y su relación con Urticaria Crónica Autoinmune.

Análisis estadístico

Por tratarse de muestras pequeñas se utilizaron métodos no paramétricos como U Mann Whitney, correlación de Pearson, Prueba exacta de Fisher y prueba del chi-cuadrado (X^2) que evaluaron la relación entre las variables independientes y dependientes.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología ubicado en el Instituto de Oncología y Hematología de la Universidad Central de Venezuela.

Muestra estudio

Se analizaron 20 pacientes adultos (14 femeninos y 6 Masculinos), la edad de los pacientes estuvo comprendida entre 19-63 años ($X=41\pm 25$ años), con diagnóstico de Urticaria Crónica que asistieron a la consulta de Inmunología del mencionado centro de salud en un periodo comprendido de 3 meses. Los mismos expresaron por escrito su consentimiento de participar en el protocolo de estudio, se llenaron fichas de recolección de datos personales de los pacientes y de laboratorio, el comité de ética del I.O.H. aprobó el presente protocolo de estudio. Los resultados de la Pruebas de Suero Autólogo (PSA) que se usaron en este estudio fueron extraídos



Prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica

de las historias y fue realizada por el médico tratante. La PSA se consideró positiva en aquellos pacientes donde el diámetro de la pápula y el eritema formado estuviese por encima de 1.5 mm del control negativo (solución salina 0.9%) (19,20).

Grupo control

Se analizaron 40 personas adultas (30 Femeninas y 10 Masculino), con edades comprendidas entre 19-62 años (promedio de edad 41.4 años) sin Urticaria Crónica y sin manifestaciones gastrointestinales. Expresaron por escrito su consentimiento de participar en el estudio.

Materiales

- Las concentraciones de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* fueron medidas por medio de un análisis de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), (r-biopharm ref. K2321, lot 05184-IgG y K2311, lot. 02145-IgA).
- Lector de ELISA, marca TECAN-SUNRISE.

Características del estudio: Ensayo clínico, analítico y prospectivo de tipo caso control.

Criterios de inclusión

1. Pacientes adultos (mayores de 18 años) de ambos sexos con diagnóstico de Urticaria Crónica, que se define por tiempo de evolución mayor a 6 semanas.
2. Sin manifestaciones gastrointestinales.

Criterios de exclusión

1. Pacientes sin urticaria crónica.
2. Pacientes con manifestaciones gastrointestinales.
3. Menores de 18 años.
4. Enfermedad psiquiátricas.
5. Mujeres embarazadas.

Procedimientos

Muestra

Se recolectó 5 ml de sangre total en tubo sin aditivo, después de la retracción del coágulo se centrifugó a 2500 r.p.m. por 10 minutos y se separó el suero y se almacenó a -4°C hasta su procesamiento.

El método aplicado es un inmunoensayo enzimático (EIA) que se basa en el uso de antígeno (Ag) inmovilizado sobre una superficie sólida, manteniendo su capacidad de combinarse con su ligando correspondiente y anticuerpo específico, el complejo Ag-Ac formado queda fijado a la fase sólida y es detectado agregando a la reacción un conjunto marcado con una enzima, dicha reacción puede evidenciarse añadiendo el sustrato para la enzima marcadora, con un cromógeno adecuado (21).

La actividad de la enzima sobre el sustrato cataliza la formación de un producto coloreado, cuya intensidad de color será proporcional a la cantidad de enzima que se fijó a la reacción. La variante aplicada en este estudio es un EIA indirecto porque determina anticuerpos específicos contra *H. pylori*.

Determinación de Ac IgG contra *Helicobacter pylori*

A cada problema y control se le determinó Ac IgG contra *H. pylori* por el método de ELISA-RIDASCREEN (r-biopharm Ref. K2321, Lot. 05184) bajo el siguiente protocolo:

1. Las microplacas de titulación y reactivos se ajustaron a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Las placas estaban recubiertas con proteínas antigénicas de la membrana externa de *H. pylori*.
3. Se diluyó el buffer de lavado 1:10 con agua destilada.
4. Se diluyó las muestras de suero 1:50 con el buffer de muestras.
5. Se pipeteo 100 ul de control positivo (IgG +), control negativo (IgG -) y muestra problema a la microplaca. La posición A 1 (blanco) de la placa permaneció vacía en la primera incubación.
6. Se tapó la placa y se incubó por 30 min a 37°C.
7. Se lavó la placa 4 veces con 300 ml de buffer de lavado diluido.
8. Se añadió 100 ml de conjugado (IgG anti humana con Peroxidasa de rábano) en todos los pozos incluyendo al A1.
9. Se tapó la placa y se incubó por 30 min a 37°C.
10. Se lavó la placa 4 veces con 300 ml de buffer de lavado diluido.
11. Se añadió 100 ml de sustrato en todos los pozos y se incubó por 30 min a 37°C.
12. Se añadió 100 ml de reactivo de parada (H_2SO_4). Se evaluó fotométricamente a 450/620 nm.

Determinación de Ac IgA contra *Helicobacter pylori*

A cada muestra problema y control se le determinó Ac IgA contra *H. pylori* por el método de ELISA-RISASCREEN (r-biopharm Ref. K2311, Lot. 02145) bajo el mismo protocolo de la determinación de IgG.

Cálculo de las concentraciones en U/ml

Las lecturas medidas fueron obtenidas en absorbancia. A estos valores se le resta la absorbancia del blanco de reactivo para obtener la absorbancia corregida. A partir del valor promedio medido para el estándar de control y de su valor nominal se calculó el factor de corrección (F). Este valor nominal es dependiente del lote y se incluye en la hoja de datos adjunta al kit comercial utilizado.

Prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica

$$F = \frac{\text{Valor nominal del estándar de control}}{\text{Valor promedio de la absorbancia del estándar de control}}$$

La absorbancia corregida para cada muestra fue multiplicada por el factor. Con estos valores corregidos se efectuó la lectura del valor correspondiente en U/ml en la curva estándar anexa al kit.

Se consideró como resultado positivo valores >: 16,0 U/ml y >:13,0 U/ml para IgG e IgA, respectivamente.

Resultados

Prevalencia de IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica (pacientes) e individuos sin urticaria crónica (grupo control)

La prevalencia para IgG en el grupo estudio y grupo control fue de 40% y 42.5%, respectivamente con valor de (p=0.85 por X² Prueba exacta de Fisher p>0.05) (Tabla 1), para IgA la prevalencia fue de 45% para el grupo estudio y 67,5% en el grupo control con valor de p=0.16 por X² Prueba exacta de Fisher p=0.10 (Tabla 2).

Estos datos reflejan una prevalencia de anticuerpos contra *Helicobacter pylori* similares en pacientes con UC y sin UC.

Tabla 1. Prevalencia de IgG en grupo control y estudio.

Individuos	Control	Pacientes	Valor de p (X ²)	Valor de p (prueba exacta de Fisher)
IgG Positivos	42.5%	40%	0.85	0.20
IgG Negativo	57.5%	60%		
Total	100%	100%		

Tabla 2. Prevalencia de IgA en grupo control y estudio.

Individuos	Control	Pacientes	Valor de p (X ²)	Valor de p (prueba exacta de Fisher)
IgA Positivos	67.5%	45%	0.16	0.10
IgA Negativo	32.5%	55%		
Total	100%	100%		

Concentración de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en grupo estudio y control

Al comparar las concentraciones de las muestras positivas para IgG en el grupo de pacientes y control observamos valores de 30 U/ml y 34 U/ml respectivamente, sin reflejar significancia estadística (p=0,55); para IgA se obtuvo en el grupo estudio 20 U/ml y en el grupo control 22U/ml (p=0,52) (Tabla 3).

Las concentraciones de los anticuerpos IgG e IgA contra *H. pylori* son similares en los pacientes con UC y en el grupo control.

Tabla 3. Concentración de IgG e IgA en grupo de pacientes y grupo control.

Concentración	Pacientes	Control	Valor de p
IgG (U/ml)	30	34	0.55
IgA (U/ml)	20	22	0.52

Asociación de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica con prueba de suero autólogo (PSA) positiva y negativa

Los resultados de PSA dentro del grupo de pacientes con Urticaria Crónica fue de 10/20 (50%) PSA positivo y 10/20 (50%) PSA negativo.

Se observó que en los pacientes con prueba de suero autólogo positiva el 60% eran positivo para IgG contra *H. pylori* y los pacientes con PSA negativa solo el 20% eran positivos para PSA, cuando se compararon ambos grupos se observó una diferencia estadísticamente significativa p<0.01 (Figura 1).

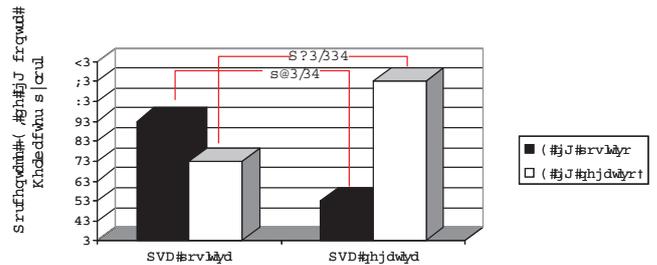


Figura 1. Comparación de IgG positiva y negativa contra *Helicobacter pylori* y prueba de suero autólogo (PSA) en pacientes con urticaria crónica.

Estos datos reflejan que el IgG contra *H. pylori* fue mas frecuentemente positiva en el grupo de PSA positivo, indicando que el *H. pylori* se asocia con UCA.

Cuando comparamos los valores de IgA contra *H. pylori* en los pacientes con PSA positivo y PSA negativo, observamos que los pacientes con urticaria crónica con PSA positiva el 70% tenían anticuerpos contra *H. pylori* y en los pacientes con PSA negativo solo 20% tenían anti IgA contra *H. pylori*. Al comparar ambos grupos se observó una diferencia estadísticamente significativa p<0.05 (Figura 2).

Este hallazgo indica que la IgA para *H. pylori* fue mas frecuentemente positiva en el grupo con PSA positivo, igual a los resultados obtenidos para IgG donde el *H. pylori* se asocia con Urticaria Crónica Autoinmune.

Asociación de prueba de suero autólogo (PSA) positiva en pacientes con urticaria crónica y anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori*

Cuando se comparó el grupo de pacientes con Urticaria Crónica y serología positiva para *Helicobacter pylori* con el grupo de pacientes con Urticaria Crónica y serología negativa para *Helicobacter pylori* se observó que la PSA positiva era más frecuente en el grupo positivo para *Helicobacter pylori*: 75% versus 33.3% para IgG (p=0.01) y 77.7% versus 27.2% para IgA (p=0.02) Figura 3.

Estos resultados sugieren que la infección por *H. pylori* es más frecuente en pacientes con Urticaria Crónica Autoinmune (definida por PSA positiva).

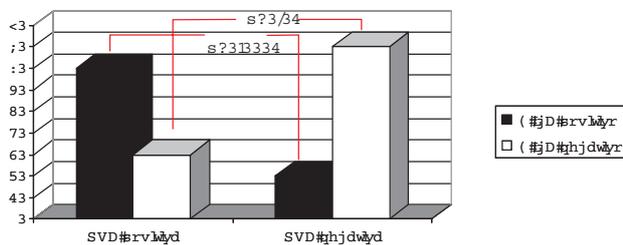


Figura 2 Comparación de IgA positivas y negativas contra *Helicobacter pylori* y prueba de suero autólogo (PSA) en pacientes con urticaria crónica.

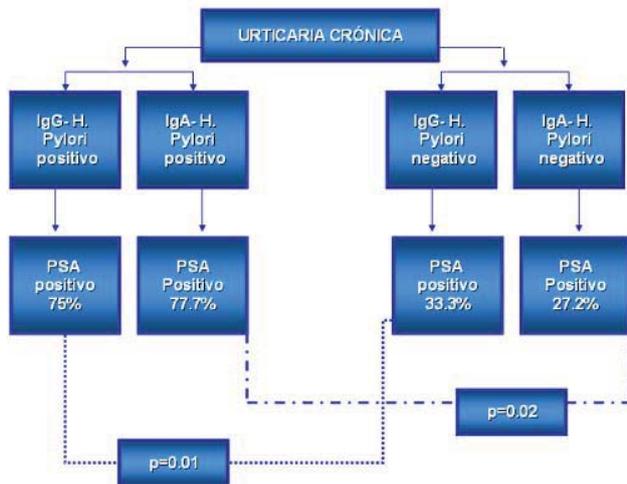


Figura 3. Anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica con prueba de suero autólogo positiva.

Se evaluó la sensibilidad y especificidad diagnóstica para la prueba de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en los pacientes con UC y se obtuvo una sensibilidad igual a 60% y la especificidad de 80%. Estos datos nos indican que

no todos los pacientes que presentan UC van a presentar anticuerpos contra *H. pylori* ya que la sensibilidad para este método fue muy baja, a su vez algunos pacientes que no presentan UC pueden tener la presencia de anticuerpos contra *H. pylori* debido a la baja especificidad de *H. pylori* para UC.

Discusión

Existe evidencia que la Urticaria Crónica puede ser de origen autoinmune en un 30-50% de los casos (12), el resto de las UC, 35% corresponden a Urticarias Físicas, 5% vasculitis Urticarianas y 10% corresponderían a las denominadas “pseudoalergicas” (aditivos alimentarios, conservantes) o infecciosas (22). El diagnóstico clínico de la UCA está basado en la PSA. En este estudio nosotros distinguimos 2 grupos de pacientes con UC de acuerdo a los resultados de la PSA, encontrando diferencia en la prevalencia de la infección por *H. pylori*.

El rol de la infección por *H. pylori* en el tracto gastrointestinal superior como posible agente causal de la UC aun permanece en controversia. Algunos autores han encontrado una alta prevalencia significativa de la infección en pacientes con UC (12-14,16) y otros no (7,10,11). Sin embargo algunos autores han demostrado que la erradicación de la infección fue asociada con la remisión de la UC sugiriendo un posible papel patogénico en este desorden de la piel (14,16). Un número de autoanticuerpos de reactividad cruzada pueden contribuir a las alteraciones duodenales y estomacales causada por *H. pylori* (12). Varios hallazgos previamente publicado sugiere una asociación entre la infección por *H. pylori* y alguna enfermedades extradigestiva tales como Síndrome Sjogren, Scleroderma, Purpura Henoch-Schonlein y Tiroiditis (13).

Algunos factores pueden explicar la discrepancia entre los resultados de esta asociación tales como las diferentes metodologías usada para la detección de la infección por *H. pylori*; la resistencia a la terapia es otro factor que puede mediar la carencia de la asociación entre terapia de erradicación y la remisión de la UC y por ultimo la antigenicidad o actividad biológica de la bacteria en diferentes países ha sido argumentada como una posible razón para esta discrepancia (7,13).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por *H. pylori* tiene una distribución mundial que varía entre un 40-50% en los países desarrollados y cerca del 90% en aquellos países en vías de desarrollo (23,24). Aproximadamente un 80% de las personas no desarrollan una enfermedad severa (20). Sin embargo, la enfermedad solo ocurre en el 15% de las personas infectadas, siendo influenciada su aparición, por la virulencia de la cepa bacteriana infectante, la susceptibilidad genética del hospedero y la presencia de cofactores ambientales (23).

Prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica

En este estudio se obtuvo una prevalencia similar de anticuerpos contra *H. pylori* en los pacientes con UC y en el grupo control. Los resultados de Hook Nikanne y col, (10); Bulbul y col, (11); Ghazzawi y col, (25) son similares a los obtenidos en la presente investigación, estos resultados apoyan una prevalencia similar de *H. pylori*. La infección por *H. pylori* en Venezuela presenta una alta prevalencia en la población normal (23). Esto puede ser la causa por la cual existe similitud en la prevalencia de la infección por *H. pylori* entre el grupo estudio y el grupo control.

En contraste a los resultados obtenidos en esta investigación Bakos y col., (12) observaron una prevalencia de anticuerpos contra *H. pylori* mayor en el grupo con UC que en el grupo control. Resultados similares son obtenidos en el estudio de Hizal y col., (13).

Los resultados de este estudio demuestran que en los pacientes con Urticaria Crónica Autoinmune (definida por PSA positiva) se obtuvo una mayor frecuencia la infección por *H. pylori*, que en los pacientes con Urticaria Crónica no Autoinmune (PSA negativo). Estos datos reflejan que el *H. pylori* se asocia con UCA y estos hallazgos son apoyados por Hizal y col., (13) quienes observaron que en los pacientes con UC y *H. pylori* es más frecuente la PSA positiva en comparación con pacientes con UC y *H. pylori* negativo. La infección por *H. pylori* parece tener correlación en la producción de autoanticuerpos en pacientes con UCA.

Los resultados obtenidos por Bulbul y col, (11) están en desacuerdo con la asociación entre UCA y *H. pylori*, ya que solo el 6% de los pacientes con *H. pylori* fueron positivo para la PSA, sugiriendo que la infección por *H. pylori* parece no tener correlación en la producción de autoanticuerpos en pacientes con UCA.

En el presente estudio la infección por *H. pylori* es más frecuentemente positiva en pacientes con UCA que en el resto de UC estos datos son apoyados por Bakos N y col., (18) indicando un posible rol de *H. pylori* en la UCA al menos en un grupo selecto de pacientes, donde la presencia de el *H. pylori* puede predisponer al desarrollo de fenómenos de autoinmunidad por anticuerpos de reactividad cruzada, pretendiendo esclarecer este enigma a través de análisis moleculares (11,18).

Con estos resultados, a pesar del grupo limitado de pacientes, podríamos incluir al *H. pylori* entre -las infecciones -a tener en cuenta cuando se tiene que llegar al diagnóstico etiológico de las Urticarias Crónicas.

Conclusiones

1. La prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra *H. pylori* son similares en pacientes con Urticaria Crónica y sin Urticaria Crónica.
2. Los resultados obtenidos en esta investigación, confirmaron que la infección por *H. pylori* está asociada con Urticaria Crónica Autoinmune.

Recomendaciones

1. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se permite sugerir la determinación de anticuerpos IgG e IgA contra *H. pylori* dentro del panel de estudios en las Urticarias Crónicas.
2. Debido a la gran dispersión de los valores obtenidos se sugiere aumentar el número de la muestra estudio.

Referencias

1. Abba T. Anafilaxia y Urticaria en Parslow T, Stites D, Terr A. Inmunología Básica y Clínica. 2002; Manual Moderno. 10ma edición. 435-446.
2. Zuberbier T. Urticaria. Allergy. 2003; 58:1224-1234.
3. Liutu M, Kalimo K, Uksila and Kalimo H. Etiologic Aspects of Chronic Urticaria. Int J Dermatol. 1998; 37(7):515-519.
4. Grattan C and Charlesworth E. Urticaria en Stephen T, Martin K, Lawrencw M. Alergia. 2000; Ediciones Harcourt. 2da edición. 93-104.
5. Kaplan A. Urticaria and Angioedema. in Middleton E, Reed Ch, Ellis E, Yunginger J. Allergy Principles e Practice. 1998; vol 11. 5ta edición.
6. Kuby J. Immunology. 2000; 4ta edición. 395-421.
7. Dauden E, Jiménez-Alonso I and García-Díez A. He/icobacter py/ori and Idiopathic Chronic Urticaria. /nt J Dermatol/. 2000; 39:446-452.
8. Davila I. Chronic Urticaria and He/icobacter py/ori. Allergo/ / mmuno/ Glin. 2000; 15:366-373.
9. Wedi B, Wagner S, Werfel T, Manns M, Kapp A. Prevalence of Helicobacter pylori-Associated Gastritis in Chronic Urticaria. Int Arch Allergy Immunol. 1998; 116:288-294.
10. Hook-Nikanne J, Va~onen E, Harvima R and Kosunen T. Is Helicobacter pylori Infedion Associated with Chronic Urticaria? Acta Derm Venereol.2000; 80:425-426.
11. Bulbul E, Turker T, Gukten M and Tunali S. Lack of Correlation Between Helicobacter pylori Infectior and Autologous Serum Skin Test in Chronic Idiopathic Urticaria. Int J Dermatol. 2004; 39:443-445.
12. Bakos N, Fekete B, Prohaszka G, Kalabay L. High Prevalence of IgG and IgA Antibodiesto 19-kDa Helicobacter pylori-Associated Lipoprotein in Chronic Urticaria. Allergy. 2003; 58:663-667.
13. Hizal M, Tuzun B, Wolf R and Tuzun Y. The Relationship Between Helicobacter pylori IgG Antibody and Autologous Serum Test in Cronic Urticaria. Int J Dermatol. 2000; 39:443-445.



Prevalencia de anticuerpos IgG e IgA contra *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica

14. Di Campli e, Gasbarrini A, Nuceri E, Franceschi F, et al. Beneficial Effects of *Helicobacter pylori* Eradication on Idiopathic Chronic Urticaria. *Dig Dis Sci.* 1998; 43(6):1226-1229.
15. Federman D, Kirsner R, Moriarty J and Concato J. The Effect of Antibiotic Therapy for Patients Infected with *Helicobacter pylori* who have Chronic Urticaria. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 49:861-4.
16. Rigazzi G, De Falco A, Ghiani H, Carbia R, losquin C and et al. Rol de la Infección por *Helicobacter pylori* en la etiología de la Urticaria Crónica Idiopática. *Estudio Controlado AAIC* 2002;33(1):22-27.
17. Platzer M, Grattan C, Poulsen L and Skov P. Validation of Basophil Release Against the Autologous Serum Skin Test and Outcome of Serum-induced Basophil Histamine Release Studies in a large Population of Chronic Urticaria Patients. *Allergy.* 2005; 60: 1152-1156.
18. Bakos N and Millander M. Comparison of Chronic Autoimmune Urticaria with Chronic Idiopathic Urticaria. *Int J. Dermatol.* 2003;42:613-615.
19. Asero R, Lorini M, Chong S, Zuberbier T and Tedeschi, A. Assessment of histamine-releasing activity of sera from patients with chronic urticaria showing positive autologous skin test of human basophils and mast cells. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34:1111-1114.
20. Fusari A, Colangelo C, Bonifazi, F and Antonicelli, L. The autologous serum skin test in the follow-up of patients with chronic urticaria. *Allergy.* 2005; 60:256-258.
21. Clifford L. Métodos de laboratorio clínico para la detección de antígenos y anticuerpos en Parslow T, Stites D. *Inmunología Básica y Clínica.* 2002; Manual Moderno. 10ma edición. 247-267.
22. Ferrer M. Nuevos avances en la etiopatogénia de la Urticaria Crónica. *Alergol Inmunol Clin.* 2002; 17(2):164-167.
23. Perrone M, Muñoz L, Camorlinga M, Correnti M, Cavazza M and et al. Importancia de la respuesta humoral de IgG anti CagA de *Helicobacter pylori* en pacientes venezolanos con enfermedades de las vías digestivas superiores. *Invest Clin.* 2005;46 (4):1-12.
24. Gonzalez J, Villareal L, Castillo N, Gonzalez A y Garcia E. Correlación entre Urticaria Crónica Idiopática e infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Alergia México.* 2005; 52(5):179-182.
25. Ghazzawi I, Obidat N. The role *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of Chronic Urticaria. *Park J Med Sci.* 2004; 20(2):101-194.

Prevalencia de *Norovirus* en muestras de heces procedentes del laboratorio del Hospital José Gregorio Hernández. Catia, Caracas

Llumey Martínez Chang ¹, Noel Silva ², Nirsén García ², Ana Monzón de Orozco ³

RESUMEN

La gastroenteritis en Venezuela es la principal causa de muerte y morbilidad en la población infantil. La falta de adecuadas metodologías diagnósticas en el laboratorio de rutina impide identificar todos los posibles microorganismos causantes de gastroenteritis enfocando el diagnóstico al estudio de parásitos protozoarios o helmintos, bacterias aeróbicas y en menor grado virus y hongos. Basado en esto, decidimos determinar si el *norovirus* es el agente causal de gastroenteritis en nuestro país, determinar las condiciones ambientales y sanitarias en la comunidad en estudio y analizar los esquemas y técnicas diagnósticas actualmente utilizadas en los centros de salud. Se evaluaron 173 muestras de heces de pacientes que asistieron al laboratorio del Hospital Magallanes de Catia. Se utilizó un kit de inmunoensayo enzimático, ELISA RIDASCREEN *norovirus* de r-biopharm AG, Alemania, el cual permite el diagnóstico *in vitro* e identificación cualitativa de los *norovirus* genogrupo I y II en muestras de heces. De las 173 muestras de heces analizadas 29 (16,76%) resultaron positivas, 144 (83,32%) fueron negativas. Cuando se evaluaron por grupo etario, el grupo de niños de 6 - 13 años se obtuvo el mayor número de muestras positivas (8) seguido del grupo de niños 0 - 5 años con 7 muestras positivas. Se encontró mayor frecuencia de *norovirus* en muestras con aspecto heterogéneo, color marrón y verde de consistencia blanda y alcalina, así mismo 19,08% de las muestras fueron positivas para algún parásito (Protozoario o Helmintos) visibles en el examen microscópico directo. Se demostró que 16,76% de las diarreas en el grupo evaluado fueron por *norovirus*, siendo importante su determinación para el diagnóstico de gastroenteritis.

Palabras clave: *Norovirus*, gastroenteritis, análisis de heces.

The prevalence of the *Norovirus* in fecal samples which originated at the laboratory of the Hospital José Gregorio Hernández. Catia, Caracas

SUMMARY

Gastroenteritis is the main cause of death and morbidity among children in Venezuela. The lack of adequate diagnostic methodologies in the laboratory reduce the identification of all possible microorganisms that cause gastroenteritis, since they focus the diagnosis on the study of parasites, protozoa or helminthes, aerobic bacteria and, to a lesser degree, on viruses and fungi. Based on this, we decided to determine if the *norovirus* is the causal agent of gastroenteritis in our country; to determine the environmental and sanitary conditions in the community under study; and, to analyze the diagnostic framework and techniques currently used in healthcare centers. 173 fecal samples of patients that visited the laboratory of the Hospital Magallanes in Catia were evaluated. An enzymatic immunoassay kit, ELISA RIDASCREEN *norovirus* of r-biopharm AG, Germany, was used since it permits the *in vitro* diagnosis and the qualitative identification of the *norovirus* genogroups I and II in fecal samples. Of the 173 stool samples analyzed, 29 (16.76%) tested positive, 144 (83.32%) tested negative. When evaluated by age group, the group of children between 6-13 years old presented the greatest number of positive samples (8), followed by the group of children between 0-5 with 7 positive samples. The highest frequency of *norovirus* was found in samples of heterogeneous appearance, brown-green color, soft and alkaline consistency; also, 19.08% of the samples tested positive for some type of parasite (Protozoa or Helminthes), visible with direct microscopic examination. So, we can conclude that it was shown that 16.76% of the diarrheas in the evaluation group were due to *norovirus*, its determination being important for the diagnosis of gastroenteritis.

Key words: *Norovirus*, gastroenteritis, fecal analysis, stool analysis.

1. Laboratorio del Hospital José Gregorio Hernández.

2. Laboratorio de Producción y Control de Calidad Corpodiagnóstica C.A.

3. Instituto de Oncología y Hematología. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

Las Gastroenteritis en Venezuela constituyen hoy en día, el principal problema al cual se enfrenta todo el sector de salud, debido a que es la principal causa de muerte y morbilidad en la población infantil nacional, y siendo esta la más sensible y de mayor importancia para el presente y futuro de un país, se establece la necesidad de investigar y actuar de forma expedita para lograr el control de la situación en el más corto de los plazos posibles.

Es un hecho notable que la mayoría de los diagnósticos de gastroenteritis que se realizan en nuestro país, son adjudicados a agentes etiológicos y/o causas desconocidas; esto se debe principalmente a la carencia de técnicas científicas y enfoques diagnósticos competentes, en los laboratorios clínicos de los principales centros de salud públicos y privados de nuestro país, los cuales difieren enormemente de lo observado en países desarrollados como Alemania, Estados Unidos de Norte América y Japón, entre otros.

La falta de adecuadas metodologías y tecnologías diagnósticas en el laboratorio de rutina, capaces de incluir a todos los posibles microorganismos causantes de gastroenteritis, es lo que no permite una identificación específica de el o los principal (es) agente (s) causal (es) de gastroenteritis, aumentando aún más la prevalencia de gastroenteritis en nuestro país, al imposibilitar la implantación de campañas epidemiológicas de mayor efectividad, como las que se observan en aquellas patologías en donde se diagnóstica de forma correcta el agente causal por ejemplo: Dengue, Malaria, Tuberculosis, Fiebre Amarilla, entre otras, en la cual se evidencia un mayor y coordinado esfuerzo sanitario en la prevención, diagnóstico y control de su prevalencia e incidencia.

Considerando estos hallazgos, y conociendo que hasta el momento la documentación existente en nuestro país en el área es limitada y no muy promocionada, nos abocamos al estudio y evaluación de la prevalencia del *norovirus* en la población asistente a la consulta externa del Laboratorio Clínico del Hospital José Gregorio Hernández en Caracas, Venezuela durante el período correspondiente a los meses Julio y Agosto de 2005.

Seleccionamos al *norovirus*, como el agente etiológico de estudio en nuestra investigación, por ser actualmente el principal virus causante de brotes de gastroenteritis a nivel mundial reportado.

Este trabajo busca contribuir a la base de datos que se está desarrollando en nuestro país, no sólo con el estudio de *norovirus*, sino también con investigaciones orientadas al estudio de *rotavirus*, *adenovirus* y *astrovirus* como agentes etiológicos virales causantes de gastroenteritis.

Las gastroenteritis se definen como una inflamación aguda del estómago y de los intestinos grueso y delgado; están mayormente asociadas a malas condiciones higiénicas, hacinamiento y desnutrición. Las gastroenteritis son particularmente importantes entre la población infantil, debido a que los niños son más susceptibles a la deshidratación y tienen escasas reservas calóricas, al igual que un sistema inmune no desarrollado en su totalidad. Dentro de los síntomas de la gastroenteritis se encuentra la diarrea (1). La diarrea se define como la presencia de tres o más deposiciones anormalmente líquidas con o sin sangre en un día, según la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2005). En Venezuela se estima que anualmente ocurren aproximadamente 1,32 millones de casos de diarreas (1). Entre los años 1997 al 2002, las diarreas han representado el 39.9% de las causas de muerte en niños menores de 5 años en Venezuela (2). Las gastroenteritis pueden ser causadas por diversos agentes etiológicos tales como virus, bacterias o parásitos. La OMS establece a los patógenos virales como la causa más común de gastroenteritis; entre los principales agentes virales tenemos a: los *rotavirus*, *adenovirus*, *astrovirus*, y *norovirus* (3).

Los *norovirus* (NVs), anteriormente llamados Norwalk-like Virus (NLV) forman parte de la familia *Caliciviridae*, y actualmente son considerados como los principales agentes virales asociados a brotes de diarreas no bacterianas (4,5).

Según un informe de la OMS sobre el estado actual de las infecciones alimentarias en países de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) y presentado el año 2004, indica que entre los años 1.995 y 2.000 más del 85% de todos los brotes de gastroenteritis registrados en Europa fueron debidos a la presencia de *norovirus* (6-8).

El nombre *norovirus* se asigna a un grupo de virus patógenos al humano, que morfológicamente se presentan como partículas pequeñas de estructura redonda (SRSVs: Small Round Structured Viruses). Estos últimos obtuvieron su nombre debido a la típica estructura de su superficie similar a cálices alineados (latín: calix = cáliz). Hoy en día los *norovirus* están clasificados dentro de la familia *Caliciviridae* (10).

Como sabemos el único reservorio natural de los *norovirus* son los seres humanos, y las sustancias eliminadas por el organismo continuamente retornan el virus al ambiente, contaminando por esta vía los alimentos que constituyen la cadena alimenticia (11).

Recientes estudios, utilizando biología molecular, han confirmado que el 50% de los voluntarios expuestos al *norovirus* son susceptibles a contraer la infección y aproximadamente el 80% de estos son asintomáticos (16).

El tiempo de incubación para la presentación de los síntomas luego de la infección, oscila entre 6 y 48 horas con una dosis de infección de sólo 100 partículas virales, y por ser ésta extremadamente baja, brinda las condiciones idóneas para una propagación muy efectiva de persona a persona (9).

Las personas infectadas con el *norovirus* pueden transmitir el virus desde el momento en que aparecen los primeros síntomas de la infección hasta aproximadamente 3 días posteriores a su recuperación. Algunas personas pueden llegar a ser transmisoras del virus por un período más largo de hasta 2 semanas después de su recuperación clínica (12).

Es importante destacar, que las infecciones con *norovirus* no son tratadas con antibióticos; ya que, no existen medicamentos que actúen en contra de los virus entéricos, y el único tratamiento recomendado durante la infección consiste en la rehidratación oral con fluidos (agua o jugos) (15).

Recientemente se desarrolló una prueba de ELISA (Enzyme Ligand Immuno Sorbent Assay), actualmente disponible en el mercado; el test RIDASCREEN® *norovirus* ELISA fabricado por r-biopharm AG, Alemania. Ridascreen *norovirus* ELISA, el cual utiliza una metodología diagnóstica más rápida y sencilla de tamizaje, que nos posibilita una detección altamente específica de *norovirus* de ambos genogrupos (GI y GII) (17).

Este inmunoensayo ha sido validado internacionalmente al ser comparado con técnicas de PCR en Alemania, Reino Unido y más recientemente en Venezuela (17,18).

La sensibilidad y especificidad obtenida del ensayo RIDASCREEN®, usando PCR como prueba de gold estándar, fue de un 95.6% respectivamente (19).

Los métodos actuales de ELISA que determinan la presencia del antígeno, representan una buena solución. Su límite de detección es, de 105 partículas por ml de muestra de heces, mejor que el de la microscopía electrónica y, sin embargo, inferior al de la PCR. Funciona para el análisis de muestras de heces de personas clínicamente enfermas (vómitos y/o diarrea), en las que, por regla general suele haber una carga viral suficiente (105 partículas/ml), no supone ningún problema (20-22).

Otra ventaja de la prueba de ELISA reside en la posibilidad de realizar análisis de un gran número de muestras en poco tiempo y a unos costos razonables. Además, el ELISA se muestra menos susceptible ante modificaciones en los antígenos a analizar (proteínas cápsides) que las estructuras objetivo en la PCR (secuencia básica de los genes). En este último caso, mutaciones puntuales individuales conducen a una no conjugación repentina de los *primers* con su secuencia objetiva definida. Mutaciones puntuales de ese tipo no se producen; sin

embargo, modificaciones perjudiciales inmediatas en los epítomos de la cápside del virus, no son importantes para el método ELISA, de forma que los anticuerpos utilizados en ELISA pueden, sin pérdida de eficacia, absorber el antígeno aunque a nivel de genomas hayan transcurrido previamente mutaciones perjudiciales para el análisis por PCR (16,23,24).

El *norovirus* se presenta como uno de los principales agentes etiológicos responsables de gastroenteritis en muchos países tales como EEUU, Alemania, Japón, Suecia y otros; sin embargo, sólo hasta hace un par de años se encuentra disponible una metodología diagnóstica inmunoenzimática (EIA) para *norovirus* (Prueba de ELISA) aplicable a la mayoría de los Laboratorios Clínicos y Centros de Investigación del país; la cual, a diferencia de la microscopía electrónica y el PCR, no requiere de costosa instrumentación, capacitación especial del personal ni de condiciones de trabajo específicas para su realización.

Entonces, al estar disponible una prueba comercial tipo ELISA de rápida elaboración, se posibilita la detección de los *norovirus* en los Laboratorios Clínicos de rutina del país, reportando el resultado obtenido en pocas horas, y por otro lado, dependiendo de la importancia que se le determine a los *norovirus* dentro del cuadro de agentes causales de diarrea en Venezuela, se puede contribuir a aumentar la sensibilidad diagnóstica de la investigación de gastroenteritis en el país, incluyendo la investigación de *norovirus* en el proceso, y finalmente contribuir a la disminución del elevado número de resultados negativos reportados diariamente en las muestras de heces en nuestros laboratorios de los distintos Centros de Salud.

La prevalencia de una enfermedad es el número de casos que presentan la enfermedad, dividido por el número de individuos que componen la población en un determinado momento. Es un parámetro útil porque mide la frecuencia de la enfermedad, y es de gran ayuda para los médicos al calcular la probabilidad de alcanzar ciertos diagnósticos (9).

Basados en estos hallazgos decidimos:

1. Determinar la importancia de *norovirus* como agente etiológico causante de gastroenteritis, en pacientes que asisten a la consulta externa del Laboratorio Clínico del Hospital José Gregorio Hernández durante el período correspondiente a los meses Julio y Agosto de 2005.
2. Determinar si las condiciones ambientales y sanitarias presentes en la comunidad en estudio, proporcionan condiciones que permitan al *norovirus* pasar de un agente productor de brotes de diarreas a un residente permanente.
3. Analizar los esquemas y técnicas diagnósticas actualmente utilizados en nuestros centros de salud, verificando la posibilidad de inclusión de nuevas y modernas técnicas de enfoque adaptables a los distintos laboratorios que conforman la red nacional.

Materiales y métodos

Población a estudiar

Se estudiaron 173 muestras de heces de pacientes que asistieron a la consulta externa de laboratorio clínico del Hospital José Gregorio Hernández.

1. Recolección e identificación de las muestras de heces:

Las muestras de Heces fueron llevadas por los pacientes asistentes a la consulta externa del Laboratorio Clínico del Hospital José Gregorio Hernández en recolectores de heces plásticos. Una vez recibidas, se identificaron y se llenó una boleta con el nombre completo del paciente, la edad, sexo y la fecha de recepción de la muestra.

2. **Registro de los datos demográficos:** Los datos demográficos de los pacientes, edad, sexo y procedencia, se registraron a partir de las boletas llenadas al momento de la recepción de las muestras de heces en el Laboratorio Clínico.

3. **Registro de las características macroscópicas y microscópicas de las muestras de heces:** En el momento de la recepción de la muestra se tomó nota del color, el aspecto Homogéneo o Heterogéneo de las heces, se indicó la reacción ácida o alcalina utilizando una tira de papel tornasol indicadora de pH y por último se realizó una observación microscópica directa en porta objetos de vidrio utilizando solución salina y lugol como diluyente (18).

4. **Transporte y preservación de las muestras de heces:** El transporte de las muestras de Heces desde el Hospital al laboratorio fue llevado a cabo en envases plásticos herméticos dentro de una cava refrigerada (2-8°C) y fueron preservadas en un congelador a (-20°C) hasta el momento de su procesamiento (19).

5. **Tratamiento de las muestras de heces:** Las muestras de heces se diluyeron 1/6 (V/V) con el buffer diluyente suministrado por el kit. Este diluyente está constituido por 75 mM de buffer fosfato ajustado a un pH 7.4, el cual viene listo para usar.

Se Tomó 0.1 mL de muestra de heces líquidas en una pipeta Pasteur o en el caso de que las muestras que eran sólidas se tomó una alícuota equivalente a 100 mg y se mezcló con 0.5 mL del buffer diluyente. Las muestras fueron centrifugadas a 2000-2300 G y se utilizó 100 µl del sobrenadante de la muestra para la realización de la prueba.

6. **Preparación del buffer de lavado:** Se diluyó 1/10 (con agua destilada) la solución concentrada de Buffer de lavado incluida en el kit, la cual contiene 0.1% Thimerosal a un pH 7.2.

El buffer de lavado ya diluido tiene un período de duración de 4 semanas a una temperatura entre 2-8°C.

7. **Procesamiento de las muestras de heces:** La metodología utilizada para la detección de *norovirus* es un ensayo inmunoenzimático denominado ELISA RIDASCREEN® *norovirus*, de la casa comercial r-biopharm AG (Germany),

el cual permite el diagnóstico *in vitro* mediante la identificación cualitativa de los *norovirus* genogrupo I y II en muestras de heces.

En la superficie de los micropozos se encuentran fijados anticuerpos monoclonales provenientes de ratón en contra la cápside del antígeno NLV específico para ambos genogrupos. Las muestras, el control positivo (antígeno recombinante de *norovirus*) y el control negativo (solución Buffer de NaCl) se pipetea en el interior de los pozos y posteriormente son incubados (para la fijación de las partículas virales) a temperatura ambiente por 60 minutos y de esta manera se favorece la interacción entre el anticuerpo específico NLV y los antígenos presentes en las muestras de heces.

Seguidamente se realiza el paso de lavado (punto decisivo en la prueba) que se inicia con una aspiración o decantación de todo el contenido de los micropozos de la placa, seguido por la colocación del buffer de lavado, proceso que se repite 5 veces. Posteriormente se añaden a los pozos anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) y se incuban a temperatura ambiente durante un período de 60 minutos. Se cubre la placa de Elisa con papel parafina para evitar pérdida de muestras y/o controles por evaporación durante el período de incubación. Una vez cumplido el período de incubación realizamos nuevamente el proceso de lavado.

Si el *norovirus* esta presente, éste se encuentra capturado entre los anticuerpos fijados en la fase sólida del pozo.

Posteriormente, se agrega 100 µl del conjugado enzimático a los pozos de la placa que contienen muestras y/o controles y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se repite el paso de lavado nuevamente. El conjugado-HRP que no fue unido es removido por el lavado.

Seguidamente, se agregan 100 µl de sustrato en cada pozo para la formación del componente coloreado. Se recubre la placa y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura.

La enzima unida a los pozos convierte el color del sustrato/cromógeno a un color azul. Seguida la última incubación, la reacción se detiene al agregar 1 gota de solución de parada (ácido clorhídrico 1N) en cada micropozo. Al agregar la solución stop se convierte el color azul en amarillo por el cambio del pH efectuado.

Finalmente, la D.O. (Densidad Óptica) se mide a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra de heces.

En cada corrida realizada se procesaron 10 muestras controles, cuya negatividad fue previamente confirmada por PCR, las cuales se consideraron como controles negativos verdaderos; así mismo, se corrió un pool de muestras positivas también confirmadas por PCR³ para garantizar la capacidad de detección de los kits utilizados.

8. Análisis del procesamiento de las muestras de heces y controles: Tanto el control positivo como el control negativo se procesaron cada vez que se realizó el inmunoensayo, para verificar la estabilidad de los reactivos y el correcto desarrollo del procedimiento.

La corrida se consideró correcta si la D.O.^{405 nm} del control negativo era menor a 0.20 y la D.O.^{405 nm} y para el control positivo que fuese mayor de 0.5 D.O.^{405 nm}¹⁹.

9. Cálculos del cut-off o punto de corte: El cut-off lo determinamos al adicionar 0.15 unidades de absorbancia al valor obtenido del control negativo, tal como lo indica el inserto del fabricante.

$$\text{Cut-off} = \text{valor de absorbancia del control negativo} + 0.15$$

10. Interpretación de los resultados obtenidos: Las muestras se consideraron positivas si los valores de absorbancia eran mayores al cut-off calculado; las muestras negativas fueron aquellas que tenían valores de absorbancia menores al valor del cut-off calculado.

Aquellas muestras que tuvieron valores de absorbancia dentro del rango correspondiente a un 10% mayor o menor al valor del cut-off calculado, no se consideraron claramente como positivas o como negativas sino más bien como indeterminadas. Estas muestras fueron procesadas nuevamente.

Resultados

Resultados de los controles de calidad de las corridas de ELISA

Como control de calidad para la metodología aplicada, se procesaron conjunto a cada corrida, 10 micropozos con un pool de muestras positivas y negativas para *norovirus*, confirmadas previamente por PCR; de estos se obtuvieron 80 resultados positivos y 80 resultados negativos, obteniendo así un 100% de reproductibilidad en ambos casos. (Se realizó 8 tandas de corridas de muestra).

Además, se procesaron los controles positivos y negativos incluidos en el kit de ELISA para cada corrida, calculándose el cut-off y obteniéndose resultados dentro del rango establecido.

Tabla 1. Resultados obtenidos de los pool de muestras controles (Pool de muestras positivas y Pool de muestras negativas, suministradas gentilmente por el Laboratorio de Biología de Virus del IVIC) (18).

Pool de muestras control.	Resultados obtenidos positivos (+)	Resultados obtenidos negativos (-)	Porcentaje de acierto (%)
1. Positivas	80	0	100
2. Negativas	0	80	100

Resultados previamente confirmados por PCR.

Todo esto nos indica que los resultados obtenidos están dentro de las especificaciones técnicas del fabricante y que además los kits que se utilizaron para la realización del trabajo muestran un correcto funcionamiento y capacidad de detección.

La sensibilidad y especificidad del kit RIDASCREEN® *norovirus* de r-biopharm AG, Alemania es de 95,0% respectivamente según lo reporta el inserto del mismo al compararlo con estudios de PCR; así mismo, se determinó un valor predictivo positivo de 93,8% y negativo de 96,1%

Asumimos que nuestros resultados son válidos hasta los límites que presenta la técnica utilizada, en este caso del kit RIDASCREEN® *norovirus* de r-biopharm AG, Alemania (14).

Prevalencia de la infección de *norovirus* en la población en estudio

Durante la realización de este trabajo de investigación se analizaron un total de 173 muestras de heces, de las cuales se obtuvieron 29 resultados positivos para *norovirus* y 144 negativos, correspondientes a un 16.76% y un 83.32% respectivamente del total de las muestras Tabla 2.

Se determinó un 16,76% de prevalencia para *norovirus* en la población en estudio para el período de tiempo seleccionado.

Tabla 2. Resultados positivos y negativos para *norovirus* del total de muestras de heces analizadas.

Muestras	Casos (n)	Porcentaje (%)
Positivas	29	16.763
Negativas	144	83.236
Total	173	100

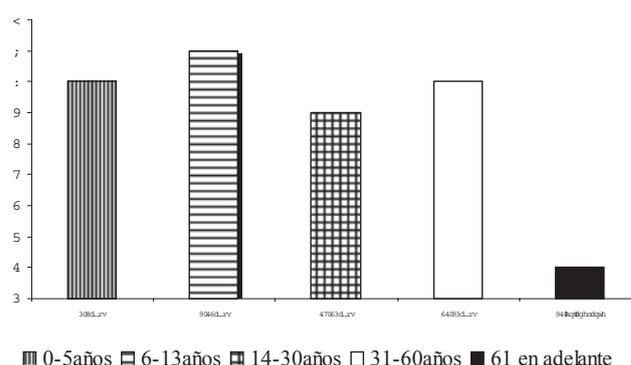


Figura 1. Distribución de muestras positivas para *norovirus* de acuerdo a la edad.

Observamos que el grupo etario con mayor número de casos positivos para *norovirus* es el comprendido por niños entre los 6-13 años, del cual obtuvimos 8 muestras positivas.

Seguidamente el grupo correspondiente por niños entre 0-5 años, en donde encontramos 7 muestras de heces positivas para *norovirus* en igual proporción que el grupo de adultos de 31-60 años. Posteriormente 6 muestras de heces positivas a *norovirus* correspondientes al grupo de adultos entre 14-30 años; y finalmente se presentó 1 sola muestra de heces positiva para *norovirus* en pacientes mayores de 61 años.

Como se puede visualizar en la Figura 1, el virus no presenta una especial predilección por grupo etario, aunque se destaca, que en los adultos mayores de 61 años sólo encontramos un caso, esto pudiese ser circunstancial y obedecer a las características del periodo de tiempo y a la población escogida para el estudio; sin embargo, la realización de trabajos complementarios con mayor número de pacientes, contribuiría a dilucidar aún más en el grupo etario de mayor riesgo para la infección.

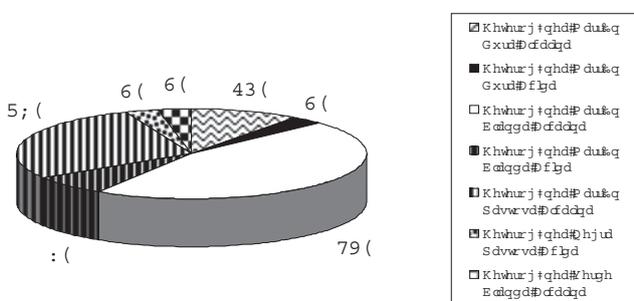


Figura 2. Distribución porcentual de las características macroscópicas provenientes de resultados positivos para *norovirus*.

Al realizar el examen Macroscópico de las muestras de heces en estudio, se encontró una mayor frecuencia de *norovirus* en muestras con aspecto heterogéneo, color marrón y verde, de consistencia blanda y de reacción alcalina. Todas estas características sumadas ocupan el 74% de los casos estudiados.

Co-infección de *norovirus* con otros parásitos (Potozoarios y/o Helmintos)

De las 173 muestras de heces analizadas, se encontró que un 19.08% fueron positivas para algún tipo de parásito (Protozoarios y/o Helmintos) visibles en el examen microscópico directo.

Por otra parte observamos, que del 16,76% de las muestra positivas, un 14,59% fueron positivas únicamente para *norovirus*, un 4.16% de las muestras fueron positivas para *norovirus* y *Blastocystis hominis*; un 0,69% de las muestras fueron positivas a *norovirus* concomitantes con *chylomastix mensnili* y por último un 0,69% de las muestras fueron positivas a *norovirus* y a Blastosporas.

Tabla 3. Resultados positivos y negativos para algún tipo de parásito (Protozoarios y/o Helmintos identificables en el examen microscópico directo.

Presencia de parásitos	Casos (n)	%
Positivos	33	19,08
Negativos	144	80,92
Total	173	100

Discusión

I. La prevalencia de *norovirus* encontrada en las muestras de heces de pacientes que asisten a la consulta externa del Laboratorio Clínico del Hospital José Gregorio Hernández, fue de 29 muestras positivas para el virus, correspondientes a un 16,76%, de un total de 173 muestras analizadas durante el periodo de estudio seleccionado.

Queda claro que a través de la realización de este trabajo de investigación, determinamos que el *norovirus* constituye un importante agente etiológico causante de gastroenteritis en la población seleccionada para el estudio durante el tiempo que duro el mismo.

Dado que esta población la podemos considerar como representativa de un importante sector de la población Venezolana que vive en condiciones similares en todo el país, conjuntamente con el hecho de que los cambios climáticos en la región (temperatura, humedad, lluvias, etc.) no varían de forma significativa a lo largo del año, planteamos la posibilidad de que el *norovirus* pudiese estar presente en otras comunidades de condiciones parecidas, de la similar forma en la cual lo hemos hallado en nuestra investigación.

Es bien conocido que actualmente en Venezuela, las características demográficas de una población como la residente en los Magallanes de Catia, representan las condiciones en las que habitan por lo menos el 80% de la población; también podemos percibir que en muchas otras comunidades, se empeoran las condiciones higiénicas y facilidades sanitarias, como es el caso de muchas barriadas populares de los estados más pobres del interior del país.

Entonces, un agente viral altamente contagioso como el *norovirus*, podría encontrar en nuestras barriadas populares el medio de cultivo y supervivencia ideal, para generar brotes que trasciendan la barrera de lo esporádico, y convertirse así en un residente permanente generador de gastroenteritis en nuestra población.

Si añadimos el hecho de que los virus en general son mas resistentes a los cambios del entorno ambiental que las bacte-

rias, los parásitos protozoarios y los helmintos, y que en particular, el *norovirus* presenta una muy marcada variabilidad genética que le hace mucho más efectivo para la infección y producción de gastroenteritis de forma recurrente, encontramos allí otras razones que fortalecen nuestra posición de que el *norovirus* está jugando actualmente un papel muy importante en la salud pública de nuestro país, adquiriendo mucho más relevancia que otros agentes etiológicos de gastroenteritis no virales.

Otro factor que no debemos dejar a un lado, es el hecho comprobado de que los *norovirus* infectan animales con mucha frecuencia. Tal es el caso del cerdo.

Este factor de infección exitosa en otras especies, trae la posibilidad de adquirir el *norovirus* a partir de fuentes no humanas.

Es muy probable, dada la alta variabilidad genética de los *norovirus*, que estas partículas virales provenientes de animales puedan infectar humanos; sin embargo, se requieren otras investigaciones para aclarar este punto en particular, y para fines de control epidemiológico es importante actuar atacando todos los focos de infección posibles, por lo que este es, un punto que no se debería descuidar en ninguna campaña de prevención y control de Gastroenteritis causadas por *norovirus* y otros virus de los cuales se posee información de infección en otras especies (por ejemplo: *rotavirus* y *adenovirus*).

II. Las muestras de heces positivas para *norovirus*, presentaron predominantemente las siguientes características macroscópicas: aspecto Heterogéneo, color marrón, consistencia blanda, pastosa y reacción alcalina (todas estas características reunidas suman un total de 72%).

Podemos considerar que la alcalinidad y la pérdida de consistencia de las heces, son alteraciones que se explican debido al desequilibrio hidroelectrolítico que generan los mecanismos de patogenicidad del *norovirus* en el aparato gastrointestinal.

Estos mecanismos de patogenicidad consisten en replicar grandes cantidades del ARN viral al invadir el interior de las células intestinales, en el cual se multiplican sucesivamente hasta un punto en el que la pared celular de la célula intestinal no tiene la capacidad de distenderse más y se rompe liberando abundantes cantidades del virus.

Estas partículas virales liberadas, son capaces de colonizar nuevas células del epitelio intestinal y así sucesivamente invadir a todas las células aledañas del tracto gastrointestinal.

Este mecanismo de patogenicidad ocasiona la destrucción del epitelio intestinal del individuo infectado con *norovirus*, impidiendo así que las células que conforman este epitelio puedan realizar varias de sus principales funciones, como lo son:

el control del equilibrio hidroelectrolítico y la absorción y degradación de los alimentos ingeridos en la dieta diaria, trayendo como consecuencia la aparición de las manifestaciones comúnmente observadas al contraer la infección, a saber, las diarreas y vómitos a repetición por periodos prolongados, deshidratación y malestar general.

Es muy poco frecuente encontrar sangre en las heces provenientes de pacientes infectados con *norovirus*. Este hecho conjuntamente con las características reportadas en nuestra investigación, podrían ser de utilidad para el Bioanalista que analiza las muestras de heces de pacientes con diarreas, de tal manera de orientar sus estudios hacia la investigación de microorganismos virales.

Es importante aclarar que de ninguna manera se debe tomar las características físico químicas de las heces como patognomónicas de ningún agente etiológico en particular; sin embargo, su valor orientador acerca de que metodologías y enfoques diagnósticos se deben seguir por parte del Bioanalista, deben ser tomadas en cuenta al momento de seleccionar y priorizar cual o cuales grupo(s) de microorganismos infecciosos investigar en una muestra determinada.

Actualmente y sin ninguna razón específica que lo valide, el enfoque del laboratorio en el diagnóstico de las diarreas, se dirige inicialmente hacia el descarte de protozoarios y helmintos, seguidamente por el estudio de la presencia de bacterias aeróbicas y sólo si el médico así lo requiere en algunos centros de diagnóstico privados se evalúa la presencia de *adenovirus* y *rotavirus*.

Este esquema hoy en día se muestra obsoleto y muy alejado de la realidad mundial para el diagnóstico de gastroenteritis; por lo cual, es imperativo cambiar los esquemas diagnósticos de nuestro sistema de salud hacia un enfoque que sitúe a los virus entéricos como punto de inicio de cualquier estudio etiológico de las diarreas.

Aunque para los actuales momentos el diagnóstico de laboratorio para la identificación de los virus es mucho más costoso que el examen microscópico simple, ante un problema de la magnitud de las gastroenteritis en Venezuela, el factor costo no debe ser lo que determine la estrategia diagnóstica a seguir en el control del principal problema de salud pública en el país.

Una alternativa pudiese ser la elaboración de marchas analíticas para el diagnóstico de gastroenteritis, dependiendo de las características físico químicas de las muestras y de la historia clínica del paciente.

Por ejemplo, si recibimos una muestra que presente dentro de sus características físico químicas la presencia de sangre, nos

enfocaríamos entonces al diagnóstico de microorganismos cuyos mecanismos de patogenicidad sean invasivos, tales como parásitos: *Entamoeba histolytica*, y bacterias.

En el caso de analizar muestras que presenten características físico químicas tales como, aspecto heterogéneo, color marrón o verde, de consistencia blanda y de reacción alcalina, en un paciente con vómitos habitante de una zona popular con condiciones de hacinamiento, deberíamos enfocar el esquema diagnóstico para este individuo, hacia la identificación de microorganismos cuyos mecanismos de patogenicidad sean menos invasivos del epitelio intestinal; como es el caso de los virus.

De esta manera se pueden crear distintos enfoques o marchas analíticas, que incluyan esquemas y técnicas apropiadas a las características físico químicas de las muestras de heces a analizar y de la historia clínica del paciente, lo cual facilitaría la identificación del o los agente(s) etiológico(s) causante(s) de gastroenteritis en menor tiempo y un más eficiente manejo de los recursos disponibles.

Es importante destacar que las metodologías y técnicas actualmente utilizadas para el diagnóstico de gastroenteritis en nuestros centros de salud públicos y privados, deben ser sometidas a diversos y constantes cambios, que se adapten a las nuevas realidades epidemiológicas de nuestro país.

III. Es posible que el hecho de no haber encontrado preferencia significativa del *norovirus* hacia un grupo etario en especial, puede obedecer a la alta variabilidad genética del microorganismo que impide la consecución de una inmunidad permanente en los individuos de la comunidad, presentándose entonces una alta posibilidad de reinfecciones.

Durante la realización de este trabajo de investigación no se nos permitió el estudio de las historias clínicas de los pacientes, esto nos imposibilitó a determinar el porcentaje de prevalencia en pacientes inmunocomprometidos; sin embargo, cabe suponer que todas aquellas personas cuyo sistema inmunológico se encuentre débil o deficiente serán más susceptibles a contraer la infección con *norovirus*.

Por otra parte, es importante destacar que se han reportado casos en los cuales las personas infectadas con el virus no presentan ningún tipo de sintomatología, por lo que existen personas estarían actuando como portadoras silentes del virus, subestimando así la prevalencia del *norovirus* como agente causal de gastroenteritis.

Ante tal situación es recomendable realizar estudios de investigación en personas aparentemente “sanas”, que no presenten ningún tipo de sintomatología, de manera de completar los estudios estadísticos que demuestren el porcentaje real de

personas infectadas con *norovirus* en una población determinada.

Es importante determinar este tipo de casos en particular, puesto que estas personas portadoras del virus, constituyen una de las principales causas de diseminación del *norovirus*, en las cuales se deben tomar medidas preventivas rigurosas, ya que constituyen fuentes de infección capaces de originar brotes, esto es particularmente importante en aquel grupo de personas encargadas de manipular y procesar alimentos para el consumo humano.

En nuestro país los estudios sanitarios que se realizan para la obtención del certificado de salud para manipular alimentos, no incluyen estudios de virus entericos, además este certificado tiene una validez de un año, dentro del cual pueden acontecer muchos episodios de infección por agentes productores de gastroenteritis.

Esto es diferente en países desarrollados como Alemania y Estados Unidos de Norte América, en donde actualmente se analizan virus entericos en los tests para manipuladores de alimentos, e inclusive se incluye el *norovirus* dentro del panel de análisis realizados.

Esto, aunado a las condiciones ambientales de la comunidad de los Magallanes de Catia, caracterizada por hacinamiento, acumulación de aguas residuales, ventas inadecuadas de alimentos en las calles, entre otros, constituye un ambiente idóneo para la permanencia del virus en la comunidad.

Por esta razón, se hace imprescindible la implementación de campañas culturales que permitan a la comunidad participar en la prevención del contagio y diseminación del virus, y no solamente atribuir responsabilidades a las autoridades sanitarias competentes.

Al lograr que la comunidad tome conciencia de la situación actual en la que vive diariamente y la magnitud del problema de salud que esto acarrea en el país, se magnificarían los esfuerzos preventivos aplicados entre la comunidad y las autoridades obteniendo entonces una disminución de la prevalencia de *virus*, específicamente del *norovirus*, así como también de otros agentes etiológicos causantes de gastroenteritis como lo son las bacterias y los parásitos.

IV. En base a los resultados de coinfecciones con parásitos (Protozoarios y/o Helminthos) no se puede determinar de forma concluyente, cual de los microorganismos involucrados (*norovirus* o parásitos) estaría produciendo el cuadro de diarrea por el cual los pacientes estarían acudiendo al servicio de coprología de nuestros centros de salud. Esto requeriría de estudios minuciosos de la historia clínica de los pacientes, diag-

nósticos diferenciales entre ambos microorganismos que pudiesen estar ocasionando la gastroenteritis, así como también del estudio de otros factores, los cuales se escapan de los límites de este trabajo debido a la dificultad logística que plantea realizar el levantamiento de la información a todos los pacientes que acudieron al servicio del Laboratorio del Hospital, durante el período de tiempo del estudio.

Por otra parte, observamos que el *norovirus* es un microorganismo que no requiere suplementos nutricionales exigentes para su desarrollo ni en grandes cantidades, por lo cual es capaz de convivir en simbiosis con cualquier tipo de parásito sin impedir su establecimiento.

Tampoco se detectó una correlación significativa entre la infección con *norovirus* y la presencia de algún parásito en específico; lo que pareciera indicar que cualquier parásito e incluso la presencia de hongos podrían convivir concomitantemente con el *norovirus* sin impedir su establecimiento como potencial agente causal de gastroenteritis en cualquier ser vivo.

A nivel del diagnóstico es importante en los laboratorios, realizar diagnósticos diferenciales que incluyan técnicas adecuadas y efectivas, aunado a un análisis exhaustivo de la historia clínica del paciente, que permitan identificar el agente etiológico que realmente está causando la patología en curso. De esta manera se podrá suministrar al paciente una mejor terapéutica que le garantice al mismo una recuperación efectiva en el menor tiempo posible.

Así mismo se podrán recomendar medidas preventivas óptimas, que eviten la diseminación de la infección disminuyendo los riesgos de contagio del virus y evitar originar futuros brotes que compliquen el control y la proliferación del *norovirus*.

Por último, con la finalidad de ampliar los estudios existentes actualmente y determinar estadísticamente la prevalencia del *norovirus* en todos los ámbitos que a este le conciernen, es recomendable en estudios posteriores, incluir diagnósticos diferenciales en aquellas muestras de heces que posean dos o más agentes etiológicos causantes de gastroenteritis, con la finalidad de determinar la prevalencia de cada uno de ellos y dilucidar cual de ellos es el agente causal de la gastroenteritis originada.

Conclusiones

Usualmente es posible determinar porcentualmente la capacidad de una técnica analítica diagnóstica para confirmar o descartar la existencia de alguna patología determinada.

En lo que concierne a las Gastroenteritis y sus diversos agen-

tes causales, se infiere que un servicio de coprología de un laboratorio de Bioanálisis será más capaz de detectar el o los agentes causales de las diarreas, mientras más se investiguen todos los microorganismos que pudiesen estar produciendo el cuadro mencionado.

Como es casi imposible, en un laboratorio de rutina bajo las condiciones escasas de recurso y tiempo que existen en la actualidad, poder investigar el gran número de agentes etiológicos posibles, el enfoque del servicio debe ser hacia la investigación de los microorganismos patógenos más frecuentes en el área que atiende el centro hospitalario.

Sumado a esta situación, hay pocas estadísticas disponibles en la mayoría de las áreas específicas de la salud pública en Venezuela; por lo cual, los estudios de prevalencia de distintos agentes etiológicos productores de Gastroenteritis, son requerimientos inexorablemente necesarios en el país.

Mediante una información estadística adecuada, el enfoque diagnóstico del laboratorio, debería cambiar de un enfoque netamente parasitológico y bacteriológico a uno dirigido hacia el descarte de virus, implementado nuevos esquemas y técnicas diagnósticos en nuestros centros de salud.

A nivel mundial, los virus constituyen la primera causa de Gastroenteritis, en un porcentaje 10 veces superior al de los parásitos (protozoarios y helmintos).

Si tomamos en cuenta que en el exámen microscópico, sólo podemos ver algunos de los posibles parásitos productores de diarreas, podemos concluir que la capacidad de detección del servicio de coprología del laboratorio es muy limitada.

En la mayoría de los laboratorios del país, no se investigan virus y esto en parte explica el alto número de resultados negativos que se reportan a diario en dichos servicios.

En este trabajo se demuestra, que para el período de tiempo escogido, el 16,76% de las diarreas pudieron tener como agente causal al *norovirus*; lo cual, es una información significativa que no se suministró al paciente o al médico tratante; por consiguiente, las personas infectadas con el virus no tomaron las medidas preventivas adecuadas para evitar la diseminación del virus, pudiendo originar posteriores complicaciones y brotes.

Por otra parte, estudios posteriores podrían demostrar la importancia del *norovirus* como agente etiológico de gastroenteritis en Venezuela y, siendo este el principal problema de salud pública infantil de nuestro país, se recomendaría incluir el estudio del *norovirus* para el diagnóstico de Gastroenteritis en los distintos laboratorios y centros diagnósticos del país.

Del mismo modo cabe esperar que otros virus tales como: *rotavirus*, *astrovirus* y *adenovirus*, pudiesen estar presentes, así como bacterias pero eso es materia que requerirá ser dilucidada en investigaciones ulteriores.

El hecho de que el *norovirus* se ha asociado históricamente con la producción de brotes aislados, a nivel mundial, en un ambiente con las condiciones particulares de los Magallanes de Catia, existe la posibilidad, que el virus no haya podido ser eliminado completamente de la comunidad y encontrarse en constante reciclaje; lo cual, lo convierte en un residente permanente del sector.

Es importante recordar que la presencia de *norovirus* se encuentra asociada a brotes, que por lo corto del tiempo estipulado para el desarrollo de este trabajo de investigación, no pudimos extendernos en el tiempo; por lo cual, recomendamos continuar dicha investigación durante un período más prolongado que permita identificar brotes, si los hubiere, y así poder determinar la frecuencia del mismo en las distintas épocas del año.

Referencias

1. Urrestarazu MI y col. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Rev Panamericana de Salud Pública* 1999;6:149-156.
2. Instituto Nacional de Estadísticas (INE). Principales causas de muerte en Venezuela, 1997-2002. Sitio web: www.ine.gob.ve.
3. Centro de Microbiología y Biología Celular Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Venezuela, 2005.
4. Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ & Estes MK. A comparison of the reactivities of the baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with the native Norwalk virus in serologic assays and some epidemiologic observations. *Jour Clin Microbio*. 1993;2185-2191.
5. http://www.uc.edu.ve/biologia/pdf/taxo_virus2.pdf.
6. Tompkins DS, Hudson MJ, Smith HR, Eglin RP, Wheeler JG, Brett MM, et al. A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun Dis Public Health*, 1999;2:108.
7. Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001;154:666-674.
8. Lopman BA, Reacher MH, van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D and Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9:90-96.
9. CDC (center for disease control and prevention), *MMWR* (morbidity and mortality weekly report) 2005; vol. 50/ N. RR-9.
10. Jonathan A. Burton-MacLeod, Erin M. Kane, Rachel S. Beard, Leslie A. Hadley, Roger I. Glass, and Tamie Ando, Evaluation and Comparison of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Antigenically Diverse Human Noroviruses in Stool Samples, *Journ Clin. Microbio*. 2004;42: 2587-2595.
11. Green KY, Ando T, Balayan MS, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ and Theil HJ. *Family Caliciviridae*. In: *Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses*. Seventh ICTV report. Academic Press, San Diego, 2000;725-739.
12. Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM. Norwalk group of viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996;783-810.
13. Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, et al. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:261-4.
14. McAnulty JM, Rubin GL, Carvan CT, Huntley EJ, Grohmann G, Hunter R. Outbreak of Norwalk-like gastroenteritis associated with contaminated drinking water at a caravan park. *Aust J Public Health* 1993;17:36-41.
15. Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1982;96:756-61.
16. Ando T, Mulders MN, Lewis DC, Estes MK, Monroe SS, Glass RI. Comparison of the polymerase region of small round structured virus strains previously classified in three antigenic types by solid-phase immune electron microscopy. *Arch Virol* 1994;135:217-26.
17. National Reference Center of the Robert-Koch-Institute in Berlin. Validation released in Germany, 2002-2003.
18. Luis Ernesto Ludert, Germán González Centro de Microbiología y Biología Celular Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas-Venezuela. Trabajo por Publicar, 2005.
19. ELISA RIDASCREEN® *norovirus*, R-biopharm, Germany.
20. Rodríguez M. Parásitos intestinales. Métodos de diagnóstico. *MSDS*. 1995;390-405.
21. Jiang X, Matson DO, Cubitt WD, Estes MK. Genetic and antigenic diversity of human caliciviruses (HuCVs) using RT-PCR and new EIAs. *Arch Virol Suppl* 1996;12:251-62.
22. Jiang X, Cubitt D, Hu J, et al. Development of an ELISA to detect MX virus, a human calicivirus in the Snow Mountain agent genogroup. *J Gen Virol* 1995;76:2739-47.
23. Jiang X, Matson DO, Cubitt WD, Estes MK. Genetic and antigenic diversity of human caliciviruses (HuCVs) using RT-PCR and new EIAs. *Arch Virol Suppl* 1996;12:251-62.
24. Jiang X, Wang J, Estes MK. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Arch Virol* 1995;140:363-74.



***Candida* en el Departamento de Neonatología de la Maternidad “Concepción Palacios”. enero-junio de 2006**

Garmendia Yolanda ¹, Vergara Vivian ¹, Rodríguez Yun ¹, Benítez Edelmira ¹, Morales María ¹, López Rayza ¹, Torres Luís ²

RESUMEN

En los últimos años la candidemia se ha incrementado en los centros hospitalarios, siendo las áreas de cuidados intensivos donde se observa con mayor frecuencia, ya que los pacientes presentan condiciones que favorecen la instauración de infecciones fúngicas. El objetivo de este estudio fue identificar y conocer la sensibilidad de las especies de *Candida* predominantes en el Departamento de Neonatología de la Maternidad “Concepción Palacios”. De 349 hemocultivos positivos recibidos del 01 de enero al 30 de junio del 2006; 74 (21.3%) desarrollaron *Candida no albicans*, con predominio de *Candida pelliculosa*, una levadura emergente involucrada como agente causal de fungemias, que presentó un patrón de sensibilidad variable.

Palabras clave: Candidemia neonatal, *Candida pelliculosa*, *Candida no albicans*, sensibilidad.

***Candida* in the Department of Neonatology of the Maternity “Concepción Palacios”. january - june, 2006**

SUMMARY

In the last years the candidemia has increased in the hospital centers, being the areas of intensive care where it appears with major frequency, due to those patients present the conditions for the establishment of fungal infections. The goal of this study was to identify and to know the sensibility of *Candida* predominant species in the Department of Neonatology of the Maternity “Concepción Palacios”. Of 349 hemocultivos positivos received from january 01 to june 30, 2006; 74 (21.3 %) desarrollaron *Candida not albicans*, with predominance *Candida pelliculosa* an emergent yeast involved as causal agent of fungemias, that there presented a pattern of changeable sensibility.

Key words: Candidemia neonatal, *Candida pelliculosa*, *Candida no albicans*, sensibility.

1. Maternidad Concepción Palacios.

2. Escuela de Bioanálisis Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela.

Introducción

La mayoría de las infecciones fúngicas intrahospitalarias son causadas por levaduras del género *Candida*. Dichas infecciones se han incrementado en los últimos años, llegando a estimarse en un 5% los pacientes hospitalizados que la padecen (1). Dentro de las mismas, las afecciones urinarias son las más frecuentes y la candidemia, la más importante, siendo el área hospitalaria donde tiene mayor presencia, las unidades de cuidados intensivos (2,3).

Los factores de riesgo son iguales en todos los pacientes hospitalizados, debido a la alteración de sus defensas, ya sean celulares, fisiológicas o en su flora habitual, por lo cual se hace difícil indicar cuál es el grupo con mayor riesgo a presentar infección por *Candida* ya que lo más frecuente es que se presente la combinación de varios factores predisponentes (1,2). El uso de nuevos antimicrobianos que causan alteración de las mucosas, catéteres intravasculares, que rompen las barreras de piel y procedimientos quirúrgicos más agresivos, influyen en el aumento de las infecciones fúngicas (4). Los neonatos, debido a su inmadurez inmunológica, además de la prematuridad, el bajo peso al nacer, la colocación de catéteres intravasculares, ventilación mecánica, nutrición parenteral, neutropenia y antibiótico terapia, son vulnerables a la candidemia, que en este grupo etario se hace presente a partir del décimo día (5,6).

El mecanismo de transmisión puede ser endógeno por la flora colonizante o exógeno a través de la piel, se ha demostrado que la colonización es mayor en prematuros que en recién nacidos a término (1,3). La vía de transmisión ocurre frecuentemente a través de las manos del personal de salud o por infusión parenteral. La presencia de levaduras en los trabajadores hospitalarios varía del 20% al 80% y a pesar de considerarse transitoria es importante en la transmisión exógena (4).

Candida es un hongo que habita en el 50% de la población sana formando parte de su microbiota de piel, tubo digestivo, vías respiratorias superiores y tracto genital (7). Este género posee más de cien especies y todas pueden causar el mismo tipo de enfermedad, desde una candidosis superficial hasta una enfermedad invasiva, aunque no todas presentan la misma patogenicidad ni sensibilidad (1).

Durante varias décadas la especie predominante fue *Candida albicans*, pero hace algunos años aparecieron nuevas especies, las cuales se encuentran distribuidas en la naturaleza, como comensales en muchos mamíferos, aves y en la microbiota de nuestro organismo. Este tipo de levadura es causa importante de sepsis nosocomial especialmente en pacientes inmunosuprimidos.

Para ofrecer un diagnóstico es importante establecer si la levadura está causando la infección o es un colonizante. La recuperación de levaduras provenientes de sitios estériles es indicativo de infección, los hemocultivos positivos indican candidemia que puede ser debida a la colonización de un catéter, candidiasis profunda o candidiasis invasiva. Por el contrario, un hemocultivo negativo no descarta infección. Los cultivos de catéteres son importantes para determinar si ésta es la puerta de entrada de la levadura.

En la Maternidad “Concepción Palacios” de Caracas-Venezuela se reciben pacientes no solo del área metropolitana sino de todas las poblaciones vecinas, muchas de ellas, adolescentes que no siguen un control durante su embarazo, por lo que a la hora del parto el médico desconoce cualquier anomalía que se haya presentado durante ese lapso. A veces no se cumple el tiempo de gestación y el solo hecho de ser prematuro, es una condición que padece el recién nacido, además de otras variables como malformaciones o enfermedades subyacentes.

Estos pacientes prematuros, de bajo peso, de poca talla, inmaduros inmunológicamente, son muy susceptibles de padecer cualquier tipo de infección, entre ellas las ocasionadas por levaduras del género *Candida*, motivo por el cual quisimos conocer la frecuencia y sensibilidad, para contribuir con futuros estudios epidemiológicos, para establecer los mecanismos de transmisión involucrados y la manera como se puede erradicarla, o por lo menos disminuir su presencia.

Materiales y métodos

Se obtuvieron 349 hemocultivos positivos de neonatos prematuros hospitalizados en el Servicio Neonatal de la Maternidad Concepción Palacios durante los meses de enero a julio del año 2006. Dichos hemocultivos fueron tomados siguiendo las normas de asepsia recomendadas y procesados por el sistema automatizado Bact Alert. Las muestras positivas fueron sembradas en Agar Sangre, Agar GC y Agar Levine. Un total de 74 hemocultivos fueron positivos para levaduras y se repicaron en Agar Sabouraud.

A las colonias obtenidas en la placa de Agar Sabouraud después de una incubación de 24 horas, se les realizó la prueba de formación de tubo germinal. Las que resultaron positivas a dicha prueba se reportaron como *Candida albicans*. Las negativas fueron identificadas por el equipo semiautomatizado Mini API de BioMérieux, utilizando galerías ID 32 C. Con la finalidad de distribuir mejor los recursos disponibles, *Candida albicans* se excluyó de las pruebas de sensibilidad. Al resto de las cepas se les realizó pruebas de sensibilidad con el mismo equipo empleando las galerías ATB fungus 2, las cuales evalúan cuatro antifúngicos: Fluconazol, Itraconazol, 5-Flucitocina y Anfotericina B. Ambos procedimientos se realizaron siguiendo las normas del fabricante.

Candida en el Departamento de Neonatología de la Maternidad “Concepción Palacios”

Como Control de Calidad se utilizaron las cepas L- 412000-156 de *Candida krusei* y L – 412000157 de *Candida parapsilosis*, donadas por la Micoteca del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, las cuales se sometieron al mismo procedimiento realizado a las cepas en estudio.

Resultados

Se obtuvieron 349 hemocultivos positivos, de los cuales 74 desarrollaron levaduras del género *Candida*. De éstas, 18 (24.32 %) no pudieron ser identificadas y fueron reportadas como *Candida especie*. El resto, 32 (43.2%) *Candida pelliculosa*; 6 (8.1 %) *Candida tropicalis*; 5 (6.75 %) *Candida albicans*; 5 (6.75%) *Candida parapsilosis*; 4 (5.40 %) *Candida famata*, 2 (2.70 %) *Candida guilliermondii*; 1 (1.35 %) *Candida glabrata* y 1 (1.35 %) *Candida lusitaniae* (Gráfico 1).



Figura 1. Colonias de *Candida pelliculosa* en Agar de Sabouraud.

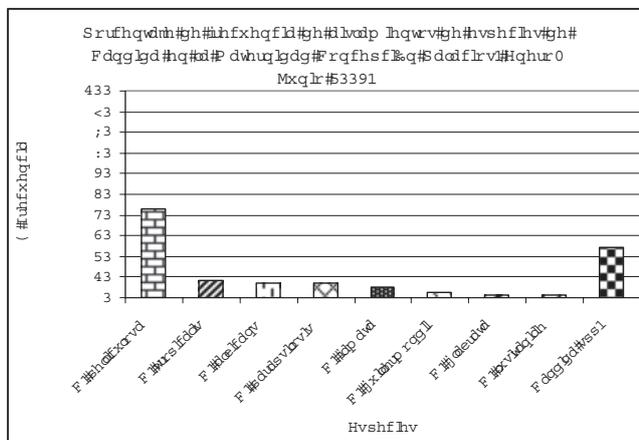


Gráfico 1. Frecuencia de las especies de *Candida no albicans* halladas en la Maternidad “Concepción Palacios” en el primer semestre del año 2006.

La especie más frecuente en el Servicio de Neonatal de la Maternidad Concepción Palacios durante el primer semestre del año 2006 fue *Candida pelliculosa* (Figura 1). *Candida albicans*, no resultó ser la especie predominante en este centro, lo cual constituye un alerta a la aparición de especies no *albicans* como agentes causales de candidemia en los neonatos de la Maternidad Concepción Palacios.

Adicionalmente se realizó una distribución de los aislamientos obtenidos de acuerdo a los meses (Tabla 1) y se observó que solo en el mes de junio no hubo ningún caso de *Candida pelliculosa*. *Candida albicans* no resultó predominante en este estudio. En los otros meses el número de casos varía, siendo marzo el más sobresaliente con un total de 14 casos. Según estos datos la distribución de las diferentes especies no es constante en el tiempo.

Tabla 1. Distribución de las especies de *Candida* aisladas en hemocultivos, según la frecuencia en el tiempo en la Maternidad Concepción Palacios en el primer semestre del año 2006.

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
<i>C. pelliculosa</i>	5	4	14	7	2	0
<i>C. tropicalis</i>	1	1	0	2	1	1
<i>C. albicans</i>	3	0	2	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	2	0	1	0	1	1
<i>C. famata</i>	3	0	1	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	1	0	0	1	0	0
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	1	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Candida spp.</i>	2	7	4	5	0	0
Total	17	12	22	16	4	3

En cuanto a las pruebas de sensibilidad (Tabla 2), se observó que tres de las siete especies encontradas resultaron sensibles a los cuatro antifúngicos probados: *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata* y *Candida lusitaniae*. Cuatro cepas de *Candida tropicalis*, resistentes a Fluconazol e Itraconazol. Todas las cepas de *Candida famata* resistentes al Fluconazol. *Candida pelliculosa* tiene 59.3% de sensibilidad frente a la 5 Flucitosina, 78.1% frente al Fluconazol y un 25% para Itraconazol.

A pesar de no estar establecidos valores de MIC para anfotericina B, los datos obtenidos fueron menores o iguales a 0.05 mcg/l, a excepción de dos aislamientos de *Candida famata* que resultaron mayores de 16 mcg/l.



Tabla 2. Sensibilidad de *Candida no albicans* aisladas en el Departamento de Neonatología de la Maternidad “Concepción Palacios” en el primer semestre del año 2006.

	Flucitocina	Fluconazol	Itraconazol
<i>Candida pelliculosa</i>	59.3 %	78.1 %	25 %
<i>Candida tropicalis</i>	100 %	33.3 %	33.3 %
<i>Candida parapsilosis</i>	100 %	100 %	20 %
<i>Candida famata</i>	50 %	0%	50 %
<i>Candida guilliermondii</i>	100 %	100%	100%
<i>Candida glabrata</i>	100 %	100 %	100 %
<i>Candida lusitanae</i>	100 %	100 %	100 %

Discusión

Candida albicans ha sido desplazada por otras especies en los últimos años, y la prevalencia es diferente en cada región, por ejemplo: en Estados Unidos y Canadá la especie no-albicans predominante en candidemias es *Candida glabrata*, debido quizás al uso de fármacos azólicos (8). En las unidades neonatales de USA, se ha estimado un aumento en la incidencia 10 veces mayor en los últimos 5 años (9). En Chile la *Candida parapsilosis* se asocia a contaminación de instrumental médico y materiales como catéteres (10). Estudios recientes realizados en Brasil y Argentina muestran que *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* comienzan a ser aisladas con bastante frecuencia en la población pediátrica (11,12).

Se ha considerado que la aparición e incremento de estas levaduras emergentes puede relacionarse con la alteración de las defensas del huésped, el uso de procedimientos agresivos en el diagnóstico y tratamiento y con la resistencia propia de estos agentes a los antifúngicos (13). Entre estas nuevas levaduras patógenas tenemos a *Candida pelliculosa* (clase Ascomycetes, Familia Endomycetaceae), la cual se encuentra como flora habitual de frutas, suelo, animales y flora transitoria de garganta, tracto digestivo y piel del ser humano. Es considerada hoy día como invasora, pudiendo causar infecciones en boca, aparato respiratorio, tracto urinario, neumonía, meningitis, endocarditis, ventriculitis y fungemias (14).

Más específicamente sobre *Candida pelliculosa* existen un gran variedad de artículos publicados desde Taiwán y Malasia hasta Brasil y Atlanta. Córdova 2002, Gómez y González 2001 han realizado identificaciones usando la reacción en cadena de la polimerasa (15-19).

En nuestro país el primer reporte sobre *Hansenula anómala* (telemorfo de *Candida pelliculosa*) fue realizado por Natera I. y colaboradores en el Centro Médico de Caracas en el año 1997, como patógeno nosocomial aislada de muestras de sangre (20).

En el Hospital Universitario de Maracaibo, en un trabajo de investigación sobre candidemia, de 92 cepas de levaduras aisladas de hemocultivos, el 5.4 % fue identificada como *Candida pelliculosa* (21).

Por otro lado, el aumento de resistencia es un fenómeno que aparece debido a que el tratamiento con antimicóticos es realizado por periodos prolongados. Por tal motivo el diagnóstico específico del agente y la determinación de su patrón de sensibilidad *in vitro* tiene consecuencias prácticas en la elección rápida y certera de la conducta adecuada (22).

Las especies involucradas varían según el país, el centro hospitalario, dentro del mismo centro, incluso según el año estudiado, por lo que debemos ampliar nuestros conocimientos epidemiológicos y conocer todos los factores de riesgo para ejercer una buena profilaxis (6).

Actualmente las levaduras son causa importante de infecciones nosocomiales que originan altas tasas de morbilidad y mortalidad sobre todo en enfermos inmunodeprimidos y neonatos. Los factores de riesgo son numerosos ligados a los avances en medicina y la transmisión es a través de las manos del personal de salud, canal del parto o aparatos intravasculares.

Conclusiones

En nuestro centro es la primera vez que se realiza un estudio de frecuencia de las diferentes especies de *Candida*, y gracias a los nuevos métodos de identificación, se pudo establecer que en el primer semestre del año 2006, la especie no albicans, más frecuente en casos de candidemia neonatal fue *Candida pelliculosa*. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde *Candida pelliculosa* ha sido aislada como causante de infección invasiva.

Candida albicans fue la tercera especie más frecuente en el mismo periodo. Estos resultados ponen en evidencia que existe un cambio en cuanto a las especies de *Candida* implicadas en fungemias en neonatos. Esto confirma lo planteado por algunos autores en cuanto a un cambio en la dinámica de las especies de *Candida* implicadas en candidemia neonatal.

La resistencia de las especies no albicans a anfotericina B y 5-flucitosina es escasa en la Maternidad “Concepción Palacios”, *Candida pelliculosa* no presenta una sensibilidad predecible. Estos resultados sugieren que las infecciones sistémicas por *Candida pelliculosa* no pueden ser tratadas empíricamente sin conocer su patrón de sensibilidad.

Algunas levaduras patógenas emergentes presentan resistencia intrínseca a los antifúngicos, por este motivo la identificación y el estudio de la sensibilidad *in vitro* deben servir para elegir el tratamiento y evitar un fracaso terapéutico.

Considerando que las manos cumplen un papel importante como vehículo de transmisión exógena de levaduras, y que se reportan un gran número de infecciones fúngicas nosocomiales, es indispensable el control estricto en el lavado de manos de todo el personal sanitario.

Agradecimientos

Lic. Romea Mizrahi por su ayuda en la identificación, Dr. Carlos Cabrera por su asesoramiento, Lic. Maribel Dolande por su guía y sugerencias, Lic. Daniel Santos asistente de redacción. Gabriel Santos y Lic. Mariangela Salazar en el diseño.

Referencias

1. Cantón E, Viudes Á, Pemán J. Infección Sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18:51-55.
2. Febré N, Silva V, Medeiros EA, Wey SB, Colombo AL, Fischman O. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary traces of intensive care unit patients, undergoing urinary catheterization. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1584-6.
3. Barrios A, Martin J, Jannone R, et al. Prospective study of nosocomial infection in a medical UCI. A proposal for the generalized use of the National Nosocomial Infections surveillance system rates. *Rev Clin Esp.* 1998; 198: 284-8.
4. Silva V, Zepeda G, Rybak Maria E, Febré N. Portación de levaduras en manos de estudiantes de medicina. *Rev Iberoam Micol.* 2003;20:41-45
5. Saiman L, Ludington E, Pfaller M. Risk Factors for Candidemia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatric Infect. Dis J* 2000;19:319-324.
6. Viudes A. Fungemias por genero *Candida* Sensibilidad in vitro y correlación in vivo. Tesis doctoral. Facultad de Medicina y Odontología, UMV de Valencia. Valencia 2000, España.
7. Hernández J, García P. Aislamientos de Teleomorfos de muestras clínicas. *Rev Iberoam Micol.* 1998; 15: 235-242.
8. St-Germaine G, Laverdière M, Pelletier R, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:949-953.
9. Kossif EH, Buescher ES, Karlowicz G. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatric Infect Dis J.* 1998; 17: 504 - 8.
10. Pfaller MA, Jones RN, Doren GV, et al. Bloodstream infections due to *Candida species*: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2000; 44: 747-751.
11. Rodero L, Davel G, Córdoba S, Soria M, Cantero C, Hoehenfeller F, Multicenter study on nosocomial candidiasis in the Republic Argentina. *Rev Microbiol.* 1990; 31: 114-9.
12. Sanchez V, Vasquez JA, Barth-Jones D, Denbry L; Sobel JD, Zervos MJ. Nosocomial Acquisition of *Candida parapsilopsis*: an epidemiologic study. *Am J Med* 1993; 94:577-582
13. García P, Domínguez I, Marín P, García R, Aoufi S, Mira J. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz, España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2001; 19: 249-256.
14. Klein AS, Tortora GT, Malowitz R, Greene WH. *Hansenula anomala*: a new fungal pathogen. *Arch Intern Med* 1988;148: 1.210-1.213.
15. Paula CR, Krebs VI, Auler ME, Nosocomial infection in new born by *Pichia anomala* in a Brazilian intensive care unit. *Med Mycol,* 2006; 44(5): 479– 84.
16. Arago P, Oshiro I, Manrique E. *Picha anomala* outbreak in a nursery: exogenous source? *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20(9): 843-8.
17. Wong A, Ibrahim H, Van Rostenberghe H, *Hansenula anomala* infection in a neonate. *J Pediatr Child Health.* 1997; 33(1): 18-25.
18. Hanzen J, Krcmery V. Polifungal candidaemia due to *Candida rugosa* and *Candida pelliculosa* in a haemodialyzed neonate. *Scand J Infect Dis.* 2002; 34(7): 555.
19. Ma JS, Chen PY, Chen Ch, Chi CS. Neonatal fungemia caused by *Hansenula anomala*: a case report. *J Microbiol Inmunol Infect.* 2000; 33(4): 267 -70.
20. Natera I, López A. Murillo J, Guzmán M, Isturiz R, Cordido M, Rubino L Fungemias por *Hansenula anomala*, Hospital Privado Centro Médico de Caracas Boletín Venezolano de Infectología. www.infomediconline.com
21. Mesa L, Arcaya N, Pineda M, Beltran H, Calvo B. Candidemia en el Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela 2000-2002. *Rev Soc Venez Microbiol.* 2005; 2 (25): 109-113.
22. Alvarado D, Diaz M, Silva V. Identification and Antifungal susceptibility of *Candida spp* isolated from in invasive mycoses. Influence of growth inhibition percentage to determine minimal inhibitory concentration. *Rev Med Chile,* 2002: Vol. 130, 416-423.



Expression of gp120 as a surrogate marker in HIV infection

E. Escobar Guevara ¹, A. Monzón de Orozco ², P. Mantilla Guevara ², M. Ochoa Díaz ³,
M. Pacheco ⁴ and E. Marcano de Herass ⁵

SUMMARY

Ninety seven patients infected with HIV -1 were studied to evaluate the expression of gp120 in peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes as a surrogate marker of disease progression, analyzing correlation of it with viral load, T cell subsets, expression of activation markers, HAAR T and clinical signs and symptoms. In patients who had not received any antiretroviral therapy (naive), expression of gp120 had a positive correlation with expression of CD95 in CD4⁺ T lymphocytes (p=0.0409) and a negative correlation with CD4⁺ T lymphocytes percentage (p=0.0183) and absolute values (p=0.0165), and with percentage of naïve CD4⁺ T cells (p=0.0126). In patients under highly active antiretroviral therapy (HAAR T) those correlations were not present. Expression of gp 120 had good correlations with some known surrogate markers of disease progression in naïve patients, but its low level of expression and the fact that those correlations disappear when HAAR T is initiated, limit the use of it as an independent surrogate marker.

Key words: gp 120 in HIV, T cell CD4⁺, surrogate marker.

Expresión de gp120 como marcador de progresión en la infección por VIH

RESUMEN

Se estudiaron 97 pacientes infectados con VIH-1 para determinar gp120 en células TCD4⁺ de sangre periférica como un marcador de progresión de enfermedad y su correlación con carga viral, subpoblaciones de células T, marcadores de activación, terapia antiretroviral, síntomas y signos clínicos. En los pacientes quienes no habían recibido terapia antiretroviral (vírgenes), la expresión de gp120 tenía una correlación positiva con la expresión de CD95 en los linfocitos TCD4⁺: (p=0,0409) y una correlación negativa con el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ (p=0,0183) con los valores absolutos (p=0.0165) y con el porcentaje de células TCD4⁺ vírgenes (p=0.0126). En los pacientes con alta terapia antiretroviral estas correlaciones no estaban presentes. La expresión de gp120 tuvo buena correlación con algunos marcadores de progresión de enfermedad en pacientes vírgenes, pero su bajo nivel de expresión y el hecho de que esta correlación desaparece cuando la terapia antiretroviral es iniciada, limita su uso como marcador independiente de progresión.

Palabras clave: Glicoproteína 120, VIH, marcadores de progresión.

-
1. Bio Cell Laboratory, Caracas, Venezuela.
 2. Institute of Oncology and Hematology, Central University of Venezuela.
 3. School of Bioanalysis, Central University of Venezuela.
 4. National Institute of Hygiene, Caracas, Venezuela.
 5. National Guard Polyclinic-Cabisofac, Caracas, Venezuela.

Introduction

Close surveillance of the patient infected with HIV is needed to detect any change indicative of progression of the infection, and, at the right moment, begin or modify clinical interventions, as could be HAART. As HIV infection have a period of time when the patient has not any clinical symptom, some other indicators, known as surrogate markers, are used to know the stage of the infection at any given moment. Viral load and T cell subsets are two parameters widely used to fulfill this purpose (1). Expression of molecules associated with T cell activation (CD38, HLA-Dr, CD95) are used too, and so, level of apoptosis of these T cells (2,3).

Glycoprotein 120 (gp 120) is a structural molecule of HIV's envelope. It have a very important function in HIV infection, attaching virus to CD4 and CXCR4 molecules in the membrane of CD4+ T cells, so virus could invade cell. Cells infected with HIV can produce and release soluble gp 120 (4), and it had been detected in serum of AIDS patients (5). During infection patients produce anti-gp120 antibodies. Several studies had shown that interaction of gp120, independent of viral particle, with CD4 and CXCR4 receptors in the membrane of T cells mediate a rapid cell death, with apoptotic characteristics (6,7). A slower apoptotic effect could be seen too: crosslinking CD4 with gp120 and anti-gp120 antibodies cause characteristic DNA fragmentation after CD3 stimulation (8). In lymph nodes of infected patients, gp120 was present in the plasma membrane of apoptotic CD4+ T cells (9). All these findings interested us in study expression of gp 120 in peripheral blood CD4+ T cells, as a marker of susceptibility of these cells to suffer the deleterious effects observed in vitro, and, eventually, as a surrogate marker of disease progression. To do the test in peripheral blood had the advantage of the easy obtaining of the sample, so the test could be do as a routine procedure, and to use flow cytometry as the method, let us save time and expenses, facts specially important in a limited resources environment.

Materials and methods

Patients: Ninety seven patients (74 men and 23 women) infected with HIV-1, were received in our laboratory, Bio Cell, in Caracas, and studied as a part of their surveillance and treatment program Staging of infection was achieved according to CDC's classification system (10). The median age of patients was 34.9 ± 12.4 years. Thirty patients were attended before they received any antiretroviral therapy (Group of Naïve Patients) and sixty-seven were under HAART (Group of Treated Patients), following a protocol which include two nucleoside analogs inhibitors or reverse transcriptase (lamivudine and stavudine) and a combination of two protease inhibitors (lopinavir and ritonavir). These patients had received this antiretroviral treatment for 8.7 ± 4.4 months by the moment this study was made.

Controls: Twenty volunteer individuals served as controls. They were asymptomatic, with serology negative to HIV infection and with similar characteristics to patients in age and gender.

Samples: 10 ml. of whole blood was drawn for each patient and control, and it was mixed with EDTA.

Flow cytometry determinations: 50.11. of EDTA whole blood were mixed, in several combinations, with 5.11 of the respective monoclonal antibodies, and incubated for 15 minutes, at room temperature, protected from light. After incubation, 2 ml. of lysing solution was added to test tubes, mixed, and incubated for 15 minutes. Test tubes were centrifuged at 1.500 rpm, for 5 minutes. Supernatant was discarded and pellet was mixed with 200.01 of PBS. Then samples were acquired in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson), 10.000 events were saved and analyzed by Cell Quest and/or Pain-a-Gate Pro (Becton Dickinson). Isotypic controls were used to set cut-off, especially for molecules of weak expression, as gp120. In this work we considered as positive to expression of CD95 only cells with "high expression" (CD95 high). Expression of molecules was reported as percentage of positive cells in a given subset. Monoclonal antibodies used were anti-FITC (ImmunoDiagnostics Inc., Wobum, MA); anti-CD95-PE, anti-FITC and anti-CD4-PC5 (Immunotech, France); anti-CD8-FITC, anti-CD38-RPE and anti-CD4-FITC/anti-CD45RA-RPE (Dako A/S, Denmark). Isotypic control monoclonal antibodies used were mouse IgG 11RDI/mouse IgG1-FITC (Beckman-Coulter, Miami, FL), mouse IgG1IPC5 (Immunotech, France) and mouse IgG1-FITC (Dako A/S, Denmark).

Viral load determinations: It was determined using Amplicor-HIV-I-Monitor (Roche Diagnostic System), following instructions of the commercial kit.

Statistics: Data were analyzed using Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). For determination of differences between groups Mann-Whitney U test was used, and for determination of correlation between parameters Spearman test was used.

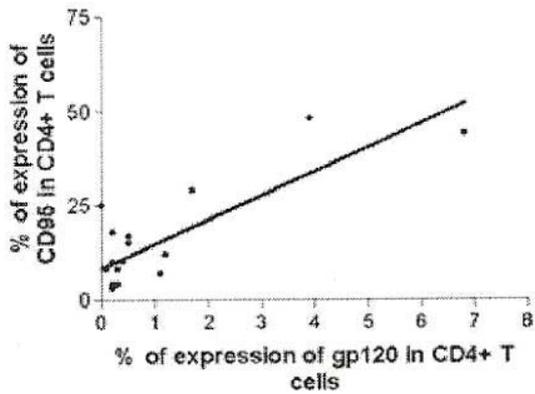
Results

Expression of gp 120 in CD4+ T cells was 1.14 ± 1.77 % in the group of naïve patients and 0.65 ± 0.57 % in the group of treated patients.

In the group of naïve patients we found that expression of gp 120 had a positive statistically significant correlation with expression of CD95 in CD4+ T lymphocytes ($p=0.0409$). The patients with higher percentages of expression of gp 120 had higher percentages of expression of CD95 in CD4+ T cells (Graph 1).



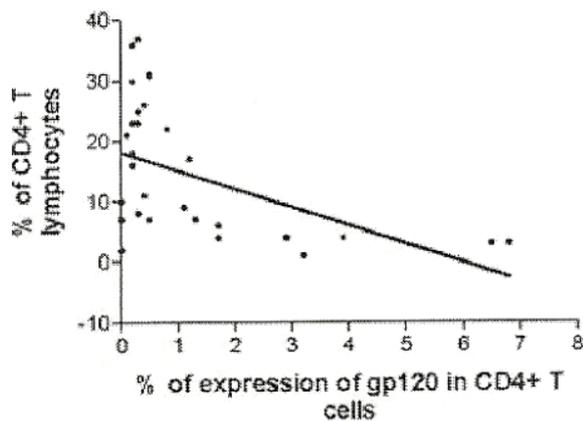
Expression of gp120 as a surrogate marker in HIV infection



Statistics (correlation:*)
 Number of XY pairs = 18
 Spearman $r = 0,4859$
 P value (Two-tailed) = 0,0409

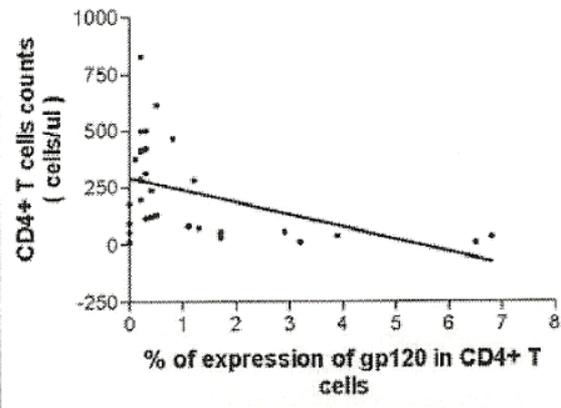
Graph 1. Expression of gp 120 and CD95 in CD4+T cells (Group of naïve patients).

In the group of naïve patients, individuals with percentages of expression of gp120 higher than 1.5 % had low percentages and absolute values of CD4+ T lymphocytes (Graphs 2 and 3), and there were negative statistically significant correlations between these parameters ($p=0.0183$ and $p=0.0165$, respectively). Nevertheless not all patients with low levels of CD4+ T cells had high percentages of expression of gp120. Also, there were negative statistically significant correlation ($p=0.0126$) between expression of gp 120 and percentage of expression of CD45RA (naïve cells) in CD4+ T cells (Graph 4).



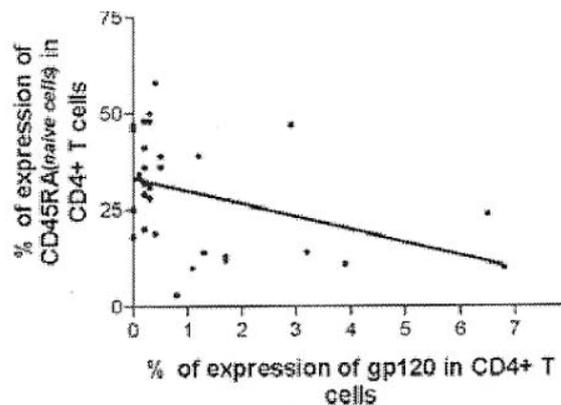
Statistics (correlation:*)
 Number of XY pairs = 30
 Spearman $r = -0,4280$
 P value (Two-tailed) = 0,0183

Graph 2. Expression of gp 120 % of CD4 T cells (Group of naïve patients).



Statistics (correlation:*)
 Number of XY pairs = 30
 Spearman $r = -0,4341$
 P value (Two-tailed) = 0,0165

Graph 3. Expression of gp 120 and CD4+T cells (/ul) (Group of naïve patients).



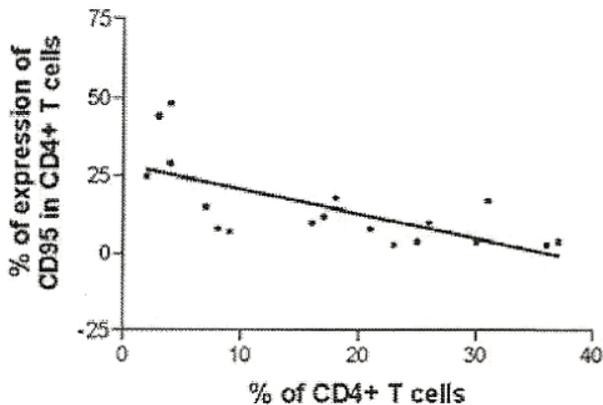
Statistics (correlation:*)
 Number of XY pairs = 30
 Spearman $r = -0,4459$
 P value (Two-tailed) = 0,0126

Graph 4. Naive CD4+ T cells and expression of gp 120 (Group of naïve patients).

Other relevant strong negative statistically significant correlations observed, both in naïve and treated patients, were between CD95 expression in CD4+ T cells and percentage and absolute values of these CD4+ T cells, with p values of 0.0009 and 0.0054 in naïve patients, and 0.004 and 0.0003 in treated patients, respectively (Graphs 5 and 6, as respectatives).

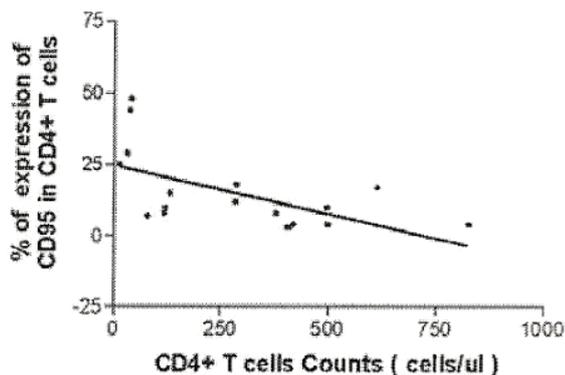
When the group of treated patients was analyzed, no correlations between expression of gp120 and other parameters were observed.

Expression of gp120 as a surrogate marker in HIV infection



Statistics (correlation:***)
 Number of XY pairs = 18
 Spearman $r = -0,7119$
 P value (Two-tailed) = 0,0009

Graph 5. CD95 and % of CD4+ T cells (Group of naïve patients).



Statistics (correlation:**)
 Number of XY pairs = 18
 Spearman $r = -0,6266$
 P value (Two-tailed) = 0,0054

Graph 6. CD95 and CD4+ T cells Counts (Group of naïve patients).

Conclusions

Taking account the deleterious effect that gp120 has in CD4+ T cells (6-9), it was not a surprise to found a negative correlation between expression of gp120 and level of CD4+ T cells in naïve patients. Nevertheless not all patients with low levels of CD4+ T cells had high expression of gp120. So, we can think in other causes of T cell destruction, as could be tat protein (11), or other deleterious effects of HIV infection. On the other hand, it is possible that gp120 attach a cell, induce an

apoptotic effect and leave this cell to join another. So, at any given moment not all cells affected by interaction with gp120 will display this molecule in its membrane. It is relevant that higher expression of gp120 is associated with lower levels of naïve CD4+ T cells (Graph 4), that could mean that this is a more susceptible subset to gp120.

Considering what high expression of CD95 means to susceptibility of a cell to suffer apoptosis (12), and the association observed between CD95 and HIV infection (13, 14), is so relevant the correlation observed between CD95 and gp120 expressions in CD4+ T cells in naïve patients.

In the group of patients studied, when HAART is initiated, we observed a rapid fall in viral load levels, but a slower recuperation of CD4+ T lymphocyte population. So, in this group level of CD4+ T cells.

Is not any more a good surrogate marker of progression to disease, at least in the first moment, after beginning HAART. This could explain why expression of gp120, which is correlated with CD4+ T lymphocyte population, has not correlation with any other surrogate marker in patients under HAART.

It is relevant that 92% of the patients (naïve and treated) with expression of gp120 > 1.5 % had one or more of the following features: viral load,³180.000 copies/ml; CD4+ T lymphocytes ≤ 157 / μ l or specific AIDS symptoms. But only 12 % of all evaluated patients had expression of gp120 1.5 %. Other disadvantage is that those patients under HAART with viral load levels³ 10.800 copies/ml (suggestive of any fail in antiretroviral therapy) had low levels of expression of gp120 (<1.5 %).

We conclude that, although expression of gp120 in peripheral blood CD4+ T lymphocytes had good correlations with known surrogate markers in naïve patients, its low level of expression, and the fact that no correlation was observed in patients under HAART, limits its use as an independent surrogate marker.

References

1. Wong MT, Dolan MI, Koslow E, et al: Patterns of virus burden and T cell phenotype are established early and are correlated with the rate of disease progression in human immunodeficiency virus infected persons. *J Infect Dis*, 1996;173:877-888.
2. Bentwich Z, Kalinkovich A, Weisman Z, Grassman Z: Immune activation in the context of HIV infection. *Clin Exp Immunol*, 1998;111: 1-2.
3. Badley AD, Parato K, Cameron DW, et al: Dynamic correlation of apoptosis and immune activation during treatment of HIV infection. *Cell Death Differ*, 1999; 6:420-432.
4. Pyle SW, Bess JWJ, Robey WG, et al: Purification of envelope glycoprotein from culture fluids of human immunodeficiency



Expression of gp120 as a surrogate marker in HIV infection

- virus (HIV)-infected H9 cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1987;3:387-400.
5. Oh, SK, Cruikshank WW, Raina J, et al: Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients. *AIDS*, 1992;5:251-256.
 6. Roggero R, Robert-Hebmann V, Harrington S, et al: Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *J Virol*, 2001;75: 7637-7650.
 7. Berndt C, Mopps B, Angermuller S, et al: CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:12556-15561.
 8. Banda NK, Bernier I, Kurahara DK, et al: Crosslinking CD4 by Human Immunodeficiency Virus gp120 primes T cell for activation-induced apoptosis. *J Exp Med*, 1992;176: 1099-1106.
 9. Sunila I, Vaccarezza M, Pantaleo G, et al: gp120 is present in the plasma membrane of apoptotic CD4 cells prepared from lymph nodes of HIV infected individuals: An immunoelectron microscopic study. *AIDS*, 1997;11:27732.
 10. 1993 revised CDC HIV Classification System and Expanded AIDS Surveillance Definition for Adolescents and Adults. *MMWR*, 1992;41(RR-17): 1-19.
 11. Westendorp MO, Frank R, Oschsenbauer C, et al: Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*, 1995;375:4977500.
 12. Krammer PH: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 2000;407: 789-795.
 13. Bohler T, Baumler C, Herr I, et al: Activation of the CD95 system increases with disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J*, 1997;16:754-759.
 14. Gougeon ML, Lecouer H, Dulioust A, et al: Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV -infected persons. Increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol*, 1996;156:3509-3520.

Requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas

La quinta edición (1997) de los requisitos uniformes se ha preparado con la finalidad de reorganizar y modificar la redacción de la cuarta edición a efecto de aumentar la claridad y abordar inquietudes con respecto a derechos, protección de la vida privada de los sujetos de investigación, descripción de los métodos aplicados y otros asuntos. Los requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas pueden reproducirse para fines educativos y sin afán de lucro, con prescindencia de los derechos del autor; el Comité alienta la distribución de este material.

A las revistas que accedan a guiarse por los requisitos uniformes (actualmente más de 500 revistas lo hacen) se les pide que en sus instrucciones para los autores citen el documento correspondiente a 1997.

Es importante hacer hincapié en lo que los requisitos significan y en lo que no. En primer lugar, los requisitos uniformes son instrucciones sobre la forma de preparar los manuscritos dirigidas a los autores; no se trata sobre indicaciones sobre estilo editorial destinadas a la redacción de las revistas. (Sin embargo, muchas revistas han incorporado en su estilo editorial ciertos elementos de los requisitos.)

En segundo lugar si los autores preparan un manuscrito según el estilo especificado en estos requisitos, los directores de las revistas participantes no devolverán el manuscrito para que se hagan cambios de estilo antes de considerarlo para publicación. No obstante, en el proceso de publicación los manuscritos podrán ser modificados por las redacciones de las revistas para adaptarlos a las particularidades de su propio estilo editorial.

En tercer lugar los autores que envíen manuscritos a una revista se abstendrán de prepararlos de acuerdo con el estilo editorial de ésta y se concretarán a cumplir con los requisitos uniformes.

Pese a todo, los autores tendrán que seguir así mismo las instrucciones particulares de la revista en cuestión por lo que se refiere a los temas apropiados para ésta y el tipo de manuscrito que se les pueden enviar: por ejemplo, artículos originales, revisiones o informes de casos. Además es probable que en dichas instrucciones figuren otros requisitos exclusivos de la publicación, tales como el número de copias del manuscrito, los idiomas en que este puede ser redactado, la extensión de los artículos y las abreviaturas aprobadas.

Se espera que las revistas participantes declaren en sus instrucciones a los autores que sus normas están de acuerdo con los requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas y citen una versión publicada de estos.

Cuestiones que deben considerarse antes de presentar un manuscrito para publicación

Publicación redundante o duplicada

Por publicación redundante o duplicada se entiende la publicación de un artículo que se traslapa considerablemente con otro ya publicado.

Los lectores de publicaciones periódicas primarias merecen que se les dé la confianza de que lo que están leyendo es original, a menos que haya una clara indicación de que el artículo se ha vuelto a publicar por elección del autor y el director. Esta posición tiene como fundamento las leyes internacionales de derechos de autor, la conducta ética y el uso eficaz en función de los costos de los recursos.

La mayor parte de las revistas científicas no desean recibir manuscritos acerca de un trabajo que ya se ha dado a conocer en gran medida en un artículo publicado o que forma parte de otro manuscrito que se ha propuesto o ha sido aceptado para publicación en otra parte, ya sea en forma impresa o en soporte electrónico. Esta norma no impide que la revista considere un artículo rechazado por otra revista o un informe completo que sigue a la publicación de un informe preliminar, como puede ser un resumen o póster presentados a la consideración de colegas en una reunión profesional. Tampoco impide que las revistas consideren un artículo que se ha presentado en una reunión científica pero que no se ha publicado íntegramente ni se está considerando para publicación en las actas de una reunión o en una publicación semejante. Las informaciones periodísticas acerca de reuniones programadas no se consideran en general como infracciones de esta regla, pero no habrán de ampliarse mediante datos suplementarios o copias de los cuadros y las ilustraciones.

Cuando se envíe un artículo para publicación, el autor debe siempre adjuntar una relación completa de toda presentación del documento a otras revistas y de cualquier informe anterior que pudieran considerarse publicación redundante o duplicada del mismo trabajo o de uno muy semejantes. El autor debe poner sobre aviso al director de la revista si el trabajo aborda temas sobre los cuales se hayan publicado informes anteriores. Si tal es el caso, esos trabajos se mencionarán con la debida referencia bibliográfica en el artículo nuevo. Junto con el manuscrito propuesto se incluirán copias de dichos materiales para ayudar al director a decidir la manera de manejar este asunto.

Si la publicación redundante o duplicada se intenta o se produce sin que medie la notificación descrita, los autores deberán atenerse a las medidas editoriales que se tomen en su contra. Como mínimo, cabe esperar el pronto rechazo del manuscrito presentado. Si el director no estaba al tanto de las infracciones y el artículo acaba por aparecer en su revista, entonces probablemente se publique en ésta un aviso de publicación

redundante o duplicada, que puede o no acompañarse de una explicación del autor y no necesitará de su aprobación.

La divulgación preliminar, generalmente por conducto de los medios de comunicación de masas, de la información científica descrita en un artículo ya aceptado pero aún sin publicar representa una infracción de las normas de muchas revistas. En contadas ocasiones, y solo mediante acuerdo con el director, puede aceptarse la disseminación preliminar de datos; por ejemplo, cuando se presenta una emergencia de salud pública.

Publicación secundaria aceptable

La publicación secundaria en el mismo idioma o en otro distinto, especialmente en otros países, se considera justificable y puede incluso ser beneficiosa, siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones.

1. Los autores tendrán que recabar la aprobación de los directores de las dos revistas involucradas; el director de la publicación secundaria tendrá en su poder una fotocopia, separata o manuscrito de la versión primaria.
2. Se respetará la precedencia de la publicación primaria dejando transcurrir por lo menos una semana antes de la publicación secundaria (a menos que específicamente se negocie otra cosa con ambos directores).
3. El artículo para publicación secundaria se destinará a un grupo diferente de lectores; podría bastar con una versión abreviada.
4. La versión secundaria reflejará fielmente los datos y las interpretaciones de la primaria.
5. Mediante una nota colocada al pie de la primera página de la versión secundaria, se informará a los lectores, a los colegas de los autores y a los organismos de documentación que el artículo ya se ha publicado con anterioridad en forma total o parcial, indicando la referencia primaria. Este podría ser un texto apropiado para dicha nota: "El presente artículo está basado en un estudio que se dio a conocer primero en (título de la revista y referencia completa)".
6. El permiso para la publicación secundaria de este tipo se otorgará gratuitamente.

Protección de los derechos del paciente a que se respete su vida privada

El derecho de los pacientes a que se respete su vida privada no debe ser infringido sin antes obtener su consentimiento fundamentado. Las descripciones por escrito, las fotografías y los árboles genealógicos que se publiquen no deberán contener información por la cual se pueda identificar a los pacientes, a menos que dichos datos resulten esenciales para fines científicos y que el paciente (o su padre o tutor) otorgue por escrito su autorización para la publicación después de haber sido debidamente informado. Para obtener el consentimiento para esta finalidad, es preciso mostrarle al paciente el manuscrito que se va a publicar.

Información para los autores

Los detalles que pueden revelar la identidad del paciente deben omitirse si no son esenciales, pero los datos del paciente nunca se alterarán ni se falsificarán solamente por tratar de lograr el anonimato. Es difícil lograr el anonimato completo y frente a cualquier duda será preciso obtener el consentimiento fundamentado. Por ejemplo, cubrir la región de los ojos en las fotografías de los pacientes es una protección insuficiente del anonimato.

La exigencia del consentimiento con conocimientos de causa deben figurar en las instrucciones para los autores de la revista. Siempre que se obtenga dicha anuencia, esto deberá contar en el artículo publicado.

Requisitos para la presentación de manuscritos a una revista

Resumen de los requisitos técnicos

Todas las partes del manuscrito estarán a doble espacio.

Cada sección o componente comenzará en página nueva.

Revise la secuencia: página del título, resumen y palabras clave, texto agradecimientos, referencias, cuadros (cada uno en página aparte), pies o epígrafes de las ilustraciones.

Las ilustraciones se presentarán en forma de impresiones fotográficas sin tomar, y no deberán exceder de 203 x 254 mm.

Incluya la autorización para reproducir material publicado con anterioridad o para usar ilustraciones en las que se pueda identificar a los sujetos humanos.

Adjunte la transferencia de los derechos de autor y otros formularios.

Presente el número exigido de copias impresas del artículo.

Guarde copias de todo lo que envíe.

Preparación del manuscrito

El texto de los artículos de observación y experimentales se divide generalmente, aunque no por fuerza, en secciones que llevan estos encabezamientos: introducción métodos, resultados y discusión. En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas secciones, sobre todo en las de resultados y discusión, a fin de hacer más claro el contenido. Es probable que otro tipo de artículos -como los informes de casos, las revisiones y los editoriales- exijan otra estructura. Para mayor orientación, los autores deberán consultar la revista en la que pretenden publicar.

Mecanografiarse el manuscrito en papel bond blanco de 216 x 279 mm o de la medida estándar ISO A4 (212 x 297 mm), con márgenes de por lo menos 25mm. Escribase o imprímase solamente sobre una cara del papel. Utilícese doble espacio a lo largo de todo el manuscrito, incluido la página del título, el resumen, el texto los agradecimientos, las referencias, cada uno de los cuadros y los pies o epígrafes de las ilustraciones. Numérense las páginas en forma consecutiva, empezando por las

del título. Sobre el ángulo superior o inferior derecho de cada página anótese el número que le corresponde.

Manuscritos en disquete

Cuando un artículo se halla cercano a la aceptación definitiva, algunas revistas piden que los autores faciliten una copia en forma electrónica (en disquete); pueden aceptar una variedad de formato de procesadoras del texto o ficheros de texto (ASCII).

Cuando presenten disquetes, los autores deberán:

1. cerciorarse de incluir la versión impresa del artículo que va en el disquete;
2. poner en el disquete únicamente la versión más reciente del manuscrito;
3. denominar claramente el fichero ;
4. rotular el disquete con indicación del formato y el nombre del fichero;
5. facilitar información sobre el equipo de computación y el software utilizados.

Los autores deberán consultar las instrucciones que la revista proporciona a los autores para determinar cuáles son los formatos que se aceptan, las convenciones que se aplican para denominar los ficheros, el número de copias que deben presentarse y otros detalles.

Página del Título

La primera página contendrá: 1) el título del artículo, que será conciso pero informativo; 2) nombre de pila preferido y apellidos de cada autor, acompañados de sus grados académicos más importantes y su afiliación institucional; 3) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; 4) declaraciones de descargo de responsabilidad, si las hay; 5) nombre y dirección del autor que se ocupará de la correspondencia relativa al manuscrito; 6) nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas, o nota informativa de que los autores no las proporcionarán; 7) procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todo ello; y 8) título abreviado (títulillo) que no pase de 40 pulsaciones (contando caracteres y espacios), el cual se colocará, debidamente identificado como tal, en la última línea de la página inicial.

Autoría

Todas las personas designadas como autores habrán de cumplir con ciertos requisitos para tener derecho a la autoría. Cada autor debe haber participado en el trabajo en grado suficiente para asumir responsabilidad pública por su contenido.

Para concederle a alguien el crédito de autor, hay que basarse únicamente en su contribución esencial por lo que se refiere a los siguientes aspectos: 1) la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos; 2) la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual; y 3) la aprobación final de la versión que será publicada. Las tres condiciones tendrán que

cumplirse siempre. La participación que consiste meramente en conseguir financiamiento o recoger datos no justifica el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores.

Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

Cada vez es más común que los ensayos multicéntricos se atribuyan a un autor corporativo. Todos los miembros del grupo que sean designados como autores, ya sea en la línea destinada al nombre de los autores a continuación del título o en una nota a pie de página, deberán cumplir plenamente con los requisitos de autoría recién señalados. Los miembros del grupo que no cumplan con dichos criterios serán mencionados, con su autorización, en la sección de agradecimientos o en un apéndice (véase "Agradecimientos").

El orden en que figuran los autores debe reflejar una decisión conjunta de éstos. Como los autores se suelen enumerar de distintas maneras, el significado del orden en que aparecen no puede deducirse con exactitud a menos que ellos mismos lo enuncien explícitamente. Para tal efecto, tal vez deseen agregar, en una nota a pie de página, la explicación sobre el orden de enumeración. Al decidir acerca de dicho orden, los autores tendrán presente que muchas revistas imponen un límite al número de autores que figuran en el índice de materias y que, cuando hay más de 25 autores, la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos incluye en MEDLINE tan solo los nombres de los 24 primeros más el del último.

Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen (que no sobrepasará las 150 palabras de extensión si es un resumen ordinario o las 250 si es uno estructurado). En él indicarán los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporcionense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. Utilícese para este propósito los términos de la lista "Medical Subject Headings" (MeSH) [Encabezamientos de temas médicos] del Index Medicus; en el caso de términos de reciente aparición que todavía no figuren en dicha lista, podrán usarse las expresiones corrientes.



Información para los autores

Introducción

Expresé el propósito del artículo y resume el fundamento lógico del estudio u observación. Mencione las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos).

Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos. La definición y la pertinencia de la raza o el grupo étnico son ambiguos. Los autores deberán ser particularmente cuidadosos con respecto a usar estas categorías.

Identifique los métodos, los aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, incluidos los de índole estadística (véase más adelante); dé referencias y explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos; describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio, como son el protocolo (población de estudio, intervenciones o exposiciones, resultados y el fundamento lógico del análisis estadístico), asignación de intervenciones (métodos de aleatorización, ocultamiento de la asignación a los grupos de tratamiento) y método de enmascaramiento (método ciego).

Los autores que presenten manuscritos de revisión incluirán una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar los datos. Estos métodos se mencionarán también en forma sinóptica en el resumen.

Ética. Cuando informe sobre experimentos en seres humanos, señale si los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas éticas del comité (institucional o regional) que supervisa la experimentación en seres humanos o con la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 1983. No utilice el nombre de los pacientes, sus iniciales ni los códigos hospitalarios, especialmente en el material ilustrativo. Cuando dé a conocer experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución, las de un consejo nacional de investigación o cualquier ley nacional acerca del cuidado y el uso de animales de laboratorio.

Estadística. Describa los métodos estadísticos con

detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición (por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información cuantitativa importante. Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado.

Las descripciones generales de los métodos utilizados deben aparecer en la sección de métodos. Cuando resume los datos en la sección de resultados, especifique los métodos estadísticos que se emplearon para analizarlos. Limite el número de cuadros y figuras al mínimo necesario para explicar el tema central del artículo y para evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las gráficas y los cuadros. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra». Defina los términos, las abreviaturas y la mayor parte de los símbolos estadísticos.

Resultados

En el texto, los cuadros y las ilustraciones, presente los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de los cuadros ni de las ilustraciones; destaque o resume tan solo las observaciones importantes.

Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. En particular, los autores evitarán hacer afir-

maciones sobre los beneficios y los costos económicos, a menos que su manuscrito incluya datos y análisis económicos. No reclame ningún tipo de precedencia ni mencione trabajos que no estén terminados. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales. Cuando sea apropiado, puede incluir recomendaciones.

Agradecimientos

En un lugar adecuado del artículo (como nota al pie de la primera página o como apéndice del texto; véanse los requisitos de la revista) uno o varios enunciados especificarán lo siguiente: 1) las colaboraciones que deben ser reconocidas pero que no justifican la autoría, tales como el apoyo general del jefe del departamento; 2) el reconocimiento por la ayuda técnica recibida; 3) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; y 4) las relaciones que puedan suscitar un conflicto de intereses (véase «Conflicto de intereses»).

Las personas que colaboraron intelectualmente en el artículo pero cuya participación no justifica la autoría pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo, «asesoramiento científico», «examen crítico de la propuesta para el estudio», «recolección de los datos» o «participación en el ensayo clínico». Estas personas tendrán que conceder su permiso para ser nombradas. Los autores se responsabilizarán de obtener la autorización por escrito de las personas mencionadas por su nombre en los agradecimientos, pues los lectores pueden inferir que estas respaldan los datos y las conclusiones.

El reconocimiento por la ayuda técnica recibida figurará en un párrafo separado de los testimonios de gratitud por otras contribuciones.

Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en los cuadros y en los pies o epígrafes de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en cuadros o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de ese cuadro o esa figura en particular.

Emplee el estilo de los ejemplos que aparecen más adelante, los cuales están basados en el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la *List of Journals Indexed in Index Medicus* [Lista de revistas indizadas en *Index Medicus*], que se publica anualmente como parte del número de enero y como separata. La lista se puede obtener asimismo en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web (<http://www.nlm.nih.gov>).

Absténgase de utilizar los resúmenes como refe-



Información para los autores

rencias. Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como «en prensa» o «de próxima aparición»; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación. La información proveniente de manuscritos presentados para publicación pero aún no aceptados se citará en el texto como «observaciones inéditas», con el permiso correspondiente de la fuente.

No cite una «comunicación personal» a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto. En el caso de artículos científicos, los autores deberán obtener el permiso de la fuente y su confirmación de la exactitud de la comunicación personal, ambos por escrito.

Los autores verificarán las referencias cotejándolas contra los documentos originales.

El estilo de los requisitos uniformes (estilo de Vancouver) se basa en gran medida en una norma de estilo ANSI adaptada por la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) para sus bases de datos. En los ejemplos que siguen se han agregado notas cuando el estilo de Vancouver difiere del estilo que actualmente utiliza la NLM.

Artículos de revista

1. Artículo de revista ordinario

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión «et al.»

(Nota: La NLM incluye ahora hasta 25 autores; si hay más de 25, enumera los primeros 24, continuación el último autor y luego agrega «et al.»)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1;124(11):980-3.

Optativamente, si se utiliza la paginación continua a lo largo de un volumen (como hacen muchas revistas médicas), se pueden omitir el mes y el número.

(Nota: Para respetar la uniformidad, en todos los ejemplos que se presentan en los requisitos uniformes se aplica esta opción. La NLM, sin embargo, no usa dicha opción.)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

Más de seis autores:

Parkin DM, Clayton D, Black Rj, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006-12.

2. Organización como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

3. No se indica el nombre del autor

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

4. Artículo en idioma extranjero¹

(Nota: La NLM traduce el título al inglés, lo encierra entre corchetes y le agrega la abreviatura correspondiente al idioma original).

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral infrapatellar seneruptur hos tidligere frisk kvinne. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1996; 116:41-2.

5. Suplemento de un volumen

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

6. Suplemento de un número

Payne DK, Sullivan MD, Massie Mj. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2): 89-97.

7. Parte de un volumen

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):303-6.

8. Parte de un número

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107(986 Pt 1):377-8.

9. Número sin volumen

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320): 110-4.

10. Sin número ni volumen

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responsos. *Curr Opin Gen Surg* 1993;3:25-33.

11. Paginación en números romanos

Fisher GA, Sikic BI. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr;9(2):xi-xii.

12. Indicación del tipo de artículo, según corresponda

Enzensber er W, Fischer PA. Metronome in Parkinson,s disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337.

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

13. Artículo que contiene una retractación

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retractación de Garey CE,

Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. En: *Nat Genet* 1994;6:426-31]. *Nat Genet* 1995;11: 104.

14. Artículo retirado por retractación

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retirado por retractación en *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3127]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:1083-8.

15. Artículo sobre el que se ha publicado una fe de erratas

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [se publica una fe de erratas en *West J Med* 1995;162:278]. *West j Med* 1995; 162:28-31.

Libros y otras monografías

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver indicaba, incorrectamente, que entre la editorial y la fecha debía ir una coma en vez de punto y coma, como debe ser).

16. Individuos como autores

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership. skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

17. Directores ("editores"), compiladores como autores

Norinan IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

18. Organización como autor y editorial

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

19. Capítulo de libro

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver prescribía el uso de dos puntos en vez de la letra p antes de las páginas.)

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

20. Actas de conferencias

Kimura j, Shibusaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

21. Artículo presentado en una conferencia

Bengtsson S, Tolheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. En: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceed-

¹ Evidentemente, «extranjero» se entiende aquí en relación con el idioma inglés, pues los ejemplos de referencias bibliográficas se han trasladado directamente del original, sin adaptarlos. [N. del t.]



Información para los autores

ings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

22. Informe científico o técnico

Publicado por la institución financiadora o patrocinadora:

Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOE169200860.

Publicado por la institución ejecutora:

Field MjJ Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. Tesis doctoral

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

24. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventores; Novoste Corporation, titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 jun 25.
Otros trabajos publicados

25. Artículo de periódico

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. Material audiovisual

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

27. Documentos legales

Ley pública:
Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:

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

Código de normas federales:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiencia:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

28. Mapa

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and

Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

29. Libro de la Biblia

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

30. *Diccionarios y obras de consulta semejantes*
Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

31. Obras clásicas

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Trabajos inéditos

32. En prensa

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. En prensa 1996.

Material en soporte electrónico

33. *Artículo de revista en formato electrónico*
Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 5];1(1):[24 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

34. Monografía en formato electrónico

CDI, clinical dermatology illustrated [monografía en CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

35. Fichero de computadora

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [programa de computadora]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Cuadros

Mecanografía o imprima cada cuadro a doble espacio y en hoja aparte. No presente los cuadros en forma de impresiones fotográficas. Numérelos consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada uno. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilícese los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: *, †, ‡, †, **, ††, †‡, †‡.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media.

No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros.

Cerciórese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Si incluye datos publicados o inéditos provenientes de otra fuente, obtenga la autorización necesaria para reproducirlos y conceda el reconocimiento cabal que corresponde.

Incluir un número excesivo de cuadros en relación con la extensión del texto puede ocasionar dificultades al confeccionar las páginas. Examine varios números recientes de la revista a la que planea presentar el artículo y calcule cuántos cuadros pueden incluirse por cada millar de palabras de texto.

Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que los cuadros suplementarios que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensos para publicarlos, queden depositados en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionados por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos cuadros se presentarán junto con el artículo para su consideración.

Ilustraciones (figuras)

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones.

Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma. No escriba directamente sobre el dorso de las figuras ni las sujete con broches para papel, pues quedan marcadas. Las figuras no se doblarán ni se montarán sobre cartón.

Las fotomicrografías incluirán en sí mismas un indicador de la escala. Los símbolos, flechas y letras usados en éstas deberán contrastar claramente con el fondo.

Si se usan fotografías de personas, estas no deberán ser identificables; de lo contrario, habrá que anexar un permiso por escrito para poder utilizarlas (véase la sección «Protección del derecho de los pacientes a que se respete su vida privada»).

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente.



Información para los autores

te original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quien sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

En el caso de las ilustraciones en color, averigüe si la revista necesita negativos, transparencias en positivo o impresiones fotográficas. La inclusión de un diagrama en el que se indique la parte de la fotografía que debe reproducirse puede resultar útil a la redacción. Algunas revistas publican ilustraciones en color únicamente si el autor paga el costo extra.

Pies o epígrafes de las ilustraciones

Los pies o epígrafes de las ilustraciones se mecanografiarán o imprimirán a doble espacio, comenzando en hoja aparte e identificándolos con los números arábigos correspondientes. Cuando se utilicen símbolos, flechas, números o letras para referirse a ciertas partes de las ilustraciones, será preciso identificar y aclarar el significado de cada uno en el pie o epígrafe. En las fotomicrografías habrá que explicar la escala y especificar el método de tinción.

Unidades de medida

Las medidas de longitud, talla, *peso* y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) o sus múltiples y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

Envío del manuscrito a la revista

Envíe por correo el número requerido de copias del manuscrito en un sobre de papel resistente; si es necesario, proteja las copias y las figuras metiéndolas entre dos hojas de cartón para evitar que las fotografías se doblen. Meta las fotografías y transparencias en su propio sobre de papel resistente.

Los manuscritos irán acompañados de una carta de envío firmada por todos los coautores. Es preciso incluir en ella lo siguiente: 1) información acerca de la publicación previa o duplicada, o

sobre la presentación de cualquier parte del trabajo a otra revista, según lo expresado líneas arriba; 2) una manifestación de las relaciones financieras o de otro tipo que pudieran dar lugar a un conflicto de intereses (*véase* más adelante); 3) una declaración de que el manuscrito ha sido leído y aprobado por todos los autores, que se ha cumplido con los requisitos de la autoría expuestos anteriormente en el presente documento y que cada autor está convencido de que el manuscrito representa un trabajo honrado; y 4) el nombre, la dirección y el número telefónico del autor correspondiente, quien se encargará de comunicarse con los demás autores en lo concerniente a las revisiones y a la aprobación final de las pruebas de imprenta. La carta incluirá cualquier información suplementaria que pueda resultar útil para el director, tal como el tipo de artículo que el manuscrito representa para esa revista en particular y si el autor (o los autores) estaría dispuesto a sufragar el costo de reproducir las ilustraciones en color.

El manuscrito se acompañará de copias de los permisos concedidos para reproducir material ya publicado, para usar ilustraciones o revelar información sobre individuos que puedan ser identificados, o para agradecer a ciertas personas su colaboración.