

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas



Volumen 10, Nº 1

Año 2007

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 María Rosángel Morales B.

Gerencia Administrativa

MSc Rosa Pabón de Santiago

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

Junta Directiva

Presidenta

Dra. Ana Monzón de Orozco

Dirección General

MSc Priscila Bastidas

Dirección Científica

Esp Nathalie Briones

Dirección Administrativa

MSc Mercedes Cerviño

Dirección de Proyectos y Divulgación Científica

Lic. Greys Ortiz

Comisión de Estudio de Credenciales

Dra. Cristina Gutiérrez

MSc Mercedes Cerviño

Comisión para otorgar unidades crédito

MSc Priscila Bastidas (Coordinadora)

Lic. Josefina Guariguata

Lic. Graciela Maggi

Comité de Redacción

Lic. Eliud Marín

Lic. Gabriel González

MSc Priscila Bastidas

Dra. Priva Zabner de Oziel

Dr. Axel R. Santiago

Dr. Julio Cesar González

EDITORIAL

En este año 2009, damos inicio a la instalación de una nueva Junta Directiva que dirigirá los destinos de nuestra sociedad hasta el año 2010.

Este número quisimos dedicarlo a “Laboratorios emblemáticos”, aquellos laboratorios que son dirigidos por Bioanalistas dedicados a su profesión, de gran trayectoria y preocupados por el desarrollo científico y social del Bioanálisis, a ellos ofrecemos este número, no son todos los que aquí están, pero esperamos se incorporen a nuestra revista en un futuro.

Esta Junta Directiva tiene como una de sus más importantes metas el desarrollo del nivel científico de la profesión, es necesaria la actualización de nuestros conocimientos cada día, a través de cursos, talleres, diplomados, etc. Todo esto de la manera más fácil y accesible al Bioanalista, utilizando las herramientas más sencillas como la información en línea. Necesitamos la incorporación del mayor número de especialistas que se unan a esta tarea de comunicación científica a nivel nacional.

Como ente ejecutor de las políticas de educación, ciencias y tecnología de la Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela esperamos contar con el apoyo del Comité Ejecutivo y de todos los colegios para llevar adelante todos estos planes en beneficio de nuestra profesión.

Es necesario destacar la importancia de nuestra publicación científica donde invitamos a todos los colegas y profesionales de la salud a publicar y de esta manera divulgar sus contribuciones científicas, y así tener un profesional científicamente informado como lo requiere el mundo actual.

Dra. Ana Monzón de Orozco
Presidenta
Sociedad Venezolana
de Bioanalistas Especialistas



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTEN

Editorial	1
Extrinsic contamination of parenteral solutions and multiple-dose vials Medina Mota Karen Marlenis, Sierra Ruiz Carmen Isabel, Orellán de García Yida, Guevara Patiño Armando	3
Vaginal flora in pregnant adolescents with membrane premature failure Ana Cristina Salas Silva, Isabel Maggiolo, Próspero Alberto Rojas Martínez, José Gerardo Amesty Hernández, Melvin Esteban Ferrer Inciarte	9
Epidemiological, clinical and bacteriological findings in urinary infections by <i>Staphylococcus saprophyticus</i> Ramón E. Andrade P., Evelyns Villarroel, Narlesky Rivero, Pedro Navarro	18
Colonization of hemolítico <i>Streptococcus</i> beta of group B in gestantes in work of childbirth and its newborn ones Amesty-Hernández J.G., Lares de Acevedo A., Sandra-Toledo L., Piña-Reyes E., Rojas-Martínez P., Salas A., Ferrer-Inciarte M.	27
Expanded spectrum Beta Lactamase producing enterobacterias in critical patients from Maternity Hospital «Concepción Palacios» V. Vergara, Y. Rodríguez, E. Benítez, Y. Garmendia, M. Morales, R. López, L. Torres	33
Prognostic value of serum soluble Interleukin-2 α receptor levels in Non Hodgkin's lymphoma patients Claudia Galicia, Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Jean Desenne, Ana Monzón de Orozco, Marina Gonzalez, Antonieta Natale, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmin Ordoñez, Maria Alejandra Torres, Aixa Müller	39
Information for authors	47



Contaminación extrínseca de soluciones parenterales y medicamentos en frascos multidosis

Medina Mota Karen Marlenis ¹, Sierra Ruiz Carmen Isabel ¹, Orellán de García Yida ¹, Guevara Patiño Armando ^{1,2}

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales ocurren durante las 48-72 horas después del ingreso a un centro de salud o luego de un periodo definido tras el alta, uno de los vehículos para este tipo de infección son las soluciones parenterales (SP) y los medicamentos en frascos multidosis (FMD). Se determinó la frecuencia de contaminación extrínseca de SP y FMD en algunos servicios de hospitalización del Complejo Hospitalario Universitario "Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar-Venezuela. Se analizaron 95 SP y 82 FMD para un total de 177 muestras, las cuales se cultivaron y los microorganismos aislados fueron identificados a través de pruebas bioquímicas convencionales. De las 177 muestras evaluadas, 42 (23,73%) presentaron crecimiento de microorganismos. El 27,36% de las SP y el 19,51% de los FMD resultaron contaminados. Los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Bacillus sp.* (55,30%), *Candida albicans* (14,88%) y *Staphylococcus coagulasa* negativos (8,52%). Se concluyó que durante el periodo estudiado en las soluciones parenterales predominó la contaminación por microorganismos ambientales, mientras que las levaduras predominaron en los frascos multidosis especialmente en los de sulfato de magnesio.

Palabras clave: Infección nosocomial, solución parenteral, medicamento en frasco multidosis.

Extrinsic contamination of parenteral solutions and multiple-dose vials

SUMMARY

Nosocomial infections occur during the 48-72 hours after admission to a health centre or after a defined period after discharge, one of the vehicles for this type of infection are the parenterals solutions (PS) and parenteral drugs in multidose vials (MDV). We determined the prevalence of extrinsic contamination of PS and MDV hospitalization in some services of the Hospital Universitario "Ruiz and Paez" in Ciudad Bolivar-Venezuela. We analyzed 95 PS and 82 MDV for a total of 177 samples, which were cultivated and isolated microorganisms were identified by conventional biochemical tests. Of the 177 samples tested, 42 (23.73%) had growth of microorganisms. The 27.36% of the PS and the 19.51% of MDV were contaminated. The most commonly isolated microorganisms were *Bacillus sp.* (55.30%), *Candida albicans* (14.88%) and coagulase negative *Staphylococcus* (8.52%). It was concluded that during the period studied in parenteral solutions prevailing contamination by environmental microorganisms, while yeast predominated in especially in multidose vials of magnesium sulfate.

Keywords: Nosocomial infections, parenteral solution, multiple-dose vials.

1. Escuela de Ciencias de la Salud "Dr. Francisco Battistini Casalta" Universidad de Oriente. Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela.

2. Unidad de Infectología y Microbiología Médica Complejo Hospitalario Universitario "Ruiz y Páez". Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela.

Introducción

La terapia intravenosa (IV), descrita por primera vez en 1832 para tratar a los pacientes con cólera, ha adquirido gran importancia en el tratamiento de diferentes patologías. En la actualidad, más de la mitad de los pacientes hospitalizados reciben terapia IV y aunque este método es altamente seguro y en muchos casos puede salvar vidas, no carece de complicaciones (1). Una de éstas es la producción de infecciones por la administración de soluciones o medicamentos contaminados (2).

La contaminación microbiológica de los medicamentos y fluidos intravenosos puede clasificarse en intrínseca o extrínseca según sea su origen. La intrínseca sucede cuando estas sustancias se contaminan microbiológicamente antes de su utilización, es decir durante la fabricación, el transporte y el almacenado. Hoy en día esto ocurre raramente. En tanto, que la extrínseca es la que se origina como resultado de las manipulaciones de los recipientes contenedores de la solución a administrar así como del sistema de administración (1).

La medida de control más importante para prevenir la contaminación de los recipientes contenedores de soluciones y medicamentos es el uso de una jeringa y de una aguja estériles para cada administración debido a que esto proporciona el nivel más alto de seguridad al recipiente. En muchos países es común la práctica de reutilizar dicho sistema en ausencia de medidas elementales para prevenir la contaminación, lo cual ha sido asociado a las infecciones intrahospitalarias (3,4).

Algunos autores han documentado la capacidad de ciertos microorganismos para reproducirse y contaminar las soluciones parenterales, una vez inoculados en las mismas. Maki et al., (1973) encontraron que varios miembros de la tribu *Klebsiellae* presentan un crecimiento rápido de 10^5 organismos/ml e incluso concentraciones que sobrepasan 10^6 microorganismos/ml en un periodo de 24 horas y son incapaces de enturbiar de manera perceptible las soluciones [5]. Así mismo, se ha determinado que las soluciones de nutrición parenteral contaminadas durante su uso con *Mucor* sp se enturbian de manera visible, observándose colonias algodonosas inclusive a las 48 horas de utilización (2). Lo mismo ocurre con los medicamentos en frascos multidosis (FMD), los cuales son reutilizados y en muchas ocasiones se les deja una aguja insertada en el tapón ente un uso y otro, la cual es una ruta directa para que los microorganismos entren en el frasco y contaminen el líquido (3,4). Existen en la literatura reportes de infecciones intrahospitalarias asociadas a FMD. Por lo menos 17 estudios divulgaron brotes con varias especies de hongos y de bacterias, que crecieron en diversos tipos de medicamentos de frascos contaminados, que eran reutilizados (6).

En los hospitales debido a la conveniencia y a la disminución de los costos se promueve el uso de los frascos multidosis, asumiendo que su contenido seguirá siendo estéril a pesar del uso repetido. Los resultados de estudios recientes indican que los índices de contaminación bacteriana en los FMD son de hasta 27%. Sin embargo, la adición de elementos bacteriostáticos, el uso de medicamentos de dosis única y la aplicación de técnicas asépticas ha disminuido el grado de contaminación (7).

En Venezuela existen muy pocos estudios donde se haga la descripción de brotes de infección intrahospitalaria y se establezca la fuente de infección así como el o los microorganismos implicados. En el Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela, contamos con un sistema de vigilancia de infecciones intrahospitalarias dirigido a los Servicios de Perinatología, basado en los resultados del Laboratorio de Microbiología. En el marco de este sistema, en el año 2004 se determinó que la principal fuente de transmisión de infecciones intrahospitalarias en los Servicios de Perinatología eran las soluciones de nutrición parenteral parcial, las cuales fueron contaminadas con *Enterobacter aerogenes* durante su preparación. Este microorganismo se logró recuperar de las soluciones parenterales que estaban en uso así como de los neonatos que las estaban recibiendo (8). Por este motivo, se decidió investigar si en la actualidad persiste el fenómeno de la contaminación extrínseca de soluciones parenterales y FMD, en los Servicios de Perinatología así como en otros servicios hospitalarios.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo, no experimental, en el cual se evaluaron desde el punto de vista microbiológico las soluciones parenterales (SP) y los FMD que estaban en uso en los Servicios de Emergencia de Adultos y Pediatría, Perinatología I y II y la Sala de Rehidratación del Complejo Hospitalario Universitario "Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar – Venezuela, durante el periodo de Enero a Marzo del año 2006.

Toma de muestras: Se realizaron estudios microbiológicos puntuales sin previo aviso, donde se tomaron muestras de las SP que estaban administrándose en ese momento y de los FMD que estaban en uso. A cada solución y/o frasco se le asignó un número y se le llenó la ficha diseñada para el registro de los datos correspondientes (fecha de recolección, el servicio, tipo de solución, presencia de agujas o perforaciones múltiples en los tapones, microorganismos aislados). Al momento de tomar la muestra se limpió la parte superior del frasco de SP o FMD con una torunda de algodón empapada con alcohol isopropílico al 70%, se esperó a que secase el alcohol y posteriormente se

Contaminación extrínseca de soluciones parenterales y medicamentos en frascos multidosis

procedió a tomar 5 ml de cada solución. Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio de manera inmediata (9).

Una vez en el laboratorio se procedió a inocular y diseminar con el asa bacteriológica calibrada, una asada de las muestras en Agar Tripticasa Soya (HiMedia), Agar MacConkey (HiMedia) y Agar Manitol Salado (HiMedia) por la técnica de siembra por agotamiento (10), la solución restante se trasvasó a un tubo con Caldo Tripticasa Soya. Los medios de cultivos sólidos inoculados, se incubaron a 35°C por 24 horas, luego de este tiempo se observó si había desarrollo microbiano, en los casos afirmativos se procedió a la descripción de las colonias, examen directo, observación mediante la coloración de Gram e identificación bioquímica. Las muestras inoculadas en los medios líquidos se incubaron hasta por siete días a 35°C con observación diaria. Los caldos que presentaron turbidez se subcultivaron en agar sangre y se incubaron por 24 horas a 35°C (11). Luego se procedió a realizar observación macro y microscópica e identificación bioquímica de los microorganismos aislados. La identificación bioquímica se realizó de acuerdo a los métodos clásicos. Los resultados fueron analizados a través de la aplicación de los estadígrafos Chi-cuadrado y el test exacto de Fischer para verificación de la independencia de las variables.

Resultados

Se evaluaron un total de 177 soluciones, de las cuales 95 (53,67%) fueron SP y 82 (46,33%) correspondieron a los FMD. Se determinó que el 23,73% (42) de todas las soluciones parenterales y medicamentos estudiados presentaron desarrollo microbiano.

Al discriminar el tipo de solución, se encontró que las parenterales presentaron mayor contaminación (26; 27,36%) con relación a los FMD (16; 19,51%), sin embargo esto no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$) (Figura 1).



Figura 1. Tipos de soluciones estudiadas según crecimiento microbiano.

El Servicio de Perinatología I resultó ser el más afectado con 35,71% (15) de las soluciones contaminadas, seguido por la Emergencia de Adultos con 21,43% (9), la Emergencia Pediátrica con 19,05% (8), la Sala de Rehidratación con 14,29% (6) y Perinatología II con 9,52% (4). Al discriminar las soluciones según su tipo por servicio estudiado se encontró que de 16 soluciones parenterales estudiadas en el Servicio de Perinatología I, el 62,2% (9) presentaron crecimiento microbiano, seguido de la Emergencia Pediátrica (13 estudiadas, 53,85% contaminadas), Perinatología II (8 estudiadas, 25% contaminadas), Sala de Rehidratación (11 estudiadas, 18,2% contaminadas) y la Emergencia de Adultos (47 estudiadas, 6% contaminadas) (Figura 2). En el caso de los medicamentos en frascos multidosis, el Servicio de Perinatología I también presentó la mayor frecuencia de contaminación, encontrándose que de un total de 15 frascos estudiados, el 40% estaban contaminados, seguido por la Sala de Rehidratación (19 estudiados, 21,1% contaminados), Emergencia de Adultos (19 estudiados, 15,8% contaminados), Perinatología II (16 estudiados, 12,5% contaminados) y la Emergencia pediátrica (13 estudiados, 7,7% contaminados) (Figura 3).



Figura 2. Soluciones parenterales según servicio y desarrollo microbiano.

Los microorganismos encontrados en todas las soluciones estudiadas fueron *Bacillus* sp (55,30%), seguido de *Candida albicans* (14,88%) y *Staphylococcus* sp coagulasa negativos (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. simulans* y *S. warneri*) (8,52%), también se aislaron *Acinetobacter baumannii*, *Corynebacterium* sp., *Candida tropicalis* y *Rhodotorula rubra* (4,26% cada uno), *Enterobacter cloacae* y *Elizabethkingia meningoseptica* (2,13% cada uno). En los medicamentos en frascos multidosis, donde se aisló el mayor número de microorganismos fue en el sulfato de magnesio, donde destaca *Candida albicans* con un total de 25% (5/20) (Tabla 1). Mientras que en las soluciones parenterales, específicamente en Dextro-sal 0,45% y solución fisiológica, predominó *Bacillus* sp en un 25,94% y 22,23% respectivamente (Tabla 2).

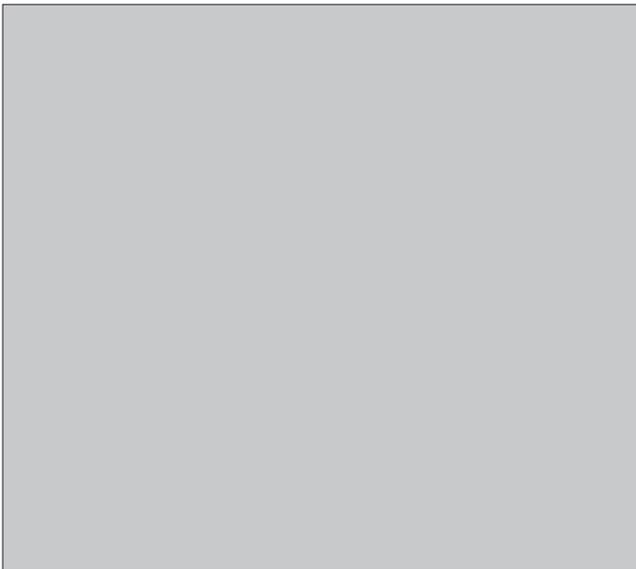


Figura 3. Medicamentos en frascos multidosis según servicio y desarrollo microbiano.

Tabla 1. Medicamentos en frascos multidosis y microorganismos aislados.

Medicamentos en frascos multidosis	Microorganismos aislados	n	%
Sulfato de magnesio	<i>Candida albicans</i>	5	25
	<i>Rhodotorula rubra</i>	2	10
	<i>Candida tropicalis</i>	2	10
	<i>Bacillus</i> sp.	2	10
Cloruro de potasio 7,5%	<i>Bacillus</i> sp.	2	10
	<i>Candida albicans</i>	1	5
	<i>Corynebacterium</i> sp.	1	5
Bicarbonato de sodio 5%	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	5
	<i>Bacillus</i> sp.	1	5
Lidocaína 2%	<i>Bacillus</i> sp.	2	10
Fluconazol	<i>Bacillus</i> sp.	1	5
Total		20	100

Tabla 2. Soluciones parenterales y microorganismos aislados.

Soluciones parenterales	Microorganismos aislados	n	%
Solución fisiológica	<i>Bacillus</i> sp.	6	22,23
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1	3,70
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	3,70
	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	3,70
	<i>Corynebacterium</i> sp.	1	3,70
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	3,70
Dextrosa al 5%	<i>Staphylococcus simulans</i>	1	3,70
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	3,70
	<i>Bacillus</i> sp.	5	18,53
Dextro-sal 0,45%	<i>Bacillus</i> sp.	7	25,94
Nutrición parenteral parcial	<i>Candida albicans</i>	1	3,70
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3,70
Total		27	100

Discusión

Las infecciones intrahospitalarias constituyen actualmente un problema en el ámbito mundial debido a que pueden producir elevadas tasas de morbilidad y mortalidad con el consecuente aumento de costos para el sistema de salud. Durante las investigaciones de brotes de infecciones nosocomiales se ha podido determinar que las soluciones parenterales, los medicamentos en frascos multidosis y monodosis, así como los hemoderivados podrían servir como reservorio para microorganismos patógenos y ser la fuente de infección (11). La bacteriemia relacionada con la infusión de las soluciones parenterales requiere cultivos positivos con el mismo germen de la sangre y solución difundida. Sin embargo, se considera que la sola contaminación masiva de la infusión es un criterio diagnóstico suficiente de bacteriemia de origen intrahospitalario para fines de la epidemiología de los hospitales (12).

Los microorganismos responsables de la mayoría de las IN son *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Bacillus* spp. y *Candida* spp. (13). En nuestro estudio se aislaron algunas de estas especies.

Los resultados de esta investigación evidencian que el 23,73% de las muestras estudiadas estaban contaminadas por microorganismos. Los estudios publicados sobre contaminación de medicamentos en frascos multidosis y soluciones parenterales presentan una considerable variación en las tasas de contaminación bacteriana que oscila entre 0% y 27%, encontrándose en algunos de estos, una tasa de contaminación alarmante (6). Uno de ellos, realizado en México, donde se estudiaron soluciones parenterales, reportó una frecuencia de contaminación del 12,9%, con predominio de bacilos Gram negativos (12), mientras que una investigación de 47 medicamentos en frascos multidosis, realizada en Canadá, se demostró contaminación en siete de los medicamentos estudiados (15%). Entre los microorganismos aislados se incluyen: *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Streptococcus viridans*, hongos y *Bacillus* sp. (7). Estos resultados son comparables con nuestra investigación, sin embargo, en esta predominaron los bacilos Gram positivos. Así mismo, en un estudio realizado en Caracas, donde se analizaron 15 medicamentos en frascos multidosis utilizados en mesoterapia, se aislaron microorganismos tales como *Cladosporium* sp., *Aspergillus terreus*, *Rodothorula rubra*, complejo *Enterobacter agglomerans*, *Serratia odorifera*, *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium fortuitum* y *M. abscessus*; debido a que estas especies de micobacterias también se aislaron de lesiones de pacientes tratados con estas sustancias, los autores sospecharon que dichos productos fueron la fuente de infección (14). Los medicamentos en

Contaminación extrínseca de soluciones parenterales y medicamentos en frascos multidosis

frascos multidosis también pueden ser un vehículo para algunos virus, entre ellos los virus de la Hepatitis B y C (15,16).

Los medicamentos en frascos multidosis frecuentemente pueden contaminarse durante su manipulación o mediante las múltiples punciones con agujas, por tanto es mejor utilizar, siempre que sea posible, los medicamentos en frascos monodosis en lugar de los multidosis, debido a que estos últimos son propensos a la contaminación microbiana y de esta manera se convierten en una fuente potencial de infección intrahospitalaria (3,4,17,18). Durante la realización de este estudio se observó en varias ocasiones que medicamentos en frascos multidosis que estaban en uso, se les había dejado agujas en los tapones y medicamentos en ampollas monodosis, de los cuales se usó sólo una fracción de su contenido, permanecieron abiertos para ser utilizados en otros pacientes. Se presume que este mal hábito facilita la entrada de microorganismos ambientales tales como *Bacillus* spp., al interior de los frascos y ampollas. También se observaron frascos que a pesar de no presentar agujas, poseían múltiples perforaciones en el tapón, lo cual también puede ser una vía para la contaminación. Esto también ha sido reportado por otros autores (18,19).

En los últimos años, han sido frecuentes los informes de brotes de infección intrahospitalaria causados por levaduras, principalmente del género *Candida*. Estos brotes pueden deberse no solamente a contaminación de fluidos para infusión intravenosa, sino también a infecciones cruzadas a través de manos contaminadas (20,21). Las levaduras requieren nutrientes para su desarrollo tales como el carbono y el nitrógeno, siendo los macroelementos indispensables el fósforo que se emplea comúnmente en forma de ácido fosfórico y el magnesio como sulfato de magnesio (22). En este estudio se aisló el mayor número de levaduras en frascos multidosis de Sulfato de Magnesio, cabe destacar que en estos medicamentos se encontraron cultivos mixtos de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Rhodotorula rubra*.

A pesar de que en nuestro estudio predominó la contaminación de las soluciones parenterales por bacilos Gram positivos, se debe tener en cuenta que por lo general, la contaminación de las soluciones parenterales es debida a especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* o *Serratia*, ya que estos gérmenes tienen un crecimiento rápido en soluciones que contienen glucosa, a pesar de que el inoculo sea bajo (9,23,24). Estudios sobre los patrones de crecimiento de microorganismos seleccionados en soluciones parenterales comunes, evaluando sus implicaciones para las bacteriemias nosocomiales han demostrado que la solución Ringer Lactato es un buen medio de cultivo para bacilos Gram negativos y la Dextrosa al 5% en agua es un medio pobre excepto para algunas bacterias de la tribu *Klebsiellae* (25).

En este estudio se aislaron dos cepas de *Corynebacterium* sp en el Servicio de Emergencia de Adultos, cabe destacar que una se aisló de un medicamento en frasco multidosis (Cloruro de Potasio al 7,5%) y la otra cepa de una solución fisiológica que estaba complementada con dicho medicamento que se le estaba administrado a un paciente, ambas soluciones fueron muestreadas el mismo día, por lo que se infiere que la solución parenteral se contaminó al momento de ser complementada con dicho medicamento.

Diversos factores pueden estar asociados a las bacteriemias debidas a la contaminación extrínseca de las soluciones por la preparación de mezclas, entre los más importantes se mencionan la carencia de materiales y equipos y especialmente los errores cometidos en los procedimientos para el manejo aséptico y adecuado de las soluciones por el personal responsable de prepararlas (19,23). Algunos estudios han demostrado una relación directa, siendo las manos del personal el principal vehículo de transmisión de agentes patógenos que infectaron a los pacientes (9,26). Aunque el objetivo de este estudio no fue demostrar la relación directa entre los microorganismos aislados de las soluciones parenterales y medicamentos en frascos multidosis con las encontradas en las manos del personal, esta es la vía más probable de transmisión, especialmente en el caso de contaminación por bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos (10,19). En esta investigación se aisló en una solución de nutrición parenteral parcial en uso, una cepa de *Enterobacter cloacae*, a este paciente se le tomó una muestra para hemocultivo donde se logró el aislamiento de dicha bacteria. Este hallazgo coincide con reportes anteriores (8,10). En nuestro hospital, en un estudio donde se evaluaron seis soluciones parenterales que se le estaban administrando a neonatos, cuatro presentaron crecimiento bacteriano y al comparar las cepas aisladas de los hemocultivos de los pacientes y de las soluciones parenterales demostraron que poseían el mismo patrón de susceptibilidad (8). El hecho de que se aislaran microorganismos de las soluciones de nutrición parenteral parcial, las cuales requieren para su preparación la mezcla de varios componentes, reafirma que las manos del personal juegan un papel preponderante. Es importante resaltar que el lavado de manos puede reducir en más de un 50% las tasas de infección y de contaminación de soluciones (27).

En conclusión, se demostró que durante el periodo estudiado las soluciones parenterales y los medicamentos en frascos multidosis, predominó la contaminación por microorganismos ambientales en las soluciones parenterales, mientras que las levaduras predominaron en los frascos multidosis especialmente en los de sulfato de magnesio.



Referencias

1. Ashworth H. Filtración en línea de los fluidos intravenosos. En: <http://www.victusinc.com/MedicalProd/Sets/FILTRACION%20EN%20LINEA.html>. Acceso 15 de Julio 2005.
2. Pineda S. Soporte nutricional en la atención primaria de salud. *Rev Cub Med Gen Integr* 2003; 19: 13-17.
3. Engender Health. 2001. Prevención de Infecciones. Manual de referencia para proveedores de servicios de salud. En: <http://www.engenderhealth.org/res/offc/safety/ip-ref/pdf/ip-ref-sp-01.pdf>. Acceso 25 de Agosto 2005.
4. Hutin Y, Hauri A, Chiarello L, Catlin M, Stilwell B, Ghebrehiwet T, et al. Best infection control practices for intradermal, subcutaneous, and intramuscular needle injections. *Bull World Health Organ* 2003; 81:491-500
5. Maki DG, Goldman DA, Rhame FS. Infection control in intravenous therapy. *Ann Intern Med.* 1973; 79: 867-887.
6. Mattner F y Gastmeier P. Bacterial contamination of multiple-dose vials: A prevalence study. *Am J Infect Control* 2004; 32: 12-16.
7. Langille D. Contamination of multiple-dose vials due to repeat use of syringes. *CMAJ* 1989; 140: 529-531.
8. Guevara M. y Medina Z. Infecciones nosocomiales en retén patológico, Hospital "Ruiz y Páez", Ciudad Bolívar. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Ciudad Bolívar-Venezuela. 2005.
9. Macías A, Muñoz J, Herrera L, Medina H, Hernández I, Alcanzar D. et al. Nosocomial pediatric bacteremia: The role of intravenous set contamination in developing countries. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 226-230
10. Habsah H, Zeehaida M, Van Rostenberghe H, Zoraida R, Wan Pauzi, Fátima I, Rosliza AR, Nik Sharimah NY, Maimunah H. An outbreak of *Pantoea* spp. in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition *J Hosp Infection* 2005; 61: 213-218
11. Vonberg RP, Gastmeier P. Hospital-acquired infections related to contaminated substances. *J Hosp Infection.* 2007; 65, 15-23
12. Muñoz J, Macías A, Guerrero F, Hernández I, Medina H, Vargas E. Control de bacteriemia nosocomial pediátrica mediante un programa de cultivo de soluciones parenterales en uso. *Salud Pública Méx* 1999; 41: 32-37
13. Malagón L, Hernández E. Infecciones Hospitalarias. 2^{da} ed. Bogotá-Colombia: Ed Médica Panamericana; 1999.
14. Rivera-Olivero IA, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Pérez R, Piquero J. y col. Infecciones en tejidos blandos por micobacterias no tuberculosas secundarias a mesoterapia. ¿Cuánto vale la belleza? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 302-306.
15. Kidd-Ljunggren K, Broman E, Ekvall H, Gustavsson O. Nosocomial transmission of hepatitis B virus infection through multiple-dose vials. *J Hosp Infec* 1999; 43: 57-62.
16. Obayashi A, Oie S. y Kamiya A. Microbial Viability in Preparations Packaged for Single Use. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 667-670.
17. Archibald L, Ramos M, Ardwin M, Agüero S, Deseda C, Banerjee S. et al. Enterobacter cloacae and Pseudomonas aeruginosa polymicrobial bloodstream infections traced to extrinsic contamination of a dextrose multidose vial. *J Pediatr* 1998; 5: 640-644.
18. Paparella S. The Risks Associated With the Use of Multidose Vials. *J Emerg Nurs* 2006;32:428-30.
19. Nogler-Semenitz E, Lass-Flörl C, Nogler M, Speer G, Dierich MP. Bacterial contamination of solutions for parenteral administration for single- and multiple-dose vials after multiple use in the hospital *Wien Med Wochenschr.* 2007; 157: 398-401
20. Ponce S, Baridó E, Rancel S, Soto J, Wey S, Zaidi M.. Manual de prevención y control de infecciones intrahospitalarias. Mexico: Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán; 1996.
21. Cano M, Pérez J, Craig A, Liu M, Lyon G, Brandt M. et al. Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. *Med Mycol* 2005; 43: 219-225.
22. Centeno S, Machado S. Evaluación de la microflora aérea en las áreas críticas del hospital principal de Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. *Invest Clín* 2004, 45: 137-144.
23. Coria J, Gallardo D, Saavedra M, Castilla L, Guevara T, De la Luz G. Riesgo de bacteremia por soluciones parenterales. Estudio prospectivo en un servicio de infectología. *Rev Mex Pediatr* 2003, 70: 5-9
24. Raad I. Gram negative bacillary bacteremia and intravenous therapy practices. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 189-91
25. Macías A, Bruckner D, Hindler J, Muñoz M, Medina H, Hernández I, y col. Infusiones parenterales como medios de cultivo desde el punto de vista de las bacteriemias nosocomiales. *Invest Clin* 2000; 52: 39-43.
26. Vargas R. Agentes causales de neumonía y su relación con microorganismos del ambiente hospitalario en pacientes de la unidad de cuidados intensivos. *Enf Infec y Microb* 2004; 24. En http://www.amimc.org.mx/revista/2004/vol_24-2/agentes.htm. Acceso 18 de julio de 2005.
27. Repáraz F, Arina P, Artajo P, Sánchez M, Escobar E. Limpieza y desinfección en el hospital. *An Sis San Navarra* 2000; 23: 81-94.



Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas

Ana Cristina Salas Silva ¹, Isabel Maggiolo ², Próspero Alberto Rojas Martínez ³, José Gerardo Amesty Hernández ⁴, Melvin Esteban Ferrer Inciarte ¹

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación existente entre flora vaginal y rotura prematura de membranas, en adolescentes embarazadas que acudieron a la consulta prenatal de la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza” (MACP), perteneciente al Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. El diseño de este estudio fue explicativo, cuasi experimental. La población y muestra estuvo representada por 80 adolescentes embarazadas, en el último trimestre de gestación. El método de recolección de datos estuvo constituido por una entrevista personalizada y los datos fueron recogidos en un formulario conformado por preguntas abiertas. A todas las pacientes se les tomó muestra para cultivo de secreción vaginal identificándose la flora vaginal presente. Como resultados obtenidos se tuvo que la población mayormente afectada fueron las adolescentes mayores de 17 años; iniciando su actividad sexual entre los 15 y 17 años, las cuales viven en concubinato y pertenecen al Nivel V según Graffar. El diagnóstico de RPM se realizó a través de la maniobra de Tarnier y el Test de Nitrazina, con un periodo de latencia de 6-12 horas, la edad gestacional estuvo entre las 37-38 semanas. Los microorganismos reportados fueron bacilos Gram positivos en un 46%, combinación de bacilos Gram positivos y Gram negativos en el 16%, levaduras en el 15%, bacilos Gram negativos 8% y virus de papiloma humano (VPH) 3%. El cultivo de secreción vaginal fue positivo en el 57% de los casos, siendo *Candida albicans* el microorganismo predominante (25%). Se concluye que existe relación entre la flora vaginal patógena y RPM en las adolescentes con embarazo a término.

Palabras clave: Flora vaginal, rotura prematura de membranas, adolescentes embarazadas.

Vaginal flora in pregnant adolescents with membrane premature failure

SUMMARY

The objective of this work was to determine the existing relation between vaginal flora and membrane premature failure, in pregnant adolescents who went to the consultation of Maternity “Dr. Armando Castillo Plaza” (MACP), pertaining to the Independent Service University Hospital of Maracaibo. The design of this study was explanatory, quasi experimental. The population was represented by 80 pregnant adolescents, in the last trimester of gestation. The method of data collection was constituted by a customized interview and the data were gathered in a form conformed by open questions. All the patients were taken vaginal secretion culture identifying the vaginal flora present. As obtained results it were had population mainly affected was the greater adolescents of 17 years ; initiating its sexual activity between the 15 and 17 years, which live in concubines and belong at Level V according to Graffar. The diagnose of MPF was made through the maneuver of Tanier and Test of Nitrazina with a period of 6-12 latency hours; the gestacional age was between the 37-38 weeks. The reported microorganisms were Gram positive bacilli in a 46%, combination of Gram positive and Gram negative bacilli in 16%, yeast in 15%, bacilli Gram negative 8% and human papiloma virus (HPV) 3%. Vaginal secretion culture was positive in 57% of the cases, being *Candida albicans* predominant microorganism (25%). One concludes that relation between the pathogenic vaginal flora exists and MPF in the adolescents with pregnancy upon maturity.

Key words: Vaginal flora, membrane premature failure, pregnant adolescents.

-
1. División de Ginecología y Obstetricia – Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza” . Hospital Universitario de Maracaibo – Estado Zulia.
 2. Universidad del Zulia.
 3. Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.
 4. Servicio de Ecografía de la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza”. Hospital Universitario de Maracaibo – Estado Zulia.

Introducción

La ecología microbiana del cuerpo humano comprende diversos compartimentos, siendo la vagina uno de ellos, en el cual conviven muchas especies de microorganismos interactuando entre sí y con el huésped. La vagina, como todo compartimiento, es estéril hasta el término de la vida fetal. Al igual que otras estructuras de revestimiento, la vagina de la recién nacida es colonizada por microorganismos durante su paso por el canal del parto o inmediatamente después, y a continuación se halla expuesta a diversas posibilidades de invasión microbiana (1).

La flora vaginal (FV) normal, si bien varía en las diferentes etapas del desarrollo y crecimiento femenino, está constituida en la vida adulta por distintas especies de gérmenes aerobios, anaerobios obligados y facultativos, y la llamada flora láctica (bacilos de Döderlein), esta última responsable de mantener el pH vaginal entre 4,5 y 5, al desdoblarse a ácido láctico el glucógeno de las células epiteliales vaginales, produciendo peróxido de hidrógeno, el cual, controla el crecimiento de anaerobios, otras bacterias, e incluso algunos virus (2-4).

Lo antes expuesto, se evidencia durante el embarazo, en éste ocurren marcados cambios del medio hormonal, debido a lo cual se produce alteración en la FV, existe reemplazo de Lactobacilos de Döderlein lo que vuelve el pH vaginal menos ácido, facilitando así la proliferación de diferentes agentes patógenos, haciendo de las infecciones cervico-vaginales un trastorno frecuente durante el embarazo y a menudo difícil de erradicar, produciéndose recurrencias de las mismas, esto afecta directamente la gestación, incrementando el número de abortos espontáneos, rotura prematura de membranas, trabajo de parto prematuro, bajo peso al nacer y fiebre post parto (5-8).

Así mismo, en la adolescente, debido a los cambios propios durante esta etapa de la vida, las células de la vagina y cervix son más susceptibles a contraer infecciones, esto está dado por varios factores, unos atribuibles a sus características biológicas y otros a conductas sexuales riesgosas. A este hecho se suma las características propias de cada adolescente tales como inmadurez física, situación familiar, necesidades básicas insatisfechas, promiscuidad a la cual se suma la condición de un embarazo el cual en muchos casos es no deseado (9).

Es importante determinar el tipo de flora vaginal predominante en el curso del embarazo, debido a que las infecciones vaginales, se han asociado con rotura prematura de las membranas y trabajo de parto pretérmino, esto es producido por la colonización de las membranas ovulares por vía ascendente, que las debilitan provocando una serie de fenómenos que conllevan a la solución de continuidad de las

mismas y a la activación de la fosfolipasa A2 provocando aumento en la síntesis de prostaglandinas e inicio del trabajo de parto (10).

Ante la presencia de infecciones vaginales, se debe implementar un tratamiento precoz para evitar las complicaciones antes mencionadas, ya que la rotura prematura de membranas y la amenaza de parto prematuro constituye un importante motivo de consulta en la emergencia obstétrica, atribuyéndose como causa muchas veces a la infección urinaria, olvidándose en la mayoría de los casos la infección del tracto vaginal (10-12).

En nuestro medio el bajo nivel cultural, la depresión socio-económica, la frecuente promiscuidad sexual y la poca instrucción acerca de una higiene adecuada hacen de nuestras adolescentes embarazadas un blanco frecuente de infecciones cervico-vaginales las cuales pueden derivar en rotura prematura de membranas. Por tanto la atención cuidadosa de estas gestantes debe ser parte integral del manejo obstétrico, de forma que se pueda prevenir el alto índice de complicaciones e infecciones materno-fetales.

Estudios realizados por Raccamarich en el año 2002 en Venezuela, reportaron un 90% de infecciones vaginales, correspondiendo el 29% a la vaginosis bacteriana, de igual manera esta afección se la ha detectado en el 15% a 20% de las gestantes. Otros estudio describen la alteración de la flora vaginal, como la causa más común de infección del tracto genital bajo en mujeres en edad reproductiva, las edades varían de acuerdo a las características culturales de la población, presentándose principalmente en embarazadas con edades comprendidas entre los 15 y 24 años (13).

Cabe destacar que sobre este tema se encontraron estudios internacionales, realizados por Gayon (14), Yáñez (15), López (5) y Montes (8); de igual manera en Venezuela existen estudios desarrollados por Torres (10) y González (16), que tratan temas relacionados con este estudio.

En vista de la relación de la flora vaginal con la rotura prematura de membranas, el parto pretérmino y las graves complicaciones para la madre y el feto, aunado al hecho que en la región no se encontró evidencia escrita sobre este tema, se crea la necesidad de realizar dicha investigación en la Maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza" en el periodo comprendido del primero de junio del 2007 a enero de 2008. Debido a que la prevención y el tratamiento temprano son claves para reducir la morbimortalidad en las adolescentes gestantes.

Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas

Formulación del problema

En este contexto de análisis, se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál es la flora vaginal más frecuente en adolescentes embarazadas en el último trimestre de gestación y si existe relación entre la flora vaginal aislada y la presencia de rotura prematura de membranas?

Objetivos de la investigación

General

Relacionar la flora vaginal en adolescentes con embarazo a término, con rotura prematura de membranas en la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza” entre junio de 2007 y enero del año 2008.

Específicos

- Identificar la microbiología presente en la flora vaginal en las adolescentes con embarazo a término que acuden a la consulta prenatal infanto-juvenil.
- Determinar los factores de riesgo asociados a la presencia de infección vaginal, en las adolescentes con embarazo a término que acuden a la consulta prenatal infanto-juvenil.
- Determinar el periodo de latencia de rotura prematura de membranas.

Este estudio se llevó a cabo en la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza”, en la ciudad de Maracaibo, Estado Zulia, en el periodo comprendido desde junio de 2007 a enero de 2008. La muestra estuvo representada por pacientes adolescentes con embarazo a término, que asistieron a la consulta prenatal de este centro.

Hipótesis

La flora vaginal presente en adolescentes embarazadas está relacionada con la rotura prematura de las membranas.

En la Tabla 1 se muestran las características epidemiológicas, características clínicas y los agentes etiológicos aislados con sus respectivos indicadores.

Este trabajo de investigación fue de tipo explicativo, estudiando la variable flora vaginal, describiendo su relación en la adolescente embarazada con rotura prematura de membranas.

El diseño empleado en la presente investigación fue casi experimental y de campo, ya que se obtuvo la información directamente de las adolescentes embarazadas, que acudieron a la consulta prenatal de la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza” (MACP) perteneciente al Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), de la ciudad de Maracaibo - Estado Zulia, en el periodo comprendido de junio de 2007 a enero de 2008.

Tabla 1. Operacionalización de la variable flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas.

Objetivos Específicos	Variable	Dimensiones	Indicadores
Identificar la microbiología presente en la flora vaginal en las adolescentes con embarazo a término que acuden a la consulta prenatal infanto-juvenil.	Flora vaginal	Microbiología presente	-Gram positivos -Gram negativos -Hongos -Otros
Determinar los factores de riesgo asociados a la presencia de infección vaginal, en las adolescentes con embarazo a término que acuden a la consulta prenatal infanto-juvenil.		Factores de riesgo	-Edad -Estado civil -Inicio actividad sexual -Nivel socioeconómico (Graffar) -Control prenatal -Edad gestacional -Antecedentes patológicos
Determinar el periodo de latencia de la rotura prematura de membranas.	RPM	Periodo de latencia	-< 6 horas -6 – 12 horas -12 – 18 horas -> 18 horas

RPM: rotura prematura de membranas.



Materiales y métodos

Población y muestra

Luego de la recolección de datos se aplicó la fórmula de Sierra Bravo para el cálculo de la muestra, la cual quedó conformada por 80 adolescentes embarazadas que acudieron a la emergencia de la MACP. La muestra fue no probabilística y no aleatoria.

Criterios de inclusión

- Adolescentes que acudieron a la consulta prenatal de la MACP
- Gestantes en el último trimestre de gestación
- Presencia de rotura prematura de membranas

Criterios de exclusión

- Adolescentes embarazadas que se encuentren en el I y II trimestre de gestación.
- Mujeres mayores de 19 años

Procedimiento

Toma de muestra: A cada paciente previamente se le explicó sobre el estudio, se solicitó su aprobación para participar en él y para la toma de muestra, se le realizó un cuestionario. Durante el examen físico ginecológico el investigador prestó atención al aspecto de las secreciones, vulva, pared vaginal y cérvix. Al mismo tiempo, con aplicadores de algodón estériles se tomó muestra de la secreción ubicada en el fondo de saco vaginal. Un aplicador fue utilizado para el frotis de tinción de Gram, otro se introdujo en un tubo de ensayo conteniendo solución salina al 0.9% para el examen al fresco, otro se introdujo en un tubo que contenía medio de Stuart para cultivo posterior.

Los cultivos de secreción vaginal se procesaron en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (CRB-SAHUM), con la siguiente metodología: se utilizó el medio de transporte de Cary and Blair para gérmenes Gram negativos y el medio de Stuart para gérmenes Gram positivos al momento de tomar la muestra.

En el laboratorio, las muestras fueron procesadas de la siguiente forma: a) Examen inicial al fresco para buscar tricomonas y levaduras; b) Examen directo con coloración de Gram. El resto de la muestra fue cultivada de la siguiente forma: 1) Medio Agar de infusión de cerebro y corazón para gérmenes Gram positivos; 2) Medio de Agar GC (gelosa-chocolate), para *Neisseria* patógenas, *Haemóphilus*, *Staphylococcus aureus*, Diplococos; 3) Agar SB (Sabouraud Dextrosa) para levaduras y hongos; 4) Agar MC (MacConkey), para bacilos y cocos Gram negativos; 5) VCN (base de agar GC, enriquecido con Isovitalax (suplemento definido químicamente desarrollado para ayudar al crecimiento de gonococos y otros microorganismos

como el *Haemóphilus*), más hemoglobina y antibióticos de VCN y un inhibidor de VCN. Dependiendo del crecimiento, se realizó un frotis para observar la afinidad tintorial.

Técnica e instrumento de recolección de datos

En esta investigación se utilizó la técnica de la entrevista para la recolección de la información. El instrumento de recolección de los datos fue un formulario conformado por preguntas abiertas y cerradas donde se recogieron todos los datos sobre las características epidemiológicas y clínicas de cada paciente. A todas las pacientes se les solicitó su aceptación para ser incluidas en el estudio, expresado en una carta de consentimiento informado.

Análisis de los datos

Para el análisis de los resultados estadístico de esta investigación se utilizó la estadística descriptiva, se realizó un estudio de frecuencias, medidas de tendencia central como la media o promedio (\bar{x}) y medidas de dispersión como desviación estándar (S). Los resultados se procesaron con el programa estadístico SPSS .10 y fueron presentados en Tablas y Figuras.

Resultados

Se estudiaron 80 adolescentes embarazadas que acudieron a la emergencia de la Maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza" perteneciente al Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, por presentar rotura prematura de membranas, en el periodo comprendido de junio de 2007 a enero de 2008, obteniéndose los siguientes resultados.

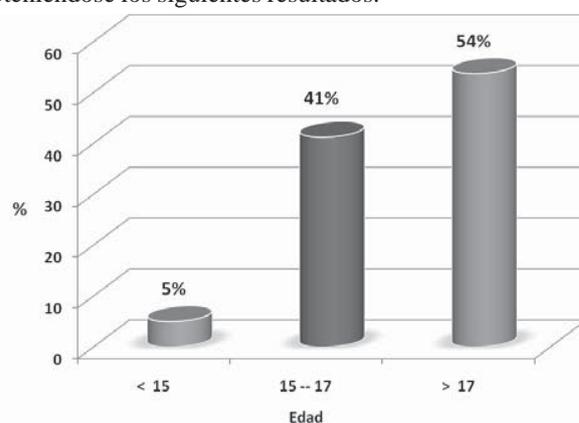


Figura 1. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Distribución según la edad. Periodo: 2007-2008.

En la Figura 1 se analiza la distribución de las pacientes que ingresaron en la emergencia de la MACP según su edad obteniéndose el mayor porcentaje en el grupo etario mayor de 17 años con el 54% (43), el grupo de 15 – 17 años el 41% (33) y en último lugar el grupo de menos de 15 años con un 5% (4).

Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas

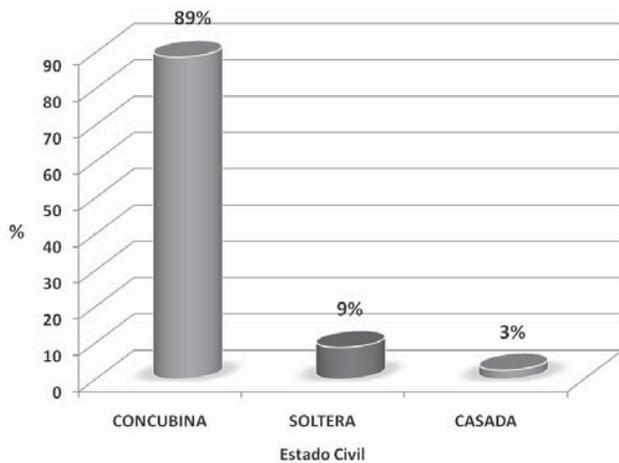


Figura 2. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Estado civil. Periodo: 2007-2008.

En la Figura 2 se aprecia la distribución según el estado civil, en donde obtuvimos que las adolescentes que viven en concubinatos ocupan el 89% (71), las solteras representan el 9% (7) y las casadas representan el 3% (2).

Figura 4. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Número de parejas. Periodo: 2007-2008.

En la Figura 4 se aprecia la distribución según el número de parejas que ha tenido cada adolescente, obteniéndose que la mayoría de ellas tienen o han tenido sólo una pareja 80% (64), las que han tenido 2 parejas representaron el 19% (15) y aquellas que han tenido 3 parejas el 1% (2).

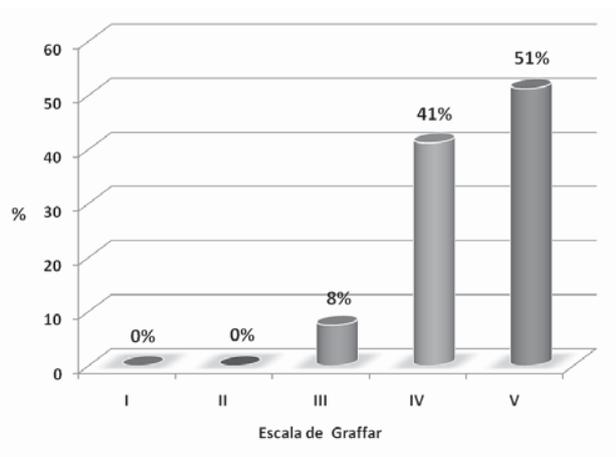


Figura 3. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Edad de inicio de actividad sexual. Periodo: 2007-2008.

Dentro de las características epidemiológicas evaluamos el inicio de relaciones sexuales en cada adolescente con RPM, esto se aprecia en la Figura 3, la mayoría de las encuestadas refirieron inicio de actividad sexual entre los 15 y 17 años en el 83% (66), las que iniciaron antes de los 15 años el 9% (7) y aquellas que refirieron haber iniciado después de los 17 años representaron también un 9% (7).

Figura 5. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Nivel Socioeconómico según Graffar. Periodo: 2007-2008.

El nivel socioeconómico constituye un factor de riesgo para la adolescente embarazada, en este sentido se tiene que existen cuatro niveles establecidos por Graffar, los cuales se analizan en la Figura 5 obteniendo los siguientes resultados: para el Nivel I, que corresponde a la clase social alta y el Nivel II que corresponde a la clase social media-alta, el porcentaje obtenido fue 0% (0); el Nivel III correspondiente a la clase social media-baja fue de 8% (6), el Nivel IV perteneciente a la clase obrera obtuvo el 41% (33)%, finalmente el Nivel V que denota la pobreza crítica o estructurada fue de 51% (41).

Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas

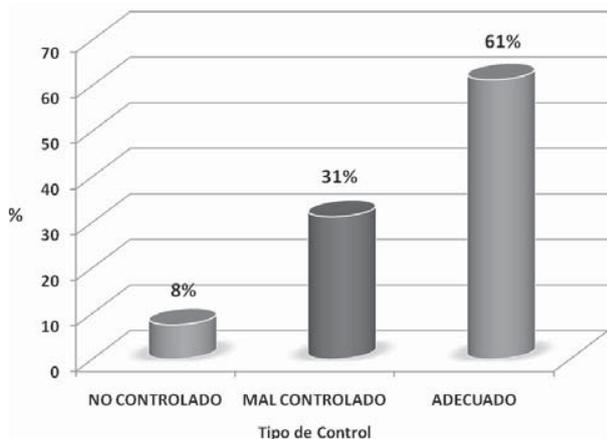


Figura 6. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Control Prenatal. Periodo: 2007-2008.

Se estimó la asistencia al control prenatal, Figura 6, obteniéndose que la mayoría de las adolescentes entrevistadas tienen un control prenatal adecuado en el 61% (49) de los casos estudiados, las adolescentes que realizaron un mal control de su gestación representaron el 31% (25) y aquellas que no fueron controladas el 8% (6).

Figura 7. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Edad gestacional. Periodo: 2007-2008.

En la Figura 7 se puede observar que la mayoría de las adolescentes presentaron RPM a las 38 semanas de gestación en un 43% (34), seguidas de las de 37 semanas con el 36% (29), las pacientes con edad gestacional de 39 semanas ocuparon el 16% (13), las de 40 semanas el 4% (3) y finalmente con 41 semana el 1% (1) restante.

Figura 8. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Distribución según la paridad. Periodo: 2007-2008.

Fue determinado el número de hijos de cada adolescente con RPM estudiada, (Figura 8), observándose que en su mayoría eran primíparas 71% (57) y de 2 a 4 paras 29% (23) restante.

Figura 9. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Citología y Tinción de Gram. Periodo: 2007-2008.

En la Figura 9 se puede apreciar el tipo de microorganismo aislado según la citología y tinción de Gram realizados en cada paciente estudiada, obteniéndose que la mayoría de estos fueron bacilos Gram positivos en un 46% (37) de los casos, los bacilos Gram positivos y negativos se determinaron en el 16% (13), las levaduras en el 15% (12), los bacilos Gram negativos el 8% (6) y VPH en 3% (2) de los casos restantes.

Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas

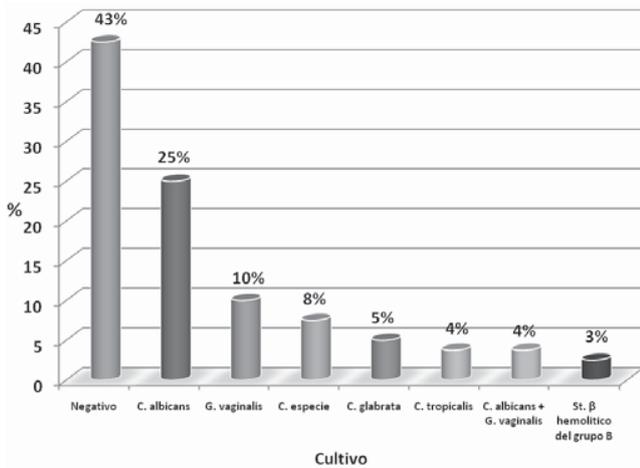


Figura 10. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Cultivo de secreción vaginal. Periodo: 2007-2008.

Siguiendo el mismo orden de ideas se les realizó cultivo de secreción vaginal a todas las adolescentes atendidas con RPM para determinar el tipo de flora vaginal presente, apreciándose en la Figura 10 que el 43% (34) de los cultivos realizados fueron negativos reportando flora vaginal normal, el 25% (20) de los casos resultó positivo para *C. albicans*, el 10% (8) para *G. vaginalis*, un 8% (6) *C. especies*, 5% (4) *C. glabrata*, 4% *alis* y el 3% *B*.

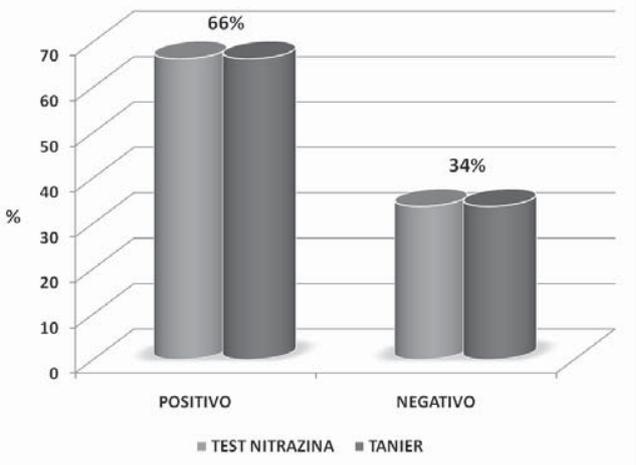


Figura 11. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Periodo de latencia . Periodo: 2007-2008.

Se determino el tiempo de evolución de la RPM, tal como se aprecia en la Figura 11, observándose que en el 51% (41) de las gestantes la evolución se ubico entre las 6 – 12 horas, de 12 – 18 horas el 30% (24), menos de 6 horas el 18% (14) y mas de 18 horas el 1%(1).

Figura 12. Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con RPM. Diagnóstico de RPM. Periodo: 2007-2008.

Finalmente se aplicaron dos pruebas diagnosticas para corroborar la presencia de rotura prematura de membranas, Figura 12, encontrándose el test de Nitrazina y la maniobra de Tanier positiva en el 66% (53) de los casos, el 34% (27) restante fue negativo.

Discusión

Se realizó un estudio prospectivo sobre la flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas. La población de estudio fue de 80 adolescentes que asistieron a la consulta prenatal de la MACP, para el momento de la consulta a cada paciente se le tomo muestra de secreción vaginal y se le realizó seguimiento hasta el momento del parto.

Las pacientes estudiadas presentaron edad promedio $17 \pm 1,4$ años, estas cifras se corresponden con lo reportado por Cuauhtemoc y col (17) cuyo promedio de edad fue de $15,7 \pm 1,2$ años. El inicio de actividad sexual referido fue a los $16 \pm 1,2$, Torres (10) reporta que la edad mas frecuente de inicio de actividad sexual fue a los 15 años. La mayoría viven en concubinato y manifiestan tener sólo una pareja sexual. La mayoría presentó un Graffar V.

Las adolescentes embarazadas atendidas en la consulta se encontraban en la $38 \pm 0,9$ semana de gestación. Con un control prenatal adecuado para el momento de la entrevista.

Los microorganismos reportados en tinción de Gram y citología fueron bacilos Gram positivos, cocos Gram positivos, cocos Gram negativos, combinación de bacilos Gram positivos y Gram negativos, levaduras, bacilos Gram negativos y VPH.

Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas

Para la determinación de la flora presente se realizó cultivo de secreción vaginal el cual resultó positivo para *Candida albicans*, siendo el microorganismo predominante, seguido en frecuencia la *Gardnerella vaginalis*, *Candida especie*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*. Cabe señalar que se encontró colonización vaginal con *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B en dos casos. El resultado de los cultivos en el grupo de estudio mostró flora normal en 43%. Esto concuerda con lo encontrado por Somogyi y col (18) (51,11%).

Estudios realizados por Villalobos y col (4), Torres y col (10) y por Kannel y Levine (19) refieren que el principal microorganismo encontrado es la *C. albicans*. La *Candida* de la especie *albicans*, es el principal agente responsable de las micosis genitales y perigenitales en aproximadamente 80% de los casos. Las especies *glabrata* y *krusei* representan entre 3% y 20% las cuales producen vaginitis pero menos virulentas, no se adhieren al epitelio vaginal, ni producen enzimas proteolíticas (4).

La infección mixta se evidenció en tres casos cuyos agentes etiológicos fueron la *C. albicans* + *G. vaginalis*. Todos los estudios bacteriológicos fueron negativos para *Trichomona vaginalis*. En vista de la relativa dificultad para establecer el diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis*, ya que la metodología de laboratorio es técnicamente demandante y costosa, se desconoce el impacto que tienen esta infección en el grupo estudiado.

La colonización o infección vaginal micótica es frecuente en la mujer embarazada. La mayoría de los casos de vaginitis micótica es producida por *Candida albicans*, siendo la tercera causa más frecuente de leucorrea en mujeres embarazadas y similar al 11.5% reportado por Castro y col. (20) en un estudio realizado en los centros de salud de León y Chinandega.

Cabe señalar que la portación asintomática del *Streptococcus grupo B* es común en la mujer, especialmente en la vagina, cérvix y recto, en porcentajes variables que oscilan entre 5 y 30% (21). López (5) reporta colonización vaginal por este microorganismo en el 26% de las pacientes.

La mayoría de las pacientes evaluadas en la consulta prenatal, a quienes se les realizó seguimiento hasta la culminación del embarazo, ingresaron semanas más tarde en la emergencia de la MACP, al momento de su ingreso se les realizó el test de Nitrazina y la Maniobra de Tanier corroborando la presencia de RPM en ausencia de trabajo de parto. El periodo de latencia de estas pacientes osciló entre las 6 y 12 horas. En este punto hay que destacar que un periodo de latencia prolongado repercute significativamente en la evolución final de la gestación y la no resolución del embarazo expone tanto a la madre como al feto a infecciones perinatales de difícil manejo terapéutico.

Por lo antes expuesto se podría establecer que existe una incidencia y predisposición a la RPM en pacientes adolescentes embarazadas y que esta tiene relación con la presencia de estos microorganismos.

Conclusiones

Luego de analizados y discutidos los resultados se tienen las siguientes conclusiones:

- En nuestro país existe un incremento considerable de adolescentes que experimentan un embarazo, en muchas ocasiones no deseado, esto se acompaña de la ausencia de educación y la falta de orientación familiar en lo que respecta a la educación sexual.
- El grupo etario con mayor prevalencia fue > 17 años ($17 \pm 1,4$), las cuales viven en concubinato con un solo compañero sexual. Este grupo de pacientes iniciaron su actividad sexual a los $16 \pm 1,2$ años. Las adolescentes tenían un nivel socioeconómico V según Graffar, y se encontraban al final de la gestación, $38 \pm 0,9$ semanas.
- Los microorganismos reportados fueron bacilos Gram positivos y negativos, cocos Gram positivos y negativos, combinación de bacilos Gram positivos y negativos, levaduras y VPH. Igualmente el cultivo de secreción vaginal fue positivo para *Candida albicans* en la mayoría de los casos. Se presentó también como agente causal de infección la *Gardnerella vaginalis*, *Candida especie*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*. Hubo presencia de *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B en el 3% de los casos estudiados. Así mismo se reportó infección mixta con *C. albicans* y *G. vaginalis*. Un porcentaje de estas pacientes presentó flora vaginal normal. Estas pacientes presentaron RPM, la cual fue corroborada con test de Nitrazina y maniobra de Tarnier, evidenciándose en estas adolescentes relación entre la flora vaginal patógena y RPM.

Referencias

1. Vainer O, Audisio T. Tracto Genital Inferior. Actualizaciones Diagnósticas y Terapéuticas. 1ra Ed. Universidad Nacional de Córdoba. Pag. 88-90; 2006.
2. Mandell D. Vulvovaginitis y cervicitis en Enfermedades Infecciosas: principios y práctica 5ª Edición. Panamericana, Argentina. Sección L Capítulo 95: 1479-1493; 2002.
3. Rosen D. Crecimiento y desarrollo fisiológico durante la adolescencia. Pediatrics in Review, Vol. 26 (2): 43-49; 2005.
4. Villalobos N, Ameer R, Colina M, et al. Flora vaginal en pacientes seropositivas y seronegativas del virus de inmunodeficiencia humana. Rev. Obstet Ginecol Venez; 64 (3): 133-138; 2004.
5. López C. Agentes etiológicos más frecuentes de Infección Cervico Vaginal en mujeres embarazadas atendidas en el HEODRA de octubre a diciembre del 2003. [Revista en Línea]

Flora vaginal en adolescentes con embarazo a término y su relación con rotura prematura de membranas

- Disponible en referencia electrónica: http://www.agente_etiologico.pdf [Consulta, 2007. mayo, 10]. 2004.
- Pérez A, Donoso E. *Obstetricia*. Segunda Edición Mediterráneo. Santiago Chile. Cap.46 Pág. 693-701; 1992.
 - Pernoll M, Benson R. *Diagnostico y Tratamiento Gineco-obstétrico*. Quinta Edición El Manual Moderno. México DF. Pág. 629-640; 1998.
 - Montes E, Payan M, Pérez M, et al. Comportamiento clínico epidemiológico de la infección vaginal en gestantes de dos consultorios. *Archivo Médico de Camagüey*; Vol. 9(3):1025-1025. [Revista en Línea] Disponible en referencia electrónica: <http://www.amc.sld.cu/amc/2005/v9n3/1033.pdf> [Consulta, 2007. mayo, 10]. 2005.
 - Peláez J, Salamon N, Machado H, et al. Salud sexual y reproductiva. *Manual de prácticas clínicas para la atención de la adolescencia*. Pág.183-184/190-191; 2000.
 - Torres K, Soto A, Sandra D, et al. Candidiasis vaginal en primigestas *Rev. Obstet Ginecol Venez*; Vol.65 (2): 55-58; 2005.
 - Charles D, Eschenbach D. *Vaginosis durante la gestación: consecuencias y tratamiento*. Infecciones Obstétricas y Perinatales. Primera edición. Editorial Mosby/ Doyma. Madrid-España. Pag. 2-7; 1994.
 - Althabe F. El parto pretérmino: detección de riesgos y tratamientos preventivos. *Rev. Panam. Salud Pública*; 5: (6) 375; 1999.
 - Raccamarich P, Polanco E, García M, et al. Vaginosis Bacteriana en Mujeres con Amenaza de Parto Prematuro en la Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera", Valencia. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*. Universidad de Carabobo; Vol. 6 (3): 2-7. [Revista en Línea] Disponible en referencia electrónica: <http://servicio.cid.uc.edu.ve/fcs/vol6n3/6-3-5.pdf> [Consulta, 2007. mayo, 10]. 2002.
 - Gayón E, Hernández H, Sam S, et al. El cultivo vaginal en el diagnóstico de vulvovaginitis en niñas y adolescentes *Acta Peditr Méx*; 26(3): 141-148; 2005.
 - Yañez L, Gaúca R, Salinas JL, et al. Infección durante el embarazo como factor causal de ruptura prematura de membranas y de parto pretérmino. *Salud Publica Mex*;32:288-297; 1990.
 - González C, Moreno M, Nieves B. Flora vaginal en pacientes que asisten a consulta ginecológica *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. Vol.26(1): 19-26; 2006.
 - Cuahtemoc E, Rodriguez M, Mota C, et al. Percepción de las relaciones familiares y malestar psicológico en adolescentes embarazadas. *Perinatol Reprod Hum*; 20(4): 80-90; 2006.
 - Somogyi L, López C, Barrios Z. Evaluación integral del flujo vaginal. *Rev Obstet Ginecol Venez*; 40 (4): 182-184; 1980.
 - Kannel WB, Levine BS. Candida infection as risk factor for HIV transmission. *J Women Health*; 12(5): 487-494; 2003.
 - Castro I y col. Prevalencia de tres enfermedades de transmisión sexual en mujeres de León, Corinto y Chinandega. MINSAL – UNAN. 1988.
 - American college of obstetric and gynecology. Prevention of early onset group B Streptococcal disease in newborns. *ACOG Comm Opin*; 173: 1-8; 1996.

Aspectos epidemiológicos, clínicos y bacteriológicos en infección urinaria por *Staphylococcus saprophyticus*

Ramón E. Andrade P.^{1,2}, Evelyns Villarroel¹, Narlesky Rivero¹, Pedro Navarro^{1,3}

RESUMEN

Las infecciones urinarias ocasionadas por *Staphylococcus saprophyticus* se describen en un grupo muy particular de pacientes. Frecuentemente, éstas son diagnosticadas en mujeres jóvenes no hospitalizadas, con clínica de cistitis, pielonefritis y en oportunidades relacionadas al embarazo. Se presenta en esta revisión los hallazgos clínicos, epidemiológicos y bacteriológicos de esta infección en 131 pacientes en el Hospital Universitario de Caracas, entre enero de 1998 hasta diciembre de 2004. Se encontraron algunas características poco frecuentes, tales como aislamiento en niños y pacientes hospitalizados de ambos sexos. Se presume que esto podría deberse a las características inherentes a la población estudiada.

Palabras clave: *Staphylococcus saprophyticus*, infección urinaria, epidemiología, diagnóstico, infección nosocomial.

Epidemiological, clinical and bacteriological findings in urinary infections by *Staphylococcus saprophyticus*

SUMMARY

Urinary infections caused by *Staphylococcus saprophyticus* have been described in a very particular group of patients. Frequently, these infections are diagnosed in young women off hospital presenting symptoms of cystitis, pyelonephritis. Occasionally, pregnancy was involved. This revision comprises clinical, epidemiological, and bacteriological findings regarding this infection in 131 patients at the Hospital Universitario de Caracas between January 1998 and December 2004. Some of these finding were less frequently. For example, isolates were found in children and hospitalized patients from both sexes. It is presumed that these could be attributed to the inherent characteristics of the population under study.

Key words: *Staphylococcus saprophyticus*, urinary infections, epidemiology, diagnostic, nosocomial infections.

1. Sección de Bacteriología. Hospital Universitario de Caracas (H.U.C.)

2. Cátedra de Microbiología. Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela (U.C.V.).

3. Servicio de Infectología Pediátrica H.U.C.

Introducción

La habilidad de los estafilococos coagulasa negativa (ECN) para causar enfermedad e infección en los humanos es un fenómeno poco comprendido. Varios factores participan; entre estos, la capacidad de estas bacterias para adherirse a las superficies mucosas y su virulencia, además factores que juegan un rol importante son la respuesta inmunológica del hospedador, la presencia de prótesis y catéteres de variada índole y utilidad, así como el tiempo de exposición previa al uso de antibióticos, entre otros.

Todos estos factores actúan conjuntamente o de manera aislada, constituyéndose así en condicionantes importantes para establecer la patogénesis de la infección (1).

Estas bacterias fueron tradicionalmente consideradas colonizantes de piel y fue tan solo a partir de 1980 cuando se empezó a atribuirles el rol de patógenos potenciales. Se aíslan a partir de una gran variedad de muestras biológicas en diferentes procesos infecciosos en el humano. Entre este grupo de bacterias, cabe destacar las especies *Staphylococcus saprophyticus* (Ss) y *Staphylococcus haemolyticus*, las cuales ocasionan infecciones urinarias; también se encuentran en este grupo *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus lugdunensis*, estas últimas están implicadas en infecciones asociadas al uso de catéteres y heridas (2-6).

Varios investigadores han identificado y clasificado a los ECN por diversas pruebas bioquímicas y estudios microbiológicos (7-10).

Staphylococcus saprophyticus es un coco gram positivo no fermentador de glucosa, coagulasa negativa, catalasa y ureasa positiva. Son similares en morfología y características bioquímicas a otros ECN, pero se diferencian de estos últimos por su resistencia a la novobiocina. No son aislados como colonizantes del tracto urinario y su presencia en las vías urinarias del humano sintomático le ha atribuido un rol patogénico (6,10-13).

Desde su aislamiento en cultivo puro en 1882, la taxonomía de los estafilococos ha sido confusa debido a las variadas técnicas utilizadas para su identificación. Se les ha asignado diversos nombres, los cuales se basaron inicialmente en característica fenotípicas tales como su morfología y en sus propiedades bioquímicas. Estos criterios se utilizaron hasta que recientemente se determinó una clasificación basada en estudios moleculares y en el análisis de su ácido desoxirribonucleico (ADN) (6,14-16). Los primeros intentos en clasificarlos fueron realizados por Baird-Parker A. C. en 1952 con subsecuentes actualizaciones a partir de 1972 (7-9). Kloss W. et al realizaron en 1975 estudios sobre su composición de bases guanina-citosina (G-C) (10).

Pereira A. reportó por primera vez en 1962 la importancia del test de la sensibilidad *in vitro* a la novobiocina, lo que permitió diferenciar rápidamente a las cepas de *micrococcus* de otras cepas de ECN, siendo las primeras resistentes a dicho antibiótico (17). Este hecho fue corroborado posteriormente por Mitchell R. et al. y Mabeck P. (18,19). En su trabajo relacionado con la clasificación e identificación de estafilococos, Mitchell R. y Baird-Parker A. reportan que los *micrococcus* del sub-grupo 3 desarrollaban una concentración mínima inhibitoria (CMI) a la novobiocina mayor a 25 microgramos por mililitro (18).

Buchanan R. et al. incluyen en el manual Bergey's al *micrococcus* subgrupo 3 de la clasificación de Baird-Parker A. en el género *Staphylococcus*, basándose en la composición de la pared celular y contenido de bases (G-C) (20).

Schleifer K. y Kloss W. reportaron que otras especies de estafilococos, tales como *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. sciuri*, son también resistentes *in vitro* a la novobiocina, a pesar de no ser de la especie Ss. Por lo tanto, queda claro que la resistencia a este antibiótico no puede tomarse como único indicador para el diagnóstico de infecciones por Ss (10).

Kloss W., Almeida R. demostraron *in vitro* que al adicionar discos con cinco microgramos de novobiocina a los cultivos de ECN en agar Muller-Hinton provenientes de muestras de infecciones del tracto urinario, en los aislamientos de Ss estos desarrollaban halos de inhibición no mayores de 16mm, lo cual les llevó a inferir que este era un método fácil y rápido para diagnosticar infecciones causadas por esta bacteria. Sin embargo, las especies *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. sciuri* también desarrollan dichos halos, estas últimas especies de bacterias provienen de animales y expresan patogenicidad frecuentemente en pacientes inmunosuprimidos. Por esta razón, los taxonomistas no consideran esta prueba determinante para la identificación de Ss, prefiriendo la utilización de pruebas de mayor especificidad (21,22).

Trabajos de Pereira A.; Mitchell R.; Mabeck C.; Maskell R.; Sellin M.; William D.; Jordan R.; Lewis M.; Lathman T.; Rupp M., describen la frecuencia y características epidemiológicas, clínicas y bacteriológicas de las infecciones urinarias por Ss. (1,12,17-19,23-27).

A continuación se describe brevemente los aspectos más relevantes de dichas investigaciones.

Pereira A. aisló SCN como causante de infección urinaria en una mujer con examen de orina caracterizado por piuria. Este investigador reporta que estas bacterias son resistentes a la novobiocina (17). Mitchell R. corroboró este hallazgo al describir infecciones urinarias en un grupo de mujeres en condi-

ciones ambulatorias con exámenes de orina patológicos caracterizados también por piuria y donde también aisló SCN resistentes a la novobiocina (18).

Mabeck C. reportó *Ss* como la segunda causa bacteriana de infecciones del tracto urinario después de la *Escherichia coli* en un grupo de mujeres sintomáticas y con alta incidencia en pacientes cuyas edades oscilaban entre 16 y 25 años (19). Estudios subsecuentes han confirmado dichas características y hacen correlación a la etapa de vida sexual activa. Hoveliuss, entre otros, determinó aislamiento de *Ss* en 20% de hombres con uretritis no gonococcica (28).

Maskell R. afirmó que *Ss* es capaz de producir inflamación aguda del tracto urinario al identificar piuria en un 80% de las muestras de orina. Este investigador lo aisló con una frecuencia del 7% en diez mil urocultivos provenientes de mujeres con infección urinaria en condiciones ambulatorias y durante un período de observación de ocho meses. Su identificación la basó tan sólo en el test de coagulasa y la resistencia a la novobiocina. Así mismo, realizó un estudio retrospectivo en 12 investigaciones relacionadas con la identificación de ECN como patógenos del tracto urinario. Ocho de estas investigaciones fueron realizadas en Europa entre 1941 y 1973 y dos en Norteamérica entre 1941 y 1942. Este mismo autor concluyó que la frecuencia variaba entre 7 y 28 por ciento (23).

Sellin M. halló también ECN resistentes a la novobiocina como segunda causa bacteriana de infecciones del tracto urinario después de la *Escherichia coli* en un grupo de 154 estudiantes universitarias norteamericanas que presentaban clínica de disuria. Esta investigadora identificó seis cepas de ECN resistentes a la novobiocina en un grupo de 200 muestras de orina contaminadas, lo que le llevó a inferir que este microorganismo es un patógeno selectivo del tracto urinario en mujeres jóvenes (12). William D. y Lewis D. encontraron *Ss* en Norteamérica con una frecuencia que variaba entre 0.09 y 0.3 por ciento respectivamente (24,25).

Latman R. encontró infección urinaria por *Ss* con una frecuencia del 11% en un grupo de 81 mujeres estudiadas durante un período de 14 meses, todas con las características epidemiológicas ya referidas. Los síntomas predominantes en este grupo eran disuria y urgencia miccional (100%), así como también lumbalgia (17%). Las alteraciones del examen de orina oscilaron entre piuria (86%) y hematuria (54%). Este autor determinó aumento de anticuerpos séricos en el 86% de los casos, lo que reveló compromiso del tracto urinario superior. Así mismo, resaltó la importancia que debe otorgarse a urocultivos puros por *Ss* en concentraciones menores a 10^5 unidades formadoras de colonias (ufc) por cc en pacientes con clínica de síndrome uretral (26), hecho ya referido previamente por Jordan (25).

Fowler J. encontró una frecuencia de infecciones urinarias por *Ss* en un 10%, afirmando que en ocasiones un 10% de las pacientes pueden tener clínica de infección recurrente después del tratamiento, las cuales son favorecidas por la presencia de cálculos, que a su vez son desarrollados debido a la producción de ureasa por parte de los *Ss* (29).

Rupp M. aisló *Ss* como productor de infección urinaria con una frecuencia del 10% (1). En Venezuela, Andrade E. encontró *Ss* con una frecuencia del 2%. Plaza I. y Rivero N. lo identifican con una frecuencia de 7 y 2% respectivamente (30-32).

Propósito

Esta revisión se realiza a fin de precisar las características epidemiológicas, clínicas y bacteriológicas de las infecciones urinarias por *Ss* en nuestro medio.

Material y métodos

Se realiza una revisión retrospectiva sobre los hallazgos de urocultivos positivos en la Sección de Bacteriología en el Hospital Universitario de Caracas (HUC). Todas las muestras analizadas provenían de pacientes con sospecha clínica de infección urinaria en condiciones ambulatorias u hospitalizados. En su estudio bacteriológico, se siguieron las recomendaciones de la Sociedad Americana de Microbiología y de la NCCLS (33-35).

Se revisaron los libros de reporte bacteriológico durante el lapso 1998-2004. Los resultados de urocultivos positivos por *Ss* fueron vertidos en fichas de registro y se analizaron aspectos epidemiológicos, clínicos y bacteriológicos. En este último aspecto, se indagó la susceptibilidad a los antimicrobianos. Dichos resultados se dividieron oportunamente en dos trienios (1998-2000 y 2001-2003) y año 2004, se hace análisis comparativos entre dichos lapsos y se describen también los datos encontrados durante el año 2004.

Resultados

Se analizan los resultados de 34.427 urocultivos procesados en la sección de bacteriología del HUC, entre enero de 1998 y diciembre de 2004, provenientes de igual número de pacientes. Todos estos urocultivos procedían de igual número de pacientes con sospecha clínica de infección urinaria. De este total de muestras, 6.439 (18%) dieron resultados positivos al urocultivo al reportarse crecimiento bacteriano superior a 10^5 ufc por cc de orina. Se encontró en este universo, 131 urocultivos (2%) con aislamiento de *Ss*. Se procedió a realizar estudios comparativos en dos trienios, 1998-2000 y 2001-2003, en cuanto a hallazgos en aspectos epidemiológicos, clínicos y bacteriológicos y se analizan también los reportados durante el año 2004 (Tabla 1).

Tabla 1. Aspectos epidemiológicos y clínicos en pacientes con infección urinaria en el HUC por Ss durante los trienios 1998-2004.

Lapso	1998-2000		2001-2003		2004	
	62		52		17	
Total de pacientes						
Sexo	Pacientes	(%)	Pacientes	(%)	Pacientes	(%)
Femenino	50	81	43*	83	17	0
Masculino	12	19	9	17	0	0
PROCEDENCIA						
Consulta Externa	24	39	38	73		
Hospitalizados	38	61	14	27	11	65
DIAGNOSTICO						
Infección urinaria	7**		5***		7	41
Pielonefritis					4	23
Pacientes con ACV y uso de sonda vesical	3		1			
Leucemia	1					
IRCT			1			
Uretritis			1			
Embarazadas****					6	36
Sin diagnostico	1		1			

ACV: Accidente cerebro-vascular.

IRCT: Insuficiencia renal crónica terminal.

*Once pacientes estaban embarazadas con más de 23 semanas de gestación.

** Un paciente con diabetes y otro paciente con SIDA.

*** Dos pacientes con diabetes y otro era un niño de 1 año de edad con clínica de infección urinaria.

**** Dos de ellas con insuficiencia renal crónica, de las cuales una presentaba cáncer de cuello uterino y síndrome nefrótico, y la otra con peritonitis otra paciente evolucionaba con SIDA y una cuarta con pielonefritis asociada.

En el primer trienio, se encontraron aislamientos de Ss en 62 de los 3.199 pacientes estudiados (2%). Mientras que en el segundo trienio fueron 52 de 2.505 (2%). En el año 2004, se encontraron 17 entre 735 pacientes estudiados (2%).

En el primer trienio, 50 aislamientos (81%) correspondía a pacientes del sexo femenino y 12 (19%) al sexo masculino. Veintiséis de estas pacientes (42%) tenían una edad que oscilaba entre 30 y 50 años. Treinta y ocho (61%) eran pacientes hospitalizados y 24 (39%) eran ambulatorios. De estas pacientes hospitalizadas, 12 (32%) correspondían al servicio de obstetricia (sala de partos). Los restantes 26 pacientes estaban ubicados en otros servicios del hospital. En este mismo trienio, 12 aislamientos de Ss provenían de pacientes masculinos, de quienes se describen sus características (Tabla 1).

En el segundo trienio, de los 52 aislamientos de Ss, 43 de ellos (83%) correspondían a pacientes de sexo femenino y 9 (17%) al sexo masculino. Veinticinco de ellas (48%) estaban ubicadas en la tercera década de vida. Treinta y ocho (73%) eran pacientes ambulatorias y 14 (27%) estaban hospitalizadas. En este último grupo, 11 (26%) eran mujeres embarazadas con más de 23 semanas de gestación (Tabla 1).

Durante el 2004, los 17 aislamientos de Ss provenían de pacientes del sexo femenino, 11 de estas pacientes (65%) estaban hospitalizadas, nueve (56%) estaban ubicadas entre la segunda y tercera década de la vida. Seis (36%) estaban embarazadas, una de ellas tenía diagnóstico de pielonefritis. En dos de las pacientes (42%) la infección urinaria estaba asociada a Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT). Una de estas pacientes tenía diagnóstico asociado de cáncer de cuello uterino y síndrome nefrótico y en otra paciente la infección urinaria estaba asociada a clínica de peritonitis, una tercera paciente evolucionaba con SIDA y una cuarta paciente evolucionaba con pielonefritis (Tabla 1).

En el trienio 2001-2003, de los 14 pacientes hospitalizados, se encontró litiasis renal en 3 de ellos. Asimismo, se reportaron estados de inmunosupresión tales como diabetes mellitus en dos pacientes e insuficiencia renal crónica en otros dos. En el año 2004, se determinó insuficiencia renal en dos pacientes, otra paciente evolucionaba con embarazo y SIDA asociado (Tabla 1).

Seis (43%) de estos pacientes estaban ubicados en el servicio de medicina y el resto estaban distribuidos en otros servicios (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución por servicios de los pacientes hospitalizados con infección urinaria en el HUC por Ss durante los trienios 1998-2000 y 2001-2003.

Lapso	1998-2000		2001-2003	
	38		14	
Total de pacientes				
Servicio	No. de pacientes	(%)	No. de Pacientes	(%)
Obstetricia	12	32	1	7
Medicina interna	7	18	6	43
Cirugía	5	13	-	-
Nefrología	4	11	-	-
Urología	4	11	-	-
Pediatría	2	5	3	21
Unidad de Terapia Intensiva	3	8	2	14
Ginecología	1	2	2	14

En el trienio 1998-2000, esta infección estaba asociada al uso de sonda vesical en 4 de los 38 pacientes hospitalizados; de los cuales, tres presentaban litiasis renal. Se encontraron estados de inmunosupresión tales como diabetes mellitus en tres pacientes, mientras que dos pacientes evolucionaron con leucosis y otros dos con colagenosis. También se determinó 5 casos de insuficiencia renal y otro con SIDA. Adicionalmente, se encontró infección urinaria asociada a vejiga de esfuerzo en dos pacientes (Tabla 3).

Tabla 3. Infección urinaria por Ss y asociación a procesos clínicos durante los trienios 1998-2000 y 2001-2003 y el año 2004.

Procesos clínicos asociados	1998-2000	2001-2003	2004
Insuficiencia Renal	5	2	2
Diabetes mellitus	3	2	-
Litiasis Renal	3	3	-
Procesos neurológicos y uso de sonda vesical	4	3	-
Leucemias	2	-	-
Colagenosis	2	-	-
Vejiga de esfuerzo	2	-	-
SIDA	1	-	1

Se encontró infección mixta en el lapso 1998-2000 por enterococos en dos pacientes. Una de ellas, de 39 años de edad, tenía antecedentes de Accidente Cerebro-Vascular (ACV) y de uso de sonda vesical. El otro caso correspondió a un hombre de 62 años con antecedente de osteomielitis crónica en pelvis. En este mismo lapso, se encontró asociación a

Escherichia coli en dos pacientes. Uno de estos correspondía a una mujer de 50 años con diagnóstico de infección urinaria y el otro a un hombre de edad indeterminada con antecedentes de paraplejía y uso de sonda vesical concomitante. También se encontró asociación por *S. epidermidis* en una mujer de 46 años con clínica de cistitis. Hubo asociación con *Candida sp* en una mujer de edad indeterminada y que cursaba con 14 semanas de gestación.

En el lapso 2001-2003, se encontró asociación por enterococos en un paciente de 66 años con diabetes mellitus. Se determinó asociación a *Escherichia coli* en dos pacientes, una de ellas de edad no precisada con clínica de cistitis y la otra correspondió a una paciente de 73 años de edad con diagnóstico de hemorragia subaranoidea, crisis convulsivas y el uso de sonda vesical concomitante. Se encontró asociación a *Klebsiella pneumoniae* en un hombre de 71 años con antecedentes de pancreatitis aguda y uso de sonda vesical y asociación a *Acinetobacter baumannii* en un paciente de 38 años con clínica de infección urinaria (Tabla 4).

Tabla 4. Asociación de infección urinaria por Ss a otros microorganismos.

Lapso	Microorganismo asociado	Características clínicas de la infección
1998-2000	Enterococos	Mujer de 39 años, embarazo de 11 semanas, ACV y sonda vesical
	Enterococos	Hombre de 62 años con osteomielitis crónica en pelvis y con infección urinaria
	<i>E. coli</i>	Hombre de edad desconocida con paraplejía y sonda vesical
	<i>E. coli</i>	Mujer de 50 años con infección urinaria
	<i>S. epidermidis</i>	Mujer de 40 años con cistitis
2001-2003	<i>Candida sp.</i>	Mujer de edad desconocida con embarazo de 11 semanas y cistitis
	Enterococos	Hombre de 68 años con diabetes mellitus e infección urinaria
	<i>E. coli</i>	Mujer de edad desconocida con cistitis
	<i>E. coli</i>	Mujer de 73 años con hemorragia subaranoidea y sonda vesical
	<i>K. pneumoniae</i>	Hombre de 71 años con pancreatitis y sonda vesical
2004	<i>A. baumannii</i>	Hombre de 38 años con infección urinaria
	<i>E. coli</i>	Mujer de 23 años con embarazo de 23 semanas y pielonefritis

Con respecto a la sensibilidad antimicrobiana, se observó que en el trienio 1998-2000 la sensibilidad a la nitrofurantoina fue del 100%, manteniéndose elevada (90%) en el trienio 2001-2003. La sensibilidad al sulfa-trimetropim se redujo de 98 a 90% entre los dos trienios, mientras que la sensibilidad a la norfloxacin solo varió de 95% al 96%. Para la tetraciclina, osciló entre 86% y 72% en estos lapsos.

Con respecto a la oxacilina, la sensibilidad osciló entre 47% y 6% para cada uno de los dos trienios comparados.

Durante el año 2004, la sensibilidad a la nitrofurantoina fue del 63%, al sulfa-trimetropin 69%, norfloxacin 74%, tetraciclina 69%, mientras que la sensibilidad a la oxacilina fue del 38% (Tabla 5).

Tabla 5. Sensibilidad antimicrobiana de Ss durante el lapso 1998-2004 HUC. Valores en porcentajes.

Antimicrobiano	1998-2000	2001-2003	2004
Nitrofurantoina	100	90	63
Trimetropim-sulfametoaxol	98	90	69
Norfloxacin	95	96	74
Tetraciclina	86	72	69
Oxacilina	47	6	38

Discusión

Ciertos microorganismos están colonizando piel y superficies mucosas en humanos y animales y su aislamientos en cultivos no indica necesariamente que haya presencia de un proceso infeccioso (17).

En la patogénesis de las infecciones del tracto urinario por ECN, se han reportado el aislamiento de *Staphylococcus epidermidis*, entre otros, provenientes de muestras de orina tomadas por el procedimiento del chorro medio de orina y se dice que dicha muestra puede ser contaminada de manera inadvertida por componentes de la microbiota normal, en condiciones de colonizantes de membranas mucosas, piel del área urogenital e introito vaginal, comportándose en algunas situaciones especiales según el hospedador como microorganismos oportunistas y en ocasiones relacionadas a infecciones nosocomiales. En menor proporción, otros ECN tales como *S. haemolyticus*, *S. warnerii*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. cohnii*, entre otros, son patógenos no comunes pero pueden estar implicados en infecciones del tracto urinario (1,3,5,34).

Existen reportes relacionadas al rol de *Ss* en la patogénesis del tracto urinario. Robert A. infirió que algunos factores del tracto urinario podrían actuar selectivamente en favorecer el desarrollo de la patogénesis de las infecciones urinarias por *Ss* (11).

Con respecto a *Ss*, se ha determinado que no está localizado en el tracto genito-urinario, ya que no se ha aislado como contaminante en cultivos de orina y se ha determinado que su presencia en pacientes sintomáticos le da credibilidad como patógeno primario de infecciones urinarias. La patogénesis de la infección del tracto urinario por *Ss* no es bien conocida, pero es probable que una infección ascendente se desarrolle a partir de colonización del área rectal o urogenital, lo cual sugiere semejanzas a la patogénesis de la infección urinaria por *Escherichia coli*. Se ha demostrado que su adherencia a las células urogenitales es mayor que otros ECN y que la propiedad de producir ureasa son de por sí dos factores a los cuales se atribuye una mayor patogenicidad de los *Ss* (1,6,12,25,27,28,36).

Las infecciones urinarias por ECN son reportadas como segunda causa de infecciones urinarias precedidas por *E. coli*. (25). En este grupo, tiene un rol preponderante como patógeno primario el *Ss*. Este hecho también fue corroborado por Andrade E, quien en el 2001 reportó en el HUC durante el lapso 1998-2000 en 18.201 pacientes a quienes se les practicó igual número de urocultivos, 3.199 positivos con más de 10^5 UFC (18%). De estos, 2.402 (75%) correspondían a urocultivos donde se aislaron bacilos gram negativos y en 797 de estos urocultivos, un 25% de ellos correspondían a bacterias gram positivas. En este último grupo, 319 (40%) correspondían a *Staphylococcus epidermidis* y 62 (8%) a *Ss* (30).

La verdadera fuente de *Ss* para causar infecciones urinarias es aun desconocida. Se ha sugerido el recto como reservorio inicial, pero al respecto existen trabajos contradictorios. Sellin

M. et al., no hallaron *Ss* en 61 hisopados rectales, pero lo detectaron en 9 de 82 hisopados vaginales (12). Pead L. et al. encontraron diez cepas de *Ss* provenientes de 150 muestras de hisopados rectales (36). Posteriormente, Walmark G. et al., lo aislaron en 1 de 206 hisopados rectales provenientes de mujeres jóvenes y no lo encontraron en muestras uretrales; aunque hacen la salvedad de no haber empleado medios de enriquecimiento en los cultivos utilizados (13). Jordan J. et al. (28), Latman R. et al. (26) también lo determinaron en recto y vagina.

Este último investigador reportó que en tres mujeres colonizadas por *Ss* a nivel de recto, vagina y uretra, estas presentaron concomitantemente infección urinaria por *Ss* y que 24 mujeres no colonizadas por *Ss* en las áreas anatómicas ya mencionadas no desarrollaron infección urinaria; por ende infiere que la presencia de *Ss* como colonizantes de áreas como el recto constituía un reservorio, el cual precedía a la colonización de vagina, uretra. Este hecho permite a posterior la patogénesis por vía ascendente en el desarrollo de infección urinaria (26). Esta asociación también fue reportada por Rupp M. (1).

Estos hallazgos se han encontrado en estudios europeos y norteamericanos, lo que ha permitido hacer correlación en similitud en cuanto a población afectada, predominando en las manifestaciones clínicas los síntomas de disuria, urgencia, frecuencia miccional y lumbalgia, y entre las paraclínicas, hallazgos de piuria y hematuria microscópica (17).

Muchas de estas infecciones urinarias se expresan con manifestaciones de infecciones urinarias altas, lo que se ha corroborado por el aumento sérico de anticuerpos contra *Ss* en proporciones que han oscilado entre 41% y 86% (1,19,26).

En otras ocasiones se ha encontrado *Ss* hasta el 20% de la uretritis no gonocócica (UNG) y hasta en el 15% de varones sin uretritis pero atendidos en clínicas de enfermedades venéreas (28).

En la casuística del HUC no se realizó estas determinaciones y ninguna de las boletas de solicitud de los urocultivos hacía mención por parte de los clínicos de hallazgos patológicos en examen macroscópicos, microscópicos o químico de la orina.

En los resultados obtenidos por nosotros observamos, al igual que en estudios extranjeros, la preponderancia de infección en pacientes del sexo femenino y con un predominio de edad que guarda relación con los grupos de edad entre la segunda y tercera década de la vida. Durante los lapsos analizados, de un total de 131 pacientes, 110 correspondían al sexo femenino (82%), de las cuales 40 estaban embarazadas. Dentro de este último grupo, 18 evolucionaban con embarazos con más

de 20 semanas de gestación. Todas las muestras fueron obtenidas por la técnica del chorro medio de orina y a ninguna se le practicó punción suprapúbica.

Queremos resaltar la frecuencia de infección urinaria por *Ss* en mujeres embarazadas, hecho reportado previamente por Jordan P., cuando describe asociación de infección urinaria en mujeres embarazadas con clínica de pielonefritis (25). En nuestra casuística, solamente una mujer evolucionó con este criterio diagnóstico y los otros casos restantes de pielonefritis diagnosticados en el año 2004 no estaban relacionados a condiciones de embarazo.

No obstante, llama la atención que en los trienios 1998-2000 y 2001-2003 se encontraron pacientes masculinos; 12 (19%) y 9 (17%) respectivamente. Todos los cuales estaban hospitalizados. En cinco de ellos se encontró asociación a cateterización de vías urinarias por diferentes problemas de índole neurológico.

Así mismo, en el trienio 1998-2000 y en el año 2004 predominó la población hospitalizada sobre la ambulatoria en un 61% y 65% respectivamente (29,36). Mientras que en el trienio 2001-2003 predomina la población ambulatoria con un 73% de los aislamientos. Con respecto a la población pediátrica, se observa una baja frecuencia ya que sólo cinco niños (4%) fueron diagnosticados con infección urinaria por *Ss* a lo largo de todo el estudio.

Estos hechos son infrecuentes en la literatura reportada en otras latitudes del globo. Con respecto a la frecuencia de la infección urinaria por *Ss* en Norteamérica, esta ha oscilado, según Williams D. y Lewis J., entre 0.09% y 0.3% respectivamente (24,25). En el caso de Venezuela, Andrade E. lo determinó en una frecuencia del 2%; Plaza I. et al. del 7% y Rivero N. del 2% (30-32). Llama la atención que en los estudios europeos, la frecuencia de esta infección oscila entre 7% y 26% (33,36). Todas estas variaciones en frecuencias con respecto a estudios foráneos nos hacen inferir que son debidas a las diferencias en las poblaciones estudiadas.

La identificación de *Ss* en infecciones urinarias con cultivos mixtos fue reportada por Walmark G., con una frecuencia del 4% (13). Mientras que en nuestros hallazgos se encontró en un 10% para cada uno de los trienios analizados. El 73% de estos cultivos mixtos estaban asociados a enterobacterias (*Escherichia coli* 4, enterococos 3, y *Klebsiella pneumoniae* 1).

En nuestros pacientes se encontró relación a litiasis renal en cinco (4%) pacientes. Esta condición ya ha sido anteriormente reportada por Fowler J. (29). Este hecho se atribuye también al rol preponderante del *Ss* de producir ureasa, propiedad

que le permite la etiopatogénesis de cálculos y la tendencia a perpetuar la infección (19,37-39). En este último particular, no hubo recaídas aparentes en nuestra casuística, ya que en ninguno de estos pacientes hubo urocultivos de control.

Queremos resaltar también la asociación de la infección urinaria por *Ss* a variados estados de inmunosupresión en 19 de los 131 pacientes (15%); tales como insuficiencia renal crónica (siete pacientes), diabetes mellitas (cinco), leucosis y colagenosis (2 cada uno), SIDA (dos), tumor renal (uno).

Con respecto a la sensibilidad antimicrobiana, esta fue determinada por la técnica de Kirby y Bauer, observándose una variada sensibilidad que guarda relación con estudios previos por Maskell, Walmark G., Jordan P., Lathman R. y Gill V., Fowler, Rupp P. y Andrade E.; Rivero, Fernandez y Andrade (1,13,23,25,27,28,30,32,40,41-43).

Con respecto a la sensibilidad a la oxacilina, esta fue del 53% en el trienio 1998-2000 y del 94% en el trienio 2001-2003. Relacionando ambos trienios, la sensibilidad a la norfloxacina, nitrofurantoina, trimetropim-sulfametoxazol osciló entre 95% - 96%, 100% - 90% y 98% - 90%. Durante el año 2004, la sensibilidad a la norfloxacina fue del 74%, nitrofurantoina del 63%, trimetropim-sulfametoxazol del 69% y la sensibilidad a la oxacilina fue del 38%.

La resistencia de los ECN con respecto a la oxacilina, se recomienda actualmente que debe ser determinada utilizando el disco de cefoxitina de 30 microgramos, el cual, tiene una mayor especificidad e igual sensibilidad a la oxacilina (44).

Concluimos que el personal del laboratorio y los clínicos deben estar conscientes que hallazgos de ECN en cultivos de orina, particularmente provenientes de pacientes sintomáticos con exámenes de orina previos patológicos (piuria) pudieran deberse a *Ss* y que el diagnóstico presuntivo puede inferirse por el test de resistencia positiva a la novobiocina. Con respecto a la sensibilidad antimicrobiana esta varía según la disponibilidad de los discos a utilizar y su correlación a la población afectada por la infección urinaria.

Actualmente se está a la espera de las nuevas actualizaciones de la NCCLS.

Agradecimiento A todo el personal del Laboratorio de la Sección de Bacteriología del H:UC. , por su desinteresado aporte y colaboración.

Referencias

- Rupp ME and Archer GL. State of the art clinical article coagulase negative Staphylococci: Pathogenesis Associated with Medical progress. CID 1994;19:231-43.
- Freeman R, Hjerging N. Species of coagulase negative isolated from catheter tips from open-heart surgery patients. Thorax. 1980;35:359.
- Gunn B. A and Davis CH. E. *Staphylococcus haemolyticus* Urinary tract infection in male patient. J Clin Microbiol 1998; 26(5):1055-7.
- Kleeman KT, Bannerman T and Kless W. Species. Distribution of coagulase negative Staphylococcal isolates at community Hospital and implications for selection of Staphylococcal Identification Procedures. J Clin Microbiol 1993; 31(5):1318-21.
- Landaeta M.J.M. Estafilococos Coagulasa Negativos: Una aproximación microbiológica. Boletín Sociedad Venezolana de Microbiología 1998; 18(2): 71-8.
- Conville PS and Albers A. *Staphylococcus saprophyticus*: A review of the literatura. J Medical Technology. 1984;1 (6): 513-19.
- Baird Parker AC. A clasification of micrococci and *Staphylococci* based on physiological and biochemical test. J Gen Microbiol. 1963;30: 409-27.
- Baird Parker AC. Family I Micrococcaceae in Buchanan. R.E., Gibbons N.E. (eds) Bergey Manual of Determinative Bacteriology, ed 8 Baltimore. The Williams and Wilkins Co; 1974. pp 478-89.
- Kloss WE, Schleifer KH. Isolation and characterization of *Staphylococci* from human Skin II. Descriptions of four new species. *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capititis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1975; 25:62-79.
- Schleifer K, Kloss W E , Isolation and Characterization of Staphylococci from human skin: I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermididis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xyloxis*. Int J Sist Bacteriol 1975; 25:50-61.
- Roberts AP. *Micrococceae* from the Urinary Tract in pregnancy. J Clin Pathol: 1967;20: 631-32.
- Sellin M, Cooke DI, Gillespie WA, Sylvester. DGH Anderson J.D. *Micrococcal* Urinary Tract infectons in young women. Lancet 1975;2: 570-72.
- Walmark G, Arremark i , Telander D. *Staphylococcus saprophyticus* a frequent cause of Urinary Tract Infection. Among female out patients. J Infect Dis. 1978; 138:791-7.
- Auleta AE, Keneddy ER. DNA base composition of some members of *Micrococcaceae*. J Bacteriol 1966; 92: 28-34.
- Mortensen N, Kocur M. Correlation of DNA base composition and acid formation from glucosa of *Staphylococci* and *Micrococci*. Act Pathol. Microbiol. Scand. 1967; 69:445-7.
- Gylestri L G, Hill LR. Agreement between DNA base composition and taxonomic classification of Gram positive cocci. J Bacteriol. 1965; 90: 136-40.
- Pereira AT. Coagulase negative strains of *Staphylococcus* Processing antig 51 in agents of Urinary infection. J Clin Pathol. 1962; 15:252-3.
- Mitchell RG, Baird Parker AC. Novobiocin resistance and clasification of *Staphylococci* and *Micrococci*. J Appl Bacteriol. 1967; 30: 251- 4.
- Mabeck CD. Significance of *coagulase negative Staphylococcal* bacteriuria. Lancet 1969;2:1150-2.
- Buchanan RG, Gibbons NE, Cowan ST, Holt JC, Liston J, Murray RG, Niven CF et al. Bergey's Manual of determinative bacteriology 8th ed. The Wiliams and Wilkins Company. Baltimore 1974 p 1246 .
- Kloss WE, Smith PB. *Staphylococci* in Lennette E II, Balows A. Hausler. W.J. Truant J.P. (eds) Manual of clinical Microbiology ed 3 Washington D.C. American Society for Microbiology. 1980 pp 83-7.
- Almeida RJ and Jorgensen JH. Use of Mueller Hinton Agar to determin novobiocin susceptibility of coagulase negative *Satphylococci*. J Clin Microbiol. 1982; 16 (6) :1155-6.
- Maskell R. Importance of coagulase negative *Staphylococci* as pathogens in the Urinary Trac. Lancet. 1974; 1: 1155-8
- Williams DN, Lund MS, Blazevic DJ. Significance of Urinary isolates of *coagulase negative Micrococcaceae*. J Clin Microbiol. 1976; 3:556-9.
- Jordan P, Irvani A, Richard G and Baer H. Urinary Tract Infection Caused by *Staphylococcus saprophyticus*. J Infec Dis. 1980; 142(4): 510-5
- Lewis JF, Brakc SR., Anderson DJ. et al. Urinary Tract Infection du *coagulase negative Staphylococcus*. Am J Clin Pathol. 1982; 77: 736-9.
- Latman R. Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. JAMA 1983; 250 (22): 3063-6.
- Hovelius B, Mardh. PA, Bygren P. Urinary Tract Infections caused by *Staphylococcus saprophyticus* recurrences and complications. J Urol. 1979; 122: 645-7.
- Fowler J. *Staphylococcus saprophyticus* as the cause of infect urinary calculus. Annals Int Med. 1985; 102(3): 342-3.
- Andrade PRE, González M, Villarroel E, Bolívar A, Navarro P. Infección urinaria por *Staphylococcus saprophyticus*. Abstracts A48. Enfermedades infecciosas y Microbiología 2001:21. Suplemento 2001. S12.
- Plaza I, Plaza R, Torres S. Identificación y estudio de Susceptibilidad de microorganismos aislados de muestras de orinas procesados en un laboratorio privado. Abstracts 24B. Pág. 9. Resúmenes de Póster de la XXVIII Jornadas Venezolanas de Microbiología. Barquisimeto. Nov 2002.
- Rivero N, Riera I, Flores L. Frecuencia de bacterias Gram positivas causantes de infecciones del tracto urinario en el Hospital Universitario de Caracas. Abstracts. 36B Pág. 13. Resumen de Póster de la XXVIII Jornadas Venezolanas de Microbiología. Barquisimeto. Nov. 2002.
- Barry AL. Thopnsberry. C. Susceptibility Testing Diffusion Test procedures in Manual of Clinical Microbiology. E Lennett (ed) American Society for microbiology. Washingthon Dc. 1980 p 463.
- Nicolle LE, Hoban SA, Harding KM. Characterization of *coagulase negative Staphylococci* from Urinary Tract Specimens. J Clin Microbiol. 1983; 17: 267- 71.
- Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Stand. Eight Edition volumen 23 number 1. NCCLS Document M2 A8 January 2003.

Aspectos epidemiológicos, clínicos y bacteriológicos en infección urinaria por *Staphylococcus saprophyticus*

36. Pead L, Crump J, Maskell R. *Staphylococcus* as Urinary Pathogenes. J Clin Pathol. 1977;30: 427- 31.
37. Thompson R B, Stamey TA. Bacteriology of infect stones.Urology. 1973; 2: 627-33.
38. Griffith DP, Musher D M, Itin C. Urease the primary caused of infection induced urinary stones.Invest Urol. 1976; 13: 346-50.
39. Nemoy NJ, Stamey TA. Surgical bacteriological and biochemical management of "Infection Stones".JAMA. 1971; 215: 1470-6.
40. Gill V. Selepaks, Williams E. Species Identification and Antibiotic susceptibilities of *coagulase negative Staphylococci* isolated from clinic specimens. J Clin Microbiol. 1983; 18: 1314-9.
41. Fernández Y, Fuenmayor A. Flora bacteriana en Infecciones Urinarias en pacientes del Hospital José Gregorio Hernández. Trujillo. Abstracts. 77B Pág. 28. Resumen de Póster de la XXVIII Jornadas Venezolanas de Microbiología. Barquisimeto. Nov 2002.
42. Rivero N, Andrade E, Flores L, Ortiz MB, Marcano M. Infección genitourinaria por *Staphylococcus saprophyticus* aislados de pacientes del Hospital universitario de Caracas. Período 2001-2004.CD ROOM del V Congreso Venezolano de Bioanálisis. Caracas, Julio 2004.
43. Andrade E, Jakowlewa A, Navarro P, Villarroel E, Laviosa M, Bolívar A. Sensibilidad Antimicrobiana de Uropatogenos identificados en pacientes adultos con infección urinaria. Antib e Inf. 2002;10:4-159-163.
44. Novedades 2005. CLSI/NCCLS. XIX Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos "Dra. Alicia Rossi". XIV Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobiano. Pag 289,291-307, Caracas 2005.



Colonización de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B en gestantes en trabajo de parto y sus neonatos

Amesty-Hernández J.G.¹, Lares de Acevedo A.², Sandra-Toledo L.², Piña-Reyes E.², Rojas-Martínez P.³, Salas A.¹, Ferrer-Inciarte M.¹

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue establecer en pacientes atendidos en la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza”, Maracaibo, Venezuela, la relación de la colonización del *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B (SGB) en la vagina y recto de las gestantes a término en trabajo de parto y la colonización de sus neonatos, entre los meses Mayo a Diciembre del 2004. Se estudiaron 100 gestantes con embarazos simples a término en trabajo de parto, independientemente de su edad cronológica y paridad, excluyéndose aquellas embarazadas con ruptura prematura de membrana mayor de 18 horas, con antibioticoterapia en el momento del parto, con fiebre intraparto, coriamnionitis o con antecedente de parto anterior con infección del recién nacido por el SGB. A cada paciente se le tomó hisopado vaginal rectal y secreción nasal a sus neonatos al momento del parto, los cuales se colocaron en un medio de Cary & Blair y se transportaron al laboratorio de bacteriología donde las muestras de vagina y de secreción nasal se cultivaron en agar sangre de carnero con Kanamicina; las muestras rectales se inocularon en agar sangre de carnero con Kanamicina y en caldo cerebro corazón con Ácido Nalidixico y Gentamicina. El SGB fue identificado mediante pruebas convencionales y una vez identificadas se les realizó las pruebas de susceptibilidad siguiendo la metodología descrita por el CLSI 2007 (Bauer & Kirby). La frecuencia de aislamiento del SGB fue de 18% en las pacientes estudiadas y del 10% en sus recién nacidos. La transmisión vertical en el momento del parto fue 55,5%. Los aislamientos de SGB fueron sensibles a todos los antibióticos probados. La frecuencia de colonización en las parturientas y en los neonatos es comparable con las reportadas en otros países. Es necesario establecer pautas para detectar la colonización materna por SGB y así prevenir la sepsis neonatal por este microorganismo.

Palabras clave: *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B, colonización, embarazadas.

Colonization of hemolítico *Streptococcus* beta of group B in gestantes in work of childbirth and its newborn ones

SUMMARY

The objective of this investigation was to establish in patients taken care of in the Maternity “ Dr. Armando Castillo Plaza”, Maracaibo, Venezuela, the relation of the colonization of the hemolítico *Streptococcus* beta of the B group (SGB) in the vagina and rectum of the gestantes upon maturity in work of childbirth and the colonization of its newborn ones, between the months May to December of the 2004. 100 gestantes with simple pregnancies in work of childbirth studied upon maturity, independently of its chronological age and parity, excluding themselves those pregnant women with greater membrane premature rupture of 18 hours, with antibioticoterapia at the moment of the childbirth, with fever intrachildbirth, coriamnionitis or with antecedent of previous childbirth with infection of new born by the SGB. To each patient hisopado was taken her vaginal rectal and nasal secretion to its newborn ones at the time of the childbirth, which was placed in means of Cary & Blair and they were transported to the bacteriology laboratory where the nasal secretion and vagina samples were cultivated in agar blood of sheep with kanamicina; the rectal samples inoculated in agar blood of sheep with kanamicina and in broth brain heart with nalidixico acid and gentamicina. The SGB was identified by means of conventional tests and once identified the methodology described by CLSI 2007 was made the susceptibility tests to them following (Bauer & Kirby). The frequency of isolation of the SGB was of 18% in the studied patients and 10% in new born her. Vertical transmission in the moment of the childbirth was 55.5%. The isolations of SGB were sensible to all proven antibiotics. The frequency of colonization in parturientas and the newborn ones is comparable with the reported ones in other countries. It is necessary to establish guidelines to detect the maternal colonization by SGB and thus to prevent the neonative sepsis by this microorganism.

Key words: Hemolítico *Streptococcus* beta of the group B, colonization, pregnant woman.

1. Maternidad Dr. Armando Castillo Plaza – Hospital Universitario de Maracaibo – Estado Zulia. Autor de correspondencia: e-mail: joseamesty@hotmail.com
2. Cátedra Práctica Profesional de Bacteriología. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
3. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

Streptococcus agalactiae o *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B (SGB) es un coco gram positivo que causa infecciones fundamentalmente en los adultos inmunocomprometidos o con enfermedades de base, en embarazadas y sus neonatos (1-3). Esta bacteria se ha dividido en serotipos Ia, Ib, III al VIII basado en su polisacárido capsular, las cuales representan marcadores epidemiológicos de gran interés.

En la embarazada, este microorganismos es responsable de la aparición de partos pretérmino o ruptura prematura de membrana, así como de infecciones del tracto urinario, corioamnionitis, endometritis post parto, infección de heridas post parto, endocarditis y sepsis, entre otras (4-6). Aproximadamente el 20% de las embarazadas están colonizadas por el SGB en el momento del parto, por tanto, corren el riesgo de transmitir el microorganismo a sus recién nacidos (7). Al respecto, se ha reportado que entre el 30% y el 70% de los niños nacidos de madres colonizadas pueden ser colonizados, por lo que esta bacteria representa actualmente la causa más frecuente de infección bacteriana perinatal de transmisión vertical en el mundo occidental. La incidencia de la colonización en el recto, ombligo o sitios orales del recién nacido es hasta de tres por mil, con una mortalidad que en 1970 alcanzaba el 50%, lo cual se ha reducido a un 4% a 5% como resultado de los avances en el diagnóstico y tratamiento en neonatología (4,8,9). Alrededor de los años 90, la tasa de enfermedad invasiva neonatal por SGB en Estados Unidos osciló entre 1,7 a 3,3 x 1000 nacidos vivos (10,11), mientras que en Europa, Canadá e Israel, estas cifras fueron mas bajas (0,2-0,5 x 1000 nacidos vivos) (12). Actualmente, muchos casos de enfermedad por éste microorganismo en neonatos se pueden prevenir por la administración de la profilaxis intraparto (7,13), lo cual ha conducido a una disminución sustancial de la enfermedad en neonatos menores de 7 días de edad.

Como demuestran datos recientes, en donde se han instaurado programas de prevención, es posible reducir sensiblemente la incidencia de ésta infección llegando hasta 0,26 por mil (8). En muchos países a nivel mundial, la profilaxis para la infección congénita por el SGB es obligatoria, disminuyendo considerablemente la incidencia de sepsis neonatal.

La enfermedad del recién nacido cursa como septicemia, neumonía o meningitis (2,4) así mismo, se ha señalado una asociación entre a colonización vaginal, el bajo peso al nacer y la muerte intrauterio (14). Los diferentes cuadros clínicos en el recién nacido hacen su aparición e diferentes tiempos; el primer cuadro ocurre durante las primeras 24 a 48 horas de vida y está caracterizado por sepsis y signos respiratorios agudos, en él se involucra a la madre, portadora de la bacteria en su tracto genital o rectal, como fuente de transmisión, y el recién nacido lo adquiere en el útero o en su paso a través del

canal del parto. El otro cuadro clínico es una meningitis, la cual hace su aparición más tardíamente y ocurre frecuentemente entre la segunda y la sexta semana de vida, ésta pudiera tener su origen en una infección nosocomial o que el recién nacido colonizado durante el parto sea un portador asintomático hasta el momento en que aparecen las manifestaciones de la enfermedad (14-16).

La importancia del SGB como agente etiológico de infección perinatal ha motivado a que se recomienden diversas estrategias para prevenir la infección durante el período neonatal, basada en la detección del microorganismo en el tracto recto vaginal materno y la administración de profilaxis antibiótica. Los factores de riesgo de infección neonatal son: la colonización con alto inóculo del SGB, la rotura prematura de membrana, mayor de 18 horas, el parto ante de las 37 semanas, la corioamnionitis, la fiebre intraparto y el antecedente de parto anterior con infección del neonato por SGB (lo que indica que la madre desarrolla títulos bajos de anticuerpos protectores frente a este patógeno (17,18).

Aunque están disponibles excelentes datos, tanto de la colonización materna como de infecciones neonatales por SGB en países desarrollados (donde la prevalencia de la colonización se ha reportado entre 5% a 35%, existe sin embargo, poca información de los países en vías de desarrollo (19-22).

Por lo anteriormente expuesto, se diseñó este estudio a fin de determinar la colonización del SGB en la vagina y el recto de las gestantes a término en trabajo de parto y la colonización en sus neonatos, que fueron atendidos en la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza” de Maracaibo, Venezuela, y así poder conocer si la colonización de este microorganismo representa epidemiológicamente un problema para la embarazada y el recién nacido en nuestro medio.

Materiales y métodos

En el presente estudio de tipo prospectivo, descriptivo y de corte transversal se estudiaron de manera no probabilística e intencionada 100 embarazadas de término en trabajo de parto y sus neonatos, independientemente de la edad cronológica y paridad, atendidos en la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza” en el lapso comprendido de mayo a diciembre del 2007. Fueron excluidos las embarazadas con ruptura prematura de membrana mayor de 18 años, que recibieron antibioticoterapia local o sistémica, con corioamnionitis con fiebre intraparto y con antecedente de parto anterior con infección del neonato por SGB.

A cada paciente se le tomó una muestra de hisopado del tercio inferior de la vagina, del recto y de las secreciones nasales de sus neonatos al momento del parto. Dichas muestras se

Colonización de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B en gestantes en trabajo de parto y sus neonatos

colocaron de inmediato en el medio de transporte de Cary and Blair y se trasladan hasta el Laboratorio del Centro de Referencia Bacteriológico del Hospital Universitario de Maracaibo, en donde fueron cultivadas antes de las 24 horas de haber sido tomadas. Las muestras provenientes de la secreción nasal del recién nacido y de la vagina, se sembraron en una placa de Agar Sangre de Carnero (ASC) con Kanamicina (30 mcgs/ml), incubándolas a una temperatura de 25°C a 37°C en una atmósfera de anaerobiosis durante 24 horas. La muestra rectal además de ser cultivadas en un ASC con Kanamicina y colocadas por el mismo tiempo a la misma atmósfera y temperatura, fueron cultivadas en un caldo de cerebro corazón con Ácido Nalidixico (15 mcgs/ml) y Gentamicina (8 mcgs/ml) incubado por 18 horas temperatura ambiente, con el fin de inhibir la flora intestinal normal existe, posteriormente el crecimiento obtenido en éste caldo se cultivó en ASC con Kanamicina (30 mcgs/ml) incubado a una temperatura de 35°C a 37°C en un atmósfera de anaerobiosis durante 24 horas.

El empleo del ASC con Kanamicina permite la inhibición de las bacterias gram negativas, pero no de los estreptococos los cuales pueden enmascarar el crecimiento del SGB. Posteriormente, pasado el período de crecimiento, a las colonias sospechosas o compatibles con SGB, se le realizó un frotis coloreado con Gram y las siguientes pruebas bioquímicas: Catalasa, CAMP, Hidrólisis del hipurato, Taxo A y Bilis Esculina.

A los microorganismos que resultaron ser SGB, se le realizó las pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos utilizando el método de difusión en disco descrita por Bauer y Kirby, siguiendo estrictamente las normas del Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI) (33). Los agentes antimicrobianos probados fueron los siguientes: Penicilina (P), Ampicilina (AM), Cefotaxima (CTX), Ceftriazona (CRO), Cefepime (FEP), Eritromicina (E), Vancomicina (Va), Teicoplanina (TEC), Ofloxacina (OFX), Levofloxacina (LEV), Clindamicina (CLN) y Cloranfenicol (C).

Resultados

De las 100 muestras tomadas por hisopado vaginal y las 100 muestras obtenidas por hisopado rectal de las embarazadas a término en trabajo de parto, 18% (18 muestras) presentaron colonización por SGB, aislándose de la vagina, en el recto y en la vagina y el recto, 6 casos cada uno (Gráfico 1).

De las 100 muestras de Secreción nasal de los recién nacidos, en el 10% (10 CASOS) se detectó la colonización por el SGB. Al considerar el número de gestantes colonizadas por éste microorganismo en relación con el número de neonatos colonizados, se determinó que el porcentaje de transmisión vertical fue del 55,5% (10/18) (Gráfico 2).

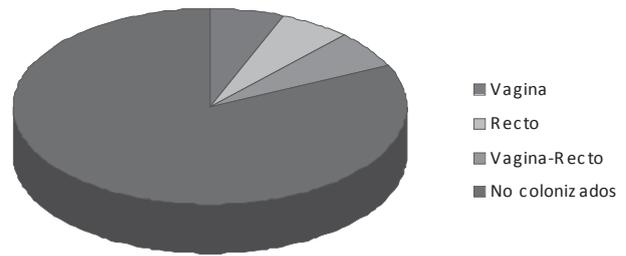


Gráfico 1. Frecuencia de colonización por *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B en gestantes a término en trabajo de parto. Maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza". Maracaibo, Venezuela 2007.

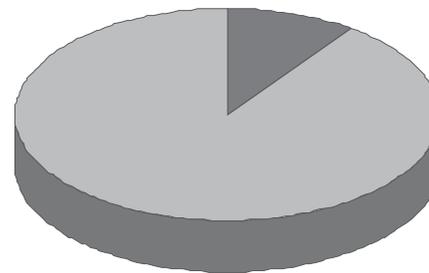


Gráfico 2. Frecuencia de colonización por *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B en los neonatos de las madres colonizadas. Maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza". Maracaibo, Venezuela 2007.

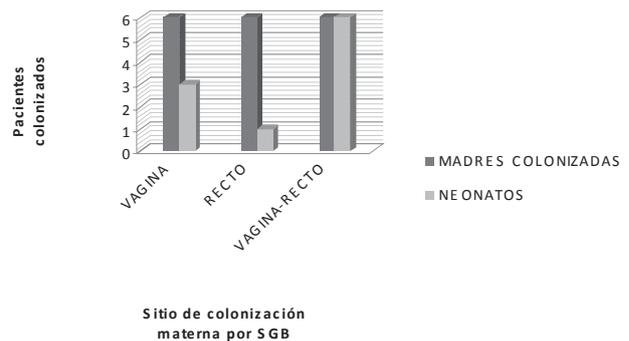


Gráfico 3. Relación entre el sitio de colonización materna y la colonización neonatal por *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B. Maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza". Maracaibo, Venezuela 2007.

Colonización de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B en gestantes en trabajo de parto y sus neonatos

En el Gráfico 3 se demuestra la relación entre el sitio de colonización materna y la colonización neonatal por SGB, observándose que de 6 madres colonizadas en la vagina, 3 (50%) neonatos fueron colonizados, de las 6 madres colonizadas con SGB en el recto sólo 1 (16,6%) fue colonizado, mientras que de las 6 madres colonizadas tanto en recto como en vagina, el 100% de sus neonatos fueron colonizados.

En relación a las Pruebas de Susceptibilidad, en la Tabla 1 se muestran la sensibilidad a los 12 agentes antimicrobianos probados, siendo sensibles a todos los antibióticos: Penicilina, Ampicilina, Cefotaxime, Ceftriaxona, Cefepime, Eritromicina, Vancomicina, Teicoplanina, Ofloxacina, Levofloxacina, Clindamicina y Cloranfenicol.

Tabla 1. Porcentaje de susceptibilidad. Agentes antimicrobianos para el *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B. Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza”. Maracaibo, Venezuela 2007.

Agente antimicrobiano	% Sensibilidad
Penicilina	100
Ampicilina	100
Cefotaxima	100
Ceftriaxona	100
Cefepime	100
Eritromicina	100
Vancomicina	100
Teicoplanina	100
Ofloxacina	100
Levofloxacina	100
Clindamicina	100
Cloranfenicol	100

Discusión

El SGB es un saprofito normal del tracto gastrointestinal y genitourinario. la colonización vaginal es variable y en las embarazadas oscila entre el 10% y el 30% (8). En el presente estudio la colonización vaginal y rectal por SGB en gestantes a término en trabajo de parto se detectó en un 1%, porcentaje éste similar a los obtenidos en varios estudios realizados en embarazadas a nivel mundial (18,19). De hecho, en España el porcentaje de colonización varía entre 11% y 18,2% (23,24), en Kuwait del 14,2% al 16%, en Polonia del 19% al 20% (27), en Grecia del 6,6%, en los Estados Unidos del 11,3% (29), en México del 13%, en Perú del 6,6% y en Argentina del 17,7 al 18,15% (32), entre otros.

Las variaciones en el porcentaje de colonización materna observadas, tanto en los diferentes países industrializados como en los que están en vía de desarrollo, sugieren que diferentes factores pueden influir en estas variaciones. Son controversiales los aspectos relacionados con los mismos: la condición

socioeconómica, la raza, la edad cronológica y la paridad (28,32), entre otras. Dichos factores pudieran explicar entre nosotros una incidencia de colonización por el SGB en la embarazada que puede considerarse elevada, porcentaje similar en algunos países latinoamericanos como por ejemplo Argentina y México, pero con diferencias notables con otros como Perú. De hecho, en Venezuela los estudios que se conocen sobre la colonización del SGB en las embarazadas, han sido reliados con embarazos de alto riesgo con un incidencia del 36%, lo cual no permitió comparar dichos resultados con los obtenidos en la presente investigación (34).

Los medios de cultivo incluyendo el número y tipo de sitios cultivados, así como los tipos de medios utilizados de igual manera pueden influir en estas variaciones, tal como se demuestra en otros estudios realizados para la detección del SGB, cuyos resultados establecen que la utilización de medios sólidos o en placas (ASC) más los caldos o medios de enriquecimiento permiten detectar entre el 98% y 99% de las portadoras del SGB (35).

En esta investigación se utilizaron de acuerdo a lo establecido para el cultivo del SGB, placas de ASC con kanamicina y un Caldo de enriquecimiento con tejidos de Cerebro Corazón con Ácido Nalidíxico y Gentamicina, lo cual permitió la máxima seguridad en el aislamiento de las mismas.

Actualmente, en muchos centros de investigación bacteriológica se utiliza el medio de Granada, un medio de cultivo, selectivo y diferencial para el SGB basado en la producción de un pigmento color naranja por la activación del metrotexate utilizado, lo cual permite su detección e identificación en 12 a 24 horas sin necesidad de realizar otras pruebas bioquímicas (36). Otras técnicas de identificación de esta bacteria consiste en: la hibridación de los ácidos nucleicos del DNA, detectando las secuencias ribosomales específicas del RNA de esta bacteria en un corto tiempo (18 a 24 horas), el método inmunoenzimático (ELISA), la contraímmunoelectroforesis (CIE) y la prueba de aglutinación directa con látex (36,37); la desventaja de estos métodos es que son costosos y necesitan del empleo de personal calificado para la realización de los mismos, razón por la cual son utilizadas en pocos centros de investigación bacteriológica a nivel mundial.

La importancia de la colonización en la embarazada radica en la transmisión vertical al recién nacido en el momento del parto. El presente estudio demostró que la colonización simultánea de la vagina y el recto fue responsable de la colonización en todos los nacidos de dichas madres, en contrapartida con la colonización rectal donde sólo se colonizó un recién nacido, y en las madres colonizadas en la vagina quienes colonizaron a 3 de sus recién nacidos. En la literatura revisada, no se encontraron reportes que permitan comparar la relación de la colonización vaginal y rectal materna con la colonización neonatal.

Colonización de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B en gestantes en trabajo de parto y sus neonatos

En el presente estudio, el SGB se reporta en las secreciones nasales de 10 recién nacidos, es decir, el 10% del total de los casos estudiados con un 55,56% de transmisión vertical madre-hijo, ya que de 18 madres colonizadas, 10 recién nacidos fueron colonizados. Esta frecuencia de transmisión vertical coincide con la reportada en la literatura, donde el porcentaje de transmisión en las madres colonizadas por el SGB a sus neonatos está entre el 30% y el 70% (38), variación que pudiera estar determinada por los títulos bajos de anticuerpos maternos IgG Anti SGB (39). Se estima que del 2% al 3% de los recién nacidos colonizados pueden desarrollar enfermedad de inicio precoz (la cual se desarrolla en los primeros 5 días de vida) o enfermedad de inicio tardío, la cual se inicia después de varias semanas de vida postnatal. La enfermedad de inicio precoz se asocia a todos los serotipos del SGB, pero el serotipo III es el responsable del 80% de las meningitis precoces y del 90% de las complicaciones tardías.

La frecuencia de transmisión vertical por el SGB puede interrumpirse con el tratamiento antibiótico antes o en el momento del parto. A pesar de que el uso de la profilaxis antimicrobiana intraparto ha disminuido exitosamente la tasa de enfermedad neonatal temprana a partir de la década de los 90, su uso indiscriminado puede conducir a infecciones causadas por otras bacterias o a la resistencia bacteriana a los mismos (40). Diversos estudios han comprobado la resistencia antimicrobiana por el SGB a la Azitromicina, Cefazolina, Cefamandol (41), Clindamicina y Eritromicina (28). De igual forma, en esta investigación, no se mostró resistencia a ninguno de los 12 antimicrobianos probados, lo cual permite el uso de la penicilina de primera elección y en caso de alergia a la misma cualquier otro antibiótico.

Los avances en el desarrollo de vacunas y en la investigación de los factores de virulencia involucrados en la respuesta inmune del SGB serán conocidos en los próximos años y las estrategias de vacunación serán la clave futura para la prevención de la enfermedad neonatal por el SGB.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados de la presente investigación permiten concluir que la frecuencia de colonización del SGB en la vagina y el recto de las gestantes a término en trabajo de parto fue del 18% y la colonización encontrada en sus neonatos fue del 10%. De las 18 gestantes colonizadas, 10 recién nacidos resultaron colonizados, lo que correspondió a un 55,56% de transmisión vertical, predominando la incidencia de colonización neonatal en las madres colonizadas en la vagina y el recto simultáneamente. No se encontró resistencia bacteriana por el SGB a ninguno de los 12 antimicrobianos estudiados.

A pesar de la elevada incidencia de embarazadas portadoras

del SGB, llama la atención que las infecciones por esta bacteria en los neonatos nacidos en la Maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza" son desconocidas, esto es debido probablemente al empleo temprano de la antibioticoterapia, que negativiza rápidamente el cultivo de los recién nacidos con signos de sepsis neonatal temprana. Otros factores involucrados pudieran ser: el título de anticuerpos maternos o los serotipos del SGB en nuestra población, incógnitas que pueden ser despejadas en investigaciones futuras.

Por los resultados anteriores, se sugiere realizar estrategias para la prevención perinatal por el SGB en la transmisión vertical materno-neonatal, así como realizar en nuestros medios estudios en las embarazadas con factores de riesgo, a fin de emplear la profilaxis antimicrobiana con carácter obligatorio como se ha establecido en otras regiones. Igualmente se recomienda el estudio dirigido a determinar la etiología de la sepsis neonatal por el SGB, e identificar los serotipos de esta bacteria predominantes en nuestra población. Los serotipos tienen propiedades diferentes de virulencia y causan morbimortalidad mayor o menor.

Referencias

1. Regan JA, Klebanoff A, Nugent RP. Vaginal infection and prematurity study group the epidemiology of group B colonization in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1991;77:604-610.
2. Baker CJ, Edwards MS. *Streptococcus agalactiae* (group B Streptococcus). En: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Doulin, R. (Eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed. Churchill Livingstone, New York. 2000;2156-2167.
3. Schuchat A. Group B *Streptococcus*. *Lancet.* 1999;353: 51-56.
4. Faro S. Group B beta-hemolytic Streptococci and puerperal infections. *Am J Obstet. Gynecol.* 1998;139: 686-9.
5. Minkoff HL, Sierra MF, Pringle GF and Schwarz RH. Vaginal colonization with group B beta-hemolytic *Streptococcus* as a risk factor for post-cesarean section febrile morbidity. *Am J Obstet. Gynecol.* 1992;142: 992.
6. Schuchat A and Wenger JD. Epidemiology of group B Streptococcal disease. Risk factors, prevention strategies, and vaccine development. *Epidemiol Rev.* 1994;16: 374-402.
7. Schrag S, Whitney C and Schuchat A. Neonatal group B streptococcal disease: How infection control teams can contribute to prevention efforts. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 1998;21: 473-483, 2000.
8. Andreu A, Sanfeliu L, Viñas L y cols. Declive de la incidencia de la sepsis perinatal por *Streptococcus* del grupo B. Barcelona 1994-2001. Relación con las políticas profilácticas. *Enf Infec Microbiol Clin*; 2003;21: 174-179.
9. Juncosa T, Bosh J, Dopico E y cols. Infección neonatal por *Streptococcus agalactiae*. Estudio métrico en el área de Barcelona. *Enf Infec Microbiol Clin.* 1998;16: 312-315.
10. Dillon HC, Khare S, Ad Gray BM. Group B Streptococcal Carriage and disease: A 6 years prospective study. *J Pediatr.* 1987;110: 31-36.
11. Centres for Disease Control and Prevention. 1998. Adoption of hospital policies for prevention of perinatal group B



Colonización de *Streptococcus* beta hemolítico del grupo B en gestantes en trabajo de parto y sus neonatos

- streptococcal disease, United States, 1997. JAMA. 280 (11): 958-959.
12. Gotoff SP. Chemoprophylaxis of early onset group B streptococcal disease in 1999. Curr Opin Pediatr. 2000;12 (12): 105-110.
 13. Centers for Disease control and prevention. Decreasing incidence of perinatal group B streptococcal disease-United States. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 1997;46 (21): 473-477.
 14. Edwards MS, Baker CJ. Group B streptococcal infections. En: Remington, J.S., Klein, J.O. (eds.). Infectious Diseases of the fetus & Newborn Infant, 5th ed. WB Saunders Co., Philadelphia. 2001;1091-1056.
 15. Dorothy M. Group B streptococcal Infections in Newborns. J. Obstet. Gynecol. Neonatal. Nurs. 2001;24: 649-658.
 16. Gotoff and Boyer. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. Pediatrics. 1999;99: 866-868.
 17. Bosch J, Ros R, Amorós M, Olivares R y Álvarez E. Infecciones perinatales por *Streptococcus agalactiae*. Estudio clínico epidemiológico y evaluación de un programa de prevención. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1992;11 (2): 22-79.
 18. Itakura A, Kurauchi O, Morikawa S, Matsuzawa K, Mizutani S and Tomoda Y. A prospective study on the relationship between intrapartum maternal group B streptococcal concentration and signs of infection in neonates. J Obstet Gynecol Res. 1996;22 (2): 101-105.
 19. Dillon HC, Gray E, Pass MA and Gray BM. Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci colonization. J Infect Dis. 1982;145 (6): 749-799.
 20. Reagan JA, Klebanoff MA, Nugent RP, Eschenbach DA, Blackwelder WC, Lou Y. et al. Colonization with group B, in pregnancy and adverse outcome. Am J Obstet Gynecol. 1996;174: 1354-1360.
 21. Crespo M y Vélez JD. Importancia clínica del *Streptococcus agalactiae* como causante de infección. Colombia Médica. 1996;27: 53-8.
 22. Riera L, Benavides G y Morillo N. 1993. Colonización por *Streptococcus* grupo B en embarazadas a término y recién nacidos en una comunidad de Venezuela. Enf Inf Microbiol Clin. 1993;11: 295-298.
 23. Andreu A, Barranco M, Boscan J y cols. Prevention of perinatal group B *Streptococaceae* disease in Europe. Scand J Infect Dis; 1997;29:532.
 24. Mazon A, Salvo MS, Ezcurra R. Resultado del programa de prevención de la infección neonatal por estreptococo del grupo B. Prog obstet GYnecol; 2000;43: 233-236.
 25. Al-Sweih N, Maryegun S, Diejomaoh M, Rotimi V, Khodakhast F, Hassan N, George S, Baig S. *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci) carriage in late pregnancy in Kuwait; Med Princ Pract. 2004;13: 10-14.
 26. Hammoud MS, Al-Shemmar M, Thalib L, Al-Sweih N, Rashuan N, Devaraj LV, Elson H. Comparison between different types of surveillance samples for the detection of GBS colonization in both parturient mothers and their infants, Ginecol Obstet invest. 2003;56: 225-230.
 27. Kowalska B, Niemlec KT, Drejewicz H, Polak K, Kubik P, Elmidaoui A, Gierowska-Bogusz B, Jaczynska R. Prevalence of group B *Streptococaceae* colonization in pregnant women and their newborns based on the results of examination of patients in the obstetric and gynecology department of the National Research Institute of Mother and Child - a pilot study. Ginecol Pol. 2003;74 (10): 1223 - 1227.
 28. Tsolia M, Psoma M, Gavrili S, Petrohilou V, Michalakis S, Legakis N, Karpathios T. Group B *Streptococaceae* colonization of greek pregnant women and neonates: prevalence risk factors and serotypes;. Clin Microbiol Infect. 2003; 9: 832 - 838.
 29. Whitney CG, Daly S, Limpong S, Festin MR, Thin KK, Chipato T, Lumbiganon P, Sauvarin J, Andreus W, Tolosa JE. Global Network for Perinatal and reproductive health. The international infections in pregnancy study: group B streptococcal colonization in pregnant women. J. Of Mat. Fet Neon Med. 2004.;16: 275 - 270.
 30. Villasenor A, Morales P, Palacios G, Solórzano F. Prevalence of *Streptococcus agalactiae* serotype III in pregnant women. Ginecol Obstet Mex. 2004;72:103-108.
 31. Collins T, Calderon M, Gilman R, Vivar A, Charache P. Group B Streptococcal colonization in a developing country: its association with sexually transmitted disease and socioeconomic factors. A J Trop Hyg. 1998;59(4):633-636.
 32. García SD, Eliseth MC, Lazzo MJ, Copolillo E, Barata AD, De Torres R, Vay CA, Famighiet AM. Group B *Streptococaceae* carriers among pregnant women. Rev Argentina Microbiol. 2003;35(4): 183-187.
 33. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5 and international supplement M100-S10. 2007.
 34. Díaz R, Nieves B, Vegas L. Colonización vaginorectal por *Streptococcus* grupo B en mujeres embarazadas con complicaciones ginecobstétricas. Rev Soc Ven Microbiol. 2002;22 (1).
 35. Bosch-Mestres J, Martín-Fernández R, Jiménez M, Anta-Losada. Estudio comparativo de tres medios de cultivo para detectar la colonización por estreptococo del grupo B en la mujer embarazada. DOYMA. Enf Inf Microbiol Clin. 2003;21(7):346-349.
 36. Cueto M, Hernández P, Luna E, Gil A, Pareja L. Comparación del medio de Granada y el Tets ICON-Strep B en la detección de estreptococos del grupo B en gestantes. DOYMA, Enf Inf Microbiol Clin. 2002;20 Supp 1: 56 - 61.
 37. Overman SB, Eley DD, Jacobs BE and Ribes JA. Evaluation of methods to increase the sensitivity and timesliness of detection of *Streptococcus* in pregnant woman. J Clin Microbiol. 2002;40(11):4329-4331.
 38. Lin FY, Weisman LE, Azimi PH, Philips JB, Clark P, Regan J, Rhoads GG, Frasc CE, Gray BM, Troendle J, Brenner RA, Moyer P, Clemens JD. Level of maternal IgG anti-group B *Streptococcus* type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. J Inf Dis. 2004;190 (5): 928 - 934.
 39. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl J Med. 2000;342 (1): 15-20.
 40. Berner R. Significance, management and prevention of *Streptococcus agalactiae* infection during the perinatal period. Expert Rev Anti Infect. 2004;2(3): 427-437.
 41. Simoes JA, Aroutcheva AA, Heimler I, Faro S. Antibiotic resistance patterns of group B streptococcal clinical isolates. Infect Dis Obstet Gynecol. 2004;12 (1):1-8.

Enterobacterias productoras de Beta Lactamasa de espectro expandido en pacientes críticos de la Maternidad «Concepción Palacios»

V. Vergara ¹, Y. Rodríguez ¹, E. Benítez ¹, Y. Garmendia ¹, M. Morales ¹, R. López ¹, L. Torres ²

RESUMEN

Dentro de los mecanismos de resistencia bacteriana encontrados en los miembros de las *Enterobacteriaceae*, las Beta Lactamasas de Espectro Expandido (BLEE), juegan un papel importante ya que debido a su naturaleza plasmídica pueden diseminarse a otros géneros diferentes a *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, de donde principalmente se han descrito y confieren resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y a aztreonam. Dado que en la Maternidad “Concepción Palacios” (MCP) la mayor parte de los pacientes constituyen neonatos y el tratamiento empleado principalmente son cefalosporinas, se evaluó la frecuencia en este centro de Enterobacterias productoras de BLEE aislados en áreas críticas de muestras de hemocultivos, puntas de catéter, orina y secreciones en el período comprendido de Enero a Junio de 2006. La identificación y sensibilidad se realizaron con las galerías ID32GN y ATBGN-5 respectivamente, utilizando el equipo semiautomatizado Mini API (BioMérieux). Para la detección fenotípica de producción de BLEE se empleó el método de doble difusión con discos y el método recomendado por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (1). La mayor frecuencia se obtuvo para *Pantoea agglomerans*, seguida de *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterobacter cloacae*. El 80 % de las enterobacterias aisladas, fueron productoras de BLEE.

Palabras clave: Enterobacterias, Beta Lactamasa de Espectro Expandido, *Pantoea agglomerans*.

Expanded spectrum Beta Lactamase producing enterobacterias in critical patients from Maternity Hospital «Concepción Palacios»

SUMMARY

Inside the mechanisms of bacterial resistance found in members of the *Enterobacteriaceae* family, the Expanded Spectrum Beta Lactamasas (ESBL), play an important role due to its plasmid nature it can be spread to other different genera to *E. coli*, *K.pneumoniae*, and *K. oxytoca*, wherefrom principally they have been described, and award resistance to cephalosporin of third and fourth generation and to aztreonam. In view of the Maternity “Concepción Palacios” (MCP) most of the patients constitutes newborn, and the principally used treatment are cephalosporin, the frequency of ESBL producing enterobacteria was evaluated in this center, isolated in critical areas from samples of blood cultures, tops of catheter, urine and secretions from January to June, 2006. The identification and sensibility were realized by the galleries ID32GN and ATBGN-5 respectively, using the semi automated Mini API (BioMérieux) equipment. For the phenotypical detection of ESBL production there were used the double diffusion of disc method and the method recommended by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (1). The major frequency was to *Pantoea agglomerans* followed by *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae*. 80 % of the isolated enterobacteria, were producer of ESBL.

Key works: Enterobacterias, BLEE, bacterial resistance, *Pantoea agglomerans*.

1. Departamento de Bacteriología, Maternidad Concepción Palacios.

2. Cátedra de Microbiología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela. Caracas Venezuela.

Introducción

En los bacilos Gram negativos la producción de β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia. Se han descrito una gran variedad de β -lactamasas, sin embargo las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) SHV y TEM son las más frecuentemente aisladas en las enterobacterias (2). A partir de la década de los ochenta, producto de mutaciones puntuales a nivel de los aminoácidos que conforman el sitio activo de las BLEA, se originaron enzimas con la capacidad de hidrolizar a los oxymino- β -lactámicos (cefalosporinas de 3ra. generación C3G y aztreonam). Estas enzimas se denominaron β -lactamasas de espectro expandido (BLEE) (3), fueron reportadas originalmente en Europa en el año 1983, pero a partir de ese momento, se han diseminado a nivel mundial (2). Las BLEE han sido reportadas principalmente en aislados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli*, pero la naturaleza plasmídica de los genes codificantes de estas enzimas, ha generado una amplia diseminación de las mismas, a otros géneros bacterianos como *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, etc., esta situación se observa principalmente en el ambiente hospitalario (4,5). Por otro lado, los genes que codifican para la producción de BLEE se encuentran localizados en megaplásmidos (>100KDa), que frecuentemente codifican resistencia a otros antimicrobianos, tales como aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y trimetoprim-sulfametazol. La susceptibilidad a las fluoroquinolonas es muy variable, de acuerdo con la cepa aislada y las tendencias de resistencia. Es por ello que el tratamiento de estos organismos multiresistentes es sumamente difícil, en múltiples ocasiones las opciones terapéuticas se restringen solo a los carbapenems (6).

Es bien conocido el mal pronóstico clínico que tienen aquellos pacientes que sufren infecciones por microorganismos productores de BLEE cuando son tratados con C3G o aztreonam (7), por lo tanto el conocimiento de la frecuencia de dichos aislamientos en cualquier centro hospitalario constituye una herramienta fundamental en el momento de seleccionar la terapia empírica en aquellos pacientes con infecciones de alto riesgo, evitando los fracasos terapéuticos clínicos y contribuyendo así con la disminución del valor costo-beneficio generado por las infecciones bacterianas. Adicionalmente, se previene la diseminación horizontal, especialmente en las Unidades de Terapia Intensiva (8).

La Maternidad “Concepción Palacios” (MCP), es un hospital catalogado de Tipo IV, con aproximadamente 460 camas operativas y cuya misión es la atención de mujeres embarazadas y al producto de su embarazo (neonatos), así como también a mujeres no embarazadas con problemas de aborto, cáncer, entre otros. Debido a la población de la cual hacemos referencia, las cefalosporinas constituyen los antibióticos prin-

cipalmente utilizados, es por ello que se quiso conocer la frecuencia de la producción de BLEE en enterobacterias aisladas de los pacientes hospitalizados en áreas críticas de dicho centro.

Métodos

Se hizo un estudio retrospectivo de los aislamientos de enterobacterias obtenidas en muestras de hemocultivos, punta de catéteres, orinas y secreciones, de los pacientes ubicados en los Servicios Neonatales (SN) y la Unidad de Terapia Intensiva de Adultos (UTIA) de la Maternidad “Concepción Palacios” en el período comprendido entre enero y junio de 2006.

Muestras

Las muestras analizadas fueron hemocultivos, puntas de catéteres, orinas y secreciones de heridas.

Los hemocultivos se tomaron siguiendo las normas de asepsia establecidas. Se obtuvo una muestra por paciente en los casos de neonatos. Para los adultos, se obtuvieron por lo menos dos muestras con un intervalo de diferencia de 15 minutos entre cada toma. Las muestras de sangre se inocularon en botellas pediátricas (Bact/ALERT® PF BioMérieux, Inc. Dirham, NC 27704) y botellas para adulto (Bact/ALERT® FA BioMérieux, Inc. Dirham, NC 27704), del equipo automatizado Bact/Alert (Organón Técnica Corporation), donde fueron monitoreadas hasta su positividad. La cantidad de muestra inoculada fue de 1 a 3 ml de sangre para los frascos pediátricos y de 7 a 10 ml para los frascos de adultos.

Las puntas de catéteres fueron obtenidas con las medidas de asepsia establecidas, se enviaron 5 cm de la punta distal al laboratorio en inyectora estéril.

Las orinas se tomaron en bolsas recolectoras, siguiendo las medidas de higiene necesarias en los pacientes pediátricos y a través de catéter en los pacientes adultos.

Las secreciones de herida fueron tomadas por el médico y se utilizaron culturesses con medio de Stuart como medio de transporte (Copan Innovation, Italy).

Las muestras fueron inoculadas en los medios de cultivo de Agar Sangre (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA), Agar GC Medium (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA) y Agar Levine Eosina Azul de Metileno (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA). Los medios de cultivo de Agar Sangre y Agar GC se incubaron en atmósfera de 5-10% de CO₂ a 35°C, y el medio Agar Levine Eosina Azul de Metileno, en estufa a 35°C.

Cepas bacterianas

Se procesaron un total de 206 aislamientos de enterobacterias, de las cuales: 139 se obtuvieron de hemocultivos, 26 de puntas de catéteres, 3 de muestras de orinas y 38 de secreciones de heridas. La mayoría de los aislamientos correspondieron a 176 neonatos ubicados en los Servicios Neonatales y los 18 restantes eran pacientes adultos ubicados en la UTIA.

Identificación de las cepas bacterianas

La identificación y la sensibilidad de las cepas se realizaron mediante el sistema semiautomatizado miniAPI (BioMérieux) utilizando galerías ID32GN y ATBGN-5 respectivamente. Adicionalmente, la identificación de las enterobacterias, se realizó siguiendo la metodología descrita por Murray y col (6) y las pruebas de sensibilidad se llevaron a cabo por el método de difusión en disco descrita por Bauer y Kirby (9) y se interpretaron según los lineamientos establecidos en el CSLI (1).

Detección fenotípica de BLEE

A los aislamientos en los cuales se observó una disminución en el halo de inhibición correspondiente a las cefalosporinas de tercera generación (C3G), y a los que se le observó resistencia a los aminoglicósidos y/o quinolonas, se les hizo la detección fenotípica de producción de BLEE.

La detección de BLEE se realizó mediante el método de doble difusión con discos recomendado por Jarlier y col (10). A los aislamientos que mostraban agrandamiento del halo en la zona de confluencia entre la C3G y el ácido clavulánico, se les realizó el método recomendado por el CLSI (1), utilizando los discos Ceftazidima (30 µg, Oxoid Limeted, Basingstoke, Hampshire, England), Ceftazidima/ác. clavulánico (30/10 µg, Oxoid Limeted, Basingstoke, Hampshire, England), Cefotaxima (30 µg, Oxoid Limeted, Basingstoke, Hampshire, England), Cefotaxima/Ac. Clavulánico (30/10µg, Oxoid Limeted, Basingstoke, Hampshire, England), Cefpodoxime (10 µg, Oxoid Limeted, Basingstoke, Hampshire, England), Cepodoxime/ác. clavulánico (10/10 µg, Oxoid Limeted, Basingstoke, Hampshire, England), siguiendo los parámetros establecidos. Se emplearon las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218, para el control de calidad de los discos.

Resultados

Los resultados obtenidos en la identificación por medio de la metodología descrita por Murray y col. (6) y la obtenida por el método semi automatizado mini API, fueron 100% coincidentes. Se aislaron un total de 206 enterobacterias, de las cuales 133 fueron identificadas como *Pantoea agglomerans*, 39 como *Klebsiella pneumoniae*, 12 como *Enterobacter cloacae*, 12 fueron *Escherichia coli* y 10 *Enterobacter aerogenes* (Figura 1). En los Servicios Neonatales (SN), se aislaron: 5

Enterobacter aerogenes, 8 *Enterobacter cloacae*, 6 *Escherichia coli*, 35 *Klebsiella pneumoniae*, y 131 cepas de *Pantoea agglomerans*. En la Unidad de Terapia Intensiva de Adultos (UTIA), se aislaron: 5 *Enterobacter aerogenes*, 4 *Enterobacter cloacae*, 6 *Escherichia coli*, 4 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Pantoea agglomerans*.

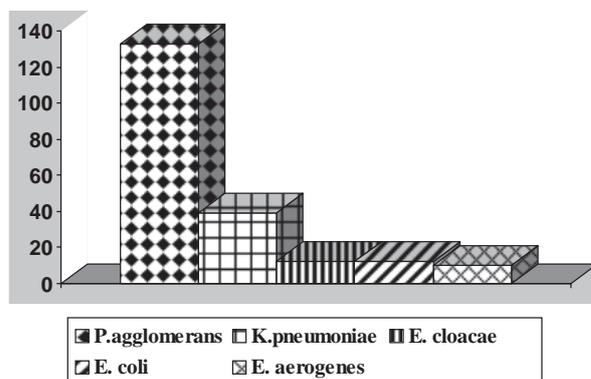


Figura1. Frecuencia de enterobacterias aisladas en la Maternidad “Concepción Palacios” entre los meses enero-junio del 2006.

Del total de aislamientos correspondientes a *Pantoea agglomerans*, 116 cepas (56%) resultaron positivas para las pruebas confirmatorias de producción de BLEE, de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, fueron positivas a estas pruebas 29 (14.1%); igualmente 9 (4.4%) cepas de *Enterobacter cloacae*, 3 (1.5%) de *Escherichia coli* y 8 (3.9%) de *Enterobacter aerogenes* dieron las pruebas confirmatorias positivas (Tabla 1). Por lo tanto obtuvimos una producción de BLEE en un 80.2% de las enterobacterias aisladas entre enero y junio del 2006.

Las cepas productoras de BLEE (BLEE +) obtenidas en los SN tuvieron la siguiente distribución: 4 *Enterobacter aerogenes*, 5 *Enterobacter cloacae*, 3 *Escherichia coli*, 27 *Klebsiella pneumoniae*, y 115 *Pantoea agglomerans*. En la UTIA se obtuvo: 4 aislamientos de *Enterobacter aerogenes* productores de BLEE, 4 *Enterobacter cloacae*, 2 *Klebsiella pneumoniae*, y 1 aislamiento de *Pantoea agglomerans* (Tabla 2).

La frecuencia de resistencia asociada a aminoglicósidos y a ciprofloxacina en los aislamientos BLEE +, fueron los siguientes: en los SN se obtuvo un porcentaje de resistencia de 34% para amikacina, 84% para gentamicina y 1% para ciprofloxacina. En la UTIA se obtuvo un 80% de resistencia a amikacina, 67% a gentamicina y 100% a ciprofloxacina. Los carbapenems se mantuvieron con un 0% de resistencia tanto en los aislamientos BLEE + de los SN como de la UTIA (Tabla 3).

Tabla 1. Comparación de tipo de enterobacterias aisladas productoras de Beta Lactamasa de Espectro Expandido (BLEE).

Microorganismo	Número de aislamientos	Número de cepas productoras de BLEE	% de cepas productoras de BLEE
<i>Pantoea agglomerans</i>	133	116	56.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	29	14.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	9	4.4
<i>Escherichia coli</i>	12	3	1.5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	8	3.9
Total	206	165	80.2

Tabla 2. Comparación de las diferentes especies de enterobacterias obtenidas en los Servicios Neonatales (SN) y la Unidad de Terapia Intensiva de Adultos (UTIA), con los aislamientos positivos para la producción de BLEE.

Microorganismo	Número de aislamientos en los SN/ Número de cepas BLEE +	Número de aislamientos en la UTIA/ Número de cepas BLEE +
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5/4	5/4
<i>Enterobacter cloacae</i>	8/5	4/4
<i>Escherichia coli</i>	6/3	6/0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35/27	4/2
<i>Pantoea agglomerans</i>	131/115	2/1
Total	185/154	21/11

BLEE+: Cepas productoras de Beta Lactamasa de Espectro Expandido.

Tabla 3. Porcentaje de resistencia asociada en los aislamientos productores de Beta Lactamasa de Espectro Expandido obtenidas en los Servicios Neonatales (SN) y la Unidad de Terapia Intensiva de Adultos (UTIA).

Antibiótico	% Resistencia en SN	% Resistencia en UTIA
Amikacina 30pg	34	80
Gentamicina 10pg	84	67
Ciprofloxacina 5pg	1	100
Imipenem 10pg	0	0

Discusión

Las BLEE, constituyen un factor muy importante de resistencia adquirida emergente a nivel mundial en miembros de *Enterobacteriaceae* (3-5). Esto constituye un grave problema a nivel hospitalario no solo por su rápida diseminación, sino también por el patrón fenotípico de multiresistencia que exhiben, reduciendo mucho las opciones terapéuticas (4,5,7). Para el año 2000 según datos de SENTRY existían en Latinoamérica un 46,9% de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, siendo México el país con mayor porcentaje con un 52%, seguido de

Argentina con 51,1% y Brasil con un 50,9%, mientras que Venezuela presentaba un porcentaje del 26.2%. El aislamiento de enterobacterias productoras de BLEE en Venezuela es un problema que ha ido en aumento a nivel hospitalario (4,5). Actualmente, el Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (www.provenra.org), maneja una cifra de 63.66% de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de hemocultivos en pacientes hospitalizados, productoras de BLEE a nivel nacional.

La Maternidad “Concepción Palacios”, atiende en la ciudad de Caracas, una población importante de mujeres embarazadas, así como también los neonatos producto de dichos embarazos, la mayoría de los cuales no son controlados. Esto trae como consecuencia que exista un número significativo de nacimientos pretérmino, con problemas de bajo peso al nacer, insuficiencia respiratoria, enfermedades congénitas entre otros. Así mismo, al ser las cefalosporinas, antibióticos con muy bajos efectos secundarios y de amplio espectro de acción, han sido grandemente utilizados para el tratamiento de mujeres embarazadas y recién nacidos, lo cual pudo haber ejercido una presión selectiva en la población bacteriana intrahospitalaria, favoreciendo el incremento de cepas resistentes.

La frecuencia de la especie de *Enterobacteriaceae* varía mucho de un centro a otro, sin embargo, en estudios realizados en el interior del país (11-13), se reporta a *Klebsiella pneumoniae* como la especie de mayor frecuencia, seguida por *Escherichia coli*. Esto también se observó en algunos estudios realizados a nivel mundial (14-16). Sin embargo, en la MCP, la mayor frecuencia fue para *Pantoea agglomerans*, un germen considerado oportunista que suele colonizar pacientes hospitalizados en los que observamos condiciones predisponentes como tratamiento antibacteriano, neutropenia, catéteres, diabetes, infusiones intravenosas, etc. (6). Además de estar ampliamente distribuido en la naturaleza (6), *Pantoea agglomerans* ha sido descrito como agente causal en casos aislados de infecciones articulares (17), hueso y tejidos blandos, como consecuencia de penetración traumática de vegetación (18-22); así como también en casos de contaminación de fluidos intravenosos (23), nutrición parenteral (24) y productos sanguíneos (25) en los que se ve involucrado un número, si se quiere reducido, de pacientes si los comparamos con los 133 aislamientos obtenidos en seis meses en la MCP.

En un estudio realizado en todo el año 2006 en El Complejo "Hospital Universitario Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar, se obtuvo un 50,6% de enterobacterias aisladas de hemocultivos, productoras de BLEE (11). En otro estudio llevado a cabo en Maracaibo (12), también analizaron las enterobacterias productoras de BLEE aisladas en hemocultivos pero por un período de tiempo mayor, junio 2002 a junio 2006, y encontraron una producción de BLEE de un 39,48%. En un análisis de mecanismos de resistencia realizado en el Estado Portuguesa (13), la producción de BLEE constituyó el 19,2% lo cual colocó a la producción de estas e-lactamasas como el segundo mecanismo de resistencia observado con mayor frecuencia. En la MCP, analizando un período de 6 meses, se obtuvo que el 80,2% de las enterobacterias aisladas dieron positivas las pruebas fenotípicas para la producción de BLEE, una cifra sin duda, alarmante, si la comparamos con los reporte citados y aún más si tomamos en cuenta que dichos aislamientos se obtuvieron principalmente de muestras de hemocultivos. Este quizá sea el reporte del porcentaje más elevado que haya sido informado en Venezuela.

Los genes que codifican para la producción de BLEE se encuentran localizados en megaplásmidos (>100 KDa), que frecuentemente codifican resistencia también a otros antimicrobianos, tales como aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y trimethoprim-sulfametazol. Esto determina que las enterobacterias productoras de BLEE frecuentemente presentan resistencia asociada a dichos antibióticos (26). En este estudio se demostró una elevada resistencia a aminoglicósidos tanto en el SN como en los aislamientos obtenidos en el área de UTIA. Sin embargo, nos llama la atención la diferencia de resistencia asociada a ciprofloxacina que existe entre el área de SN (1%) y

el de UTIA (100%). Esto probablemente se deba a la diferencia en el uso de quinolonas que existe entre ambas áreas ya que en los neonatos, este grupo de antibióticos no es utilizado. Los carbapenemes en este grupo de *Enterobacteriaceae*, se mantienen como los antibióticos de elección.

Por último, es de hacer notar que a pesar de que la mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE en la MCP están presentes en el área de SN, si bien concuerda con las condiciones predisponentes que poseen los pacientes de dicha área, tales como, bajo peso al nacer, insuficiencia respiratoria, uso de catéter, alimentación parenteral, etc., el hecho de que las cifras sean tan elevadas y que se mantengan en el tiempo, hace sugerir que existe un problema de transmisión continua en las que el personal juegan un papel primordial y que urge tomar medidas de control efectivas tales como el uso de barreras de contacto (aislamiento del paciente, lavado estricto de manos, uso de alcohol isopropílico), capacitación permanente del personal, indicación de cultivos de control epidemiológico y una vigilancia activa y segura por parte de los comités de control de infecciones.

Referencias

1. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. January 2006. M100-S16. Vol. 26 N°3.
2. Bradford P.A. Extended-spectrum β -lactamases en the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-951.
3. Jacoby GA and LS Munoz-Price. The new β -lactamases. N Engl J Med. 2005; 352:380-391.
4. Torres L, Gagliotta V. β -lactamasas de Espectro Expandido en Enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. RSVM 2006; 2:80-84.
5. Comegna M, Guzmán M, Carmona O, Molina M. y Grupo Colaborativo del Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana. Resistencia Bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. Nuevos hallazgos. RSVM 2000; 20(1):58-63.
6. Quintiliani R, Sahn D, Courvalin P. Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents en: Murray PR, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R: Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C.: ASM Press, 1999. p. 1505.
7. Paterson DL and Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18:657-686.
8. Rossi F, Andreazzi D. Resistencia Bacteriana. Interpretando el antibiograma. Sao Paulo: Atheneu, 2006:65-91.
9. Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turk M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. Am J Clin Pathol. 1996;45:439-496.
10. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G and Philippon A. Extended broad-spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer B-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10: 867-878.



Enterobacterias productoras de Beta Lactamasa de espectro expandido en pacientes críticos de la Maternidad Concepción Palacios

11. Senmache L, Guevara A. Resistencia a los antimicrobianos en Enterobacterias Productoras de BLEE aisladas de hemocultivos, en el Complejo "Hospital Universitario Ruiz y Páez" Ciudad Bolívar, Estado Bolívar. Enero-diciembre 2006. XVI Congreso de la Sociedad Venezolana de Medicina Interna. Año Cincuentenario. Maracaibo, Venezuela. p. 1
12. Sandra T, Paz A. Enterobacterias productoras de ã-lactamasas de Espectro Extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario de Venezuela. *Kasmera* 2007; 35(1):15-25. ISSN 0075-5222.
13. Gómez A, Maurera T. Mecanismos de Resistencia a los antimicrobianos en el Hospital Universitario Dr. Miguel Oraá de Guanare, Estado Portuguesa, Venezuela. *Rev Méd Ext Portuguesa* 2007; 1:107-115.
14. Branger C, Lesimple A, Brown B, Berry P and Lambert N. Long term investigation of the clonal dissemination of *K. pneumoniae* isolater producing extended-spectrum B-lactamases in a university hospital. *J Med Microbiol.* 1998; 47:210-219.
15. Wu T, Chia J, Su I, Huo A, Chu C, Chiu C. Dissemination of Extended-Spectrum B-Lactamases producing *Enterobacteriaceae* in pediatric Intensive care Units. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(10):4836-38.
16. Daoud J and Hakime N. Prevalence and susceptibility patterns of Extended-Spectrum B-Lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut. *Rev Esp Quimioterap.* 2003; 16(2):233-38.
17. Miranda E, García I, Calmet J, Ardanuy C, Giné J. Artritis séptica de rodilla por *Pantoea agglomerans*: caso clínico. *Rev Esp Cir Osteoarti.* 2005; 40: 185-188.
18. De Champs C, Le Seaux S, Dubost J, Boisgard S, Sauvezie B and Sirot J. Isolation of *Pantoea agglomerans* in two cases of septic monoarthritis after plant thorn and wood silver injuries. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:460-461.
19. Flatauer FE and Khan MA. Septic arthritis caused by *Enterobacter agglomerans*. *Arch. Intern. Med.* 1978; 138:788.
20. Kratz A, Greenberg D, Barki Y, Cohen E and Lifshitz M. *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injurie; case report and literature review. *Arch Dis Child.* 2003; 88:542-544.
21. Ulloa-Gutierrez R, Moya T and Avila-Aguero ML. *Pantoea agglomerans* and thorn-associated suppurative arthritis. *Pediatr Infect Dis J.* 2004; 23:690.
22. Vincent K and Szabo RM. *Enterobacter agglomerans* osteomyelitis of the hand from a rose thorn. A case report. *Orthopedics* 1988; 11:465-467.
23. Matsaniotis NS, Siriopoulou VP, Theodoridou MC, Tzanetou KG and Mostrou GI. Enterobater sepsis in infants and children due to contaminated intravenous fluids. *Infect Control* 1984; 5:471-477.
24. Hbsah H, Zeehaida M, Van Rostenberghe H, Noraida R, Wan Pauzi WI, Fatimah I, Rosliza AR, Nik Sharimah N Y and Maimunah H. An outbreak of *Pantoea spp.* In a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition. *J Hosp Infect.* 2005;61:213-218.
25. Alvarez FE, Rogge KJ, Terrand J and Lichtiger B. Bacterial contamination of cellular blood components. A retrospective review at a large cancer center. *Ann Clin Lab Sci.* 1995; 25:283-290.
26. Pujol M, Peña C. El significado clínico de las ã-lactamasas de Espectro Expandido. *Enfermedades Infecciosas: Microbiol Clin.* 2003;21(2)69-71.

Valor pronóstico de los niveles séricos del Receptor α soluble de Interleuquina-2 en pacientes con Linfoma No Hodgkin

Claudia Galicia, Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Jean Desenne, Ana Monzón de Orozco, Marina Gonzalez, Antonieta Natale, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmin Ordoñez, Maria Alejandra Torres, Aixa Müller

RESUMEN

El receptor α soluble de la interleuquina 2 (sR α IL-2) ha sido considerado un marcador pronóstico en pacientes con linfoma No Hodgkin (LNH). El objetivo del trabajo consistió en determinar la significancia de los niveles del sR α IL-2 en pacientes con LNH, su correlación con factores clínico patológicos, biológicos y su valor pronóstico. Se procesaron muestras de suero de 43 nuevos casos de pacientes con LNH, pretratamiento, edades comprendidas entre 25-84 años, mediana 55 años, 33 (77%) LNH agresivos y 10 (23%) LNH indolentes. Según el Índice Pronóstico Internacional (IPI), 37 (86%) de bajo riesgo y 6 (14%) de alto riesgo, siendo el tiempo promedio de seguimiento de la enfermedad 30 meses (rango 3-48 meses). Se recolectaron 20 muestras de suero de controles sanos, donantes de banco de sangre, para determinar el valor de referencia. Las muestras de pacientes y controles se congelaron a -70°C hasta su procesamiento. El sR α IL-2 se determinó por un inmunoensayo enzimático adsorbente (ELISA), sensibilidad 10 pg/ml y se consideraron elevados los niveles >2000 pg/ml. Los marcadores biológicos: Beta 2 microglobulina (B2M), Proteína C Reactiva (PCR), Velocidad de sedimentación globular (VSG), Albúmina sérica, Lactato deshidrogenasa (LDH), Aspartato amino transferasa (AST), Alanino amino transferasa (ALT) y Fosfatasa alcalina (ALP), se determinaron por métodos de inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA), aglutinación directa, Wintrobe, colorimétrico y cinético, respectivamente. Los niveles séricos del sR α IL-2 en pacientes con LNH fueron significativamente superiores al del grupo control ($p < 0,001$) y 26 (60%) de los pacientes expresaron niveles elevados del sR α IL-2 ($p < 0,001$). Se detectaron niveles del sR α IL-2 significativamente incrementados asociados a pacientes con estadio clínico (EC) III-IV ($p = 0,02$), síntomas B ($p = 0,04$), valores elevados de B2M ($p = 0,01$) y PCR ($p = 0,05$). Los niveles del sR α IL-2 correlacionaron de forma significativa y directa con EC, síntomas B, B2M y PCR, ($p = 0,05$). En el análisis univariado, la sobrevida global (SG) (4 años, 18%) de los pacientes con LNH agresivos con niveles elevados del sR α IL-2 fue significativamente inferior a la SG (59%) de los pacientes con niveles ≤ 2000 pg/ml ($p = 0,048$). La determinación del sR α IL-2, pretratamiento, en pacientes con LNH, podría aportar información sobre la progresión, actividad y pronóstico de la enfermedad, siendo importante para la selección de la estrategia terapéutica.

Palabras clave: Receptor α soluble de Interleuquina-2, Linfoma No Hodgkin, factor pronóstico.

Prognostic value of serum soluble Interleukin-2 α receptor levels in Non Hodgkin's lymphoma patients

SUMMARY

Soluble Interleukin-2 α receptor (sIL-2 α R) has been considered as a prognostic marker in Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients. The aim of this study was to assess the significance of sIL-2 α R levels in the pre-treatment serum of NHL patients, as well as its correlation with the clinical-pathological and biological factors and its prognostic value. Forty-three serum samples from newly diagnosed NHL patients were processed before starting the treatment. The median age was 55 years old (range 25-84 years), 33 cases (77%) were classified as aggressive lymphomas and 10 cases (23%) as indolent lymphomas. According to the International Prognostic Index (IPI), 37 cases (87%) were classified as high risk group and 6 cases (14%) as low risk group. The average time of follow-ups was 30 months (range 3-48 months). 20 healthy control samples from blood bank donors were collected for establishing the reference value. All patients and control samples were kept at -70°C until processed. The sIL-2 α R levels were determined by applying an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), sensitivity 10 pg/ml. Values were considered elevated when they exceeded 2000 pg/ml. The biological markers: Beta 2 microglobulin (B2M), C-Reactive Protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum albumin, serum lactate dehydrogenase (LDH), aspartate amino transaminase (AST), alanine amino transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), were determined by the methods of microparticle enzyme immunoassay (MEIA), direct agglutination, Wintrobe, colorimetric and kinetic respectively. The sIL-2 α R serum levels in the NHL patients were significantly higher than the control group ($p < 0.001$) and 26 (60%) of the patients expressed values higher than 2000 pg/ml ($p < 0.001$). Significantly elevated serum levels of sIL-2 α R were associated with clinical stage (CS) III-IV ($p = 0.02$), B symptoms ($p = 0.04$), elevated levels of B2M ($p = 0.01$) and CRP ($p = 0.05$). There was a significant and direct correlation between the sIL-2 α R concentrations with CS, B symptoms, B2M and CRP ($p = 0.05$). According to the univariate analysis, the overall survival of aggressive NHL patients with high sIL-2 α R levels was significantly lower (4 years, 18%) than those with sIL-2 α R ≤ 2000 pg/ml ($p = 0.048$). Knowledge of the serum levels of sIL-2 α R in pretreatment NHL patients may help us to have information about the possible prognosis, progression and activation of disease and may be important for determination of treatment strategy.

Key words: Soluble interleukin-2 α receptor, Non Hodgkin's Lymphoma, prognostic factor.

Dirección: Instituto de Oncología y Hematología, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Universidad Central de Venezuela: Unidad de Linfoma, Laboratorio de Inmunología, Laboratorio General.

Introducción

Los Linfomas No-Hodgkin (LNH) comprenden un variado espectro de desórdenes linfoproliferativos con diferentes comportamientos clínicos y características biológicas (1-4).

Recientemente se ha avanzado en la investigación de los aspectos biológicos de esta malignidad, asociados al estudio de las citoquinas, sus receptores solubles y su relación con la patogénesis (5). En tal sentido una serie de estudios han sugerido la significancia del receptor alfa soluble de la Interleuquina-2 (sR α IL-2) como marcador pronóstico en LNH (6).

El receptor alfa de la IL-2 es producido por linfocitos T y B activados y está compuesto por tres glicoproteínas (α , ϵ , γ) (7). La cadena α de peso molecular 55 KD referida como antígeno Tac (CD25) funciona como un receptor de baja afinidad, compuesto por 351 aminoácidos de los cuales 13 se localizan intracitoplasmáticamente.

El sR α IL-2 corresponde a una porción truncada de la cadena alfa del antígeno Tac (CD25), el cual es menor que su contraparte celular (45KD vs 55KD), pero es capaz de unirse a la IL-2 eficientemente. La cadena ϵ es una glicoproteína de 575 aminoácidos de peso molecular de 75 KD y las cadenas ϵ y γ son receptores de moderada afinidad (8). El sR α IL-2 no se expresa en células en reposo, la activación de las células T por antígeno o mitógeno induce su expresión en la superficie de los linfocitos T y es liberado por efecto de una proteasa (9).

La interleuquina 2 (IL-2) fue descrita en el sobrenadante de cultivos de células activadas y está involucrada en la inmunoregulación, promoviendo la proliferación de los linfocitos T. La IL-2 se combina específicamente con su receptor sobre la superficie de los linfocitos T e induce la respuesta celular (8,9).

Debido a que el sR α IL-2 es producido por linfocitos activados, su nivel sérico es índice de activación linfocitaria y en consecuencia se han detectado niveles incrementados en pacientes con malignidades hematológicas como leucemias y linfomas (10-15).

La identificación de pacientes con LNH, con diferentes posibilidades de respuesta al tratamiento, es crítico para el desarrollo de las terapias según el índice de riesgo de la enfermedad. En tal sentido, el Índice Pronóstico Internacional (IPI) ha sido el modelo predictivo utilizado para la categorización de los pacientes con LNH en grupos de riesgo. El IPI incorpora cinco factores pronósticos: la edad, el estado funcional del paciente, el estadio clínico, la actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH) y el número de lesiones

extranodales (16). Inicialmente fue aplicado a los LNH agresivos y posteriormente fue validado para todos los grados de malignidad (17). No obstante, la precisión de dicho modelo predictivo pudiera complementarse con la combinación de marcadores biológicos adicionales asociados al tumor, de allí la importancia de determinar los niveles del sR α IL-2 y evaluar su utilidad como marcador tumoral en LNH.

Materiales

Pacientes: Se evaluaron 43 pacientes con diagnóstico de Linfoma No-Hodgkin (LNH) confirmados clínicamente e histopatológicamente, los cuales acudieron a la consulta de Linfoma del Instituto de Oncología y Hematología U.C.V.-Ministerio de Salud., durante el periodo 1999 - 2004, siendo el tiempo promedio de seguimiento de la enfermedad de 30 meses (rango 3-48 meses). Se incluyeron pacientes que no recibieron tratamiento previo de la enfermedad, con serología negativa para VIH, excluyéndose los pacientes con LNH previamente tratados o con enfermedades asociadas tipo diabetes, insuficiencia renal u otras, y aquellos con serología positiva para VIH.

Los pacientes se clasificaron histopatológicamente según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (18). Para la estadificación clínica se aplicó el sistema de clasificación de ANN ARBOR: siendo los estadios I-II (enfermedad localizada) y estadios III-IV (enfermedad avanzada). El estado funcional de los pacientes se determinó aplicando la escala de Karnofsky (19). De acuerdo al IPI se clasificaron los grupos de riesgo: bajo riesgo (bajo riesgo e intermedio bajo) y alto riesgo (riesgo intermedio alto y alto riesgo). En la práctica clínica con fines pronósticos los LNH se subdividieron en las categorías de linfomas indolentes y agresivos (3).

Grupo control: Se incluyeron 20 individuos aparentemente sanos, donantes de Banco de Sangre, para establecer los valores de referencia (VR) de los niveles séricos del sR α IL-2.

Evolución clínica: Los pacientes se trataron con esquemas de primera línea establecidos internacionalmente para los Linfomas No Hodgkin (1).

Para la evaluación clínica se aplicaron los siguientes criterios:

Remisión completa (RC): se define como la desaparición de todas las manifestaciones clínicas y signos de la enfermedad, con normalización de las alteraciones radiológicas y de los datos bioquímicos que fueran anormales antes de iniciar la quimioterapia. Una vez finalizado el tratamiento, la respuesta se mantendrá, al menos tres meses. En caso de infiltración de la médula ósea, la desaparición de la enfermedad morfológica/

Valor pronóstico de los niveles séricos del Receptor á soluble de Interleuquina-2 en pacientes con Linfoma No Hodgkin

histológica, deberá ir unida a normalización de las cifras hematológicas periféricas (>12 g/dl de Hb, >100.000 plaquetas/mm³ y >1.500 granulocitos/mm³).

Remisión parcial (RP>50): Se define como la reducción del 50% o más de la enfermedad medible durante al menos un mes. Debe haber ausencias de citopenias periféricas.

Progresión: Aumento en la frecuencia o en la severidad de los síntomas, o aparición de nuevas áreas afectadas, o progresión de más de un 25% en las localizaciones tumorales iniciales.

Sobrevida global (SG): Es el tiempo transcurrido desde que se hace el diagnóstico y se inicia o no un tratamiento, hasta la muerte ocasionada por la enfermedad inicial que se está evaluando o hasta la fecha del último control.

Sobrevida libre de enfermedad (SLE): Es el tiempo transcurrido entre la fecha RC y la nueva aparición de síntomas y signos de enfermedad (recaída).

Métodos

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa, una sola toma de muestra antes de la administración del tratamiento. Para la muestra de sangre total se utilizaron tubos con anticoagulante EDTA y para la obtención del suero tubos estériles sin anticoagulante, los cuales se centrifugaron a 2500 rpm, por 10 min. y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Las muestras de suero de pacientes y controles se procesaron bajo las mismas condiciones.

LDH, AST, ALT Y FALC: Las enzimas se analizaron por métodos cinéticos UV, utilizando un autoanalizador de química sanguínea (Hitachi modelo 704 Roche): ALT (VR: ≤ 38 u/l, Roche catálogo N° 851121); AST (VR: ≤ 41 u/l, Roche catálogo N° 851132); FALC (VR: ≤ 290 u/l, Roche catálogo N° 816388).

LDH (VR: 80-285 u/l, Invelab catálogo N° 89289). La actividad de la LDH se consideró elevada para valores >570 U/L, correspondiendo al 100% del valor superior del rango de referencia, según lo establecido por el IPI, en pacientes con LNH (16).

PCR: se aplicó método de aglutinación directa semicuantitativo (Wiener Lab. catálogo N° 006531). VR: ≤ 6 mg/dl.

B2M: Se determinó mediante el método de inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA), sistema IMX. (Abbot, cat N° 69-2197/R11). VR: $\leq 3,4$ mg/dl.

Determinación de indicadores hematológicos: Hemoglobina, Hematocrito, Recuento celular, Formula leucocitaria, y

Velocidad de Sedimentación globular (VSG) por el método Wintrobe 1 hora, VR: 0-15 mmh.

Receptor alfa soluble de la Interleuquina 2 (sR α IL-2): Los niveles séricos del sR α IL-2 se determinaron en las muestras de pacientes y controles sanos aplicando un inmunoensayo enzimático adsorbente (ELISA), modalidad sándwich, (Quantikine Human IL-2sR α catálogo N° DR2A00). Se empleó un anticuerpo monoclonal de captura específico para el sR α IL-2, adherido a la placa de ELISA. Las muestras, estándares y el conjugado, se incubaron en cada pozo formándose un complejo: anticuerpo de captura – antígeno - conjugado (anticuerpo policlonal anti sR α IL-2- enzima). Posterior a los lavados para remover los reactivos y muestras no ligadas, se añadió el sustrato, produciéndose el desarrollo de color, cuya intensidad es proporcional a la concentración del sR α IL-2 combinado. El desarrollo del color se detuvo con el reactivo de parada y la intensidad del color se detectó en un densitómetro a la longitud de onda de 450nm, siendo el nivel de sensibilidad del ensayo de 10 pg/ml.

Análisis estadístico

Se aplicaron las pruebas estadísticas no paramétricas: Test U-Mann-Whitney para determinar las diferencias en el comportamiento del marcador entre los grupos, expresados por la mediana y el coeficiente de correlación de Spearman rank-sum para determinar la correlación entre los factores pronósticos. Se aplicó la prueba exacta de Fisher para el análisis de las frecuencias y para las curvas de supervivencia el método de Kaplan-Meier y la prueba de Log-rank para el análisis univariado. La significancia estadística se estableció en $p=0,05$

Resultados

Características clínico-patológicas y biológicas de los pacientes con LNH: En la Tabla 1 se muestran las características clínico- patológicas de los pacientes evaluados. De acuerdo a los factores de mal pronóstico, 33% de los pacientes presentaron edades mayores de 60 años, 58% de sexo femenino, 60% con estadio clínico III-IV (enfermedad avanzada), 7% estado funcional alterado, 63% con afectación extraganglionar >1 región, 47% presentaron síntomas B, 70% enfermedad voluminosa mayor de 10 cm, y el 19% y 63% con compromiso de médula ósea y abdominal respectivamente. Según la histología del tumor, el 56% correspondió al subtipo histológico Linfoma difuso de células grandes tipo B, 9% al subtipo Linfoma folicular y el 12 % al Linfoma linfocítico pequeño. En relación a las categorías pronósticas, el 77% correspondió a LNH agresivos y el 23% a LNH indolentes. Con respecto al IPI, el 86% se categorizó de bajo riesgo y el 14% de alto riesgo.



Valor pronóstico de los niveles séricos del Receptor á soluble de Interleuquina-2 en pacientes con Linfoma No Hodgkin

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Características		αRIL-2	
		N (43)	%
Edad (mediana 55, rango 25-84 años)	≤ 60 años > 60 años	29 14	67 33
Sexo	Masculino Femenino	18 25	42 58
Clasificación Histológica	Difuso de células grandes Células del manto Parecido Burkitt Células grandes anaplásicas T Células T periféricas Imunoblástico Folicular Linfocítico pequeño Tipo malcoma Micosis fungoide	24 02 01 02 01 01 04 05 02 01	56 05 02 05 02 02 09 12 05 02
Categorías pronósticas	Agresivos Indolentes	33 10	77 23
Estadio Clínico	I-II III-IV	17 26	40 60
Estado funcional Karnofsky	< 70% ≥ 70%	03 40	07 93
Enfermedad extraganglionar	≤ 1 > 1	16 27	37 63
Síntomas B	No Si	23 20	53 47
Enfermedad voluminosa	≤10 cm > 10 cm	13 30	30 70
Compromiso de médula ósea	No Si	35 08	81 19
Enfermedad abdominal	No SI	16 27	35 63
IPI	Bajo riesgo Alto riesgo	37 06	86 14

IPI: Índice Pronóstico Internacional
Bajo riesgo (bajo e intermedio bajo)
Alto riesgo (intermedio alto y muy alto riesgo)

En relación a la frecuencia de los marcadores biológicos alterados, en base al valor límite de referencia (cut-off), el 12%, 28%, 7%, 9%, 23%, 49%, 93% y el 61% de los pacientes presentaron respectivamente niveles elevados de LDH, B2M, AST, ALT, FALC, PCR, VSG e IL-6 y el 79% niveles bajos de Albúmina sérica.

Niveles séricos del sRdIL-2 en pacientes con LNH: Los pacientes con LNH presentaron valores séricos del sRdIL-2 significativamente superiores a los del grupo control, $p < 0,001$ (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles séricos del sRdIL-2 en pacientes con Linfoma No Hodgkin y controles sanos.

Parámetros	sRdIL-2 (pg/ml)	
	Controles	Pacientes
Mediana	560	3200
Rango	320-2000	3200-40000
*p	<0,001	

sRdIL-2: Receptor alfa soluble de Interleuquina -2
*p significativa = 0,05. Prueba U-Mann-Whitney.

Tomando en cuenta el valor de referencia obtenido en el grupo control, de los 43 pacientes evaluados, 26 (60%) presentaron niveles significativamente elevados del sRdIL-2 (>2000 pg/ml) comparados con 17(40%) de los pacientes con valores del sRdIL-2 ≤ 2000 pg/ml, $p < 0,001$ (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles séricos del sRdIL-2 en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Niveles séricos sRdIL-2	≤ 2000 pg/ml	> 2000 pg/ml	*p
N° pacientes =43	17(40%)	26(60%)	
Mediana	780	5200	0,001
Rango	320-2000	2280-40000	

sRdIL-2: Receptor alfa soluble de Interleuquina -2
*p significativa = 0,05. Prueba U-Mann-Whitney.

Asociación de los niveles séricos de sRdIL-2 con las características clínico-patológicas y biológicas de los pacientes con LNH: En la Tabla 4, observamos que los pacientes con estadio clínico III-IV cursaron con valores del sRdIL-2 significativamente superiores comparados con el grupo de pacientes con estadio clínico I-II, $p = 0,02$. Los niveles del sRdIL-2 fueron significativamente elevados en el grupo de pacientes que presentaron los síntomas B (fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso), respecto al grupo con ausencia de los síntomas, $p = 0,04$. No se obtuvieron diferencias significativas relacionadas con la edad, el estado funcional, la enfermedad extraganglionar, la enfermedad voluminosa, el compromiso de médula ósea, la enfermedad abdominal y el IPI.

En cuanto a los marcadores biológicos (Tabla 5), los niveles del sRdIL-2 en el grupo de pacientes con concentraciones elevadas de B2M, fueron significativamente superiores comparados con los niveles del receptor en el grupo de pacientes con valores normales de B2M, $p = 0,01$. También se observaron valores del sRdIL-2 significativamente aumentados, asociados al grupo de pacientes con niveles elevados de PCR respecto al grupo de pacientes con valores normales de PCR, $p = 0,05$.

Valor pronóstico de los niveles séricos del Receptor á soluble de Interleuquina-2 en pacientes con Linfoma No Hodgkin

No se obtuvieron resultados significativos asociados a los valores de LDH, AST, ALT, FALC, Albúmina, VSG e IL-6.

Tabla 4. Asociación de los niveles séricos del sRαIL-2 con las características clínico-patológicas en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Características		N	sRαIL-2 (M) pg/ml	Rango	P*
Edad	≤60 años	29	3200	400 – 12400	0,57
	>60 años	14	4440	320 - 40000	
Estadio Clínico	I-II	17	1520	320 – 40000	0,02
	III-IV	26	3150	400-40000	
Estado Funcional Karnofsky	< 70 %	3	3200	500-3200	0,48
	≥ 70%	40	3500	320-40000	
Enfermedad Extraganglionar	≤1	16	1580	320-15600	0,26
	>1	27	3200	320 – 40000	
Enfermedad voluminosa	≤10 cm	13	2280	380 – 7200	0,14
	>10 cm	30	5000	320 – 40000	
IPI	Bajo riesgo	37	3000	320-40000	0,16
	Alto riesgo	06	7600	1620-12400	
Síntomas B	No	23	1320	320 - 40000	0,04
	Si	20	4800	320 – 40000	
Enfermedad Abdominal	No	15	3200	320-40000	0,92
	Si	26	4000	400-40000	
Compromiso de médula ósea	No	35	4000	320-40000	0,13
	Si	8	1980	480 – 5200	

sRαIL-2: Receptor alfa soluble de Interleuquina -2

IPI: Índice pronostico Internacional

M: mediana

*p significativa = 0,05. Prueba U-Mann-Whitney

Correlación de los niveles séricos de sRαIL-2 con las características clínico- patológicas y marcadores biológicos en los pacientes con LNH: Los niveles del sRαIL-2 correlacionaron de forma directa y significativa con el estadio clínico de los pacientes ($r=0,33$ $p=0,047$) y la presencia de síntomas B ($r=0,42$ $p=0,05$). No se determinaron correlaciones significativas para el resto de las condiciones clínicas evaluadas (Tabla 6).

El análisis de correlación con los marcadores biológicos mostró que los niveles del sRαIL-2 correlacionaron significativamente con los valores de B2M ($r= 0,42$ $p=0,05$) y PCR en forma directa ($r=0,30$ $p= 0,05$), no habiéndose detectado correlaciones significativas con el resto de los marcadores biológicos (Tabla 7).

Tabla 5. Asociación de los niveles séricos del sRαIL-2 con los marcadores biológicos en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Variabes		N	sRαIL-2 (M) pg/ml	Rango	P*
LDH**	≤570 UI/L	38	4400	320 – 40000	0,24
	>570UI/L	5	1160	500 – 3200	
B2M	≤3,4 mg/l	31	920	320-8000	0,01
	>3,4 mg/l	12	3200	380-40000	
AST	≤38 U/L	40	3600	320- 40000	0,15
	>38 U/L	3	1040	680-1160	
ALT	≤41 U/L	40	3000	320-40000	0,26
	>41 U/L	3	5200	4800-10000	
FALC	≤290 U/L	33	3000	320 – 40000	0,21
	>290 U/L	10	4200	680 – 40000	
Albúmina sérica	≤ 3,4	09	4100	320 – 12000	0,82
	> 3,4	34	3200	380- 40000	
VSG	≤ 15	3	4000	2000-12400	0,60
	>15	21	4800	320 – 40000	
	VD	09			
IL- 6	≤ 1,99 pg/ml	15	4800	380-40000	0,42
	> 1,99 pg/ml	23	3000	320 - 40000	
	VD	05			
PCR	≤6 mg/dl	22	2140	320 – 40000	0,05
	>6 mg/dl	21	5200	640-40000	

sRαIL-2: Receptor alfa soluble de Interleuquina -2

PCR: Proteína C Reactiva

FALC: Fosfatasa alcalina

B2M: Beta 2 microglobulina

ALT: Alanina amino transferasa

AST: Aspartato amino transaminasa

VD: Valor des conocido

VSG: Velocidad de sedimentación globular

LDH**: Lactato deshidrogenasa (100% del límite superior del valor de referencia)

IL-6: Interleukina -6

*p significativa = 0,05. Prueba U-Mann-Whitney

Tabla 6. Correlación de los niveles séricos del sRαIL-2 con las características clínico-patológicas en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Características	r	*p
Edad	0.16	NS
Estadio clínico	0.32	0.047
Estado funcional Karnofsky	0.162	NS
Enfermedad extraganglionar	0.23	NS
Enfermedad voluminosa	0.20	NS
IPI	0.02	NS
Síntomas B	0.42	0.05
Compromiso de médula ósea	0.003	NS

sRαIL-2: Receptor alfa soluble de Interleuquina -2

IPI: Índice. Pronóstico Internacional

*p significativa = 0,05 Coeficiente correlación Spearman.

NS: no significativo



Valor pronóstico de los niveles séricos del Receptor á soluble de Interleuquina-2 en pacientes con Linfoma No Hodgkin

Tabla 7. Correlación de los niveles del sRdIL-2 con los marcadores biológicos en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

VARIABLES	r	p*
LDH	0,15	NS
B2M	0,42	0,05
AST	0,08	NS
ALT	0,08	NS
FALC	0,32	NS
Albúmina	-0,20	NS
IL-6	0,14	NS
PCR	0,30	0,05

sRdIL-2: Receptor alfa soluble de Interleuquina -2

PCR: Proteína C Reactiva

B2M: Beta 2 microglobulina

LDH: Lactato deshidrogenasa

IL-6: Interleukina -6

NS: no significativo

*p significativa = 0,05 Coeficiente correlación Spearman.

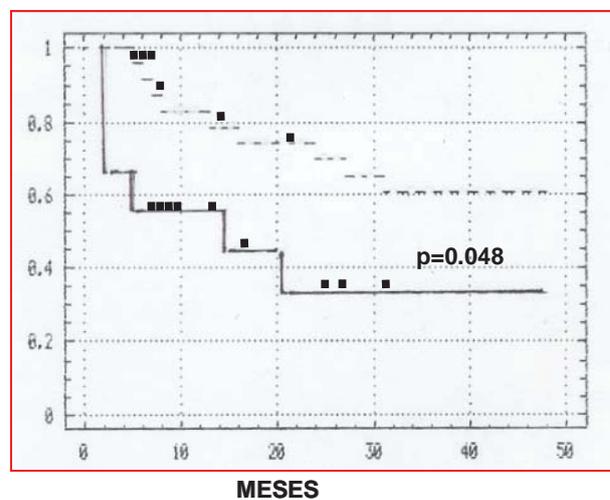
Niveles séricos de sRdIL-2 pretratamiento y evolución clínica:

De acuerdo a la evolución clínica, el 16% de los pacientes entraron en remisión completa, 19% respondieron parcialmente, 8% progresaron y 22% fallecieron. Se detectaron niveles elevados del sRdIL-2 (>2000 pg/ml) en el 38% de los pacientes con respuesta completa, 58% de los pacientes con respuesta parcial, 50% de los pacientes que progresaron y en el 68% de los fallecidos, pero estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Niveles séricos de sRdIL-2 y sobrevida: El análisis univariado de la sobrevida global de acuerdo a los niveles séricos del sRdIL-2 en los pacientes con LNH agresivos, indicó que para el tiempo de seguimiento de 4 años, los pacientes con valores elevados del sRdIL-2 (>2000 pg/ml) presentaron una probabilidad de sobrevida (18%) significativamente inferior comparada con la probabilidad de sobrevida global (59%) del grupo de pacientes con valores normales del sRdIL-2, $p = 0,048$ (Figura 1).

El tamaño de la muestra y la distribución de los datos (vivos y fallecidos), fueron limitantes para el análisis de la sobrevida en el grupo de los linfomas indolentes, igualmente para las curvas de la sobrevida libre de enfermedad en ambos grupos pronósticos (datos no mostrados).

Figura 1. Curva de la sobrevida global de acuerdo a los niveles del sRdIL-2 en pacientes con LNH agresivos. Método Kaplan Meier.



sRdIL-2

— > 2000 pg/ml n = 11 Eventos = 9 —
 ≤ 2000 pg/ml n = 22 Eventos = 6

RdIL-2: Receptor á soluble Interleuquina-2

n: número pacientes,

Eventos: fallecidos Tiempo de seguimiento: 3 a 48 meses

*p significativa = 0.05 Análisis univariado Prueba Log Rank

Discusión

La profundización en el estudio de los factores pronósticos biológicos que complementan la información aportada por el IPI en pacientes con LNH ha adquirido un interés considerable.

EL sRdIL-2 se presenta en la literatura particularmente como un marcador biológico predictivo asociado con la sobrevida global y la respuesta al tratamiento en pacientes con LNH (11,12,14,15).

En el presente estudio, los pacientes con LNH presentaron niveles séricos del sRdIL-2 significativamente elevados antes de iniciar el tratamiento. La asociación de su incrementada expresión con el estadio clínico III-IV, síntomas B, niveles elevados de B2M y PCR, coinciden con los hallazgos previamente reportados en pacientes con LNH (11-15,23,24), de los cuales solo en el estudio de Pérez-Encina M., et al. (12) se analizaron pacientes con LNH agresivos, LNH indolentes y el grupo total, observándose una asociación significativa entre los niveles elevados del sRdIL-2 y el estadio clínico (enfermedad avanzada) en los tres grupos evaluados y una asociación con los síntomas B con el grupo total y los linfomas agresivos. La relación del sRdIL-2 con el estadio clínico y la

B2M es reflejo de la diseminación y proliferación del proceso tumoral y la asociación con los síntomas B y los niveles elevados de la PCR, nos indican su relación con la respuesta del paciente al tumor, el estado de inflamación y la activación celular.

Si bien el incremento en la expresión del sRdIL-2 no es un marcador específico de malignidad ya que los linfocitos y monocitos activados expresan el receptor (9,21), en nuestro trabajo los niveles del sRdIL-2 correlacionaron significativamente y de forma directa con las condiciones clínicas que reflejan la progresión y expansión de la enfermedad así como con las concentraciones de B2M, marcador biológico que refleja la actividad proliferativa del tumor. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Pérez-Encina M., et al. (12), quienes demostraron la misma correlación en los tres grupos de pacientes evaluados. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la acumulación del sRdIL-2 en la sangre de los pacientes con LNH es consecuencia directa de su liberación por las células tumorales (22). También observamos la correlación directa entre el sRdIL-2, presencia de síntomas B y la PCR, lo cual refleja el estado de activación del sistema inmune y la respuesta inflamatoria, en la cual también participan las citoquinas pro-inflamatorias tales como la interleuquina -6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF) y sus receptores solubles, favoreciendo el estado de inflamación general (6,20,23).

En relación a los grupos pronósticos y los niveles del sRdIL-2, no se observaron diferencias entre los linfomas agresivos y los indolentes, contrario a los resultados de Pérez-Encina M., et al. (12), quienes reportaron niveles superiores del sRdIL-2 en los linfomas agresivos. En dicho trabajo el número de pacientes era comparable entre los grupos, no siendo así en nuestro caso, pudiendo influir esto en la significancia estadística, a pesar de las diferencias entre los valores de las medianas entre ambos grupos y el efecto de la distribución de los datos.

En nuestro estudio, si bien una proporción significativa de pacientes presentaron niveles del sRdIL-2 pretratamiento incrementados, no se observaron resultados significativos relacionados con la evolución clínica, probablemente debido al bajo número de pacientes.

En el análisis univariado de la supervivencia global, nuestro estudio determinó el valor pronóstico para el sRdIL-2. Los pacientes con LNH agresivos que expresaron niveles elevados del sRdIL-2 cursaron con una menor probabilidad de supervivencia global en comparación con el grupo de pacientes con niveles normales del sRdIL-2, no obstante no se demostró su valor pronóstico independiente en el análisis multivariado. Fabre-Guillevin E., et al. (15) reportaron resultados similares correlacionados con

la supervivencia global, remisión completa y supervivencia libre de enfermedad, basados en valores de cut-off diferentes (≤ 110 pg/ml), además en su trabajo analizaron los grupos de riesgo según el IPI de acuerdo a los niveles del sRdIL-2 y sus observaciones indicaron una menor supervivencia global y remisión completa en pacientes de riesgo intermedio con altos niveles del sRdIL-2. Por otra parte, Goto H., et al. (14) reportaron disminución de la probabilidad de supervivencia global en los pacientes con niveles elevados del sRdIL-2 (>2000 U/ml) en comparación con los pacientes con bajos niveles del mismo, mostrando ser un marcador independiente de la supervivencia global. Adicionalmente, al combinarlo con el IPI, sus resultados indicaron una menor probabilidad de supervivencia global en los pacientes con niveles elevados del sRdIL-2 y grupos de alto riesgo. Nitsu N., et al. (11) obtuvieron resultados concordantes con los nuestros respecto a la supervivencia global asociada a niveles elevados del sRdIL-2 (> 2000 U/ml y >3000 U/ml) y cuando se combinaron con el IPI no obtuvieron resultados significativos para la supervivencia global, no obstante el análisis multivariado mostró la independencia del marcador. El trabajo de Chopra G.S., et al. (5) coincide con el nuestro en cuanto al valor pronóstico del sRdIL-2 pretratamiento y además en su estudio determinaron niveles incrementados durante el tratamiento en pacientes con respuesta parcial y progresión de la enfermedad. Stasi R., et al. (25) determinaron diferencias significativas respecto a los niveles del sRdIL-2 entre pacientes con LNH respondedores y no respondedores.

Debido a la variabilidad de los resultados entre los trabajos reportados, es importante considerar los factores que determinan estas diferencias y dificultan la comparación de los mismos (15), tales como el tamaño de la muestra, las características clínico-patológicas, la histología del tumor y la heterogeneidad de los subtipos histológicos, siendo recomendable la clasificación de la OMS para la posterior categorización de los grupos pronósticos. Desde el punto de vista metodológico, el método utilizado, la variabilidad de los criterios para establecer el valor del cut-off, así como el análisis estadístico aplicado, son determinantes en la reproducibilidad de los resultados.

En el presente estudio evaluamos la utilidad de la determinación de los niveles séricos del sRdIL-2 en pacientes con LNH. Los resultados sugieren que su expresión refleja el comportamiento biológico del tumor, la progresión y actividad de la enfermedad, considerándose la expresión de los niveles elevados, un marcador de mal pronóstico para la supervivencia global en los pacientes con LNH agresivos.

La profundización en el comportamiento de los niveles séricos del sRdIL-2 en los pacientes con LNH, permitiría complementar la información aportada por el IPI para la categorización de los pacientes y la selección de las estrategias terapéuticas.

Agradecimiento

Agradecemos al profesor Leovigildo García, profesor jubilado de la Cátedra de Matemática y Bioestadística de la Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, por la asesoría estadística.

Agradecemos a la Fundación BADAN por el financiamiento del estudio estadístico.

Referencias

1. Feldman AL, Pittaluga S, Jaffe ES. Classification and histopathology of the lymphomas. En Canellos G.P., Lister T.A., Young B., editors. The lymphomas. Saunders, Elsevier. Second Edition 2006 p.2-38.
2. Fisher RJ, Mauch PM, Friedberg JW. Non Hodgkin Lymphomas. En Cancer principles and Practice Oncology. Vincent De Vita Jr., Samuel Hullman, Steve A. Rosemberg. 7th Edition. Lippincott: Williams & Wilkins 2005. Capitulo 41-2; p.1957-1997.
3. Hennessy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non Hodgkin lymphoma: an update. The Lancet Oncology 2004; 5 : 341-352.
4. Evans LS, Hancock BW. Non hodgkin Lymphoma. Lancet 2003; 362:139-46.
5. Chopra C, Chitalkar PG. Cytokines as useful prognostic markers in lymphoma cases. MJAFI 2004; 60:45-49
6. Nicolaidis C, Dimou S, Pavlidis N. Prognostic factors in aggressive Non- Hodgking's lymphomas. Oncologist 1998; 3: 189-197
7. Vchiyama T, Broder S, Walman TA. A monoclonal antibody (anti-tac) reactive with activated and functionally mature human T Cells. Production of anti tac monoclonal antibody and distribution of tac (T) cells. J. Immunol 1981;126:1393-1403.
8. Robb RJ, Munck A, Smith KA. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity and biological relevance. J Exp Med. 1981;154:1455-1474
9. Rubin LA, Kuyman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R. Soluble interleuquin-2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. Journal of Immunology 1985;135:3172-3177.
10. Barak V, Ginzburg M, Kalickman I, Polliack A. Serum soluble interleuquin-2 receptor levels are associated with clinical disease status and histopathological grade in non Hodgkin's lymphoma. Leukemia and Lymphoma 1992; 7:431-438.
11. Nitsu N, Jijima K, Chizuka A. High serum soluble interleuquin 2 receptor level is associated with poor outcome of aggressive non Hodgkin's lymphoma. Eur J Haematol 2001;66:24-30.
12. Pérez-Encina M, Quintas A, Bendaña A, Rabuñal M, Bello J. Correlation and prognostic value of serum soluble ICAM-1, B2M microglobulin and IL-2dRs levels in non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia and lymphoma 1999; 33(5-6);:1551-556.
13. Janik J, Morris J, Pittaluga S, McDonald K, Raffeld M, Jaffe ES, et al. Elevated serum-soluble interleukin-2 receptor levels in patients with anaplastic large cell lymphoma. Blood 2004; 104:3355-3357.
14. Goto H, Tsurumi H, Takemura M, Ino-Shimomura Y, Kasanara S, Sawada M, et al. Serum-soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) level determines clinical outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: in combination with the International Prognostic Index. J. Cancer Res Clin Oncol 2005; 131:73-79.
15. Fabre-Guillevin E, Tabrizi R, Coulon V, Monnereau A., Eghbali H., Soubeyran I., et al. Aggressive non-Hodgkin's lymphoma: concomitant evaluation of interleuquin-2 soluble interleukin-2 receptor, interleukin -4, interleukin -6, interleukin -10 and correlation with outcome. Leukemia and lymphoma 2006; 47 (4): 603-611.
16. Shipp HA. A predictive model for aggressive non Hodgkin's lymphomas. The International Non Hodgkin's lymphomas prognostic factors proyect. N Engl J Med 1993; 329: 987-994.
17. Hermans J, Krol A, Groningen K, et al. International prognostic Index for aggressive non Hodgkin's lymphoma is valid for all malignancy grades. Blood 1995; 88(4): 1460-63.
18. Harris NL, Jaffe ES, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting. The Haematology Journal 2000; 1:53-66.
19. Karnofsky et al. Clinical Oncology. P. Rubin Ed. American Cancer Society. 1983.
20. Zabner de Oziel P, Galizia C, Somoza R, Wallis V, Desenne J, Gonzalez M, et al. Valor pronóstico de los niveles de la Interleuquina-6 en Linfoma No Hodgkin. Act Cient de la Soc. Venez. de Bioanal. Espec. 2006;9(1):11-21.
21. Herrmann F, Cannistra SA, Levine G, Griffin JD. Expression of interleukin-2 receptors and binding of IL-2 by gamma interferon-induced human leukemic and normal monocytic cells. J Exp Med. 1985; 162: 1111-1116.
22. Chilosi M, Semenzato G, Vinante F, et al. Increased levels of soluble interleukin-2 receptor in non-Hodgkin's lymphomas. Relationship with clinical, histologic and phenotypic features. Am J Clin Pathol. 1989; 92:186-191.
23. Legoufee E, Rodriguez MC, Picot B, Richard B, Klein B, Commes T. C-Reactive Protein serum level is a valuable and simple prognostic marker in non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia and Lymphoma 1998; 31: 351-357
24. Stasi R, Zinzani PL, Galieni P, Lanta VM, Damasio E, Dispensa E, et al. Prognostic value of serum IL-10 and soluble IL-2 receptor levels in aggressive non Hodgkin's lymphoma. British Journal of Haematology 1994; 88:770-777
25. Stasi R, Zinzani PL, Lanta VM, Damasio E, Dispensa E, Dammacco F, et al. Clinical implications of cytokine and soluble receptor measurements in patients with newly diagnosed aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Eur J Haematol 1995; 54: 9-17

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 manuscritos 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 (titulillo) 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* 1993:325-33.

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.

Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon

Hernández Mirna ¹, Monzón Ana ¹, Zabner-Oziel Priva ¹, Morales Maria Rosángel ¹, Guedez Nelson ¹

RESUMEN

El cáncer colo-rectal es uno de los cánceres más comunes en el mundo actual, para lo cual el 5-Fluorouracilo (5-FU) es usualmente parte importante del tratamiento quimioterapéutico. La Timidilato Sintetasa (TS), es la enzima blanco para el 5-FU. Estudios recientes sugieren que la TS puede predecir el pronóstico y el éxito de la terapia basada en el 5-FU. El propósito de este estudio retrospectivo fue determinar la expresión de la TS en muestras de biopsias de cáncer de colon incluidas en parafina, mediante la técnica de inmunohistoquímica y correlacionarla con factores de riesgo, antígeno carcinoembrionario (CEA), CA-19-9, evolución del paciente y respuesta al tratamiento con 5-FU. La población en estudio consistió en 34 muestras de biopsias de cáncer de colon obtenidas de pacientes quienes fueron tratados con 5-FU y Leucovorina. A las muestras de adenocarcinomas colónicas incluidas en parafina se les realizó la detección de TS a través de inmunohistoquímica. Los pacientes en cuyos tumores había una alta expresión de la TS, mostraron una sobrevida significativamente menor comparado son aquellos pacientes que mostraron baja expresión de la enzima en sus tumores ($p=0,004$). La expresión de la TS puede ser utilizada como un importante marcador pronóstico de sobrevida y de respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer colo-rectal.

Palabras clave: Timidilato sintetasa (TS), cáncer de colon, 5-Fluorouracilo (5-FU).

Prognostic and predictive value of the thymidylate synthase (TS) in patients with colon cancer

SUMMARY

Colorectal cancer is one of the most common cancers in the world today, for which a 5-fluorouracil (5-FU) is usually an important part of the chemotherapeutic treatment. The thymidylate synthase (TS), is the target enzyme for 5-FU. Recent studies suggest that TS can predict the prognosis and the success of therapy based on 5-FU. The purpose of this retrospective study was to determine the expression of TS in samples from biopsies of colon cancer in paraffin, using the technique of immunohistochemistry and its correlation with risk factors, carcinoembryonic antigen (CEA), CA-19-9, patients evolution and response to treatment with 5-FU. The study population consisted of 34 biopsy samples obtained from colon cancer patients who were treated with 5-FU and Leucovorin. A sample of colonic adenocarcinoma in paraffin was performed to detect TS through immunohistochemistry. Patients whose tumours had a high expression of TS showed a significantly lower survival rate compared with those patients who showed low expression of the enzyme in their tumours ($p = 0.004$). The expression of TS can be used as an important marker of survival prognosis and response to chemotherapy in patients with colon cancer.

Key words: Thymidylate synthase (TS), colon cancer, 5-fluorouracil (5-FU).

1. Laboratorio de Inmunología, Instituto de Oncología y Hematología, MPPS. Postgrado de Inmunología de Laboratorio. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

El cáncer colo-rectal es la segunda causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos y representa el tercer cáncer más común tanto en hombres como en mujeres, con un estimado de mortalidad anual de 55.000 individuos (1-3). En Venezuela, el cáncer colo-rectal ocupa el cuarto lugar de incidencia por cáncer, el cuarto lugar de causa de muerte por cáncer en hombre y el quinto lugar de muerte en mujeres (4).

La incidencia específica por edad aumenta continuamente de la segunda a la octava década de la vida, existiendo predominancia masculina. En el momento del diagnóstico, el 10% de los pacientes tendrán enfermedad *in situ*, un tercio presentará enfermedad regional y un 20% enfermedad metastásica a distancia. La tasa de mortalidad ajustada por edad aumentó de forma continua tanto para hombres como para mujeres desde 1930 hasta 1950, en los últimos años ha descendido ligeramente la tasa de mortalidad en mujeres, permaneciendo constante en hombres (5).

Casi dos terceras partes del total de los pacientes diagnosticados con cáncer colo-rectal presentarán enfermedad local avanzada. Para estos pacientes, la cirugía es la principal terapia con una consideración para la quimioterapia adyuvante, particularmente en enfermedad de nódulos linfáticos positivos.

La sola intervención quirúrgica puede curar la mayoría de estos pacientes, mientras que la quimioterapia ha mostrado que disminuye la tasa de recurrencia cerca del 30%, así que muchos pacientes reciben quimioterapia innecesariamente (6).

El uso de quimioterapia basado en la fluoropirimidina es el principal tratamiento para los pacientes con cáncer colo-rectal avanzado, pero desafortunadamente solo una minoría de estos pacientes se benefician del uso de tales regímenes. El 5-Fluorouracilo (5-FU) es uno de los agentes quimioterapéuticos más ampliamente utilizado, sin embargo el 5-FU utilizado como agente único tiene un efecto limitado en el tratamiento de cáncer de colon, con un porcentaje de respuesta de solo 10 al 20% (7).

La combinación de 5-FU y Leucovorina (LV) ha demostrado que mejora la sobrevida de un número significativo de pacientes con cáncer colo-rectal avanzado, a pesar de esto el porcentaje absoluto de estos pacientes quienes se benefician de la quimioterapia es aun bajo (1). La introducción de oxaliplatino dentro del tratamiento quimioterapéutico de tumores colo-rectales metastáticos representa un progreso significativo en la lucha contra esta enfermedad (8).

Debido a la carencia de *marcadores predictivos* (variables que proporcionan información sobre el beneficio que se obtendrá

con los tratamientos quimioterapéuticos) la respuesta individual a la quimioterapia en los pacientes con cáncer colo-rectal avanzado es aun difícil de preveer. De hecho, poco se sabe acerca de marcadores biológicos y bioquímicos de sensibilidad a las fluoropirimidinas en tumores colo-rectales (1).

Además, la identificación y uso de *marcadores pronósticos* (variable que proporciona información prospectiva sobre resultados de un paciente), pueden ayudar a la selección de un paciente para una modalidad terapéutica particular (9).

La Timidilato sintetasa (TS) es una enzima que cataliza la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) y 5,10-metilentetrahidrofolato (CH₂H₄ folato) a desoxitimidina monofosfato (dTMP) y dihidrofolato, esto proporciona la única vía de novo para la biosíntesis de dTMP y es la única enzima del metabolismo de folato en el cual el CH₂H₄ folato es oxidado durante la transferencia de carbono. Debido al papel central de la TS en la síntesis de un precursor de ADN esencial y su importancia como un blanco quimioterapéutico, la enzima ha sido muy estudiada (10-12).

Se ha descrito que los niveles intracelulares de la TS tiene utilidad como marcador pronóstico y predictivo en el manejo de pacientes con cáncer colo-rectal (12-14). Estudios importantes de la comunidad internacional han evidenciado que pacientes con altos niveles de la TS en sus tumores tienen significativamente peor evolución clínica, comparados con aquellos pacientes cuyos cánceres tienen bajos niveles intracelulares de la TS (14). Igualmente, se ha reportado que altos niveles de la TS en pacientes con cáncer colo-rectal, gástrico, mama u ovario, están positivamente correlacionados con pobre sobrevida y/o pobre respuesta al 5-FU.

La TS es el blanco intracelular primario para drogas antimetabolitos, incluyendo el 5-FU, raltitrexel y pemitrexed (12-15).

Investigaciones clínicas y preclínicas han demostrado la importancia de los niveles intracelulares de la TS como un determinante de sensibilidad al tratamiento con 5-FU. El 5-Fluorouracilo por si solo es inactivo y requiere su conversión intracelular a 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (FdUMP), de esta forma, FdUMP ejerce su actividad citotóxica a través de la formación de un complejo ternario con la TS y bloqueo del proceso de síntesis de ADN (17).

Estudios previos realizados con varios cánceres han demostrado que hay una estrecha relación entre la sobre expresión de la TS y la resistencia al 5-FU. Además, el nivel de expresión de la TS predijo la respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU. De aquí, que baja expresión de TS fue

Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon

acompañado por un gran porcentaje de respuesta a la quimioterapia con 5-FU, y alta expresión de TS fue asociado con un pobre pronóstico en cánceres gástricos y colo-rectal (17).

Múltiples investigaciones clínicas retrospectivas y relativamente pequeñas, usando inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o pruebas de polimorfismos para determinar TS, han mostrado que los pacientes con bajos niveles de TS en sus tumores tienen una mejor respuesta a tratamientos que contienen fluoropirimidina comparado con la respuesta en pacientes cuyos cánceres tienen altos niveles de TS. También, otros estudios clínicos y preclínicos demuestran que los niveles de TS se correlacionan con sensibilidad y respuesta a 5-FU (18).

Los métodos convencionales de cuantificación y detección de la TS han sido por ensayos bioquímicos que miden la cantidad de FdUMP radio marcado y unido a la TS después de la extracción de la enzima en células y tejido. También se ha determinado la actividad catalítica de la enzima en las células intactas o sistemas libres de células. Estos ensayos tienen varias limitaciones particularmente cuando es aplicado para la determinación de la actividad de la TS en muestras de tejido humano (19).

Otros ensayos determinan la TS intracelular a través de su capacidad para liberar Tritio desde la conversión de dUMP hasta dTMP (Ensayo de Liberación de Tritio) o la capacidad de unión a FdUMP (Ensayo de Unión a Ligandos), sin embargo también tiene limitaciones debido a que existe la necesidad de obtener grandes cantidades (>50mg) de muestras de tejido fresco (20).

Los métodos más sensibles para la cuantificación de la expresión del gen de la TS fueron recientemente desarrollados. La PCR semicuantitativa ha permitido la determinación de la expresión del gen TS intratumoral (21). Este método basado en PCR es capaz de medir genes de expresión, tales como la TS en muestras de biopsias obtenidas por endoscopia de rutina del tracto gastrointestinal alto y bajo (22). La genotipificación de la TS es más predictiva para la respuesta a la terapia que la inmunohistoquímica en pacientes con cáncer de colon (13, 23).

Debido a su exquisita sensibilidad, la tecnología del PCR puede finalmente proporcionar los medios para medir marcadores de respuesta para la mayoría de las drogas anticáncer en el material tumoral de pacientes individuales (24).

El desarrollo de anticuerpos contra la TS ha proporcionado una oportunidad para desarrollar nuevas técnicas que permitan medir la expresión de TS intratumoral en estudios clínicos y preclínicos (25). Behan y col, elaboraron y caracterizaron el

anticuerpo monoclonal TS 106 para evaluar inmunológicamente la localización y cuantificación de la TS en células y tejidos humanos (26). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra TS humano proporcionan la adecuada sensibilidad y especificidad necesaria para superar aquellos problemas inherentes en los ensayos bioquímicos (27). Igualmente, Johnston y col, desarrollaron anticuerpos monoclonales contra TS humana que tienen la sensibilidad y especificidad requeridas para detectar y cuantificar la enzima TS en secciones de tejido fijados en formalina (28). Los anticuerpos monoclonales contra TS han facilitado el desarrollo de ensayos inmunológicos que pueden detectar cantidades femtomolares de la proteína TS usando muestras de biopsias de tejidos pequeños (29). Por otro lado el estudio realizado por Van Triest y col, describe la metodología y validación del uso de un anticuerpo policlonal contra TS para la cuantificación de los niveles de la TS en material incluido en parafina de 50 pacientes con cáncer colo-rectal (2).

A través del presente estudio queremos demostrar que la TS puede ser usada como un marcador para pronóstico y predicción en la selección de pacientes con cáncer colo-rectal en estadios avanzados, que realmente se beneficiarán de la aplicación de quimioterapia con 5-FU.

Teniendo en cuenta las elevadas cifras de incidencia y mortalidad del cáncer colo-rectal en Venezuela, que según estadísticas nacionales llega a extremos que pudiera considerarse como problema de salud pública, y estimando que la mayoría se presenta en estadios avanzados de la enfermedad, en el cual la quimioterapia es una de las principales armas en el arsenal médico para su tratamiento, consideramos importante tener un indicador cuantificable que permita evaluar y seleccionar cuales pacientes serán los más beneficiados de recibir este tipo de terapia, mas aún cuando se conoce los importantes efectos colaterales asociados al uso de los agentes quimioterapéuticos.

La aplicación de los niveles de TS en tejidos con cáncer colo-rectal puede servir para fines de predicción y pronóstico de pacientes con cáncer colo-rectal, y pudiera ser aplicado prospectivamente en la evaluación patológica de rutina en cáncer de colon en un futuro cercano.

En base a lo anteriormente expuesto, nos propusimos determinar retrospectivamente la expresión de la enzima TS en tejidos de tumor de pacientes con cáncer de colon mediante la técnica de inmunohistoquímica y correlacionarla con la evolución y respuesta al tratamiento con 5-FU, factores de riesgo, marcador tumoral antígeno carcinoembrionario (CEA) y CA-19-9.



Métodos

La realización del presente trabajo se llevó a cabo a través de un estudio retrospectivo, en el que se requirió de la integración de un equipo multidisciplinario dado por el Servicio de Oncología-Hematología (MSDS)-UCV y el Instituto de Anatomía Patológica Dr. José Antonio O'Daly-UCV.

Se estudiaron 34 muestras de tejido incluidos en parafina, tomadas de tumores pertenecientes a pacientes con diagnóstico anatomopatológico de cáncer de colon que acudieron a la consulta de oncología en el Instituto de Oncología y Hematología durante el periodo 1993-2001. Los bloques de tejido fueron obtenidos del Instituto de Anatomía Patológica Dr. José Antonio O'Daly-UCV.

Las biopsias incluidas en parafina fueron previamente analizadas histológicamente para establecer la presencia de tejido neoplásico empleando la coloración de hematoxilina eosina.

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes en estudio identificando: nombre, apellido, edad, sexo, número de historia, fecha de diagnóstico, antecedentes familiares, número y fecha de biopsia, tipo y localización de tumor, estadio clínico, tratamiento recibido, resultados de los antígenos CEA CA-19-9.

En este estudio se consideraron los siguientes criterios: **Criterios de inclusión:** 1.-Pacientes con diagnóstico anatomopatológico de cáncer colo-rectal primario. **Criterios de exclusión:** 1.-Pacientes con diagnóstico anatomopatológico de doble cáncer primario. 2.-Pacientes con diagnóstico anatomopatológico de cáncer metastático de colon (útero, estómago, ovario). 3.-Causas de muerte no asociadas al cáncer de colon.

La determinación de CEA y CA-19-9 fue realizada mediante el sistema IMX (Abbott, Diagnostics Division) basado en la técnica de inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA). *Valores de referencia:* CA-19-9: 0-37 pg/mL. CEA: no fumadores: 0-3 ng/mL y fumadores: 0-5 ng/mL.

Determinación de la expresión de Timidilato Sintetasa en adenocarcinoma colónico por Inmunohistoquímica

Muestras histológicas de adenocarcinoma colónico fueron fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina. A estas muestras incluidas en parafina se les realizaron los cortes de 4 micras de espesor usando un microtomo (Reichert-Jung) y colocadas sobre láminas (DAKO, S3003). Las láminas histológicas fueron desparafinadas y rehidratadas en pasos sucesivos de xilol y alcohol, para luego ser equilibradas en un baño de agua desionizada por 5 minutos. Posteriormente, fue recuperado el antígeno colocando las láminas en una jarra de Coplin con buffer citrato 10mM, pH 6 precalentado a 90°C y

colocados en un sistema de vapor (Flavor Scenter Steamer, Black & Decker) durante 30 minutos, luego fueron lavadas con agua de chorro por 3 minutos y pasadas por agua desionizada por 1 minuto.

La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada cubriendo las secciones de tejido con 100pl de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol absoluto durante 15 minutos. Después fueron lavadas con agua de chorro, pasadas por agua deionizada y colocadas en PBS 1X, pH 7.4 por 5 minutos. Para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, los tejidos se incubaron por 20 minutos con 100pl de un agente bloqueante de proteínas (IMMUNON™; 484360).

La expresión de la TS en las muestras de adenocarcinoma colónico fue determinada agregando a las láminas 100pl de antisuero anti-TS (ROCHE, Cat. N° 3186008) e incubadas toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Seguidamente, se realizaron 2 lavados con PBS 1X, pH 7.4 durante 5 minutos. Posteriormente, se cubrieron las láminas con 100pl del anticuerpo secundario (ENVISION, PEROXIDASA, RABBIT. DAKO, K4002) y fueron incubadas por 30 minutos.

Luego de lavar 2 veces con PBS 1X, pH 7.4, durante 5 minutos, la actividad de la peroxidasa se demostró agregando 100pl de 3'-diaminobenzidina (DAKO, K3467) e incubadas 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las láminas fueron lavadas con abundante agua de chorro durante 10 minutos y contrastadas con hematoxilina de Mayer por 1 minuto seguido de lavados con abundante agua de chorro por 5 minutos. Las láminas con las secciones histológicas se pasaron por baños sucesivos de alcohol y xilol.

Antes de la evaluación microscópica se agregó a las láminas el medio de montaje (MAR TEX) y se cubrieron con laminillas cubreobjetos. Se incluyeron en cada corrida inmunohistoquímica controles externos positivos (amígdala palatina) e internos (placas de Peyer). La omisión del anticuerpo primario en un caso de adenocarcinoma de colon y amígdala, fue utilizado como control negativo de la inmunoreacción de TS.

Las láminas fueron examinadas con un microscopio de luz. Se consideró como inmunoreacción positiva para TS solamente la tinción nuclear. En este caso se evaluó la intensidad de la inmunoreacción a TS tanto en células neoplásicas como en células estromales. Se estudiaron campos microscópicos de 40X consecutivos a partir de las zonas de mayor intensidad.

Se utilizaron los siguientes parámetros: Indetectable (0), Leve intensidad (+), Moderada intensidad (++) y Fuerte intensidad (+++).

Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon

Posteriormente, los niveles de intensidad de 0 a 1+, se agruparon y se consideraron de baja intensidad para la TS, mientras que la intensidad de coloración de 2+ a 3+ fue considerada de alta intensidad para la TS.

Análisis estadístico

Se estimó la media y desviación estándar en cada una de las variables cuantitativas evaluadas. A las variables categóricas se les calculó la frecuencia y la moda.

Las variables se codificaron de acuerdo a su escala de medición; así, la edad, la fecha de diagnóstico y los valores CEA y CA-19-9, se tomaron como numéricas, discretas las primeras y continuas las dos últimas respectivamente. Las variables dicotómicas: sexo de paciente, aplicación de radioterapia, consumo de alcohol, uso de tabaco, antecedentes familiares, evolución y expresión de la TS se codificaron como: 0 masculino, negación, fallecido, baja expresión de la TS y 1: femenino, afirmación, con vida, alta expresión de TS.

Una vez codificadas las variables, se evaluó la relación entre la expresión de la TS y cada una de las variables consideradas factores de riesgos (edad, sexo, antecedentes familiares, alcohol y tabaco), verificadas estadísticamente a través de la prueba de probabilidad exacta de Fisher. De igual forma, se evaluó la expresión de la enzima en estudio con los valores observados de los marcadores tumorales CEA y CA-19-9, construyéndose las tablas y usando la prueba de Fisher correspondiente (30).

Se construyeron tablas de vida de acuerdo a lo establecido por la bibliografía (31) y se analizaron de acuerdo a metodologías no paramétricas (32). Para evaluar la asociación entre expresión de la TS y sobrevida, fue usado el Test Log-rank (33).

Se consideró un valor estadísticamente significativo $p=0,05$ y altamente significativo $p=0,01$. Todos los datos fueron procesados usando el programa estadístico SPSS 9.0 para Windows.

Resultados

Se incluyeron 34 pacientes con cáncer colo-rectal primario, de los cuales 20 (58,8%) eran masculinos y 14 (41,2%) eran femeninos. La edad media de los pacientes fue de 52,8 años, en un rango de 25 a 84 años. Todos los pacientes recibieron tratamiento quimioterapéutico basado en 5-FU y LV.

De los 34 pacientes estudiados, 19 (55,9%) negaban consumo de alcohol y el resto 15 (44,1%) lo afirmaban, de igual manera 21 (61,8%) negaban el uso del tabaco y 13 (38,2%) afirmaban haber fumado. Los detalles clínico patológicos de los tumores primarios de los 34 pacientes son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los pacientes según edad, sexo, quimioterapia, diferencia del tumor, clasificación DUKE, clasificación TNM y expresión de la TS.

Parámetro	Nº	%
Nº de pacientes	34	100
Edad (años)		
Media	52,8	.
Rango	25-84	
Sexo		
Hombres	20	58,8
Mujeres	14	41,2
Quimioterapia		
5-FU/LV	34	100
Diferenciación del tumor		
Bien diferenciado	17	50
Moderadamente diferenciado	10	29,4
Poco diferenciado	7	20,6
Clasificación DUKES		
A	1	3
B	13	38,2
C	20	58,8
Clasificación TNM		
I	1	3
II	13	38,2
III	18	52,9
IV	2	5,9
Expresión de TS		
Baja	18	52,9
Alta	16	47,1

5-Fluorouracilo (5-FU), Leucovorina (LV), Timidilato sintetasa (TS).

En relación a la expresión de la TS, 18 pacientes (52,9%) mostraron baja expresión de la TS en sus tumores, mientras que 16 (47,1%) mostraron alta expresión.

Al investigar si existía alguna correlación entre la expresión de la TS y la edad de los pacientes, encontramos que, dividiendo al grupo en 2 categorías, la primera incluyendo a los <50 años y la segunda a los \geq a 50 años, se observó que en los pacientes mayores de 50 años hubo alta expresión de la TS en el 32,4%, mientras que con los pacientes de la primera categoría la expresión alta fue en el 14,6%; esta diferencia



Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon

porcentual no fue estadísticamente significativa ($p=0,406$) (Tabla 2).

Tabla 2. Expresión de la TS de acuerdo a los factores de riesgos.

Factores	n (%)	Expresión de la TS		p
		Baja n (%)	Alta n (%)	
Edad				
<50 años	14 (41,1)	9 (26,5)	5 (14,6)	ns
≥50 años	20 (58,9)	9 (26,5)	11 (32,4)	
Sexo				
Masculino	20 (58,8)	10 (29,4)	10 (29,4)	ns
Femenino	14 (41,2)	8 (23,5)	6 (17,6)	
Antecedentes familiares				
No	25 (73,5)	16 (47,1)	9 (26,5)	ns
Si	9 (26,5)	2 (5,9)	7 (20,6)	
Consumo alcohol				
No	19 (55,9)	10 (29,4)	9 (26,5)	ns
Si	15 (44,1)	8 (23,5)	7 (20,6)	
Consumo tabaco				
No	21 (61,8)	13 (38,2)	8 (23,5)	ns
Si	13 (38,2)	5 (14,7)	8 (23,5)	
CEA				
Normal	18 (58)	13 (41,9)	5 (16,1)	ns
Elevado	13 (42)	5 (16,1)	8 (25,8)	
CA-19-9				
Normal	28 (90)	15 (48,4)	13 (41,9)	ns
Elevado	3 (10)	3 (9,7)	0 (0)	

Timidilato sintetasa (TS), p significativa=0,05, ns: no significativo. Prueba exacta de Fisher.

Cuando se hizo la correlación de la expresión de la TS con el sexo, de los 34 pacientes estudiados, se encontró que de un total de 20 pacientes masculinos que representan el 58,8%, 10 mostraron alta expresión de la TS y el resto baja expresión, en tanto que de los 14 pacientes femeninos (41,2%) del total, 6 mostraron alta expresión de la TS y el resto mostró baja expresión. No se observó diferencia significativa (Tabla 2).

Con respecto a la posible asociación entre la expresión de la TS y los antecedentes familiares de cáncer, se encontró que 25 de los 34 pacientes incluidos en el estudio, es decir, el 73,5% negaron tener familiares que hayan muerto por causa de enfermedades cancerígenas, de los cuales 16 de ellos presentaron baja expresión de la TS en sus tumores y 9 mostraron alta expresión. Los otros 9 pacientes, que representan el 26,5% de los 34 pacientes afirmaron tener familiares con antecedentes de cáncer, 2 de ellos tenían baja expresión de la TS y 7 mostraron alta expresión de la TS. No se observó significancia estadística (Tabla 2).

Cuando se analizó la posible asociación entre la expresión de la TS con el consumo de alcohol y el uso del tabaco, se encontró que no hubo diferencia estadísticamente significativa, como se muestra en la Tabla 2.

Al analizar la relación entre la expresión de la TS con los valores de los marcadores tumorales CEA y CA-19-9, tampoco se observó diferencia estadísticamente significativa (Tabla 2).

En cuanto a la relación entre la expresión de la TS y la evolución de los 34 pacientes analizados, se encontró que de 17 pacientes (50%) que habían fallecido a causa del cáncer de colon, 13 de ellos mostraron alta expresión de TS y 4 pacientes mostraron una baja expresión; de los 17 pacientes restantes, es decir el otro 50% que se conoce que están con vida, 14 mostraron baja expresión de la TS en sus tumores y 3 presentaron alta expresión. Esta observación fue altamente significativa ($p=0,001$) como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia de la expresión de la TS de acuerdo a la evolución clínica.

Evolución clínica	n (%)	Expresión de la TS		P*
		Baja n (%)	Alta n (%)	
Vivos	17 (50)	14 (41,2)	3 (8,8)	p=0,001
Fallecidos	17 (50)	4 (11,8)	13 (38,2)	

p* significativa = 0,05 Prueba exacta de Fisher.
(TS): Timidilato sintetasa

Sobrevida en relación a la expresión de la TS

El periodo de seguimiento para los 34 pacientes analizados en este estudio fue de 10 años. La supervivencia media de toda la población fue de 3,8 años (Intervalo de confianza-IC- del 95%; 2,8 a 4,9 años). En relación a la expresión de la TS, 18 pacientes (52,9%) mostraron una baja expresión de la TS en sus tumores, mientras que 16 (47,1%) tuvieron alta expresión de la TS. La Figura 1 representa la curva de supervivencia en donde se evalúa la asociación entre la expresión de la TS y la probabilidad de supervivencia en los pacientes con cáncer colo-rectal. La curva muestra una supervivencia media de 5 años (IC del 95%; 3,5 a 6,5 años) en el grupo de pacientes que tuvieron en sus tumores baja expresión de la TS y una supervivencia media de 2,5 años (IC del 95%; 1,4 a 3,6 años) en el grupo de pacientes con alta expresión de la TS en sus tumores.

La probabilidad de supervivencia en los pacientes con cáncer colo-rectal que mostraron una baja expresión de la TS en un lapso de 2 años fue de 0,85 comparado con una probabilidad de 0,55 en los pacientes que tuvieron una alta expresión de la TS y de 0,15 para los pacientes con alta expresión de la TS en sus tumores. Se puede observar que la probabilidad de supervivencia

Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon

para los pacientes con cáncer colo-rectal que mostraron una alta expresión de la TS en sus tumores fue significativamente más baja, comparado con la probabilidad de sobrevida en aquellos pacientes con baja expresión de la TS, esta observación fue altamente significativa ($p=0,004$).

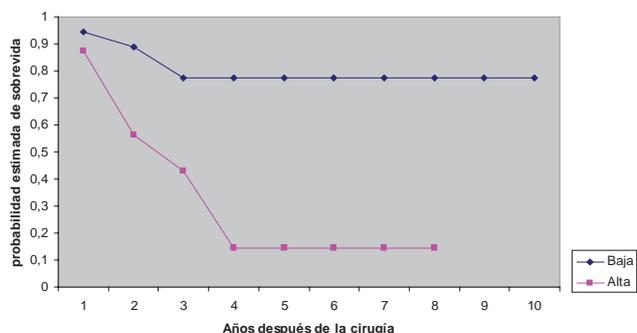


Figura 1. Curva de sobrevida global de acuerdo a la expresión de la TS en pacientes con cáncer de colon. Método Kaplan Meier. Probabilidad de sobrevida baja (—◆—), alta (—□—). $P=0.004$. Prueba de Log rank.

Discusión

La TS juega un papel clave en la síntesis de un precursor de ADN y representa un blanco quimioterapéutico importante para el 5-FU, el agente más efectivo en el tratamiento de cáncer de colon (10).

El sistema de clasificación DUKES, desarrollado casi 60 años atrás, es comúnmente usado para evaluar el pronóstico y en algún grado, determina el tratamiento de pacientes con cáncer colo-rectal (34). Sin embargo, recientes avances en la biología molecular del cáncer sugieren que los cambios moleculares dentro de un tumor primario pueden servir para definir más exactamente el pronóstico en pacientes individuales. Es posible que estos cambios moleculares pudieran servir de guía al tomar decisiones sobre la terapéutica a seguir (6).

Los marcadores tumorales tales como, CEA y CA-19-9, han sido evaluados por su capacidad de predecir el curso clínico de esta enfermedad y continúan utilizándose en la práctica clínica (28).

Cuando se evaluó la asociación de la expresión de la TS con edad, sexo, antecedentes familiares, alcohol, tabaco, CEA y CA-19-9, no se encontró diferencias estadísticamente significativas. Esto coincide con el estudio llevado a cabo por Aschele, Debernardis y col. (21), donde tampoco se encontró diferencias significativas en el nivel de expresión de la TS con respecto a la edad y el sexo. Igualmente Paradiso y col (1), correlacionaron la expresión de la TS con el sexo en pacientes con cáncer colo-rectal, no encontrando diferencias significativas.

En este estudio se logró una buena estandarización de la técnica de inmunohistoquímica para detectar la expresión de la TS en secciones de tejido incluidas en parafina. El antisuero anti-TS proporciona una herramienta estandarizada y confiable para determinar semi-cuantitativa o cualitativamente la expresión de la TS en secciones de tejido incluidas en parafina (23).

La literatura indica la importancia clínica de la expresión de la TS en pacientes con cáncer colo-rectal. Vam Triest y col (35) determinaron que la alta expresión de la TS en pacientes con cáncer colo-rectal fue asociado a una pobre respuesta a la quimioterapia basada en el 5-FU, también los altos niveles de la TS se asociaron con una pobre sobrevida.

En un estudio realizado por Beck y col (36), en el cual midieron la actividad enzimática de la TS en paralelo a la respuesta a Fluorouracilo (FU) en un panel de 19 líneas celulares de tumor humano, encontraron que las líneas celulares más sensibles a FU exhibieron la más baja actividad de la TS y viceversa.

De todos los estudios de la literatura es importante destacar el trabajo llevado a cabo por Salonga y col. (37), el estudio se realizó en muestras tumorales de 33 pacientes con cáncer colo-rectal avanzado que recibían tratamiento quimioterapéutico con infusión de 5-FU de larga duración y en las que se analizó por PCR la expresión de la TS. Lo más interesante de los resultados fue encontrar que los pacientes que tenían niveles bajos de la TS presentaban un 100% de respuesta, mientras que la respuesta fue del 0% cuando los niveles de expresión eran elevados. Aun de mayor importancia fue encontrar que la expresión de la TS se correlacionó directamente con la sobrevida de los pacientes. Ohrling y col, en un estudio que involucró a 348 pacientes con cáncer de colon, encontraron que una baja expresión de TS en los nódulos linfoides metastáticos se correlacionó con una mejor respuesta clínica (38). Formentini y col, señalan que pacientes con enfermedad metastásica que expresan altos niveles de TS tendrán una menor probabilidad de responder al tratamiento basado en fluoropyrimidina y tienen poca tasa de sobrevivencia (39). Pacientes con altos niveles de TS, quienes han tenido una reablación quirúrgica completa del tumor primario, tienen un pobre pronóstico comparados con aquellos con tumor y con baja expresión de TS (39). En contraste con la enfermedad avanzada y la cirugía completa, pacientes con altos niveles de TS parecen beneficiarse, especialmente, de quimioterapia basada en fluoropyrimidina después de la resección completa del tumor primario, mientras que pacientes con bajos niveles de TS no (39,40).

En el estudio realizado por Yoshinori y col. (8), se determinó la expresión de la TS en 50 muestras de cáncer colon rectal incluidas en parafina a través de la técnica de PCR. Se encontró que la sobrevida media para los 50 pacientes analizados en este estudio fue de 8,4 meses (IC del 95%; 6,4 a 12,3 meses).

Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon

Los pacientes que tuvieron alta expresión de la TS mostraron una sobrevida media de 1,5 meses, comparado con una sobrevida media de 10,2 meses para el grupo de pacientes con baja expresión de la TS en sus tumores. Cuando analizaron la asociación entre la expresión de la TS y sobrevida encontraron que la probabilidad de sobrevida en los pacientes con baja expresión de la TS fue de 0,77 en un periodo de 6 meses, y la probabilidad de sobrevida para los pacientes con alta expresión de la TS fue de 0,00. Los autores de este estudio concluyeron que la sobrevida en los pacientes con baja expresión de la TS fue significativamente mejor, comparados con los pacientes que mostraron alta expresión de la TS.

Estos hallazgos concuerdan con los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, donde la sobrevida media para los 34 pacientes analizados en este estudio fue de 3,8 años (IC del 95%; 2,8 a 4,9 años). Los pacientes que tuvieron una baja expresión de la TS en sus tumores mostraron una sobrevida media de 5 años (IC del 95%; 3,5 a 6,5 años), la cual fue significativamente mayor comparado con el grupo de pacientes con una alta expresión de la TS quienes mostraron una sobrevida media de 2,5 años (IC del 95% 1,4 a 3,6 años). Cuando evaluamos la probabilidad de sobrevida con respecto a la expresión de la TS, encontramos resultados similares con respecto al trabajo anterior, donde se confirmó que el nivel de expresión de la enzima se correlacionó con la evolución y sobrevida en los pacientes con cáncer colo-rectal.

La probabilidad de sobrevida en los pacientes con baja expresión de la TS en un periodo de 2 y 5 años fue de 0,85 y 0,75 respectivamente, y la probabilidad de sobrevida en el grupo de pacientes con alta expresión de la TS fue de 0,55 y 0,15 respectivamente. Una de las diferencias importantes de nuestro estudio con respecto al trabajo de Yoshinori y col (8) fue que en este último la determinación de la expresión de la TS la hicieron empleando la técnica de la PCR. En nuestro trabajo se utilizó la técnica de la inmunohistoquímica. El presente estudio confirma la importancia que tiene la determinación de la TS en pacientes con cáncer colon rectal, donde el nivel de expresión de la enzima se correlaciona con la evolución y la sobrevida en dichos pacientes.

Sin embargo, la razón de que la asociación de los niveles de la TS predice la respuesta clínica de un paciente no esta totalmente claro. Esta asociación de la expresión de la TS con sobrevida, pudiera reflejar que los pacientes que tuvieron peor evolución clínica no respondieron a la quimioterapia basada en el 5-FU. Por otro lado, la relevancia biológica de la TS se relaciona no solo a la importancia de esta enzima asociada a división y proliferación celular (28) sino que posiblemente la asociación de la expresión de la TS con sobrevida puede ser un reflejo de proliferación de células tumorales.

En este estudio el beneficio de la quimioterapia basado en 5-FU en los pacientes con baja expresión de la TS en sus tumores, se reflejó en la curva de sobrevida, lo que pudiera ser un indicador de la respuesta a la quimioterapia con el 5-FU en pacientes con cáncer colon rectal.

Recientemente el trabajo de Gonsens y col. (23) comparan la inmunohistoquímica con la genotipificación del gen de la TS, demostrando que los análisis basados en el ADN son más predictivos que la inmunohistoquímica para la determinar la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer de colon tratados con 5-FU.

Esto demuestra que es importante desarrollar estudios basados en genotipificación para ver su valor predictivo, sin embargo la inmunohistoquímica sigue siendo una herramienta importante para determinar la expresión de TS.

Conclusiones

1. El presente constituye el primer trabajo de investigación en Venezuela que estandariza la determinación de la TS en pacientes con cáncer colo-rectal.
2. La determinación de la TS en nuestro estudio no tuvo correlación significativa con los siguientes factores: edad, sexo, antecedentes familiares, consumo de alcohol, uso de tabaco; tampoco se encontró correlación con los valores de los marcadores tumorales CEA y CA-19-9.
3. En el presente estudio la expresión de la TS tuvo una correlación significativa con la evolución, la sobrevida media y la probabilidad de sobrevida en pacientes con cáncer colo-rectal. La baja expresión de la TS significó una evolución más favorable y una mayor probabilidad de sobrevida; lo inverso ocurrió en aquellos pacientes que reflejaron altos niveles de expresión de la enzima en este estudio.
4. Como ya ha sido reportado previamente en la literatura médica internacional, nuestro estudio confirma la importancia de la determinación de la expresión de TS como un marcador pronóstico de sobrevida y de respuesta quimioterapéutica basada en el 5-FU en pacientes con cáncer colon rectal.

Recomendaciones

1. Consideramos conveniente evaluar en un estudio prospectivo, con un número mayor de pacientes, la expresión de la TS en pacientes con cáncer colo-rectal, con el objetivo de confirmar su importancia como marcador pronóstico de evolución y sobrevida en pacientes con esta enfermedad (Marcador Pronóstico).
2. Así mismo, es necesario confirmar prospectivamente la importancia de la TS como predictor de la respuesta a la quimioterapia basada en el 5-FU (Marcador Predictivo) y/

Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon

o como indicador de resistencia adquirida durante dicho tratamiento.

3. La confirmación de lo anterior, permitirá recomendar la inclusión de la determinación de la TS, conjuntamente con otros marcadores, en la evolución clínica rutinaria y en la toma de decisiones terapéuticas de los pacientes con cáncer colo-rectal.
4. Se recomienda evaluar los métodos de genotipificación de la TS en estudios prospectivos.

Referencias

1. Paradiso A, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallejo C, Lacava J et al. Thymidylate Synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colonrectal cancer patients. *Br J Cancer* 2000; 82(3):560-567.
2. Van Triest B, Loftus B, Pinedo H, Backus H, Schoenmakers P, Telleman F et al. Thymidylate Synthase expression in patients with colonrectal carcinoma using a polyclonal Thymidylate Synthase antibody in comparison to the TS 106 monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 2000; 48(6):755-760.
3. Gorlick R, Metzger R, Danenberg K, Salonga D, Miles J, Longo G et al. Higher levels of Thymidylate Synthase gene expression are observed in pulmonary as compared with hepatic metastases of colonrectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1998; 16(4):1465-1469.
4. MSDS. Registro Central de Cáncer. Venezuela 2007.
5. Midis GP, Feig BW. Cáncer de colon, recto y ano. En Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM, editores. MD. Anderson Oncología. 2nd ed. Houston, Texas; 2000.p.178-222.
6. Lenz HJ, Danenberg K, Leichman C, Florentine B, Johnston P, Groshen S et al. P53 and Thymidylate Synthase expression in untreated stage II colon cancer: associations with recurrence, survival, and site. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1227-34.
7. Peter G, Van der Wilt C, Van Groeningen C, Smit K, Meijer S, Pinedo H. Thymidylate Synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. *J Clin Oncol* 1994; 12(10): 2035-42.
8. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg PV et al. ERCC1 and Thymidylate Synthase mRNA levels predict survival for colonrectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19(23):4298-4304.
9. MacLeod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colonrectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(2):191-203.
10. Hardy L, Finer-Moore J, Montfort W, Jones M, Santi D, Stroud R. Atomic structure of Thymidylate Synthase: target for rational drug design. *Science* 1987; 235:448-55.
11. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S et al. Quantisation of intratumoral Thymidylate Synthase expression predicts for disseminated colonrectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997; 15(10):3223-29.
12. Haqqani A, Cowling R, Maroun J, Birnboim H. Characterization of a polyclonal antibody to human Thymidylate Synthase suitable for the study of colonrectal cancer specimens. *J Histochem Cytochem* 1999; 47(12):1563-73.
13. Dotor E, Cuatrecasas M, Martínez-Iniesta M, Navarro M, Vilarde F, Guinó E et al. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colonrectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24:1603-11.
14. Ciaparrone M, Quirini M, Schinzari G, Zannoni G, Corsi DC, Vecchio FM et al. Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colonrectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Oncology* 2006; 70:366-77.
15. Edler D, Blomgren H, Allegra C, Jhonston P, Lagersted U, Magnusson I et al. Immunohistochemical determination of Thymidylate Synthase in colonrectal cancer-methodological studies. *Eur J Cancer* 1997; 33(13):2278-81.
16. Ladner R, Lynch F, Groshen S, Xiong Y, Sherrod A, Caradonna S et al. dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colonrectal cancer. *Cancer Res* 2000; 60:3493-3503.
17. Mizutani Y, Wada H, Ogawa O, Yoshida O, Fukushima M, Nonomura N et al. Prognostic significance of Thymidylate Synthase activity in bladder carcinoma. *Cancer* 2001; 92(3):510-518.
18. Kornmann M, Link K, Lenz HJ, Pillasch J, Metzger R, Butzer U et al. Thymidylate Synthase is a predictor response and resistance in hepatic artery infusion chemotherapy. *Cancer Lett* 1997; 118:29-35.
19. Johnston P, Drake J, Trepel J, Allegra C. Immunological quantisation of Thymidylate Synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 1992; 52:4306-12.
20. Davies M, Johnston P, Kaur S, Mersh T. Colonrectal liver metastasis Thymidylate Synthase staining correlates with response to hepatic arterial floxuridine. *Clin Cancer Res* 1999; 5:325-28.
21. Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunessi G, Baldo Ch et al. Immunohistochemical quantisation of Thymidylate Synthase expression in colonrectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 17(6): 1760-70.
22. Leichman L, Lenz HJ, Leichman CG, Groshen S, Danenberg K, Baranda J et al. Quantisation of intratumoral Thymidylate Synthase expression predicts for resistance to protracted infusion of 5-fluorouracil and weekly leucovorin in disseminated colonrectal cancers: preliminary report from an ongoing trial. *Eur J Cancer* 1995; 31A (7/8):1306-10.
23. Gosens MJ, Moerland E, Lemmons VP, Rutten HT, Tan-Go I, van den Brule AJ. Thymidylate synthase genotyping is more predictive for therapy response than immunohistochemistry in patients with colon cancer. *Int J Cancer* 2008 (Epub ahead of print)
24. Horikoshi T, Danenberg K, Stadlbauer T, Volkenant M, Shea L, Aigner K et al. Quantisation of Thymidylate Synthase, Dihydrofolate Reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumours using the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992; 52:108-116.
25. Findlay MPN, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aherne GW. Lack of correlation between Thymidylate



Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon

- Synthase levels in primary colonrectal tumours and subsequent response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1997; 75(6):903-09.
26. Behan K, Johnston P, Allegra C. Epitope mapping of a series of human Thymidylate Synthase monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1998; 58:2606-11.
 27. Johnston P, Liang Ch, Henry S, Chabner B, Allegra C. Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human Thymidylate Synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res* 1991; 51: 6668-76.
 28. Johnston P, Fisher E, Rockette H, Fisher B, Wolmark N, Drake J et al. The role of Thymidylate Synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12(12):2640-47.
 29. Johnston P, Lenz H, Leichman C, Danenberg K, Allegra C, Danenberg P et al. Thymidylate Synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colonrectal and gastric tumours. *Cancer Res* 1995; 55:1407-12.
 30. Visuata VB. Análisis estadístico con SSPS para Windows; estadística multivariante. Mc Graw Hill Ed. Madrid, España 1997.p.304.
 31. Cutler SJ, Ederer F. Maximum utilization of the life-table method in analyzing survival. *J Chronic Dis* 1958; 8:699-712.
 32. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Assoc* 1958; 53:457-470.
 33. Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *J R Stat Soc A* 1972; 135:185-206.
 34. Fisher E, Sass R, Palenkar A, Fisher B, Wolmark N et al. Dukes' Classification Revisited. *Cancer* 1989; 64:2354-2360.
 35. Van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers J, Van Diest P, Shoenmakers P, Voorn D et al. Prognostic role of Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase-platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colonrectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1063-1072.
 36. Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischer JL, Formento P, Renee N et al. A role for Dihydropyrimidine Dehydrogenase and Thymidylate Synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 1994; 30A (10):1517-1522.
 37. Salonga D, Danenberg K, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-wei D et al. Colonrectal tumours responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase, and Thymidine Phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1322-1327.
 38. Ohrling K, Edler D, Hallström M, Ragnhammar P, Blomgren H. Detection of thymidylate synthase expression in lymph node metastases of colonrectal cancer can improve the prognostic information. *J Clin Oncol* 2005; 23:5452-4.
 39. Formentini A, Henne-Bruns D, Kornmann M. Thymidylate synthase expression and prognosis of patients with gastrointestinal cancers receiving adjuvant chemotherapy: a review. *Langenbecks Arch Surg.* 2004; 389:405-13.
 40. Edler D, Glimelius B, Hallström M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I et al. Thymidylate synthase expression in colonrectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002; 20:1721-8.

Fisiopatología de la enfermedad arterio coronaria. Marcadores cardíacos para infarto agudo del miocardio

González Julio Cesar ¹, Figueira Leticia ² y Acosta María Eugenia ²

RESUMEN

La inflamación tiene un papel establecido, tanto en la iniciación como en la progresión del proceso aterosclerótico y el síndrome coronario agudo. Factores de transcripción nuclear, macrófagos y linfocitos participan y modulan los mecanismos inflamatorios asociados con la rotura o la erosión de la placa, que culmina en muchos casos con el síndrome coronario agudo. Estas biomoléculas constituyen objetivos de medición para tratar de identificar y monitorizar el infarto agudo al miocardio. La lista de biomarcadores estudiados en la enfermedad cardiovascular se ha expandido rápidamente en los últimos tiempos. El presente artículo consiste en una revisión de los biomarcadores de lesión miocárdica frecuentemente utilizados, así como su poder predictor de enfermedad coronaria.

Palabras clave: Infarto agudo al miocardio, aterosclerosis, biomarcadores de síndrome agudo coronario.

Phisiopathology of coronary diseases. Biomarkers acute miocardic infart

SUMMARY

It's well-known that inflammation plays a role in atherogenesis, atherosclerotic plaque progression, and acute coronary syndrome. Nuclear transcription Factors, macrophages and lymphocyte, participate and modulate the inflammatory mechanisms associate with the breakage or the erosion of the plate, that culminates in many causes with the acute coronary syndrome. These biomolecules constitute measurement objectives to try, identify and to monitorear the acute infarct to the myocardium. The list of biomarkers studied in the cardiovascular disease has expanded quickly lately. The present article consists in a review of the biomarkers of myocardic leasures frequently used as a power predictor for coronary disease.

Key word: Biomarkers of acute coronary syndrome, atherosclerosis, miocardic infarct acute.

-
1. Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.
 2. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

La enfermedad arterio coronaria (EAC) comienza con aterosclerosis, disminución de la luz arterial por la placa ateromatosa; estas placas son inicialmente pequeñas y estables y no producen ningún síntoma clínico. A medida que la EAC progresa la placa aumenta de grosor y disminuye el flujo sanguíneo coronario. Los individuos con *angina pectoris estable* tienen dolor del tórax después de un esfuerzo, lo cual es un signo que indica que el flujo sanguíneo del corazón es insuficiente para mantener el aumento de la demanda de oxígeno necesario durante el ejercicio. En algunos pacientes la placa ateromatosa se vuelve inestable y vulnerable a una ruptura debido a la normal tensión que se produce por los movimientos del corazón. Cuando se rompe la placa, el contenido se expone a la circulación causando una agregación de las plaquetas y la formación del trombo. En aquellos pacientes donde el trombo no ocluye completamente la luz también produce dolor torácico e isquemia al reposo, estos pacientes son diagnosticados con *angina pectoris inestable*. Cuando el trombo ocluye completamente alguna arteria coronaria se produce el infarto agudo al miocardio (IAM), el cual parte del tejido miocárdico se necrosa y puede ser remplazado por tejido cicatrizante (1).

Se producen una serie de cambios bioquímicos como resultados de falta de entrega de oxígeno al miocardio y la incapacidad de excretar los metabolitos. Los eventos son influenciados por la severidad de la isquemia, sexo y edad. En los primeros segundos la falta de oxígeno agota rápidamente los depósitos de energía, algunos procesos no esenciales consumen energía y obligan a la célula a usar medios alternativos para la producción de energía (metabolismo anaeróbico, glicogenólisis, gluconeogénesis). Cortocircuitos de bombas iónicas consumen ATP, permitiendo la salida de electrolitos intracelulares especialmente K^+ . En los primeros minutos, la disminución o la falta de flujo sanguíneo conduce a una deficiente depuración de metabolitos (lactato, adenosina, fosfato, H^+) producidos en la función celular normal. Todos estos cambios pueden ser reversible, sin embargo si la oclusión persiste durante 30 a 60 minutos se producen daños irreversibles como muerte celular, caracterizado por liberación de macromoléculas (enzimas y proteínas) (2).

Factores de riesgos

Están constituidos por cualquier hábito o característica biológica que sirva para predecir la probabilidad de un individuo de desarrollar una enfermedad cardiovascular.

La existencia de un factor de riesgo (FR) no implica obligatoriamente una relación causa-efecto con la enfermedad. El conocimiento y detección de los factores de riesgo desempeña un importante papel para la valoración del riesgo

cardiovascular, variable clave para las estrategias de intervención sobre dichas enfermedades. La presencia de varios FR en un mismo individuo multiplica su riesgo de forma importante. Si bien todos los FR favorecen el desarrollo de la EAC en los diferentes lechos vasculares, el poder predictivo de los FR es diferente para los distintos territorios. Así, el colesterol tiene mayor poder predictivo para el territorio coronario.

Tabla 1. Factores de riesgo para IAM.

- EDAD
- TABACO
- DIABETES
- HISTORIA FAMILIAR
- HIPERTENSIÓN > 140/90 mm/Hg
- DISLIPIDEMIAS (Colesterol >200 mg/dL; LDL-colesterol >100 mg/dL; HDL-colesterol <40 mg/dL.
- DIAGNÓSTICO PREVIO DE ATROSCLEROSIS.
- PREVIO INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO

Diagnóstico de IAM

En 1974, la definición de infarto del miocardio dictada por la Organización Mundial de la Salud se sustentó sobre un tripode: la confirmación clínica de un dolor de rasgos anginosos, la demostración de nuevas ondas Q en el trazado electrocardiográfico, y una elevación significativa de ciertas enzimas solubles en el plasma del miocardio (3). Cualquier combinación entre dos de ellas significó, desde entonces, infarto del miocardio. En el año 2000, la definición de infarto del miocardio fue reevaluada, y una comisión integrada por representantes de las sociedades científicas más prominentes del hemisferio norte generó un documento que sustentó sobre una única variable diagnóstica, y eventualmente en adición a la anterior, sentencia: cualquier determinación química preferiblemente Troponina (Tnc), capaz de probar la destrucción de un gramo de tejido miocárdico significa infarto (4).

Recientemente en 2007 fue publicada, a través de los órganos de difusión de la Sociedad Europea de Cardiología y de la Asociación Estadounidense del Corazón, una definición de Infarto al miocardio. Clasifican al infarto en varios tipos: Tipo 1 es el llamado Espontáneo, relacionado a isquemia, debido a un evento coronario primario como erosión de placa y/o rotura, fisura o disección de ésta. En este caso en particular se usa la definición siguiente: Detección de incremento y/o caída de biomarcadores (preferentemente Tnc) con por lo menos un valor por encima del límite superior normal junto con evidencia de isquemia miocárdica, demostrada por lo menos con uno de los siguientes: Síntomas de isquemia. Cambios en el Electro Cardiograma (ECG) indicativos de nueva isquemia (nuevos cambios en la curva ST-T) (5).

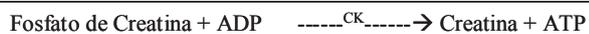
Fisiopatología de la enfermedad arterio coronaria. Marcadores cardíacos para infarto agudo del miocardio

Desarrollo de nuevas ondas Q patológicas en el ECG. Evidencia de nueva pérdida de miocardio viable en estudio de imágenes o nueva anomalía de motilidad regional. Si por alguna razón los biomarcadores no se midieron o se normalizaron, la demostración de nueva pérdida de miocardio (mediante estudios de imágenes: Ecocardiografía o Radioisótopos) en ausencia de causas no isquémicas cumple el criterio para definir Infarto de Miocardio. Sin embargo, si los biomarcadores se midieron y fueron normales, ninguna técnica de imágenes es válida. Tipo 2: Secundario a isquemia, debido a un incremento en la demanda o disminución en el aporte de oxígeno. La elevación de biomarcadores refleja necrosis miocárdica, pero no indican su mecanismo. Así, con un par de resultados elevados de un biomarcador sólo podremos afirmar que hubo necrosis miocárdica, pero no si fue por trombosis coronaria; para esto se necesita la evidencia de isquemia. Tipo 3: Muerte cardíaca inesperada, incluyendo al paro cardíaco, frecuentemente precedida de síntomas sugestivos de isquemia miocárdica y acompañada presumiblemente de nueva elevación del segmento ST o evidencia de trombo en una coronaria durante una coronariografía y/o en la autopsia. Tipo 4a: Infarto de miocardio asociado a intervención. Tipo 4b: Infarto de miocardio asociado a trombosis de stent, documentada por coronariografía y/o autopsia. Tipo 5: Infarto de miocardio asociado a cirugía coronaria. El incremento de Tnc sobre un valor normal basal, se le denomina necrosis miocárdica, pero no infarto peri-procedimiento. Para este diagnóstico necesitamos un incremento de 5 veces el valor límite superior más nuevas ondas Q patológicas o coronariografía que documente una oclusión de una coronaria nativa o de un puente, o estudio de imágenes que demuestre una nueva pérdida de tejido viable (5).

Marcadores de infarto agudo del miocardio

Creatina kinasa

La Creatina Kinasa (CK) se encuentra principalmente en células del cerebro, músculo esquelético y miocárdico, tiene un peso molecular (Pm) de 82 Kd y cataliza la conversión de fosfato de creatina a creatina y ATP:



En la mitocondria, la CK cataliza la reacción inversa para formar fosfato de creatina y ADP, en el citoplasma la CK está asociada al sistema de transporte y a la contractilidad en el músculo para producir ATP. La CK total está elevada en el infarto del miocardio, y otras formas de daño cardíaco (trauma del corazón, miocarditis, cirugía cardíaca), además se puede encontrar valores elevados en patología del músculo esquelético como miopatías inflamatorias y degenerativas (distrofia muscular, rabdomiólisis, polimiositis) condiciones

raras del metabolismo (hipotiroidismo, hipertermia maligna, hipertermia prolongada) (6).

La CK citoplasmática está constituida por 2 subunidades, M y B la combinación de estas subunidades producirá 3 diferentes isoenzimas de CK; MM, MB, BB. La isoenzima MM es la principal CK encontrada en el músculo esquelético y miocardio. La isoenzima MB se encuentra en el miocardio (15%-30%) y en el músculo esquelético en muy pequeñas concentraciones (1%-2%). La CK-BB se encuentra en el cerebro y sistema gastrointestinal.

Aunque la determinación de CK total no es específica para IAM, la CK total y en particular su isoenzima CK-MB tiene gran importancia en el diagnóstico del infarto al miocardio, sin embargo se han encontrado los mismos resultados en pacientes con angina inestable e IAM (7,8).

A habido problemas en la interpretación de la CK-MB, debido a la presencia de falsos positivos y negativos. Aunque la enzima CK-MB es específica para el músculo cardíaco se ha encontrado valores elevados en sujetos con miopatías crónicas, debido a la regeneración constante del músculo esquelético, igualmente se encuentran valores bajos en sujetos aparentemente sanos.

La vida media de la CK-MB en la circulación es relativamente corta, aproximadamente 12 horas; por lo tanto las muestras recogidas fuera de este lapso de tiempo tendrán valores bajos de CK-MB, así como también la relación CK-MB/CK Total.

Aunque algunos investigadores argumentan que no debe utilizarse la CK-MB como prueba diagnóstica del infarto del miocardio, la CK-MB es muy útil en reinfartos, donde su vida media corta es más apropiada que la vida media más larga de las Tnc.

Tnc I y T cardíacas

Las Tnc se encuentran en la actina, y forma parte del aparato contráctil del músculo cardíaco. Está constituida por subunidades: C (18 Kd), I (24 Kd) y T (37 Kd). Una pequeña fracción de la Tnc se encuentra disuelta en el citosol en forma libre estimada aproximadamente en el 6% para TncT, y 2% para Tnc I. Después de la necrosis del miocardio hay una liberación inicial de Tnc del pool citosólico seguido por un prolongado aumento debido a la degradación de las miofibrillas musculares cardíacas. La forma predominante de la Tnc cardíaca son los complejos TIC e IC y la Tnc libre T (9).

Tienen la ventaja a diferencia de la CK-MB que puede permanecer por más tiempo en la circulación después de un infarto al miocardio, debido a que la Tnc puede liberarse lentamente a la circulación.



Las Tnc son estructuralmente proteínas únicas, que solamente se encuentran en el tejido cardíaco, lo que permite producir métodos de inmunoensayos que reconocen solo estas formas (10). Hasta ahora, no hay evidencia que demuestre que las Tnc puedan ser sintetizadas por otros tejidos.

De los tres tipos de Tnc, se han utilizado dos Tnc I y la Tnc T en inmunoensayos, y al parecer ofrecen la misma información clínica. La Tnc T no se mide, ya que tiene la misma secuencia que la Tnc C del músculo liso. La alta especificidad de los métodos de inmunoensayos de la Tnc, permite el uso de concentraciones bajas de corte (cerca a cero) para la detección de mínimos daños miocárdicos (11), a diferencia de la CK-MB, la cual es liberada del recambio normal del músculo esquelético produciendo una significativa concentración de línea de base, o rango que existe normalmente en individuos sanos; por lo tanto, se necesita un alto valor de corte para minimizar los resultados falsos positivos.

En relación a su cinética en el IAM, Tnc aumenta a partir de las 4 horas de iniciado la lesión y persisten elevadas, la Tnc I de 7 a 10 días y la Tnc T por 10 a 14 días.

La presencia de Tnc en altas concentraciones en la circulación, indican daño cardíaco tales como: daño isquémico, sepsis y trauma (12). Aunque tales elevaciones están relacionadas a la severidad de la enfermedad y están asociadas a la mayor morbilidad y mortalidad, no proveen una útil información acerca de la probabilidad de sufrir una futura enfermedad isquémica (13). Sin embargo, cuando una isquemia arterio coronaria está asociada incluso a bajos niveles de Tnc, predicen un resultado adverso (14).

La Tnc I está propensa a ser modificada en la circulación (oxidada y fosforilada) o formar complejos. Esto puede tener relevancia clínica, ya que los diferentes anticuerpos usados por las marcas comerciales pueden reconocer estas diferentes formas moleculares en diversos grados. Otro problema importante en el análisis de Tnc I, es que los diferentes métodos utilizados son calibrados con distintos patrones; por lo que la misma muestra sanguínea puede arrojar resultados diferentes con diferentes inmunoensayos. Actualmente se acepta que la presencia de algún nivel detectado por cualquier inmunoensayo validado en pacientes con isquemia arterio coronaria, indica un mal pronóstico, por lo tanto la concentración absoluta no es tan importante (15).

Mioglobina (MIO)

La MIO es una proteína de 17 Kd, unidora de oxígeno similar a la hemoglobina, se encuentra en las células del músculo esquelético y cardíaco. La MIO es liberada en la circulación después de una lesión muscular. El aumento de los niveles de MIO en suero se produce alrededor de las 2 a 6 horas después

del daño muscular y alcanza la máxima elevación después de un IAM aproximadamente entre 6 a 12 horas. La elevación de la MIO es breve, en el 50 % de los pacientes que han sufrido un IAM el nivel de MIO en suero regresa a su rango normal (31-80 ng/mL) en 12 a 18 horas, y la MIO en orina puede detectarse de 3 a 7 días después del daño muscular. La temprana elevación en el suero de la MIO se debe a su pequeño tamaño, lo cual le permite translocarse rápidamente a la circulación sin pasar por los vasos linfáticos, a diferencia de la CK-MB la cual es translocada a la circulación pasando obligatoriamente a través del sistema linfático debido a su mayor tamaño. La MIO es eliminada rápidamente de la circulación sanguínea, por vía renal. La Mioglobinuria puede aparecer dentro de 3 horas después de IAM y está presente en la orina por más de 72 horas (16).

La MIO es una prueba muy sensible pero poco específica como marcador de la lesión del músculo cardíaco. En caso de que la MIO se utilice como marcador único se deben obtener 2 muestras de sangre, con una separación de 2 horas, para lograr una buena sensibilidad, especificidad y un valor predictivo adecuado (17).

Otros marcadores de IAM

Anhidrasa carbónica III (AC III)

La AC III es una proteína citoplasmática de 28 Kd presente en el músculo esquelético, pero no en el músculo cardíaco, de manera que puede ser utilizado como un marcador cardíaco negativo. Es liberada después de que el músculo sufra una injuria, y va estrechamente unida a la liberación de la MIO. La razón MIO/ACIII se mantiene en valores estables en sujetos sanos y en daño muscular esquelético, y se encuentra valores elevados en IAM (18,19).

Albúmina modificada de isquemia (AMI)

La AMI es una forma variante de albúmina, cuyo extremo N-terminal tiene afinidad por iones metálicos. Se ha propuesto que se origina de las interacciones de la albúmina con radicales libres en los tejidos donde se produce isquemia. La ventaja teórica de esta prueba es que permite detectar isquemia antes de que se produzca daño irreversible de la célula. El cambio en la albúmina parece producirse dentro de los primeros minutos de la isquemia y hasta las 6 horas. La prueba es claramente no específica para isquemia cardíaca, pero tiene una sensibilidad clínica del 80 al 90 % para el IAM, y tiene mayor sensibilidad que la de un electrocardiograma (20,21).

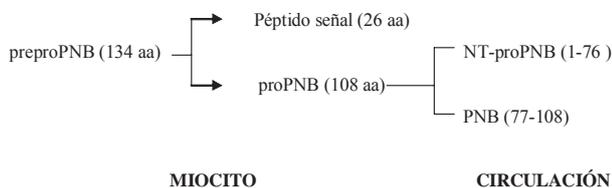
Péptido natriurético tipo B. NT-propéptido natriurético tipo B

El Péptido Natriurético tipo B (PNB) es un hormona peptídica de 32 aminoácidos, producida por los ventrículos del corazón en respuesta al estiramiento miocárdico, sobrecarga de

Fisiopatología de la enfermedad arterio coronaria. Marcadores cardíacos para infarto agudo del miocardio

volumen e incremento en la presión de llenado ventricular. El PNB contrarresta el efecto del eje renina-angiotensina-aldosterona, al producir vasodilatación, excreción de sodio y agua, y una reducción en la presión sanguínea. Al producirse una sobre estimulación cardíaca, los mocitos pueden sobre regular a nivel genómico para producir preproPNB, el cual es entonces convertido a proPNB antes de ser liberado en la circulación en concentraciones equimolares como PNB y NT-proPNB, un metabolito biológicamente inactivo (22). El PNB es rápidamente hidrolizado por una endopeptidasa, el cual tiene una vida de aproximadamente 20 minutos. El NT proPNB tiene una vida media de aproximadamente 90 minutos.

Esquema de la liberación del PNB y NT-proPNB



Estos péptidos también son antimitóticos y pueden modular la hipertrofia cardíaca (23).

La concentración plasmática del PNB también se eleva en presencia de disfunción ventricular izquierda, con el aumento de la insuficiencia cardíaca.

Asimismo, el PNB se eleva en otros estados fisiopatológicos tales como hipertensión, hipertrofia cardíaca, hipertensión pulmonar y enfermedad renal. Un estudio sistemático ha mostrado que el PNB es un fuerte indicador pronóstico de riesgo relativo de muerte o eventos cardiovasculares para individuos sintomáticos y pacientes con insuficiencia cardíaca en todos los estados de la enfermedad (24).

En síntesis, los PNB en los Síndromes Coronarios Agudos podrían ser:

Predictores dinámicos de la evolución, de la extensión y complejidad de la enfermedad coronaria, independientemente de la Fracción de Eyección del Ventriculo Izquierdo. Asimismo, son predictores de mortalidad e infarto, especialmente si hay niveles bajos a intermedios de Tnc. Y también son predictores de revascularización exitosa, relacionados con una estrategia de tratamiento invasiva o no invasiva. Por otra parte, son marcadores de isquemia, en Síndromes Coronarios Agudos sin elevación de la onda ST (25-28).

En sujetos sanos, la concentración del PNB y el NT-pro PNB

están influenciado por la edad, género, índice de masa corporal y función renal; así se encuentran valores mayores en mujeres, con más edad, que tienen menor IMC y los que tienen mal funcionamiento del riñón (29), también se han encontrado niveles ligeramente incrementados en corredores de maratón (30). Los valores de corte para PNB son aproximadamente de 50 pg/mL y para NT-pro PNB 250 pg/mL (31).

Proteína c reactiva

La Proteína C Reactiva (PCR) es una Beta globulina de fase aguda, con un Pm de 118 Kd. Es sintetizada en el hígado en respuesta a citoquinas durante una inflamación, y normalmente sólo se detectan trazas en circulación. Es una proteína no glicosilada de simetría cíclica. Estable durante 20 años en el suero refrigerado a -70°C . Cuando se produce algún daño al tejido, hay un aumento detectable a las 6-8 horas, y se produce un pico en 48 horas y comienza un descenso a partir de las 48 horas.

Niveles elevados de PCR en suero o plasma los encontramos como respuesta no específica a infecciones bacterianas e inflamaciones no infecciosas. Recientemente evidencias epidemiológicas han mostrado que la PCR (PCR-as Alta Sensibilidad) en ausencia de enfermedades inflamatorias puede predecir un futuro evento miocárdico o cerebrovascular (32-34). La Asociación Americana de Cardiología (AHA) recomienda la siguiente interpretación: $< 1,0$ mg/L riesgo bajo; 1,1 a 3,0 mg/L riesgo moderado; 3,1 a 10,0 mg/L riesgo alto (35).

El valor de PCR-as parece relacionar la actividad en la placa aterosclerótica. Entre los elementos celulares de la placa aterosclerótica, están las células infamatorias que al producir Interleuquina 6, causa secreción de PCR en la circulación.

Sin embargo, hay ciertos problemas al emplear los niveles de PCR para predecir futuros eventos cardiovasculares, uno de ellos es biológico, y tiene que ver con la alta variabilidad biológica de la PCR; incluso infecciones subclínicas moderadas pueden causar aumento significativo en concentraciones de PCR; por esto al evaluar alguna ECV por PCR no debe haber existido alguna enfermedad infecciosas en las últimas 2 semanas previas. Diversos estudios han investigado la variabilidad de la concentración de PCR en individuos sanos durante meses, encontrando valores promedios con una desviación de un 30% a un 63% (36); lo que podría indicar que no basta con una sola medición para llegar a un diagnóstico y a una posible terapia; es por ello que se ha propuesto medir la PCR en dos oportunidades, con un intervalo de por lo menos una semana para tener un diagnóstico más acertado (37).

El otro problema es de tipo analítico, ya que no todos los métodos producen resultados idénticos, y pocos laboratorios de

Referencia tienen los recursos para determinar sus propios valores de referencias.

Proteínas de unión de ácidos grasos cardíacos (PUAGC)

Las PUAGC son proteínas citosólicas de bajo Pm que están comprendidas entre 14 a 15 Kd, cuyo papel es el transporte intracelular de ácidos grasos. Tres PUAGc diferentes se encuentran en corazón, hígado e intestino; también se encuentran en otros tejidos para la utilización de los ácidos grasos como sustratos metabólicos. PUAGc poseen una estructura única, y son abundantes en el miocardio, pero también pueden detectarse en músculo cardíaco y riñones. Sus niveles se elevan después de lesión miocárdica en ratas, y también se encuentran niveles elevados en suero y orina humanos, posterior al infarto del miocardio. Las mediciones de estas proteínas pueden tener una sensibilidad comparada a la de MIO, para la detección de reperfusión después de la terapia trombolítica (38-40).

Fosforilasa de glucógeno (FG)

Es una enzima glicolítica abundante, presente en todos los tejidos. Cataliza la inter conversión de 2-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato, el primer paso de la glucogenólisis. La enzima, es de estructura dimérica compuesta de tres subunidades distintas, con un Pm aproximado de 90 Kd. Así encontramos la GPLL (hígado), GPMM (músculo) y GPBB (cerebro). La GPBB también se expresa en el miocardio así como en otros tejidos, pero no en el músculo esquelético. La utilidad potencial de la FGBB se debe a que es liberada más temprano que otros marcadores, y puede ser liberada bajo condiciones de isquemia reversible, y se eleva 12 a 48 horas después del IAM (41,42).

Miosina de cadenas pesadas (MCP)

La MCP son 2 fragmentos largos con un Pm de 200 Kd, que se disocian de otras proteínas estructurales. La MCP no se encuentran presentes en plasma hasta 2 días después del evento; niveles máximo ocurren en 5 a 6 días. La elevación persiste después de 10 días; lo cual permite la determinación prolongada de necrosis miocárdica. La existencia de múltiples variantes en aurícula, ventrículo y músculo esquelético con estructuras similares han limitado su especificidad cardíaca (43).

Miosina de cadenas ligeras (MCL)

Al menos 2 formas de las MCLs existen en los ventrículos y aurículas, y al menos tres formas de MCLs se encuentran en el músculo esquelético. Estas formas poseen estructuras similares, y la secuencia de aminoácidos de las MCL-II ventriculares y MCL-II esqueléticas lentas son idénticas. Debido a esta similitud estructural, la especificidad de las MCL para lesión miocárdica es limitada. Ambos tipos de fragmentos MCL se disocian del aparato contráctil después de la necrosis

celular. Generalmente, los fragmentos de MCL son detectados en plasma dentro de las 6 horas de presentarse el infarto. Niveles elevados están presentes por más de 7 días y es depurado de la circulación por vía renal. Los fragmentos MCL son un marcador sensible de lesión miocárdica, en parte debido a su prolongada elevación que permite detección retrospectiva después de 2 semanas. Las mediciones de MCL son más sensibles para la detección de IAM, comparada con las mediciones de CK y CK-MB, probablemente debido a su prolongada ventana diagnóstica y la mayor relación de cantidad de proteína por gramo de tejido (44-46).

Mieloperoxidasa (MPO)

La MPO es una enzima leucocitaria (polimorfonucleares y monocitos) que se encuentra en mayor proporción en las lesiones activas, que en las estables. La MPO cataliza la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el ión cloro, para producir hipoclorito, el cual es un potente bactericida; de hecho, se ha sugerido que la determinación de la MPO en pacientes que ingresan por dolor torácico, es un buen predictor temprano del riesgo de IAM, así como de la incidencia de eventos cardiovasculares en los siguientes 6 meses. A diferencia de otros marcadores, como las Tnc, la MPO identifica a pacientes con riesgo de eventos sin que haya habido necrosis miocárdica (47). Por otro lado, se ha observado que los valores de MPO son un predictor potente e independiente de disfunción endotelial. La disfunción endotelial mediada por la MPO, es un posible vínculo de relación entre la oxidación, la inflamación y la enfermedad cardiovascular, y pone de manifiesto la relevancia de los neutrófilos en la fisiopatología de la aterosclerosis (48).

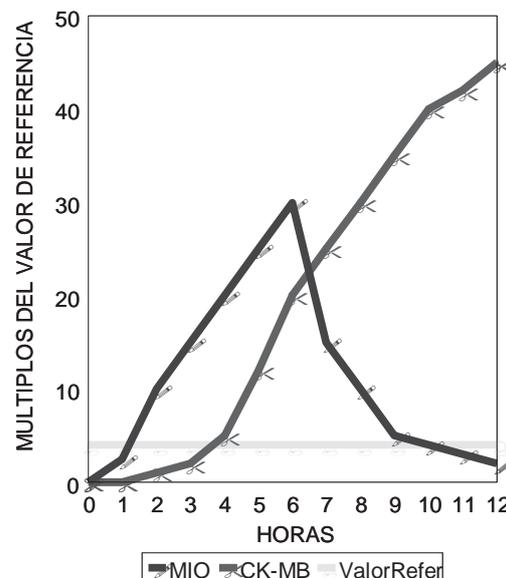


Gráfico 1. Niveles de MIO, CK-MB en suero según el tiempo después del IAM.

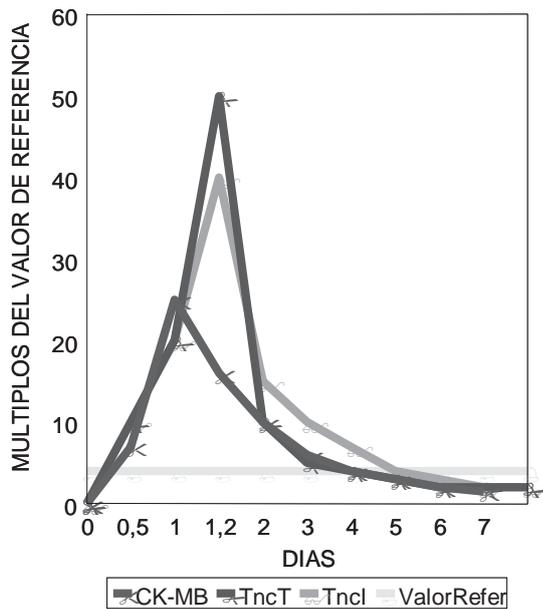


Gráfico 2. Niveles de biomarcadores de IAM en suero según el tiempo después del IAM.

Diagnóstico de IAM

La MIO es el marcador más temprano y tiene la más alta sensibilidad; precozmente se eleva dentro de las 3 horas después del dolor torácico (Gráfico 1) (49). La Tnc y la CK-MB se elevan significativamente entre 3 a 6 horas después del comienzo de los signos y síntomas. La Tnc T, se libera en un modelo de dos etapas para pacientes con reperfusión, la primera etapa se relaciona a la pérdida de subunidades citosólicas, y la segunda etapa se debe a la destrucción total del tejido contráctil. En el modelo de liberación para Tnc I hay también una liberación monofásica, presumiblemente debido a un pool citosólico libre disminuido, y una tasa de depuración más rápida desde el lecho sanguíneo. Para hacer el diagnóstico de IAM, se requiere realizar determinaciones seriadas en el lapso de uno a dos días, la CK-MB es la prueba más específica durante el primer día después del infarto (50), la elevación máxima ocurre a las 18 a 24 horas después de una oclusión permanente, durante el segundo día después del infarto la Tnc es tan sensitiva como la CK-MB (51,52). Como se muestra en el gráfico 2, la CK-MB se mantiene elevada solamente durante 2 o 3 días después de comienzo del infarto, la Tnc T y la Tnc I permanecen elevadas en la circulación hasta 10 días después del IAM (53).

Referencias

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105: 1135-43.
2. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340: 115-126.

3. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics -2009 Update. *Circulation*. 2009;119: e1-e161.
5. Antman EM, Hand M, Mullany ChJ, et al. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial Infarction redefined – A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J*. 2000;21: 1502-1513.
6. Thygesen K, Alpert JS, Harvey D. White on behalf of the joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J*. 2007;28: 2525-2538.
7. Chan, KM, Ladenson JH, Pierce GF, Jaffe AS. Increased creatine kinase MB in the absence of acute myocardial infarction. *Clin.Chem*. 1986;32: 2044-2052.
8. Schroeder JS, Lamb IH, Hu M. Do patients in whom myocardial infarction has been ruled out have a better prognosis after hospitalization than those surviving infarction?. *N Engl J Med*. 1980;303. 1-5.
9. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation*. 2000;102. 118-122.
10. Muller-Bardorff M, Hallermayer K, Schroeder A, Ebert C, Borgys A, Gerhardt W, et al. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation. *Clin Chem*. 1997;43: 458-466.
11. Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clin Chem*.1992; 38: 2203-2214.
12. Schulz O, Schimke I. Recent assay developments for cardiac troponins. Are we sensitive enough to recognize the high sensitives?. *Herz*. 2008;33 (7): 526-531.
13. Ammann P, Pfister M, Fehr T, Rickli H. Raised cardiac troponins. *Brit Med J*. 2004;328: 1028-1029.
14. Gunnewick JM, van der Hoeven JG. Cardiac troponin elevations among critically ill patients. *Curr Op Crit Care*. 2004;10: 342-346.
15. Morrow DA, Evidence-based decision limits for cardiac troponin: low-level elevation and prognosis. *Am Heart J*. 2004;148: 739-742.
16. San filippo FM, Hobbs MS, Knuiman MW, et al. Impact of New Biomarkers of Myocardial Damage on Trends in Myocardial Infarction Hospital Admission Rates from Population-based Administrative Data. *Am J Epidemiol*. 2008;168: 225-233.
17. Johannes M, Morandell D, Genser N et al. Equivalent early sensitives of myoglobin, creatin kinase mass, creatine kinase isoform ratios, and cardiac troponins I and T for acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 1995;41: 1266-1272.
18. Herlitz J, Svensson L. The value of biochemical markers for risk stratification prior to hospital admission in acute chest pain. *Acute Card Care*. 2008;1-8.
19. Vaananen HK, Syrjala H, Rakhila P, Vuori J, Melamies LM, Myllyla V, Takala TE. Serum carbonic anhydrase III and myoglobin concentrations in acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 1990; 36: 635-638.
20. Beuerle JR, Azzazy HM, Styba G, et al. Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patients. *Clin Chem Acta*. 2000;294: 115-128.



21. Sinha MK, Roy D, Gaze DC, et al. Role of ischemia modified albumin, a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J.* 2004; 21: 29-34.
22. Roy D, Quiles J, Aldama G, et al. Ischemia modified albumin for the assessment of patients presenting to the emergency department with acute chest pain but normal or non-diagnostic 12-lead electrocardiograms and negative cardiac troponin T. *Int J Cardiol.* 2004;97: 297-301.
23. Wu AH. B-Type Natriuretic Peptide and Its Clinical Utility in Patients with Heart Failure. *MLO Med Lab Obs.* 2001;33 (10): 10-14.
24. Chen HH, Burnett JC. The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999;111: 406-416.
25. Doust JA, Petrzak E, Dobson A, Glasziou P. How Well Does B-Type Natriuretic Peptide Predict Death and Cardiac Events in Patients With Heart Failure: Systematic Review. *BMJ.* 2005;330 (7492): 625.
26. Heeschen C, Hamm CW, Mitrovic V, et al: N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels for dynamic risk stratification of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2004;110: 3206-3212.
27. James SK, Lindback J, Tilly J, et al: Troponin-T and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predict mortality benefit from coronary revascularization in acute coronary syndromes: a GUSTO-IV substudy. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(6): 1146-1154.
28. Bassan R, Potsch A, Maisel A, et al: B-type Natriuretic Peptide: a novel early blood marker of acute myocardial infarction in patients with chest pain and no ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2005; 26:234-240.
29. Muir AR Neill J, Darragh K, et al: Use of N-terminal-pro-Brain Natriuretic Peptide as a diagnostic and prognostic marker for ischemic heart disease in patients presenting to a rapid access chest pain clinic. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(suppl A): 352A: 1005-199(abstract).
30. Wu AHB, Smith AC, Mather JF, Duncan B, White CM, et al. Biological variation for NT-pro- and B type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 2003;92: 428-431.
31. Lippi G, Schena F, Salvagno GL, et al. Influence of a half-marathon run on NT-proBNP and TroponinT. *Clin Lab.* 2008;54 (7-8):251-254.
32. Abbott Point of Care Inc. Péptido natriurético del tipo B/(BNP). 2006. INSTRUCTIVO i-STAT 1 Analyzer. 1-16.
33. Ridker PM. High sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation.* 2001;103: 1813-1818.
34. Casas JP, Shah T, Hingorani AD, et al. C-reactive protein a coronary heart disease a critical review. *J Intern Med.* 2008;264 (4):295-314.
35. Shlipak MG, Ix JH, Bibbins-Domingo K, Lin F, Whooley MA. Biomarkers to predict recurrent cardiovascular disease: the Heart and Soul Study. *Am J Med.* 2008;121 (1): 50-57.
36. Pearson TA et al. New AHA/CDC Guidelines Support the use of usCRP Testing in Intermediate Risk CVD Patients. *Circulation.* 2003;107: 499-511.
37. Campbell B, Badrick T, Flatman R, Kanowski D. Limited clinical utility of high-sensitivity plasma C-reactive protein assays. *Ann Clin Biochem.* 2002;39: 85-88.
38. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003; 107: 499 –511.
39. Van Nieuwenhoven FA, Kleine HT, Wodzig WH, et al. Discrimination between myocardial and skeletal muscle injury by assessment of the plasma ratio of myoglobin over fatty acid-binding protein. *Circulation.* 1995;92: 2848-2854.
40. Zanotti G. Muscle fatty acid binding protein. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1441: 94-105.
41. Setsuta K, Seino Y, Kitahara Y, et al. Elevated levels of both cardiomyocyte membrane and myofibril damage markers predict adverse outcomes in patients with chronic Heart failure. *Circ J.* 2008; 72 (4): 569-574.
42. Rabitzsch G, Mair J, Lechleitner P, et al. Immunoenzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. *Clin Chem.* 1995;41:966-978.
43. Krause EG, Rabitzsch G, Noll F, et al. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of myocardial ischaemic injury and infarction. *Mol Cell Biochem.* 1996;160-161: 289-295.
44. Adams III JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* 1993; 88 (2). 750-763.
45. Uji Y, Sugiuchi H, Okabe H. Measurement of human ventricular myosin Light Chain-1 by monoclonal solid-phase enzyme immunoassay in patients with acute myocardial infarction. *J Clin Lab Anal.* 1991; 5: 242-246.
45. Ravkilde J, Nissen H, Honder M, et al. Independent prognostic value of serum creatine kinase isoenzyme MB mass, cardiac troponin T and myosin light chain levels in suspected acute myocardial infarction. Analysis of 28 months of follow up in 196 patients. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25: 574-581.
46. Ravkilde J, Botker HE, Sogaard P, et al. Human ventricular myosin light chain isotype I as a marker of myocardial injury. *Cardiology* 1994;84: 135-144.
47. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med.* 2003;349: 595-604.
48. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, et al. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 2004;110: 1134 -9.
49. Gibler WB, Gibler CD, Weinshtker E, et al. Myoglobin as an early indicator of acute myocardial infarction. *Ann Emerg Med.* 1987; 16: 851-856.
50. Apple FS. Acute myocardial infarction and coronary reperfusion: serum cardiac markers for the 1990s. *Am J Clin Path.* 1992;97: 217-226.
51. Tzivoni D, Koukoui D, Guetta V, et al. Comparison of troponin T to creatine kinase and to radionuclide cardiac imaging infarct size in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty. *Am J Cardiol.* 2008;101 (6): 753-757.
52. Tsai SH, Chu SJ, Hsu CW, et al. Use and interpretation of cardiac troponins in the ED. *Am J Emerg Med.* 2008;26 (3): 331-341.
53. Vittorini S, Clerico A. Cardiovascular biomarkers: increasing impact of laboratory medicine in cardiology practice. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46 (6): 748-763.

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

Monterrey Carmen ¹, Silva Yamileth ², Garcia Nirsén ¹, Camacho Natacha ¹, Bastidas María G. ¹, Monzón Ana ³, Silva Noel ¹

RESUMEN

Empleados de oficinas que actualmente trabajan dentro de edificaciones con sistemas cerrados de aire acondicionado, pudiesen estar expuestos a hongos y ácaros en su lugar de trabajo. Las condiciones pudiesen ser peores si estos sistemas no son mantenidos de forma apropiada. El Instituto Universitario de Policía Científica de Caracas¹ (IUPOLC, Venezuela), pudiese ser un ejemplo de esta situación. Analizar la prevalencia de los niveles de IgE Específica en contra de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia Tropicalis*) y hongos ambientales (*Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria tenuis/alternata*) en una población que reporta sintomatología relacionada con Alergias tipo I (Mediadas por IgE), y que labora en Instituto Universitario de Policía Científica de Caracas, IUPOLC. De la totalidad de trabajadores del edificio del IUPOLC, actualmente 47 empleados reportaron poseer síntomas asociados con Alergias Tipo I al momento de la toma de la muestra para este estudio. Se evaluó los niveles de IgE específica en contra de ácaros y hongos utilizando el sistema de Allergy Screen® de r-biopharm, (Actualmente utilizado en más de 70 países), el cual es un método de fase sólida de nitro celulosa. El laboratorio que realizó el estudio está suscrito al esquema de control de calidad externo UK NEQAS (Reino Unido) y además organiza el único sistema disponible para tal fin en Venezuela. RESULTADOS: 82.98 % de los pacientes estudiados presentaron sensibilizaciones en contra de ácaro y/o hongos. 53,19 % mostraron valores significativos hacia ácaros; Dentro de ellos el más frecuente fue *Blomia tropicalis*, (25 casos), seguido *Dermatophagoides pteronissynus* por *Dermatophagoides farinae*. Dentro de los hongos los más frecuentes resultaron *Cladosporium herbarum* (10 casos), *Aspergillus fumigatus*, (9 casos) *Penicillium notatum* (4 casos) y *Alternaria alternata* (1 caso). Este estudio sugiere la importancia del rol que juegan los hongos y los ácaros en los trabajadores del IUPOLC. La prevalencia dentro de los empleados fue relativamente alta. Se requieren más estudios para elucidar la importancia de las condiciones de los hogares en el desarrollo de la alergia reportada por los pacientes.

Palabras clave: Alergia tipo I, IgE específica en suero, alérgenos ocupacionales.

Prevalence of sensibilization to mites and moulds on workers with allergy Type I

SUMMARY

Office employees that actually work inside buildings with air-conditioned closed systems are well known to be exposed to fungi and storage mites in their workplace. The conditions could be worst when those systems aren't properly maintained. The "Instituto Universitario de Policía Científica de Caracas" (IUPOLC, Venezuela) could be an example for that situation. AIM: To evaluate the prevalence of sensitization to moulds and mites through Specific IgE levels determinations, on workers of the IUPOLC that presented clinical symptoms associated with allergy type I at the moment of the study. From the total population of workers of the IUPOLC facility, actually 47 employees of IUPOLC presented one or more clinical symptoms associated with allergy at the moment of the study. The level of serum-specific IgE to mites and moulds were evaluated, using the Allergy Screen® r-biopharm methodology enzymatic solid phase method in nitro-cellulose in all subjects (Actually used in more than 70 countries). The Laboratory that performed the tests is actually subscribed to the UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service), and also they organize the only Allergy External Quality Scheme available in Venezuela. 82.98 % of the patients analyzed presented one or more increased values for mites or molds. 53,2 % resulted with positive values for Mites; the most frequent mites involved on the population were *Blomia tropicalis*, (with 25 cases), *Dermatophagoides pteronissynus* and *Dermatophagoides farinae*. On molds the most frequent sensibilizations resulted on *Cladosporium herbarum* (10 cases), *Aspergillus fumigatus*, (9 cases) *Penicillium notatum* (4 cases) and last *Alternaria alternata* (1 case). This study suggests an important role of fungi and mites as occupational allergens for IUPOLC workers. The prevalence of allergic symptoms among employees of IUPOLC was relatively high. Further studies are necessary to elucidate the importance of home conditions in the development of allergy reported by the patients.

Key words: Allergy type I, serum-specific IgE, occupational allergens.

1. Laboratorio de Producción y Control de Calidad, Corpodiagnostica C. A., Venezuela.
2. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
3. Instituto de Oncología y Hematología - Universidad Central de Venezuela.

Introducción

Las alergias tipo I son enfermedades crónicas que afectan a más del 20% de la población en algunos países, especialmente en zonas urbanas (1).

La Alergias perturban notablemente la calidad de vida de los individuos afectados y predisponen a la aparición de otras enfermedades de gran importancia tales como el asma, neumonía, conjuntivitis, entre otros.

Los ácaros y los hongos ambientales son las principales sustancias o alérgenos desencadenantes de cuadros alérgicos en la población.

Se ha determinado que los ácaros y hongos ambientales se desarrollan mejor en ambientes cerrados, húmedos, y con poca higiene tales como pudiesen ser algunas oficinas y hogares; por lo que investigar su prevalencia mediante métodos de diagnóstico *in vitro* en una población particular que posee síntomas sospechosos de Alergias, podría contribuir con el diagnóstico correcto de la misma, e incidir finalmente en la elaboración de estrategias terapéuticas y de control que generen mejoras en sus síntomas y calidad de vida, así como un mejor entendimiento de la patología alérgica.

Al igual que ocurre en muchos sitios de trabajo urbanos, los empleados que laboran diariamente en el Instituto Universitario de Policía Científica (IUPOLC), de Caracas, están expuestos a un ambiente cerrado de oficinas, con aire acondicionado y de acumulación de polvo, el cual es bien conocido que favorece el desarrollo y permanencia de ácaros y hongos ambientales, relacionados con la aparición de reacciones de hipersensibilidad inmediata mediadas por IgE Específica (Alergias tipo I) o atopias en la población.

Sobre la base de lo antes expuesto proponemos investigar a un grupo de trabajadores de el IUPOLC que presenta síntomas relacionados con las Alergias tipo I, realizando pruebas *in vitro* para la determinación de anticuerpos tipo IgE específica en contra de los antígenos de ácaros y hongos ambientales de mayor relevancia en Venezuela, para así calcular su prevalencia y analizar si los mismos pudiesen estar involucrados como agentes etiológicos de la sintomatología alérgica reportada por los individuos que participaron en el estudio.

Las Alergias son enfermedades crónicas que llegan a afectar a más del 20% de la población en algunos países (1).

Adicionalmente, hoy se conoce que su prevalencia ha venido incrementándose en los últimos años, especialmente en las zonas más desarrolladas (urbanas), a diferencia de lo que sucede con otras enfermedades que afectan a zonas rurales y/o de menor desarrollo.

Al ser enfermedades crónicas, las Alergias afectan notablemente la calidad de vida del individuo afectado, causando gran cantidad de síntomas en el organismo, los cuales van desde dermatitis, rinitis, tos, entre otras, hasta la predisposición del individuo a otras enfermedades de mayor gravedad tales como neumonías, asma, choques anafilácticos, intolerancias alimenticias, y otros.

Dentro de los distintos tipos de Alergia descritos por la literatura, encontramos las denominadas tipo I, (sinónimos conocidos: atopia, anafilaxis y reacciones de hipersensibilidad inmediata mediadas por Inmunoglobulina E, IgE), las cuales han venido siendo estudiadas desde el siglo XIX (2).

En general, se han clasificado a las sustancias o alérgenos que generan este tipo de Alergias, como “Inhalantes o Alimentos”, dependiendo de la vía de entrada que tengan al organismo, sin embargo, existen sustancias que pudiesen causar efectos a través de ambas vías. Ej. Los ácaros(3).

Los alérgenos más importantes para las Alergias tipo I, son los de tipo inhalantes y dentro de estos, los grupos que dada su relevancia medica han sido más estudiado son los ácaros y hongos ambientales (4-7).

Dentro de estos grupos existen gran cantidad de especies, sin embargo, gracias a numerosas investigaciones en el área, hoy se conoce cuales son los más prevalentes dentro de la etiología alérgica.

Por su naturaleza de sustancias “inhalantes”, es lógico intuir que el medio ambiente es fundamental para la instalación y proliferación de dichos microorganismos, existiendo condiciones particulares que favorecen su desarrollo, tales como: temperaturas templadas, alta humedad, poco aseo e higiene, ambientes cerrados, hacinamiento, entre otros.

Es por lo tanto, que diversos estudios nacionales e internacionales han evidenciado la presencia en grandes concentraciones de ácaros y hongos ambientales en los ambientes urbanos, especialmente hogares y oficinas con las características señaladas en el párrafo anterior (6-11).

El diagnóstico de las Alergias Tipo I es realizado por el médico especialista, sobre la base de la historia clínica del paciente, y los resultados de pruebas *in vivo* y más recientemente mediante técnicas *in vitro*, que se realizan para determinar las distintas sensibilidades de un individuo a sustancias alérgicas sospechosas de producir el cuadro alérgico.

Las pruebas *in vivo* han sido los métodos más utilizados y sensibles hasta el momento, y si bien son los más antiguos, las

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

mismas no han sido estandarizadas. Adicionalmente poseen contraindicaciones dependiendo del estado clínico del paciente y sus resultados no son cuantificables; dentro de estas, las más importantes por su frecuente uso, son las denominadas pruebas de piel.

Las pruebas *in vitro*, más recientemente desarrolladas, poseen menor sensibilidad diagnóstica que las pruebas *in vivo*, sin embargo han demostrado ser más específicas y estandarizables, pudiendo ser utilizadas incluso en aquellos casos en donde las pruebas de piel no arrojan resultados concluyentes (Ej.: Dermografismo, terapia antihistamínica, entre otros).

Las principales pruebas *in vitro* para el diagnóstico de Alergias tipo I son la determinación de IgE Total y Específica, y los resultados de las mismas son aceptados por la comunidad médica especialista, siempre y cuando los métodos utilizados hayan sido validados adecuadamente.

En el presente estudio, utilizaremos la determinación de IgE Específica por el método Allergy Screen® de r-biopharm, Alemania, el cual es un método utilizado en más de 60 países del mundo, evaluado adecuadamente por líderes de opinión en el área, (4) y para el cual el laboratorio de producción y control de calidad de Corpodiagnostica C. A., controla su calidad internamente y mediante la participación en un programa o esquema de control de calidad interlaboratorios organizado en el Reino Unido (U.K.), en donde participan más de 300 laboratorios especializados a nivel mundial, denominado UK NEQAS. (United Kingdom National External Quality Assessment Service.)

Partiendo de un grupo de individuos sintomáticos, (desde el punto de vista de signos y síntomas alérgicos referidos por la literatura especializada), estudiaremos la presencia de IgE específica en contra de antígenos de hongos y ácaros ambientales de conocida prevalencia en Venezuela, de forma de contribuir con el esclarecimiento etiológico de los síntomas presentados por los individuos que participan en el estudio.

Adicionalmente calcularemos las prevalencias de dichas sensibilidades para ácaros y hongos ambientales en la población estudiada y procederemos a realizar algunas recomendaciones de forma contribuir con el diagnóstico y mejora de la calidad de vida de los individuos del estudio y los síntomas alérgicos reportados.

Así nos propusimos analizar la Prevalencia de los niveles de IgE Específica en contra de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia Tropicalis*) y hongos ambientales (*Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria tenuis/alternata*) en una población que reporta sintomatología

relacionadas con Alergias tipo I (Mediadas por IgE), y que labora en Instituto Universitario de Policía Científica de Caracas, IUPOLC.

Para ello debemos: 1. Estimar los valores de IgE Específica para ácaros y hongos ambientales de conocida importancia en Venezuela en la población en estudio; y 2. Analizar la prevalencia de valores significativos de IgE Específica para las distintas especies de ácaros y hongos ensayados en la población en estudio.

Métodos

Población de estudio

Individuos que trabajan en el IUPOLC de Caracas, mayores de 18 años edad, y que presentan síntomas relacionados con Alergia Tipo I diagnosticados o no, para el día 30 de Julio de 2.008 (día de la toma de muestra sanguínea).

La muestra de este estudio está conformada por 47 individuos, mayores de 18 años de edad, que voluntariamente aceptaron participar en el estudio y que presentaban síntomas relacionados con Alergia Tipo I diagnosticados o no para el día 30 de Julio de 2008.

En resumen, los criterios de inclusión y de exclusión fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

1. Pacientes con sintomatología alérgica. (Según los síntomas descritos en la literatura médica especializada, (12) y registrada en el formato CÓDIGO FL-S01).
2. Mayores de 18 años.
3. Consentimiento voluntario firmado donde se explican los beneficios y riesgos de su participación en la investigación.

Criterios de exclusión

1. Pacientes sin sintomatología alérgica.
2. Menores de 18 años.
3. Deseo voluntario de no continuar participando en la investigación. (Nota: no se registró ningún caso para este criterio).

Instrumentos de recolección de información:

Se utilizó un formato por escrito (CÓDIGO FL-S01) para el registro de los nombres, apellidos, edad, sexo, y síntomas relacionados con alergias tipo I, en los pacientes que participaron en el estudio.

Los niveles de IgE Específica obtenidos por la técnica AllergyScreen® para la determinación de ácaros y hongos ambientales en la población en estudio, fueron obtenidos utilizando la instrumentación y programas de reporte pertene-



Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

cientes al Laboratorio de Producción y Control de Calidad de Corpodiagnostica C. A.

Calculo de prevalencia

Para los fines de este trabajo utilizamos el cálculo de prevalencia puntual, el cual es la frecuencia de una enfermedad o condición en un punto del tiempo. Es una proporción que expresa la probabilidad de que una persona sea un caso en un momento o edad determinados (13).

La prevalencia puntual se estima con la siguiente fórmula:

Prevalencia puntual = Ct/Nt

Ct= número de casos existentes(prevalentes) en un momento o edad determinados.

Nt= número total de individuos en la población en ese momento o edad determinados.

Metodología para la prueba de IgE específica

La prueba para determinación de IgE alérgico-específica EAST se basa en una modificación no isotópica del método original de radioalergoabsorbencia (RAST, sigla en inglés de radioalergosorbent test), y permite la determinación simultánea en un paciente de los niveles de IgE contra varios alérgenos específicos. Se obtienen resultados cuantitativos usando un sistema de clasificación similar al utilizado en las pruebas RAST. Todos los paneles de alérgenos de las pruebas EAST incorporan controles internos que evalúan el rendimiento del ensayo y compensan la unión no específica en la muestra de suero del paciente.

El ensayo a utilizar específicamente es el método de inmunoblot *in vitro* RIDA® AllergyScreen, el cual está diseñado para la determinación semi-cuantitativa o cualitativa de inmunoglobulinas de tipo IgE alérgico-específicas en el suero humano (4).

Para el diagnóstico *in vitro*. Se trata de un enzoinmunoensayo con membrana de nitrocelulosa (inmunoblot) para la identificación cuantitativa de anticuerpos específicos IgE contra un panel de alérgenos individuales en suero humano, en clase EAST (Enzimo Allergy Sorbent Test).

El presente test se basa en el principio del enzoinmunoensayo con membrana de nitrocelulosa (inmunoblot). En la superficie de membranas de nitrocelulosa están unidos los alérgenos correspondientes a la composición del panel. Los anticuerpos IgE alérgico-específicos presentes en muestras de suero de pacientes se unen a los antígenos y en un segundo paso se agregan los anticuerpos antihumanos IgE acoplados a biotina. Durante el tercer paso de incubación se produce la unión de la biotina a la estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina. La enzima convierte el sustrato incoloro

(BCIP/NBT) en un producto final azul violáceo. La intensidad de la coloración azul es proporcional a la cantidad de anticuerpos alérgico-específicos en el suero. El análisis se realiza con el programa RIDA® X-Screen /RIDA® maXi-Screen, o con menor exactitud mediante una plantilla de evaluación.

Las tiras de inmunoblot se pueden interpretar con la ayuda de un equipo lector y un software especial (resultados cuantitativos) denominado RIDA® X-Screen, obteniéndose resultados cuantitativos en el sistema 6 clases EAST y en concentración en unidades arbitrarias por mililitro (IU/mL).

El método fue validado en Alemania, siendo los resultados de la validación del método los siguientes: (4)

Comparación con el método de referencia (IgE):

Sensibilidad: 84.3%

Especificidad: 95.0%

Exactitud: 90.6%

Comparación con el skin-prick test (prueba de piel):

Sensibilidad: 95.1%

Especificidad: 80.2%

Exactitud: 88.3%

Recolección e identificación de muestras de sangre

La sangre de los pacientes con sintomatología alérgica, fueron recolectadas en tubos sin anticoagulante. Estas fueron debidamente identificadas con nombre, edad, sexo del paciente y fecha de recolección.

Las muestras fueron tomadas y transportadas al laboratorio de Producción y Control de Calidad de Corpodiagnóstica C.A. Centrifugados y separados, los sueros fueron identificados y refrigerados inmediatamente y preservados en un congelador a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Realización del test

Antes de su uso se llevan todos los reactivos, los sueros de pacientes y las membranas del test a la temperatura ambiente. Los reactivos se deben mezclar bien inmediatamente antes de su empleo. Después de su uso se debe conservar inmediatamente el kit del test a la misma temperatura de $2-8^{\circ}\text{C}$. Las membranas del test sólo pueden ser utilizadas una vez. Los reactivos y las membranas del test no se deben usar cuando el envase esté dañado o los recipientes hayan perdido su hermeticidad. No está permitido intercambiar o combinar componentes de kits de distintos lotes.

Los resultados reproducibles dependen en gran medida de la observancia de los tiempos y temperaturas de incubación, así como de un lavado uniforme de la tira de prueba.

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

Se debe evitar la incidencia directa de luz solar durante la realización del test. Las membranas de prueba solo deben agarrarse por su asidero. Se debe evitar por tanto tocar su superficie de reacción. La cámara de reacción se puede rotular (usar rotulador de fibra) con los datos de pacientes (por Ej. número del laboratorio).

Preparación del buffer de lavado

El contenido del frasco de concentrado de buffer de lavado se completa con agua destilada hasta 500 ml. Los cristales que pudieran encontrarse en el buffer concentrado se deben solubilizar primeramente con calor (baño María a 37°C).

Transferir el buffer diluido a un frasco lavador.

1. En correspondencia con la cantidad de test a evaluar, se extraen del envase las membranas del test y se lavan con el buffer de muestras diluido (frasco lavador). Para simplificar la operación se puede utilizar directo el soporte con 10 membranas del test. Las membranas se deben humedecer completamente con el buffer de lavado. Esto se logra fácilmente si se sostiene horizontalmente el soporte lleno con las membranas y se balancea con cuidado algunas veces de un lado a otro. Acto seguido se extraen las membranas del test, y se vuelven a lavar ligeramente con buffer y se colocan sobre una base absorbente. A continuación se rellenan las membranas con 250 μ l de suero de paciente y se incuban 45 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en un agitador horizontal (100 – 120 rpm).
2. Las membranas del test se enjuagan con el buffer diluido (frasco lavador) por lo menos durante 5 seg. Para ello las membranas del test se sostienen en forma vertical hacia abajo, para evitar que lleguen salpicaduras a los sueros de las membranas vecinas. El chorro de la solución de lavado debe pasarse varias veces por la membrana. Después se rellena la membrana con buffer de lavado diluido, se mueve varias veces de un lado a otro y se vacía. Finalmente se sostienen las membranas nuevamente inclinadas hacia abajo y se enjuagan durante 5 segundos con el frasco lavador. Después se procede a vaciar las membranas y secarlas sobre una superficie absorbente.
3. Dispensar 5 gotas (aprox. 250 μ l) de suero del paciente a cada membrana. Se incuban las membranas 45 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en el agitador horizontal (100 – 120 rpm).
4. Lavar como en el primer paso.
5. Añadir 5 gotas (aprox. 250 μ l) de conjugado a cada membrana. Se incuban las membranas 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en el agitador horizontal (100 - 120 rpm).
6. Lavar como en el primer paso.
7. Añadir 5 gotas (aprox. 250 μ l) de sustrato a cada membrana. Se incuban las membranas 20 minutos en la oscuridad a

temperatura ambiente (20-25°C) en el agitador horizontal (100 -120 rpm).

Después de la incubación se termina la reacción de color mediante un breve enjuague de las membranas con abundante agua destilada o en agua corriente (agua del grifo). Las membranas se secan al aire o con ayuda de un secador de pelo corriente (para acelerar el secado). El fondo de color azul-lila de la membrana desaparece con el secado. Solo después del secado total de la membrana en la cámara de reacción se debe comenzar la evaluación con el equipo y el software correspondiente.

Interpretación de las concentraciones de IgE específica, en Clases EAST (19)

EAST-CLASE Interpretación de IgE específica para el alérgeno ensayado

0	Indetectable
1	Bajo
2	Medio
3	Alto
4	Muy Alto
5	Extremadamente Alto
6	Extremadamente Alto

Los resultados de IgE específica obtenidos siempre deben ser analizados en conjunto con la historia clínica del paciente.

Para lograr una mejor especificidad y sensibilidad diagnóstica en las técnicas de determinación de IgE específica, actualmente, los especialistas más reconocidos en el área consideran como valores significativos aquellos mayores o iguales a CLASE 2 (para Ácaros) y a CLASE 1 (para Hongos ambientales), para pacientes que presentan síntomas relacionados a alergias tipo I (9,10,17,20-24).

Alergia a ácaros

Los ácaros son animales emparentados con las arañas, tienen un tamaño de menos de 0,3 mm., por lo que sólo son visibles al microscopio. Las especies que con mayor frecuencia producen alergia son las del género *Dermatophagoides*. (9,11) Su hábitat predilecto se relaciona con temperaturas templadas (alrededor de 20°C) y humedad relativa elevada (por encima del 70%). Un ambiente con una humedad inferior al 50-60% limita extraordinariamente su presencia. Los alérgenos de los ácaros que con más frecuencia producen alergia se encuentran en las heces de estos animales, y también en el cuerpo (9).

Alergia a los hongos

Existe una amplia evidencia histórica que relaciona determinados tipos de alergias con los hongos y aunque ya se han descrito históricamente enfermedades compatibles con la



Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

alergia a los hongos, la primera descripción conocida que relaciona a hongos y cuadros alérgicos data de 1726, cuando Floyer observó síntomas asmáticos en pacientes que habían visitado unas bodegas. Blackley describió, en 1873, un “catarro bronquial” con roncus pulmonar severo (*Catarrhus Aestivus*, fiebre del heno o asma del heno) después de la inhalación de esporas de *Chaetomium* y *Penicillium* (8).

Control de calidad

Por cada corrida procesada se corrieron simultáneamente controles positivos y negativos de IgE específico, con la finalidad de verificar el funcionamiento del sistema y realizar los estudios de precisión analítica según los criterios de aseguramiento de la calidad internos establecidos en el Laboratorio de Producción y Control de Calidad de Corpodiagnostica.

Paralelamente el Laboratorio de Producción y Control de Calidad de Corpodiagnostica participa en un programa de control de calidad externo inter-laboratorios organizado en el Reino Unido (UK NEQAS, United Kingdom National External Quality Assessment Service, <http://www.ukneqas.org.uk>) en donde se comparan los datos de más de 300 laboratorio a nivel mundial, en lo referente a la exactitud de la técnica utilizada para la determinación de los niveles de IgE Específica.

El Laboratorio de Producción y Control de Calidad de Corpodiagnostica C. A. organiza y participa en un esquema nacional de comparación interlaboratorios para IgE específica utilizando el método Allergy Screen® de r-biopharm, en donde participan 17 laboratorios de todo el país, iniciado en el año 2.007 y para los momentos de la realización de este trabajo, aún vigentes.

Adicionalmente, para fines de control negativo del estudio se seleccionaron 5 individuos del IUPOLC que reportaron no presentar ninguna sintomatología relacionada con Alergias tipo I, para realizarle los ensayos de IgE específica para ácaros y hongos ambientales.

Resultados de los análisis de sueros

Serán interpretado según el esquema de reporte Internacional FDA, Food and Drug Administration, USA, en clases EAST del 0 al 6, el cual también es aceptado en la mayoría de los países europeos, asiáticos y latinoamericanos (14).

Resultados

Actualmente el criterio mayormente utilizado por los médicos especialistas para establecer la relevancia de los valores de IgE específica para una sustancia en particular depende de la naturaleza de la misma y de la historia clínica del paciente.

Cualquier concentración de IgE Específica hacía un alérgeno en particular pudiese ser significativa o no, dependiendo de la historia clínica del paciente.

En la búsqueda de la mejor especificidad analítica de nuestro estudio, seleccionamos el siguiente esquema, por ser el más utilizado por los inmunólogos y en el caso de pacientes con una historia clínica positiva para sintomatología alérgica. (Tabla 1).

Tabla 1. Interpretación clínica de los niveles de IgE específica en contra de ácaros y hongos ambientales en pacientes con historia clínica positiva para sintomatología alérgica.

Especie de Hongos ensayado	Clase EAST	Interpretación clínica
<i>Cladosporium herbarum</i>	Mayor a Clase 1	Significativo
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mayor a Clase 1	Significativo
<i>Penicillium notatum</i>	Mayor a Clase 1	Significativo
<i>Alternaria tenuis/alternata</i>	Mayor a Clase 1	Significativo
Especie de Ácaros ensayado	Clase EAST	Interpretación clínica
<i>Blomia tropicalis</i>	Mayor a Clase 2	Significativo
<i>Derm. pteronyssinus</i>	Mayor a Clase 2	Significativo
<i>Derm. Farinae</i>	Mayor a Clase 2	Significativo

Tabla 2. Resultados en clases EAST para pacientes asintomáticos del IUPOLC, ácaros y hongos ambientales.

Nº Control (Pacientes sin síntomas)	1	2	3	4	5
Clase EAST: <i>Derm. pteronyssinus</i>	1	0	0	0	0
Clase EAST: <i>Derm. Farinae</i>	0	0	0	0	0
Clase EAST: <i>Blomia tropicalis</i>	2	1	0	2	0
Clase EAST: <i>Penicillium notatum</i>	0	0	0	0	0
Clases EAST: <i>Cladosporium herbarum</i>	0	0	0	0	0
Clases EAST: <i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0	0	0
Clases EAST: <i>Alternaria tenuis/alternata</i>	0	0	0	0	0

En los resultados obtenidos en Clase EAST para ácaros y hongos ambientales para pacientes asintomáticos del IUPOLC se observa que los pacientes 1 y 4 resultaron significativos para *Blomia tropicalis*, mientras que el resto de los pacientes resultaron con concentración indetectables de IgE específico en contra de ácaros y hongos ambientales (Tabla 2).

Los resultados de este estudio evidenciaron que de un total de 47 pacientes analizados, 39 de ellos (82.98%) presentaron valores significativos de IgE específica para hongos y/o ácaros, de los cuales 25 pacientes (53.19%) obtuvieron valores significativos de IgE específica para ácaros, 14 pacientes, (29.79%) presentaron valores significativos de IgE específica para hongos, y 9 pacientes (19.15%) valores significativos de dicho anticuerpo para ácaros y hongos simultáneamente (Figura 1).

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

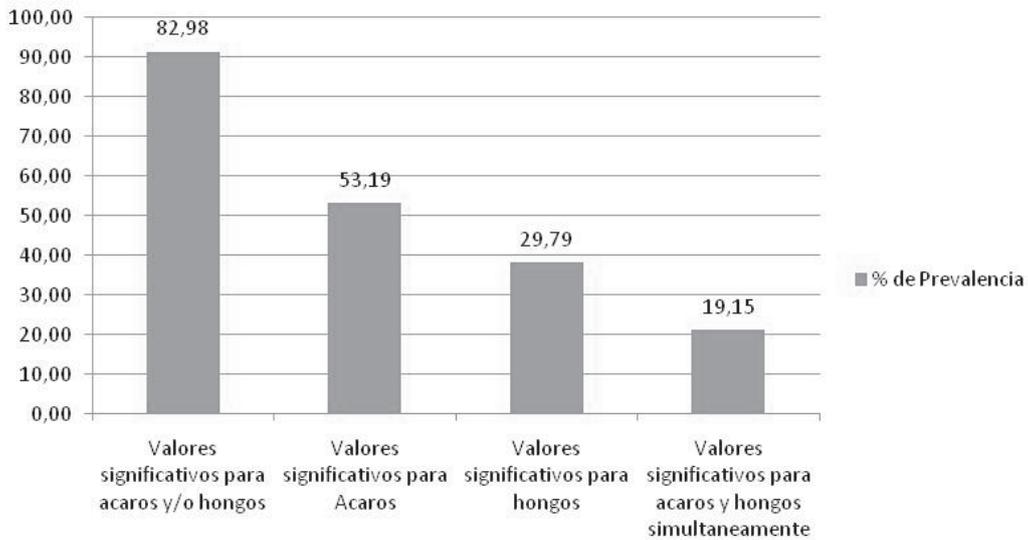
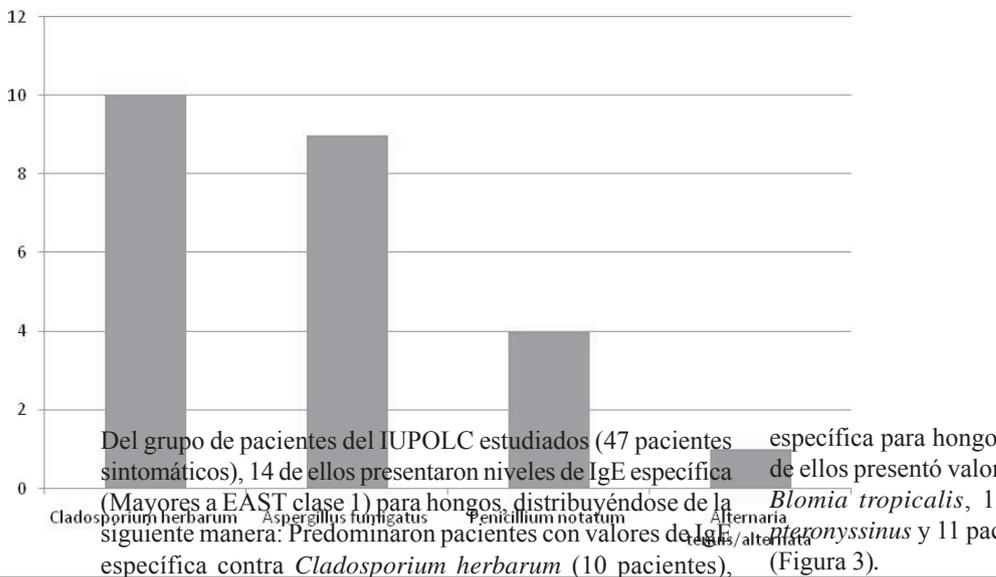


Figura 1. Porcentaje de prevalencia de IgE específica en la población en estudio, según tipo de alérgeno.



hongos.

Del grupo de pacientes del IUPOLC estudiados (47 pacientes sintomáticos), 14 de ellos presentaron niveles de IgE específica (Mayores a EAST clase 1) para hongos, distribuyéndose de la siguiente manera: Predominaron pacientes con valores de IgE específica contra *Cladosporium herbarum* (10 pacientes), seguido de (9 pacientes) con IgE específica contra *Aspergillus fumigatus*, y por último (4 pacientes) con niveles significativos de IgE específica contra *Penicillium notatum*. Este anticuerpo también se evidenció contra *Alternaria alternata* tan sólo en (1 paciente) de la población con anticuerpos contra hongos ambientales (Figura 2).

De los 47 pacientes (100%) analizados en el estudio, 25 pacientes (53.19%) obtuvieron valores significativos de IgE específica para hongos y ácaros (EAST mayor a clase 2), 25 de ellos presentó valores significativos de IgE específica para *Blomia tropicalis*, 12 pacientes para *Dermatophagoides pteronyssinus* y 11 pacientes para *Dermatophagoides farinae* (Figura 3).

De los 47 pacientes (100%) analizados en el estudio, 25 pacientes (53.19%) obtuvieron valores significativos de IgE específica para ácaros, observándose variaciones en el número de casos según las combinaciones posibles de ácaros. En relación a la combinación de *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* simultáneamente resultaron 10 pacientes, en el caso

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

de la combinación de *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus* resultaron 2 pacientes, en la combinación de *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides farinae* se obtuvo 1

paciente y ningún paciente para *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* simultáneamente (Figura 4).

Figura 3. Distribución de número de pacientes con valores significativos de IgE específica por tipo de ácaros.

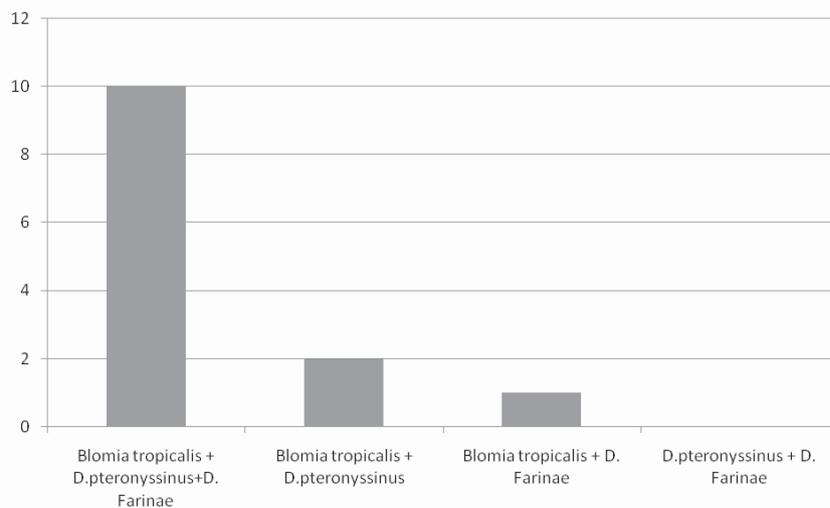


Figura 4. Numero de casos por combinaciones posibles de ácaros en pacientes sintomáticos con valores significativos de IgE específica (EAST mayor a clase 2).

Discusión

En nuestro estudio, un colectivo de 47 pacientes con síntomas sugestivos de alergia Tipo I, fue investigado en busca de la presencia de IgE específica contra *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum* y *Alternaria alternata/tenuis*, donde las condiciones del ambiente de trabajo común para el grupo, pudiesen favorecer

el crecimiento de tales hongos y/o ácaros.

De los 47 pacientes con síntomas alérgicos sugestivos evaluados en nuestro estudio, 25 de ellos (53.19%) estaban sensibilizados a los ácaros, 14 (29.79%) a los hongos y 9 pacientes (19.15%) a ambos alérgenos. Esto demuestra que la mayoría de los pacientes (91.49%) reaccionaron a, al menos, uno de los ácaros u hongos examinados utilizando la determinación in vitro de IgE sérica específica (EAST).

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

La mayoría de ellos (53.19%) arrojaron resultados positivos para ácaros, con un porcentaje elevado (100%) de reacción significativa de IgE específica (EAST clase 2) para el ácaro *Blomia tropicalis*, observándose la presencia de anticuerpos contra este ácaro en los 39 pacientes sintomáticos evaluados y en 2 de los pacientes asintomáticos (controles) estudiados.

La distribución observada de las distintas especies de ácaros ensayadas en nuestro estudio refiere mayor prevalencia hacia *Blomia tropicalis* seguido de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, lo cual difiere de lo registrado en la literatura consultada, ya que, *Blomia tropicalis* ocupa el tercer lugar entre los ácaros con mayor frecuencia aislados, es decir se ubica después de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*.

Cabe destacar que 10 de los pacientes están sensibilizados simultáneamente a las tres especies de ácaros que evaluamos. Sin embargo 11 pacientes (44%) fueron positivos sólo a *Dermatophagoides farinae* y 12 (48%) sólo a *Dermatophagoides pteronyssinus*. Ningún paciente obtuvo resultados significativos (clase EAST mayor de 2) sólo a un ácaro género *Dermatophagoides* (siempre aparecieron anticuerpos simultáneos contra *Blomia tropicalis*).

Al valorar la prevalencia de sensibilización a ácaros según las distintas especies estudiadas, se observó un claro predominio de valores significativos hacia *Blomia tropicalis* y en menor medida se encontraron resultados significativos para las otras especies de ácaros. Este importante hecho sugiere la posibilidad de la existencia de reacciones cruzadas entre las dos familias de ácaros, ya que todos los pacientes sensibles al género *Dermatophagoides*, lo fueron también a *Blomia tropicalis*, lo cual implica que, las reacciones cruzadas juegan un papel importante en el desencadenamiento de la patología alérgica. Esta posibilidad está en concordancia con numerosos estudios que demuestran que este fenómeno es particularmente notable entre especies de una misma familia taxonómica. Según estudios realizados en otras localidades se ha establecido que *Blomia tropicalis* puede tener reacciones cruzadas con las especies del género *Dermatophagoides*, principalmente la especie *pteronyssinus*, debido a la gran semejanza estructural y molecular que existe en sus epitopes y que en algunos casos el sistema inmunológico no es capaz de discernir (14).

Las reacciones cruzadas ocurren cuando un anticuerpo se fija a un antígeno distinto, pero muy relacionado, a aquel que indujo su formación (15).

Los antígenos que inducen reacciones cruzadas generalmente poseen algunos, aunque no todos, de los rasgos responsables de la fijación estrecha del epitope relacionado y, por lo general, se fijan de manera más débil, aunque éste no siempre es

el caso. De hecho a pesar de que generalmente se tiende a pensar en los anticuerpos como moléculas altamente específicas, es importante recordar que todo anticuerpo tiene la capacidad para fijarse muy débilmente a un número vasto de diversos antígenos, aunque sea capaz de fijarse con fuerza solo a unos cuantos (15).

En relación a la distribución observada de los distintos géneros de hongos ensayados en el estudio, existe correlación con la reportada en la literatura, en donde la prevalencia refiere en primer lugar al género *Cladosporium*, seguido de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria* en último lugar. En el IUPOLC predominaron pacientes con valores de IgE específica (EAST clase1) contra *Cladosporium herbarum* 71.43% (10 pacientes), seguido de un 64.29% (9 pacientes) con IgE específica contra *Aspergillus fumigatus*, y por último un 28.57% (4 pacientes) con IgE específica contra *Penicillium notatum*. Este anticuerpo también se evidenció contra *Alternaria alternata* sólo en 7.14% (1 paciente) de la población con anticuerpos contra hongos ambientales.

Se encontraron un total de 4 pacientes con los tres géneros de hongos estudiados; por lo tanto sería interesante estudios ulteriores para investigar si la microbiota fúngica del edificio del IUPOLC presenta similitud con las sensibilizaciones halladas en el presente trabajo.

Los ácaros del polvo doméstico representan los alérgenos sensibilizantes más relevantes a nivel mundial, su proliferación en los ambientes intradomiciliarios se ve favorecida por numerosos factores (inadecuadas normas de diseño de los edificios, exceso de elementos que acumulan polvo, etc.).

Se estima que 20% de la población es alérgica a factores ambientales y el alérgeno más importante es el ácaro, un arácnido o artrópodo que vive, principalmente en las casas. Donde encuentra no solo las condiciones de humedad y temperatura adecuadas sino también alimento. Es el causante de rinitis, conjuntivitis, dermatitis atópica, urticaria e incluso asma. Se trata de enfermedades de alta incidencia en los países tropicales y subtropicales como Venezuela donde es mayor el crecimiento de ácaros y la prevalencia de enfermedades respiratorias y/o alérgicas (16).

El instituto Universitario de Policía Científica, cuenta con ambiente cerrado, con poca ventilación, aire acondicionado individual para cada área, (es necesario acotar que no contamos con información acerca del mantenimiento de los ductos de dichos aires acondicionados), se ubican áreas (biblioteca), donde evidentemente se observó acumulación de polvo; existe poca ventilación, humedad y temperaturas variables, jardines, árboles, entre otros, todas estas condiciones favorables para el desarrollo de hongos y/o ácaros. Es

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

importante tomar en cuenta la ubicación geográfica del instituto, el cual se encuentra situado a escasos metros de la sede principal de la morgue de Bello Monte (Caracas), lo cual favorece aún más no sólo el desarrollo de los alérgenos ambientales comunes, sino de otros tipos de microbiota (bacterias) que podrían causar sensibilizaciones en el personal del Instituto.

Existen reacciones que producen síntomas por mecanismos no relacionados con la IgE, y que directamente causan la liberación de mediadores. Esto es lo que puede haber sucedido en 10 de los pacientes del IUPOLC estudiados, donde los valores de IgE específica en contra de los diversos alérgenos ensayados en esa población fueron indetectables para interpretación médica (EAST clase 0) Cabe destacar que los ácaros y los hongos no son los únicos alérgenos a los cuales estamos expuestos diariamente, algunos insectos como cucaracha son fuente importante de alérgenos respirables causantes de sensibilización al igual que los gatos y perros aportan una fuente de exposición inmediata en los domicilios y, dado que sus alérgenos son fácilmente transportables, también es posible la exposición en lugares públicos. Los alérgenos de gato se encuentran principalmente en la saliva, piel y pelo. Una gran proporción de ellos se encuentra dispersa en el aire en partículas microscópicas que resultan muy difíciles de eliminar. En el perro, las fuentes principales de alérgeno son el pelo, la piel y la saliva, siendo también fácilmente transportados adheridos a las vestimentas, todo esto indica la posible exposición simultánea de los pacientes estudiados a alérgenos diferentes de los que habitualmente predominan en el IUPOLC ya que en sus domicilios se hallan en contacto a muchos otros provenientes como se dijo anteriormente de epitelio y pelos de animales e insectos, así como alérgenos propios del polvo doméstico, los cuales pueden o no causar sintomatología en las personas expuestas, dependiendo de la concentración del alérgeno y de las condiciones inmunológicas de la persona afectada (susceptibilidad). Igualmente no se debe descartar que la sintomatología referida por los pacientes evaluados sea causada por alérgenos alimentarios y no por los alérgenos ambientales ensayados, explicación que pudiera darse para los pacientes sintomáticos que obtuvieron valores no significativos para interpretación médica de IgE específica (EAST clase 0) para hongos y ácaros. Sin embargo existen patologías crónicas (neoplasias de células plasmáticas productoras de IgE, defecto de células T, nefropatías) donde los pacientes presentan síntomas parecidos a los observados en las alergias tipo I. Algunos estados metabólicos como el hipertiroidismo, hipotiroidismo, embarazo, anticonceptivos pueden exacerbar o simular una reacción alérgica.

Dos de los cinco pacientes que no refirieron síntomas relacionados con alergia y por lo tanto fueron tomados como pacientes control, obtuvieron unos niveles significativos

(EAST clase mayor o igual a 2) de IgE específica contra ácaros, sin embargo la literatura menciona que, desde el punto de vista diagnóstico un paciente sensibilizado a *Blomia* sin síntomas, es no significativo.

La IgE específica en suero y en la superficie de los mastocitos y basófilos ligadas al FcεRI en pacientes con alergia es una marca de la enfermedad atópica. A pesar de que la tolerancia de las células T periféricas es inducida rápidamente durante la SIT, no hay evidencia de tolerancia en las células B al inicio del tratamiento. La exposición natural a alérgenos relevantes a menudo está asociada con un incremento en la síntesis de IgE. De manera similar, la SIT frecuentemente incrementa de manera transitoria la IgE específica en suero seguida por un descenso gradual en un período de meses o años de tratamiento.

La respuesta de anticuerpos inducida durante la SIT es funcionalmente heterogénea, la cual puede contar para los datos en conflicto en relación con los efectos protectores de IgG. Las subclases de los anticuerpos IgG, en especial la subclase IgG4, se piensa que se unen al alérgeno antes de que se unan a la IgE y por consiguiente previene la activación de mastocitos y basófilos.

La inducción y aumento en la secreción de IL-10 por la SIT aparentemente contra-regula la IgE alérgeno específica y esto, simultáneamente, incrementa la producción de IgG4. Por consiguiente, la IL-10 no sólo genera tolerancia en las células T, sino que regula la formación de isotipos específicos y sesga la respuesta específica de IgE dominante hacia un fenotipo IgG4.

La enfermedad alérgica es una entidad patológica que se produce por la relación inadecuada del individuo susceptible con su medio ambiente. El contacto repetido de los alérgenos con células de su sistema inmune, resulta en la producción de cantidades elevadas de IgE.

La distribución de frecuencias tanto para ácaros como para hongos encontrada en el presente estudio se corresponde en gran medida con la descrita en la literatura consultada.

Adicionalmente, la polisensibilización podría ser atribuida a una exposición múltiple, ya que en el polvo domiciliario frecuentemente coexisten varias especies de ácaros compartiendo el mismo nicho ecológico.

Por otro lado, es importante considerar que el alto porcentaje de sensibilización al extracto de ácaros en la población estudiada se puede deber a una exposición prolongada a estos alérgenos en sitios diferentes a el IUPOLC.

Conclusiones

Los hongos y ácaros podrían ser los causantes de los síntomas alérgicos en los pacientes de la población estudiada, con prevalencia hacia los mismos, ya que éstos son causa importante de alergias, específicamente de origen respiratorio en la población objeto de estudio, pero sin embargo, no constituyen la única causa.

A la vista de nuestro resultado, consideramos que las especies *Dermatophagoides* y *Blomia tropicalis* son de gran relevancia en nuestro medio, por el gran número de pacientes sensibilizados a ellas. Se debería evaluar su reactividad cruzada, así como la caracterización de alérgenos, ya que las investigaciones realizadas hasta la fecha indican que algunas especies como *Blomia tropicalis* poseen alérgenos comunes con *Dermatophagoides spp.* y otros que pueden ser especie-específicos.

Se pueden haber facilitado las co-sensibilizaciones si tenemos en consideración que algunos de los ácaros localizados pueden encontrarse también en los propios domicilios de los pacientes.

El diagnóstico de alergia utilizando pruebas *in vitro*, se alcanza cuando en un paciente que presenta sintomatología compatible con esa condición, se demuestra que existe IgE específica para alérgenos medioambientales que son inocuos para el resto de la población.

En nuestro estudio se han identificado especies de reconocida capacidad alergizante en concentraciones suficientes como para inducir respuestas específicas de IgE y como para desencadenar los síntomas alérgicos referidos por los individuos que resultaron estar sensibilizados.

Se observó correlación entre los niveles de IgE específica en los individuos afectados y la sintomatología alérgica referida por ellos.

El presente estudio puso de manifiesto una alta prevalencia de polisensibilizaciones a diversos grupos de aeroalérgenos (ácaros y hongos) en pacientes que presentan sintomatología alérgica.

La distribución observada de las distintas especies de ácaros ensayadas en nuestro estudio refiere mayor prevalencia hacia *Blomia tropicalis* seguido de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, lo cual difiere de lo registrado en la literatura consultada, ya que, *Blomia tropicalis* ocupa el tercer lugar entre los ácaros con mayor frecuencia aislados, es decir se ubica después de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*.

En relación a la distribución observada de los distintos géneros de hongos ensayados en el estudio, existe correlación con la reportada en la literatura, en donde la prevalencia refiere en primer lugar al género *Cladosporium*, seguido de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria* en último lugar. En el IUPOLC predominaron pacientes con valores de IgE específica (EAST clase I) contra *Cladosporium herbarum* (10 pacientes), seguido de un (9 pacientes) con IgE específica contra *Aspergillus fumigatus*, y por último un (4 pacientes) con IgE específica contra *Penicillium notatum*. Este anticuerpo también se evidenció contra *Alternaria alternata* sólo en (1 paciente) de la población con anticuerpos contra hongos ambientales.

Es necesario sugerir que luego de los resultados emanados de nuestro estudio y debido a la sintomatología referida por los pacientes evaluados, sería conveniente estudiar, aislar e identificar la microflora aérea presente en el edificio del IUPOLC, para poder, junto con una adecuada evaluación médica, conocer si este ambiente presenta los alérgenos a los cuales los pacientes resultaron sensibilizados y su posible implicación en la sintomatología referida por estos, para así mejorar su calidad de vida y su desempeño laboral. Así mismo debido a la alta prevalencia de sensibilizaciones observadas hacia los ácaros, y conocida su implicación en cuadros alérgicos, es necesario e importante analizar muestras de polvo de esos mismos ambientes en aras de identificar cuales de los géneros de estos artrópodos están presentes en el recinto.

Recomendaciones

- Algunas de las medidas que se pueden tomar para disminuir el número de ácaros en las oficinas.
- En el caso de las medidas a aplicar para disminuir la existencia de los hongos es necesario evitar humidificadores, limpiar periódicamente los filtros de los aires acondicionados, si existen “manchas de humedad” (en paredes, elementos sanitarios del baño, cortinas de ducha, macetas) deberán sanearse adecuadamente.
- Realizar exámenes complementarios, lo cual forma parte esencial de la idoneidad que todo especialista en alergia e inmunología debe poseer.
- Se necesitan más estudios para evaluar la relevancia clínica, diagnóstico, control, historia natural y tratamiento de estas alergias.
- Descartar otras patologías subyacentes en los pacientes tales como, infecciones y otros, que pudieran estar empeorando el cuadro sintomático de los individuos.
- Evaluar la microflora presente en las instalaciones del Instituto mediante el aislamiento e identificación por medio de cultivo de muestras ambientales y análisis de polvo proveniente de diferentes áreas posiblemente afectadas.

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

Referencias

1. Allergies in UK among highest prevalence in the world costing £1bn annually [en línea], 14 Apr 2004, Disponible en: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/7256.php>, Consultado el 10 de mayo de 2008.
2. Roitt Ivan. Inmunología Fundamentos. 9ª Ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2000.
3. Sánchez-Borges M, Suárez-Chacón R, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F. Ingestión de ácaros: An update on oral anaphylaxis from mite ingestion. *Annals of allergy, asthma, & immunology*. 2005;94(2):216-221.
4. Herzum I, Blumer N, Kersten W, Benz H. Diagnostic and Analytical performance of a screening panel for allergy. *Clin Chem Lab Med*, 2005; 43(9) 963-6.
5. PW Yuen A, Cheung S, Tang K.. The skin prick test results of 977 patients suffering from chronic rhinitis in Hong Kong; *Hong Kong Med J Links* 2007;13(2):131-6.
6. Sattar HA, Mobayed H, al-Mohammed AA, Ibrahim AS, Jufairi AA, Balamurugan P, Mary VP, Bener A. Eur Ann Allergy Clin Immunol Links. 2003. Oct;35(8):300-5. The pattern of indoor and outdoor respiratory allergens in asthmatic adult patients in a humid and desert newly developed country.
7. Galante D, Hartung de Capriles C, Mata-Essayag S, Conesa A, Córdova Y, Trejo E, Tassinari P. Respiratory allergies in Venezuela: are fungi responsible?. *Mycoses*, 2006;49(6):493-498.
8. Bial Aristegui. Alergia a los Hongos. *Rev Iber Mic*. 2002;19:10-14,20.
10. Puccio FA, Lynch NR, Noya O, Noda A, Hagel I, López E, López R, Caraballo L, Mercado D, DiPrisco MC. Importance of including *Blomia tropicalis* in the routine diagnosis of Venezuelan patients with persistent allergic symptoms. *Allergy* 2004;59(7):753-757.
11. Sánchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F, Fernández-Caldas E. Mite and cockroach sensitization in allergic patients from Caracas. *Annals of allergy, asthma, & immunology*, vol. 90, n°6, pp. 664-668.
12. Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas, [en línea], Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/allergy.html>, Consultado el 10 de mayo de 2008.
13. Rada Gabriel. Estudios de Prevalencia III. [en línea], 2007. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/recursos/recepidem/epiDesc8.htm>, Consultado el 11 de julio de 2008.
14. Food and Drug Administration USA. Radioallergosorbent Test (RAST) Methods for Allergen-Specific Immunoglobulin E (IgE) 510(k) s. Final Guidance for Industry and FDA. 2001.
15. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden J. Inmunología básica y clínica. 10ª Ed, Editorial Manual Moderno. México DF, 2000.
16. Mendez A. Contaminación por Ácaros. *Medicina en gotas* [en línea] 2007. Disponible en <http://salud.solotecnologia.com.ve/?p=168>, consultado el 15 de septiembre de 2008.
17. Dr. Mauro Madero Izaguirre, Dr. Mauro Madero Ardito. IgE: Estructura, Aplicación y Utilidad en el Diagnóstico de la Enfermedad Alérgica. *Revista Científica. Sociedad Ecuatoriana de Dermatología*. 2003;1(1):22-25.
18. Barret James T. Inmunología Médica. 5ª Ed. Interamericana. México: McGRAW- HILL. 1.990.
19. Zambrano Sergio A. Inmunología. 1ª Ed. Interamericana. México: McGRAW-HILL. 1.993.
20. States DP, Terr AI, Parslow T.G. Inmunología Básica y Clínica. Editorial Manual Moderno. 1998.
21. Johansson, L. Yman. In Vitro Assays for Immunoglobulin E. Methodology, Indication and Interpretation. S.G.O., Department of Clinical Immunology, Karolinska Hospital, S 104 01 University of Stockholm, Sweden. 1988.
22. Sampson HA. Utility of food specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol*; 2001;107:891-896.
23. Hirsch, Range, Walther, Hederer, L. Assig, Frey, Leupold. Prevalence and Determinants of house dust mite allergen in East German homes. *Clin&Exp Allergy*; 1998;28(8): 956-964.
24. Jens C, Bente S, Graudal C, Jette C. SvendAace HenriskenSerum IgE Antibodies to the Scabies, Mite *Int Journal of Derm*; 1985. Volume 24, Issue 1, Pages: 313-315.
25. C Rolinck-Werninghaus, T Keil, M Kopp, S Zielen, U Schauer, A von Berg, U Wahn, E Hamelmann, Specific IgE serum concentration is associated with symptom severity in children with seasonal allergic rhinitis. *Allergy* 2008;63(10):1339-1344.
26. Taina Taskinen, Sirpa Laitinen, Anne Hyvärinen, Teija Meklin, Tuula Husman, Aino Nevalainen, Matti Korppi. Mold-specific IgE antibodies in relation to exposure and skin test data in schoolchildren. *Allergology International* 2001; 50(3):239-245.
27. Algorta, Juan A. María Teresa Lizaso, Ana Isabel Tabar, Blanca Esther García, Belen Gómez, Jaime Asturias, Alberto Martínez Double-blind, placebo-controlled Alternaria alternata immunotherapy: in vivo and in vitro parameters. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2008; 19(1): 76-81.
28. Datos por publicar, Laboratorio de Producción y Control de Calidad Corpodiagnóstica C.A.
29. Balestrini Acuña, Miriam. Como se Elabora el Proyecto de Investigación. Sexta ed. Editorial BL Consultores Asociados. Caracas, Venezuela. 2002.
30. The University of Adelaide Aspergillus Fumigatus [en línea]. 2008. Micología on line. Disponible en: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/aspergillus11>. Consultado el 15 de abril de 2008.
31. Ecotech Environmental Consultants Cladosporium. [En línea]. 2005. Disponible en: <http://www.ecotechus.com/images/Cladosporium.jpg>. Consultado el 15 de abril de 2008.
32. University of South Carolina. Esporangios de Mucor Racemosus [en línea]. 2006. Microbiology and Immunology on line. Disponible en: <http://www.pathmicro.med.sc.edu/mycology/mucor2.jpg>. Consultado el 15 de abril de 2008.
33. Cazurrabbit Penicillium notatum [en línea]. 2005. Disponible en : <http://www.cazurrabbit.com/.../03/03/img/hongo.jpg> Consultado el 15 de abril de 2008.
34. Korhonen K, Mähönen S, Hyvärinen A, Nevalainen A, Husman T, Pekkanen J, Korppi M. Skin test reactivity to molds in pre-school children with newly diagnosed asthma. Department of Paediatrics, Kuopio University Hospital, Kuopio, Finland.
35. J Huss K, Adkinson NF Jr, Eggleston PA, Dawson C, Van Natta ML, Hamilton RG, Hopkins J. House dust mite and cockroach exposure are strong risk factors for positive allergy skin test responses in the Childhood Asthma Management Program. *Allergy Clin Immunol Links*. 2001. Asthma and Allergy Center, Baltimore, MD, USA.; vol.107, pp.:48-54.

Prevalencia de sensibilización hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I

36. Fireman, Ph. Atlas de inmunología CD-ROM ISBN: 978848174943-4. Edición 3ª Idioma: castellano.2006.
37. Rangel A, Salmen S, Muñoz J, García F, Hernández M. Dermatophagoides sp. and IgE anti-D. pteronyssinus and D. farinae detection in a Venezuelan community at more than m above the sea level. Clinical and experimental allergy (1998) .
- Institute of Clinical Immunology, Faculty of Medicine, University of Los Andes, Mérida, Venezuela, vol. 28, nº9, pp. 1100-1103.
38. CI Ezeamuzie, MS Thomson, S Al-Ali, A Dowaisan, M Khan, Z Hijazi, Asthma in the desert: spectrum of the sensitizing aeroallergens Allergy. 2000;55(2): 157-162.

Niveles plasmáticos de Mieloperoxidasa y Proteína C Reactiva en conejos machos Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica

González Julio C.^{1,3,5}, Figueira Leticia², González Dora C.³, Alvarez Ángela⁴, Aguilera Carolina⁴ y Reigosa Aldo⁵

RESUMEN

La Mieloperoxidasa (MPO) y la Proteína C Reactiva (PCR) han sido implicados en la fisiopatología de la aterosclerosis. El objetivo del presente estudio fue determinar las concentraciones plasmáticas de MPO y PCR y su relación con la formación de ateromas en conejos. Se estudiaron 23 conejos machos Nueva Zelanda: Grupo1: conejarina y verdura; Grupo2: Huevo y conejarina. El periodo experimental duró 13 semanas. Se determinó perfil lipídico por métodos enzimáticos, MPO por ELISA y PCR por turbidimetría en 0 13va semana. Se realizó estudio histológico de aorta. Los resultados revelaron que la PCR se elevó en el grupo 2 al final del estudio ($p < 0,05$). No se observó diferencias en MPO en el grupo 2 en el estudio. En cuanto a los ateromas se evidenciaron lesiones tipo I y II en los conejos del grupo 2. En conclusión, se encontró que la PCR y no la MPO son marcadores de aterosclerosis según nuestras condiciones experimentales.

Palabras clave: MPO, PCR, Oxidación, inflamación, aterosclerosis

Plasma concentration of Myeloperoxidase and C -Reactive Protein in male New Zealand rabbits, exposed to a hyperlipidemic diet

SUMMARY

Myeloperoxidase (MPO) and C-reactive protein (CRP) have been implicated in atherosclerosis. The objective of the present study was to determine plasma concentration MPO and CRP and its relationship of formation of aortic lesions in rabbits. 23 male New Zealand rabbits were study: Group 1: "conejarina" (commercial rabbit food) and vegetables; Group 2: egg and conejarina. The experiment lasted 13 weeks. Lipid profile was done by enzymatic methods, MPO by ELISA, and PCR by turbidimetry in weeks 0 and 13. Histological study of rabbits' aorta was done. Results revealed that in group 2 CRP increased at final study ($p < 0.05$). No differences were observed in MPO values in the experiment. Regarding atheroma, group 2 presented type I and II lesions. In conclusion only CRP is marker of atherosclerosis according to our experimental conditions.

Key words: MPO, CRP, oxidation, inflammation, atherosclerosis.

1. Laboratorio de Investigación del Postgrado de la Escuela de Bioanálisis.
2. Facultad de Farmacia UCV.
3. Laboratorio Clínico Julio C. González.
4. Escuela de Bioanálisis Valencia.
5. Centro de Investigaciones Medicas y Biotecnológicas de la UC. Email jcgonzal@uc.edu.ve

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inmuno – inflamatoria crónica involucrada en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (1,2), las cuales representan para el año 2006 la principal causa de mortalidad en Venezuela, constituyendo el 20,63% de la mortalidad nacional diagnosticada (3).

El evento desencadenante de la aterosclerosis es la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial (1,2,4), donde la Mieloperoxidasa (MPO), desempeña un papel importante en la aterogénesis gracias a las reacciones oxidativas que cataliza esta enzima (5).

La MPO es una enzima tetramérica, de la clase oxidoreductasa (peróxido de hidrógeno oxidoreductasa EC 1.11.1.7), de naturaleza glicoproteica de 130 – 150 KDa. (6), que se almacena a nivel lisosomal en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares, y es secretada al medio extracelular ante diferentes estímulos nocivos (7). La MPO ha sido aislada de diferentes fluidos como semen, saliva, y órganos como corazón, riñón, piel, hígado y placenta (8); y se ha encontrado en mayor proporción en lesiones ateroscleróticas activas que en las estables (9).

La MPO cataliza la formación de ácido hipocloroso (HClO^-), a partir del ión cloruro (Cl^-) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (generado en los leucocitos) (5). Esta enzima al estar relacionada con el estrés oxidativo, participa en la aterosclerosis; ya que induce por medio de la cloración de las LDL, esteroides y residuos de tirosina de la Apo A, modificaciones que transforman las LDL en partículas aterogénicas (6,7,10,11). Por otra parte, la MPO activa directamente a metaloproteinasas, facilitando la desestabilización y ruptura de la placa (12).

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína de fase aguda, cuyos niveles séricos incrementan rápidamente ante un estímulo inflamatorio. Esta β -globulina es una importante línea de defensa, la cual permite reconocer patógenos y células dañadas y promover su eliminación mediante la activación del sistema de complemento (13). La PCR es sintetizada principalmente por el hígado, sin embargo se ha documentado expresión extra hepática de esta proteína en diferentes tejidos como neuronas humanas, células endoteliales, lesiones ateroscleróticas, riñones y tejido adiposo (14).

Se ha propuesto a la MPO como un predictor temprano del riesgo de infarto agudo al miocardio (9) y de disfunción endotelial. (15). Asimismo, se ha encontrado que los niveles séricos de MPO se correlacionan con la extensión y severidad de la aterosclerosis y de enfermedad arterio coronaria (16). Por otra parte, la PCR se ha asociado como predictor de infarto de miocardio y como un indicador de inflamación y marca-

dor de enfermedad cardiovascular (17-19). En vista de ello, nos proponemos determinar las concentraciones plasmáticas de MPO y PCR y su relación con la formación de ateromas en conejos machos Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica.

Materiales y métodos

Muestra y diseño experimental

Se utilizó 23 conejos machos de raza Nueva Zelanda de 10 semanas de edad con un peso entre 1200 – 1300 gramos, provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC, Caracas, Venezuela). Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos organizados de la siguiente manera: Grupo 1 (control): Integrado por 7 conejos; cada uno fue alimentado diariamente con 150 gramos de zanahoria y lechuga, 150 gramos de conejarina (Protinal, Venezuela) y agua a libre demanda. Grupo 2: Constituido por 16 conejos; cada uno fue alimentado diariamente con un huevo hervido (Cada huevo contiene aproximadamente 300 mg de colesterol en su yema (20) y 150 gramos de conejarina y agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de trece semanas.

Todos los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los procedimientos de cuidado de los animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (21). El experimento fue realizado rigurosamente según las normas éticas del Bioterio Central de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela).

Determinaciones bioquímicas

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas al inicio (semana 0) y fin del experimento (13^{va} semana). Se realizó la determinación plasmática de colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos colorimétricos directos (Wiener Lab, Argentina). El c-HDL, c-LDL se realizó por extracción y posterior determinación enzimática. La concentración de MPO fue determinada por ELISA (Assay Design). La PCR se determinó por ensayo turbidimétrico cuantitativo (Turbilatex, LabKit, España).

Preparación de tejidos y tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas

Los conejos fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas, fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas. Procesadas según la técnica de rutina y

posteriormente teñidas con hematoxilina- eosina (22), para luego ser observados por microscopía óptica. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo a la clasificación de la American Heart Association (23).

Análisis de los datos

Se calculó promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se empleó la correlación de Pearson para relacionar el perfil lipídico con los niveles de MPO y PCR. Se utilizó el análisis de Wilcoxon Signed Rank y Wilcoxon Rank Sum para comparar los valores de las variables sujetas a estudio, y una tabla de asociación para clasificar el grado de ateroma. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa Statistix versión 8.

Resultados

No se observó diferencias significativas en los pesos basales entre los dos grupos de conejos. A lo largo del estudio hubo un incremento significativo en el peso de los conejos del grupo 2 con respecto al grupo 1, y con respecto a sus pesos basales ($p < 0,05$). Asimismo, se observó que el incremento del peso fue mayor en el grupo 2 (datos no mostrados).

No se observó diferencias significativas en las concentraciones séricas basales de colesterol total (CT), c-HDL, c-LDL y triglicéridos (TG) entre los grupos de conejos sujetos a estudio. Al final del estudio se apreció un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 2 con respecto al grupo 1 y con respecto a sus valores basales ($p < 0,004$). Por su parte, el CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 1 permaneció sin cambios significativos a lo largo del experimento (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio y desviación estándar del Perfil Lipídico en los grupos 1 y 2 en el inicio y fin del estudio.

Variables	Basal		Fin del estudio	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Colesterol (mg/dL)	60 ± 10	62 ± 12	61 ± 11	827 ± 287*
c-HDL (mg/dL)	17 ± 5	17 ± 4	19 ± 4	47 ± 15*
c-LDL (mg/dL)	40 ± 15	39 ± 11	41 ± 9	704 ± 253*
Triglicéridos (mg/dL)	56 ± 23	58 ± 20	60 ± 17	157 ± 35*

$p < 0,05$ * Significativo

En cuanto a las concentraciones de MPO y PCR, no se observaron diferencias significativas entre los grupos sujetos a estudio en condiciones basales. Dichos marcadores en el grupo 1 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento. Asimismo no se observó diferencias en la concentración de

MPO entre los grupos 1 y 2 a lo largo del estudio. La concentración de PCR al final del experimento, aumentó en el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de la MPO y PCR en los grupos 1 y 2 en el inicio y fin del estudio.

Variables	Basal		Fin del estudio	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
MPO (ng/mL)	1,45 ± 0,06	1,47 ± 0,02	1,46 ± 0,02	1,50 ± 0,04
PCR (mg/L)	0,70 ± 0,09	0,73 ± 0,02	0,76 ± 0,08	3,42 ± 0,50*

$p < 0,05$ * Significativo

No se observó asociación significativa entre los marcadores de inflamación estudiados con las variables sujetas a estudio a lo largo del estudio (datos no mostrados).

En cuanto a los cortes histológicos de las aortas, se observó que ningún animal en el grupo 1 evidenció lesiones ateroscleróticas. Por su parte en el grupo 2, se observó que todos los conejos evidenciaron lesiones ateroscleróticas (Tabla 3), presentando lesiones de tipo I (Figura 1) y II (Figura 2).

Tabla 3. Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta.

Grupo	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
1	7	0	0	0	0	0
2	0	3	10	0	0	0

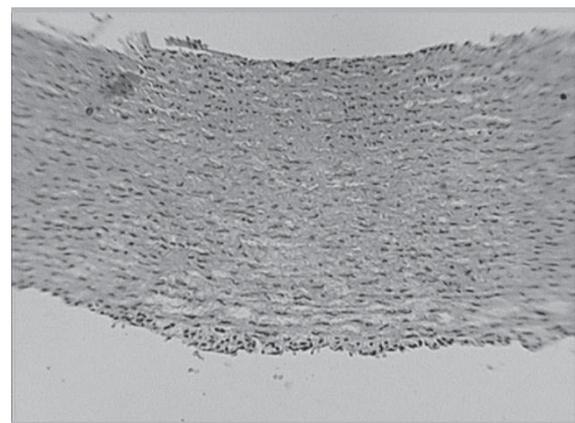


Figura 1. Lesión Tipo I, 100X en aorta de conejos del grupo 2, se observa un engrosamiento de la íntima arterial y aisladas células espumosas subendoteliales.

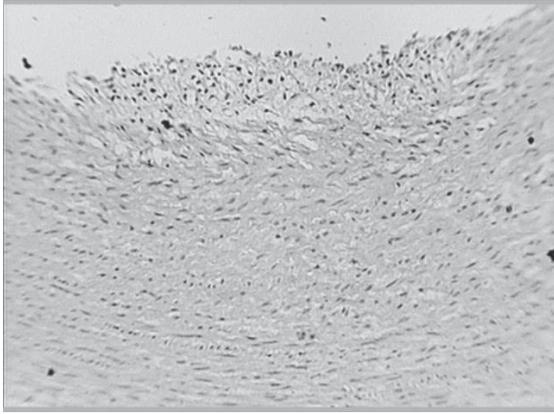


Figura 2. Lesión Tipo II, 100X en aorta de conejos del grupo 2, se observa en la íntima de la arteria cúmulos de lípidos intracelulares.

Discusión

El presente estudio se enfocó en determinar las concentraciones plasmáticas de MPO y PCR y su relación con la formación de ateromas en conejos machos Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica, en donde se observó que los conejos fueron semejantes entre sí en condiciones basales, pues no se detectaron diferencias significativas en el peso, perfil lipídico, MPO y PCR, reflejando ausencia de un proceso oxidativo e inflamatorio en los mismos. Asimismo, la MPO y PCR permanecieron sin cambios a lo largo del experimento en los conejos del grupo 1, lo cual indica ausencia de un estado oxidativo e inflamatorio en este grupo de conejos durante todo el estudio.

Por otra parte se pudo evidenciar que los conejos consumieron su dieta, ya que se observó un aumento significativo de sus pesos a lo largo del experimento, debido a que los mismos son conejos jóvenes que estaban en período de crecimiento; por lo que la falta de suficientes cantidades de alimento en sus dietas, les ocasionaría retraso en su crecimiento (24).

A partir de la 4ta semana los conejos del grupo 2 evidenciaron hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, tal como se ha reportado previamente (25), debido a la acumulación de lípidos exógenos provenientes de su dieta (26).

Asimismo se pudo corroborar que la dieta que consumieron los conejos del grupo 2, fue aterogénica; ya que los mismos exhibieron lesiones ateroscleróticas; sin embargo, las mismas fueron lesiones tempranas (tipo I y II), esto pudo ser debido a que la cantidad de dieta suministrada fue baja, y el tiempo de experimentación corto; por su parte los conejos del grupo 1 no desarrollaron lesión aterosclerótica, puesto que consumieron partes iguales de conejarina y vegetales; ya que la dieta

exclusiva de conejarina conlleva a la formación de ateromas, debido a los componentes presentes en el alimento para conejo (26).

Un hallazgo que nos ha llamado la atención es que a pesar de encontrar al final del estudio en el grupo 2 lesiones ateroscleróticas y un aumento en el perfil lipídico y PCR, no se observó cambios en los niveles de MPO. Por su parte, en un estudio en ratones deficientes en MPO a quienes se les administró una dieta alta en grasa y colesterol, se encontraron lesiones ateroscleróticas en el grupo tratado con la dieta lipídica con respecto al control (27). Por otra parte, otros estudios han encontrado que las concentraciones séricas de MPO sirven como predictor de disfunción endotelial en pacientes con enfermedad cardiovascular (15), y está asociado con la progresión de aterosclerosis en pacientes con c-HDL por debajo de 49 mg/dL (28). Asimismo en un estudio en ratones deficientes de receptor de LDL alimentados con una dieta alta en grasa, encontraron una marcada acumulación de MPO y neutrófilos en la placa, demostrando la presencia e importancia de los neutrófilos y MPO en la placa aterosclerótica en murinos (29). En vista de ello, indudablemente un estudio evaluando la MPO en la placa nos permitirá aclarar estos hallazgos.

En cuanto a los niveles de PCR, se encontró niveles elevados de esta molécula en el plasma del grupo 2 al final del estudio; indicando la existencia de un estado inflamatorio en el proceso aterosclerótico, este hallazgo sugiere la existencia de una relación entre los niveles séricos de PCR con la presencia de lesiones ateroscleróticas, ya que se ha encontrado que la PCR es un marcador asociado a inflamación y aterosclerosis (17-19). Este estado inflamatorio, fue inducido por la dieta hiperlipidémica que consumieron los conejos, ya que estudios en animales han demostrado que la hiperlipidemia conduce a un aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular y citoquinas, con la consecuente acumulación de monocitos en la íntima, promoviendo la aterosclerosis (30). Nuestros resultados son apoyados por otros estudios en donde se encontraron niveles elevados de PCR en pacientes con síndrome coronario agudo (30).

En conclusión, según nuestras condiciones experimentales la PCR plasmática es un marcador de inflamación y aterosclerosis. Por su parte el MPO plasmático no presentó cambios a lo largo del estudio.

Agradecimientos

El proyecto fue financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, de la Universidad de Carabobo. Agradecemos al Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo por facilitarnos las instalaciones para llevar a cabo el experimento. Y al Bioterio Central por su asistencia técnica.

Referencia

1. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 2008; 23(3):381-90.
2. Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Curr Diab Rep*. 2007; 7(4):257-64.
3. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de Mortalidad 2006. Dirección General de epidemiología. Dirección de información y estadísticas de salud.
4. Espondaburu O, Fara V, Ocampo L. El proceso aterogénico y su desarrollo en las enfermedades autoinmunes. *Acta Bioquím Clín Latinoamer* 2004; 38 (2).
5. Gutierrez J, Stoppani A. La Mieloperoxidasa como factor de daño oxidativo del miocardio: Inactivación de la dihidrolipoamida deshidrogenasa. *Medicina* 1998; 58; 171-178.
6. Panasenko O, Vakhrusheva T, Vlasova I, Chekanov A, Baranov Y, Sergienko V. Role of myeloperoxidase-mediated modification of human blood lipoproteins in atherosclerosis development. *Bull Exp Biol Med*. 2007;144 (3):428-31
7. Vargas M, Mendoza R, Fernández M, Fabián M, Gómez J. Incremento de la actividad de mieloperoxidasa plasmática en pacientes con asma asociada a diabetes mellitus tipo 2. indicador de mayor desequilibrio homeostático. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2006; 19 (3): 201-205.
8. Onel H, García M, Pereira N, Flores R. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 1998; 17(3):190-197
9. Bueno H, Bardají A, García-Moll X, Alonso J. Actualización en cardiopatía isquémica 2004 *Rev Esp Cardiol Supl*. 2005; 5:3A-12A.
10. Heinecke J. The role of myeloperoxidase in HDL oxidation and atherogenesis. *Curr Atheroscler Rep*. 2007;9 (4):249-51
11. Vaisar T, Shao B, Green P, Oda M, Oram J, Heinecke J. Myeloperoxidase and inflammatory proteins: pathways for generating dysfunctional high-density lipoprotein in humans. *Curr Atheroscler Rep*. 2007; 9 (5):417-24.
12. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 1999; 340: 448 – 54.
13. Volanakis J. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 2001; 38: 189-197.
14. Rattazzi M, Faggin E, Bertipaglia B, Pauletto P. Innate immunity and atherogenesis. *Lupus* 2005; 14, 747-751.
15. Vita J, Brennan M, Gokce N. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2004; 110:1134- 1139.
16. Düzgünçinar O, Yavuz B, Hazirolan T, Deniz A, Tokgözoğlu SL, Akata D, Demirpençe E. Plasma myeloperoxidase is related to the severity of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2008; 63(2):147-52.
17. Gotto A. Role of C-Reactive Protein in Coronary Risk Reduction: Focus on Primary Prevention. *Am J Cardiol* 2007; 99 (5): 718 – 725.
18. Inoue N. Vascular C – reactive protein in the pathogenesis of coronary artery disease: role of vascular inflammation and oxidative stress. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2006; 6 (4): 227 – 231.
19. De Ferranti S, Rifai N. C- reactive protein: a nontraditional serum marker of cardiovascular risk. *Cardiovasc Pathol* 2007; 16 (1): 14 – 21.
20. Speziale A. El Laboratorio Clínico y la evaluación del riesgo coronario. *Rev. Mex Patol Clin* 2000; 47: 202 – 218.
21. Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA
22. Luna L. The Histological Staining Manual. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 1968 Cap 1-4: 11-37. Editions McGraw-Hill. New York. USA.
23. Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. American Heart Association. *Circulation* 1995; 15: 1512 – 1531.
24. Patton N, Hagen K, Gorham J, Flatt R. Domestic Rabbits: Diseases and Parasites. 2000. A Pacific Northwest Extension Publication. Washington DC, USA.
25. Kolodgie F, Katocs A, Largis E, Wrenn J, Herderick E, Lee S, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1454 – 1464.
26. Bravo M, Armas F, Cabrera M, González J, Pelayo T, González D, Reigosa A. Administración parenteral de homocisteína y efecto del ácido fólico en la formación de ateromas en conejos. *Salus* 2002; 6: 23-29.
27. Brennan ML, Anderson MM, Shih DM. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest* 2001; 107: 419-430
28. Exner M, Minar E, Mlekusch W, Sabeti S, Amighi J, Lalouschek W, Maurer G, Bieglmayer C, Kieweg H, Wagner O, Schillinger M. Myeloperoxidase Predicts Progression of Carotid Stenosis in States of Low High-Density Lipoprotein Cholesterol. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 2212- 2218.
29. Van Leeuwen M, Gijbels M, Duijvestijn A, Smook M, Van de Gaar M, Heeringa P, de Winther M, Tervaert J. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(1):84-89.
30. Tziakas D, Chalikia G, Kaski J, Kekes A, Hatzinikolaou E, Stakos D, Tentes I, Kortsaris A, Hatseras D. Inflammatory and anti inflammatory variable clusters and risk prediction in acute coronary syndrome patients: A factor analysis approach. *Atherosclerosis* 2007; 193: 196 – 203.



Utilidad del Tripolifosfato de Sodio en la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh en escolares

González Maczy, Castillo Yuliana, Fernández Diana, González Maria E., Quintero Maribel, Rangel Lisbeth, Nava Mariángel, Villasmil Jessica

RESUMEN

Los grupos sanguíneos son cada uno de los diversos tipos en que se han clasificado la sangre humana, basado en los componentes antigénicos presentes en la membrana de los glóbulos rojos, la sangre posee características específicas entre ellas la presencia o no del antígeno D (factor Rh), que es una proteína que se encuentra en la superficie del glóbulo rojo. El objetivo es determinar la utilidad del Tripolifosfato de Sodio (TPF) en la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh en escolares. El universo de estudio estuvo conformado por un grupo de 100 escolares mayores de 12 años, de ambos sexos a los cuales se les determinó el grupo sanguíneo y factor Rh por el método de aglutinación en tubo. Se obtuvo un 100% de correlación en ambas determinaciones (con TPF y sin anticoagulante) por lo que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas con una ($p < 0,00001$). El TPF puede ser recomendado como un anticoagulante para la realización de grupo sanguíneo, factor Rh y otras pruebas hematológicas, y para proyectar su eficacia como alternativa útil sustitutiva de otros de mayor costo convirtiéndose en un anticoagulante universal y único.

Palabras clave: Anticoagulante, TPF, grupos sanguíneos, factor Rh.

Usefulness of Sodium Tripoliphosphate in the classification of blood types and the Rh factor in school children

SUMMARY

The blood types are each of the diverse groups into human blood cells, has been classified based on the antigenic components present in the red cells membrane, blood possesses specific characteristics, among them the presence or not of the antigen D (Rh factor), which is a protein found on the surface of the red cell. To determine the usefulness of (TPF) in the classification of blood types and the Rh factor in school children. The sample was made up of a group of 100 school children over 12 years of age, of both sexes, whose blood type and Rh factor were determined for the tube agglutination method. 100 % correlation was obtained in both determinations (with TPF and without anticoagulant) therefore no statistically meaningful differences were found with a ($p < 0,00001$). The TPF maybe recommended as an anticoagulant for the determination of the blood type, Rh factor, and other haematological tests, and to suggest its efficient as a useful alternative to other, more expensive methods, becoming a unique and universal anticoagulant.

Key words: Anticoagulant, TPF, blood groups, factor Rh.

Introducción

Los Antígenos del grupo sanguíneo son estructuras proteicas o de carbohidratos, polimórficos y heredados localizados en la superficie extracelular de la membrana del glóbulo rojo. Son reconocidos por anticuerpos que se producen en individuos antígenos negativos después de la exposición a glóbulos rojos de antígenos positivos a través de la transfusión y embarazo. La producción de anticuerpos contra los grupos sanguíneos va a conducir a la identificación de numerosos antígenos y fenotipos que incluyen los fenotipos nulos Mas de 250 antígenos se conocen los que han sido asignados a 29 sistemas de grupos sanguíneos, cada uno de ellos esta decodificado por genes o familias de genes discretamente organizados, que se encuentran ligados o asociados, los cuales han sido reconocidos por la Sociedad Internacional para Transfusión Sanguínea (ISBT) (1).

El Tripolifosfato de sodio es ampliamente utilizado en la industria cárnica por sus benéficas funciones, siendo óptimo para la retención de agua y estabilizador de las emulsiones (2,3).

Actualmente, el tripolifosfato de sodio ha sido empleado como anticoagulante en sangre de diferentes especies (aves, cerdo y bovino) para la obtención de plasma animal, el cual es posteriormente utilizado para la elaboración de ciertos productos alimenticios tales como galletas, embutidos, etc. (4-7). Rangel y colaboradores, señalaron que debido al carácter altamente negativo, el tripolifosfato de sodio al reaccionar con el calcio, impide que este catión divalente intervenga en el proceso de coagulación de la sangre, pudiendo ser ésta una de las razones que explican el eficiente efecto que ejerce este aditivo alimentario como anticoagulante en la sangre animal (8).

En investigaciones realizadas por Rangel y Saldivia en el 2005, se evaluó el efecto del TPF como anticoagulante sobre parámetros hematológicos de rutina. En este estudio se demostró que el TPF puede ser utilizado como anticoagulante en sangre humana a concentraciones igual o mayores al 3%, obteniéndose valores similares en los siguientes parámetros hematológicos de rutina cuando se compara con el EDTA-Na₂: hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos, recuento plaquetario, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media; demostrándose también que no produce alteración morfológica de la imagen roja, imagen planetaria, ni distorsión de los leucocitos (9).

En otro estudio llevado a cabo por Andrade y cols. al principio del 2007 se evaluó el efecto del TPF como anticoagulante sobre las principales pruebas que se realizan en el laboratorio

de bioquímica clínica. En esta investigación se encontró que la mayoría de los parámetros químicos analizados al ser comparados con EDTA y heparina no mostraron mayores diferencias, sin embargo, en las determinaciones de colesterol total, calcio y sodio de las muestras tratadas con TPF se evidencio diferencias significativas en relación al control (10).

Con la presente investigación, se continúa el estudio del TPF como anticoagulante en el laboratorio clínico, específicamente en el área de inmunohematología, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del tripolifosfato de sodio como anticoagulante sobre la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh.

Métodos

La presente investigación es de tipo descriptiva, ya que se determinaron los grupos sanguíneos y factor Rh en escolares verificando mediante análisis la utilidad de una sustancia anticoagulante como el tripolifosfato de sodio (TPF). Una investigación descriptiva consiste en caracterizar hechos, fenómenos o grupos, con la finalidad de establecer su estructura y comportamiento (11).

Población

La población a estudiar estuvo conformada por 100 escolares mayores de 12-18 años, de ambos sexos, pertenecientes a la Unidad Educativa Carlos Luis Andrade de la parroquia Francisco Ochoa del Municipio San Francisco en el Estado Zulia, lo cuales fueron sometidos a la venopunción para la obtención de muestras sanguíneas contando con la autorización por escrito de sus padres y representantes.

Inicialmente antes de comenzar la investigación se procedió a la preparación del anticoagulante (TPF) a una concentración de 5%, concentración óptima para realizar las determinaciones deseadas, luego de su preparación se llevaron a cabo los ensayos necesarios para la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh.

Preparación del anticoagulante

Para la preparación del anticoagulante se empleó sales de tripolifosfato de sodio en polvo, con un grado de pureza de 99%, el cual fue facilitado por el servicio de hematología del Hospital Central de Maracaibo "Dr. Urquinaona" y por la empresa Food-Tech de Venezuela C.A.

Se pesaron 5g de tripolifosfato de sodio en polvo, en una balanza analítica marca Mettler modelo AE-200 y se colocaron posteriormente en balones aforado de 100mL de capacidad, se enrasó con agua destilada y desionizada, con la finalidad de preparar una solución del anticoagulante a una concentración del 5% (12).

Utilidad del Tripolifosfato de Sodio en la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh en escolares

Consecutivamente, se midieron 0,1mL (100µl) del anticoagulante con una micropipeta digital marca Socorres, y se colocaron en tubos de ensayo de 13 x 75, químicamente limpios, los mismos seguidamente fueron rotulados con el nombre y concentración respectiva del anticoagulante, guardados y almacenados a temperatura ambiente (12).

Determinación de grupos sanguíneo y factor Rh

Toma de la muestra y determinación de grupos sanguíneos y factor Rh.

A cada escolar se le extrajo un total de 5mL de sangre por venopunción, la misma fue dividida en dos alícuotas, la primera de 4mL fue dispensada en un tubo que contienen 100µL de tripolifosfato de sodio (el cual fue preparado inicialmente), e inmediatamente mezclada, y el resto de la muestra que corresponde a una alícuota de 1mL fue colocada en un tubo de sin anticoagulante.

Seguidamente se procedió a realizar las determinaciones pertinentes para la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh, siguiendo con los lineamientos establecidos según el método de aglutinación directa en tubo, el cual se basa en una reacción antígeno anticuerpo en el que se investigan aglutinógenos o antígenos del sistema ABO y factor Rh de los glóbulos rojos, que reacciona en presencia del suero correspondiente (Anti-A, Anti-B ó Anti-AB), originando una malla o botón, cuya presencia define el tipo de sistema y factor Rh respectivo.

Reactivos utilizados

Kit de reactivos para la determinación de grupos sanguíneos (ABO) y factor Rh por aglutinación del laboratorio Immunolab.

Procedimiento: Prueba de aglutinación directa en tubo.

Para poner en práctica la técnica se cumplieron debidamente con todos pasos a seguir para cada paciente.

Se tomaron ambos tubos (alícuota con anticoagulante: TPF 5% y alícuota sin anticoagulante).

Del tubo sin anticoagulante, se separó el coágulo y se colocó en otro tubo seco para romperlo, y se lavó el sobrenadante tres veces con solución salina fisiológica al 0,85% centrifugando a máxima revolución por cinco minutos las dos primeras y la última a igual revolución pero por diez minutos, luego de cada lavado se descartó el sobrenadante con el objeto de que este quede transparente al finalizar los tres ciclos de lavado de glóbulos rojos.

Del tubo con TPF al 5% se tomaron 2ml y se colocaron en otro tubo seco y se procedió al lavado de los glóbulos rojos de la manera anteriormente descrita.

Posterior a los lavados de ambos tubos se preparó una dilución 1:5 de cada uno; tomando una gota de glóbulos rojos lavados más cuatro gotas de solución salina fisiológica al 0,85%.

Subsiguientemente se procedió a rotular ocho tubos de la siguiente manera: cuatro tubos para alícuotas obtenidas sin anticoagulantes: A, B, AB, D y cuatro tubos para alícuotas obtenidas con anticoagulante (TPF 5%):A,B, AB,D.

Luego se agregó a cada tubo una gota de la dilución 1:5 correspondientemente, más una gota del reactivo respectivo.

A los tubos rotulados como A se les agregó el reactivo anti-A, a los tubos rotulados como B el reactivo anti-B, a los tubos rotulados como AB el reactivo anti-AB y a los tubos rotulados como D el reactivo anti-D.

Los ocho tubos se deben centrifugar por dos minutos a baja revolución por un tiempo de un minuto para luego realizar la lectura con ayuda de una lámpara de Wiener (13).

a. Lectura e interpretación del Sistema ABO:

- No hay aglutinación: Grupo O.
- Aglutinación en todos: Grupo AB.
- Aglutinación en A y AB: Grupo A.
- Aglutinación en B y AB: Grupo B.

b. Lectura e interpretación del Sistema Rh:

- Aglutinación: Rh (D) positivo
- No Aglutinación ó débil positivo: Debe practicarse la prueba de la variante D y luego reportar en caso de que sea negativo Rh Negativo, que no es más que la prueba de Coombs indirecta (prueba confirmatoria); basada en la determinación de anticuerpos incompletos (IgG) circulantes en el suero del paciente, previa fase de sensibilización de los glóbulos rojos (glóbulos rojos con un antígeno específico) con los anticuerpos incompletos, dicha reacción se pone de manifiesto de forma macroscópica mediante la adición del suero de Coombs. Procedimiento: Prueba de Coombs indirecta; una vez finalizado la investigación del Rh (D), si este es negativo ó débil positivo, se debe descartar la presencia de la variante D, para lo cual no se descarta el tubo donde se llevó a cabo la investigación del antígeno Rh (D) el mismo se llevó a incubar a 37° C en baño de María por 15 a 30 minutos, luego se lavaron por tres veces con suero fisiológico, al finalizar los lavados se descartó el sobrenadante. Al sedimento que quedó se le añadió de una a dos gotas de suero de Coombs. Mezclar.

Centrifugar durante uno a dos minutos a baja revolución. Se leyó con ayuda de una lámpara de Wiener.



Utilidad del Tripolifosfato de Sodio en la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh en escolares

Lectura e interpretación: aglutinación; D positivo = Rh (+), no aglutinación; D negativo = Rh (-) (22).

Métodos estadísticos

En el análisis estadístico para evaluar el efecto del TPF en la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh se empleó el test de correlación de Spearman para obtener la concordancia la cual fue de un 100% entre las muestras anticoaguladas con TPF y las tomadas sin anticoagulante, siendo el coeficiente de correlación $(r) = +1$ con una $p < 0,00001$; además se determinó la sensibilidad del método la cual fue de un 99% y la especificidad siendo esta de 98% (14,15).

Resultados

En Figura 1 se ilustran los resultados obtenidos al procesar las muestras tratadas sin anticoagulante y con TPF, obteniéndose una concordancia del 100% en ambas determinaciones.

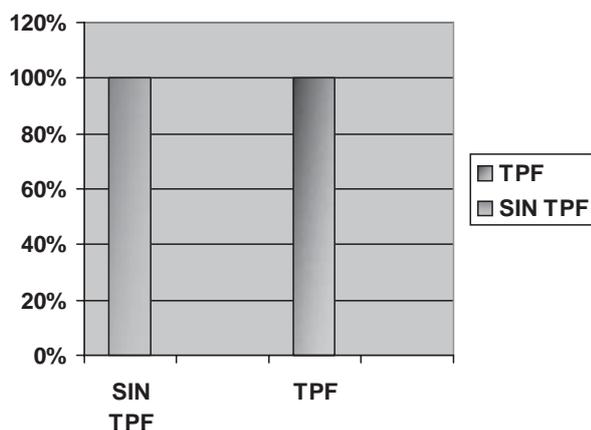


Figura 1. Resultados de muestras analizadas.

En la Figura 2 se muestra que el método utilizado para estas determinaciones tuvo un sensibilidad del 99% y una especificidad del 98%.

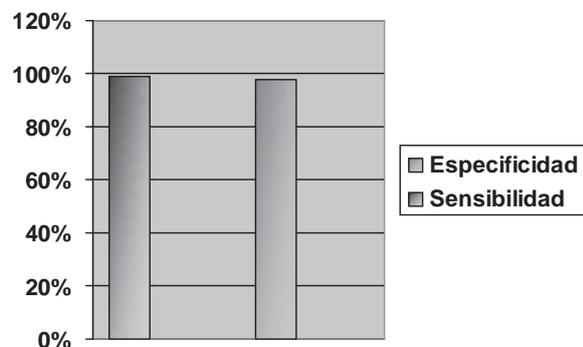


Figura 2. Sensibilidad y especificidad del método.

Estos resultados indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,00001$), para la determinación de grupo sanguíneo y factor Rh de muestras tratadas sin anticoagulante y TPF sin anticoagulante y TPF.

Discusión

Menssen y colaboradores en el 2001, midieron el efecto de la Hirudina como anticoagulante universal en hematología, química clínica y tipaje de grupo sanguíneo; obteniendo como resultado que los contajes de sangre completa, test de bioquímica, inmunológicos y de compatibilidad realizados a partir de sangre con Hirudina y sangre sin anticoagulante arrojaron resultados idénticos. Los factores de la coagulación, pero no los analitos globales de la coagulación podrían ser medidos a partir de sangre con Hirudina (16). Dichos resultados coinciden con los obtenidos en nuestra investigación donde se determinó grupo sanguíneo y factor Rh con TPF y sin anticoagulante, obteniéndose resultados idénticos en ambas determinaciones.

A pesar de la gran cantidad de estudios que se han realizado hasta ahora, tratando de encontrar un anticoagulante que cumpla con todos los requisitos necesarios para sustituir al EDTA, este sigue siendo el anticoagulante de elección dentro del campo de la hematología clínica, posiblemente la razón sea que los compuestos estudiados anteriormente, aunque dan resultados similares, presentan ciertas limitaciones, entre ellas, su costo superior al EDTA.

El bajo costo del TPF y la similitud con el EDTA en su mecanismo de acción como anticoagulante, podría hacer de este compuesto un sustituto del EDTA en la obtención de muestras sanguíneas para la determinación de los parámetros hematológicos de rutina, incluyendo el tipaje de grupo sanguíneo y factor Rh; pudiendo representar una alternativa para aquellos laboratorios rurales, ambulatorios, hospitales, etc., donde el presupuesto gubernamental es limitado.

Además, Rángel en el 2005, demostró la utilidad que tiene el TPF para la determinación de los parámetros hematológicos de rutina, (9) lo que confirma que existe la ventaja de que con el mismo tubo utilizado para hematología completa se puede posteriormente, realizar la tipificación de grupo sanguíneo y factor Rh.

Por lo que es necesario continuar realizando nuevos estudios para evaluar el comportamiento del TPF en otros parámetros de laboratorio, ya que este pudiera ser el anticoagulante universal que tanto se ha buscado para ser empleado en un futuro para la obtención de muestras de sangre con múltiples propósitos en el laboratorio clínico.

Utilidad del Tripolifosfato de Sodio en la tipificación de grupos sanguíneos y factor Rh en escolares

Referencias

1. Marion E. Reid, Narla Mohandas. Red Blood Cell Blood Group Antigens: Structure and Function. *Seminars in Hematology* 2004; 41(2):93-117.
2. Henson, L. La solubilidad de los fosfatos. *Revista Carne Tec.* 1997;4 (2):30-31.
3. Tapias G, López J. Aditivos de uso en procesamiento de carnes (Documento en línea) Disponible: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap03/cap03_04.html. 2005.
4. Benítez B, Archile A, Rancel L, Bracho B, Hernández M, Márquez E. Calidad nutricional y aceptabilidad de un producto formulado con carne de pollo deshuesada mecánicamente, plasma y glóbulos rojos de bovino. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 2000;52 (3):307-311.
5. Benítez B, Márquez E, Barboza Y, Izquierdo P, Arias B. Formulación y características de productos carnicol elaborados con sub productos de la industria animal. *Revista científica. Facultad de Ciencias Veterinarias – LUZ.* 2000;Vol. 10.
6. Márquez E, Barboza Y, Izquierdo P, Torres G. Studies on the incorporation of bovine plasma in emulsiotype of meat product". *Journal of food science and technology.* 1997;34 (4):337-339.
7. Márquez E, Benítez B, Méndez N, Rangel L, Mendoza I, Venencia I, Izquierdo P, Romero R, Castejon H. Características nutricionales de una galleta formulada con plasma sanguíneo de bovino como principal fuente proteica. *Archivos Latinoamericanos de nutrición.* 1998;48(3):250-255.
8. Rangel L, Archile A, Castejón O, Izquierdo P, Márquez E. Utilización del tripolifosfato de sodio como anticoagulante y su efecto sobre las propiedades emulsificantes del plasma sanguíneo animal. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ.* 1995;5 (2):111-116
9. Rangel L. Evaluación de un nuevo anticoagulante para pruebas hematológicas de rutina. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor asociado de la Universidad del Zulia. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, La Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia 2005. 84p.
10. Andrade Juandrys, Peña Joslarca, Siu Juleiny. Efecto del Tripolifosfato de Sodio como anticoagulante sobre los parámetros bioquímicos. Trabajo especial de grado para optar al título de Licenciados en Bioanálisis. La Universidad del Zulia. Maracaibo. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. Estado Zulia. República Bolivariana de Venezuela. 2007;51p.
11. Arias Fidia. Proyecto de investigación. 3^{era} edición. Caracas. Venezuela. Editorial Episteme 1999; p120.
12. Rangel L, Archile A, Castejón O, Izquierdo P, Márquez E. Utilización del tripolifosfato de sodio como anticoagulante y su efecto sobre las propiedades emulsificantes del plasma sanguíneo animal. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ.* 1995;5 (2): 111-116.
13. Vives J, Aguilar J. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. Barcelona-España, Salvat Editores S.A 1997; 4-19.
14. J Susan Milton. "Estadística para Biología y Ciencias de la Salud". Aravaca-Madrid, Editorial Interamericana Mc-Graw-Hill. 2001; 496-497.
15. Milton Tsokos. Estadística para Biología y Ciencias de la Salud. Madrid-España, Editorial Interamericana Mc-Graw-Hill. 1987;351-388.
16. Hans D Menssen, Kart Melber, Natascha Brandt and Eckhard Thiefl. The Use of Hirudin as Universal Anticoagulant in Haematology, Clinical Chemistry and Blood Grouping. 2007;1267-1277.

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

Yeqres Sorana¹, Rosales Maribel², Acosta Cecilio², Carrera Arelis²

RESUMEN

Debido a la ausencia de publicaciones de trabajos de investigación venezolanos sobre valores de referencia de los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática en población infantil sana, los profesionales del área de la salud se basan en su propia experiencia y en la de sus colegas, para interpretar los resultados de estas pruebas o simplemente utilizan los valores establecidos para las casas comerciales o los de la literatura internacional; los cuales no son adecuados, porque pertenecen a poblaciones de otros países en donde existen condiciones ambientales, dieta, estilo de vida, entre otros factores, diferentes a los de nuestra región, y en su mayoría corresponden a adultos. Por lo que se propuso establecer los valores de referencia de los niveles séricos de la albúmina, bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta y de la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, gamma glutamiltransferasa y fosfatasa alcalina en la población infantil sana del municipio Sucre, estado Sucre y compararlos con los valores de referencia establecidos para la casa comercial de los reactivos utilizados (Olympus Diagnostica), cuantificando cada uno de estos parámetros, en sueros de 486 niños, con edades entre los 3–11 años, clasificados según la edad y sexo para determinar el efecto y la interacción de éstos dos factores a través de un análisis de varianza de dos vías y una prueba *a posteriori*, el cálculo de los intervalos de referencia se realizó mediante los percentiles 2,5 y 97,5. Encontrando que para establecer los valores de referencia para los niveles séricos de albúmina, bilirrubina total, directa e indirecta se consideró solo la variable edad; mientras que para los valores de referencia de la aspartato aminotransferasa y la fosfatasa alcalina fueron consideradas las dos variables (edad y sexo), y en el caso de la alanina aminotransferasa y gamma glutamiltransferasa no se consideraron las variables edad y sexo. Concluyendo que los valores de referencia establecidos difieren de los recomendados por Olympus Diagnostica, lo que se demuestra, la importancia de que cada laboratorio debe establecer sus propios valores de referencia.

Palabras clave: Parámetros bioquímicos, función hepática.

Reference values for the biochemical parameters that evaluate the hepatic function in healthy infantile population

SUMMARY

Due to absence of publications in Venezuela of investigation paperwork on reference values of biochemical parameters that evaluate the hepatic function in infantile healthy population, the health professionals base on their own experience and on his colleagues, to interpret the results of these tests, simply there use the values established by the business firms or those found on the international literature, which are not adapted, because they belong to populations of other countries where there exist environmental conditions, diet, way of life, among other factors, different from those of our region, and mainly they correspond to adults. Because of this, it was proposed to establish the reference values of the serum levels of the albumin, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin and of the enzymatic activity alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma glutamyltransferase and alkaline phosphatase in the infantile healthy population of the Sucre municipality at Sucre State and compare them with the established reference values of the business firm of the used reagents (Olympus Diagnostic), quantifying each of these parameters, in 486 children's serum, with ages between 3-11 years classified according to the age and sex to determine the effect and the interaction of these two factors through a analysis of variance of two lines and a posteriori tests, the calculation of the intervals of reference fulfilled by means of the percentiles 2,5 and 97,5. Finding that, to establish the values of reference of the serum levels of albumin, total, direct and indirect bilirubin was considered only the age variable; whereas for the reference values of the aspartate aminotransferase were considered both variables (age and sex), and in the case of alanine aminotransferasa and gamma glutamyltransferasa age and sex were not considered. Concluding that the established reference values differ from the recommended ones by Olympus Diagnostica, which demonstrate the importance why every laboratory must establish its own reference values.

Key words: Biochemical parameters, hepatic function.

1. Universidad de Oriente, Departamento de Bioanálisis, Núcleo Sucre.

2. Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Cumaná-Venezuela. Email: soryeg@gmail.com.

Introducción

Durante la etapa de crecimiento normal (niñez), los valores de referencia de los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, entre otros, se ven fisiológicamente afectados; es decir éstos difieren de los valores obtenidos en poblaciones de referencia de adultos (1-3).

Estas alteraciones se deben a que la principal función de la hormona de crecimiento (GH) es promover la síntesis proteica y la replicación celular, siendo un potente agente anabólico y citogénico, aumentando el crecimiento esquelético, muscular y visceral, y a nivel hepático estimulando la síntesis de proteínas y la utilización de ácidos grasos. Lo que se traduce en un aumento de la tasa metabólica y por ende de los niveles de actividad de muchas enzimas (4-6).

Durán-Chávez y cols. (7), en un estudio realizado en una población infantil sana, encontraron que el 50% de los niños presentaron niveles elevados de las enzimas ALT y AST, respecto a los valores que se consideran normales en adultos. Mientras, que los niveles de actividad de la enzima GGT dependen de la edad en la población infantil (8).

En cuanto a los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina, son varios los estudios realizados que demuestran que esta enzima presenta una tendencia significativa al incremento conforme aumenta la edad en la población pediátrica y en todos los casos, su valor supera en más del doble a los valores de referencia obtenidos en la población adulta (9-11).

Por su parte Dufour (3) y Siest y cols. (12) recomiendan tener límites de referencia para los niveles séricos de albúmina, bilirrubina total y de los niveles de actividad de las enzimas hepáticas ALT, AST, GGT y ALP adecuados para la población infantil, debido a que estos parámetros varían con la edad en la población menor de 25 años.

El interés clínico de estos parámetros bioquímicos radica en que bajo condiciones patológicas, niveles elevados pueden señalar la presencia de diversas enfermedades hepáticas o hepatobiliares (1,13). Aún más recientemente, se están empleando los niveles de actividad de las enzimas ALT, AST y GGT para medir el riesgo de enfermedades hepáticas no alcohólicas en niños obesos (14-16).

Pero a fin de determinar que una enfermedad hepática o hepatobiliar de este tipo, esta presente o no, es imprescindible comparar los valores obtenidos en el paciente con los que teóricamente le corresponden a un niño sano (3). Si no se cuenta con un rango de referencia frente al cual establecer comparaciones, por razones fisiológicas en los niños, el análisis de laboratorio pierde su real importancia (5).

La Federación Internacional de Química Clínica: IFCC (17), recomienda que los valores de referencia que se empleen sean obtenidos en el mismo laboratorio que está realizando los análisis, ya que estos valores varían según los diferentes criterios de selección de las poblaciones de referencia, región geográfica, exposición ambiental, nivel de entrenamiento, estado nutricional, nivel socioeconómico y diferencias metodológicas en cuanto a la realización de la prueba (equipo, procedimiento) así como al analista.

Gómez y cols. (18) indican, que los valores de referencia reportados por las casas comerciales no son recientes por lo que no se puede asegurar que algunos de estos no se hayan modificado. En el caso de los niveles de actividad de las enzimas ALT, AST y GGT, estudios recientes han demostrado que estos están fuertemente asociados con el índice de masa corporal, los lípidos séricos y la glucosa plasmática, lo que implica que los individuos con una excesiva masa grasa deberían ser excluidos de la población de referencia (16,19).

En base a lo anteriormente expuesto y a que no se dispone de valores de referencia de los niveles séricos de albúmina, bilirrubina total y fraccionada y de actividad enzimática de la alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, gamma glutamiltransferasa y fosfatasa alcalina para la población pediátrica de la ciudad de Cumaná, se propuso el presente estudio cuyo principal objetivo fue establecer los valores de referencia para los niveles séricos de cada uno de estos parámetros en una población de niños sanos de la ciudad de Cumaná - estado Sucre, Venezuela y compararlos con los valores de referencia establecidos para la casa comercial de los reactivos utilizados.

Materiales y métodos

Población en estudio

La presente investigación se elaboró sobre la base de un estudio cuantitativo, que incluyó a un grupo de 535 niños sanos (265 femeninos y 270 masculinos), con edades comprendidas entre 3 y 11 años, seleccionados al azar de la población infantil de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, durante los meses noviembre 2005 - noviembre 2007.

Condición de paciente sano

Se incluyeron niños con peso y talla adecuados para su edad, empleando los puntos de corte de la Organización Mundial de la Salud (20), los cuales no deberían estar recibiendo ningún tratamiento médico, ni presentar síntomas o signos de alguna enfermedad aparente, se les realizó un estudio hematológico y una exploración física, por parte de un médico pediatra, para descartar cualquier infección aguda no diagnosticada. Los pacientes el día de la extracción de la muestra de sangre debían tener un ayuno de 10 a 12 horas.

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

Normas de bioética

Este estudio se realizó bajo las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki ratificada por la 29th World Medical Assembly, Tokio 1995 (21). Previa información de los objetivos y alcances del estudio, se les solicitó una autorización por escrito a cada uno de los padres y representantes para la inclusión de sus representados en este estudio, las cuales se conservan en archivo.

Obtención de las muestras

A cada uno de los niños se le extrajo una muestra de sangre periférica por punción venosa, las cuales fueron colocadas en tubos de ensayo de vidrio, dejándolas coagular espontáneamente. Posteriormente, se centrifugaron a 3 000 rpm por 10 minutos, para la obtención de los respectivos sueros (máximo 30 minutos después de las extracciones de las muestras), los cuales fueron inmediatamente procesados. Se excluyeron los sueros que presentaron hemólisis y/o lipemia.

En el momento de la extracción de la muestra de sangre, los niños fueron pesados en una balanza de pie y medidos, mediante el uso de una cinta métrica fijada a la pared, en posición de pie, de espalda a la cinta métrica, sin zapatos con ambos talones juntos y las rodillas estiradas, la cabeza colocada en plano de Frankfort y los hombros relajados (20).

Métodos utilizados en las determinaciones analíticas

Para la determinación de los niveles séricos de albúmina, bilirrubina total y fraccionada, así como para la actividad enzimática de la AST, ALT, GGT y ALP se utilizó el equipo Olympus AU 600 automatizado, perteneciente (en comodato) al Laboratorio General del SAHUAPA, principal centro de asistencia médica de la ciudad de Cumaná.

El equipo fue calibrado diariamente a través de un coeficiente de "extinción" teórico específico para cada enzima y para el control de calidad de los resultados, se utilizaron diariamente controles nivel normal y nivel anormal marca Olympus (ODC0003/ODC0004), verificando siempre que los valores obtenidos entraran dentro del rango establecido, para cada uno de ellos, por Olympus Diagnostica.

Para la cuantificación de todos los parámetros estudiados se utilizaron los reactivos de la casa comercial Olympus Diagnostica; en el caso particular de las enzimas, las determinaciones se realizaron a una temperatura de 37 °C y a pH de: 7,15 ALT (EC 2.6.1.2), 7,65 AST (EC 2.6.1.1), 7,95 GGT (EC 2.3.2.2) y 10,4 ALP (EC 3.1.3.1).

Análisis estadístico

Los niños se clasificaron según la edad y sexo. Luego, se determinó el posible efecto del sexo y la edad sobre los niveles

séricos de cada uno de los parámetros estudiados y si existía algún tipo de interacción entre estas dos variables, a través de un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con interacción, el cual fue seguido de una prueba *a posteriori* SNK al 95% (22). El cálculo de los intervalos de referencia se realizó utilizando los percentiles 2,5 y 97,5 (17).

El paquete estadístico empleado fue el statgraphics plus.

Resultados

De los 535 niños seleccionados al azar, sólo pudieron ser incluidos en el estudio 486 (Tabla 1), siendo las principales causas de exclusión: infecciones diagnosticadas mediante exploración física y/o pruebas hematológicas, obesidad y suero lipémico.

Tabla 1. Distribución absoluta y porcentual de la población de referencia, según la edad y el sexo.

Edad (años)	Mascullinos		Femeninos		Total	
	N	%	N	%	N	%
3	27	5,56	27	5,56	54	11,1
4	27	5,56	27	5,56	54	11,1
5	27	5,56	27	5,56	54	11,1
6	27	5,56	27	5,56	54	11,1
7	27	5,56	27	5,56	54	11,1
8	27	5,56	27	5,56	54	11,1
9	27	5,56	26	5,35	53	10,8
10	27	5,56	28	5,76	55	11,3
11	27	5,56	27	5,56	54	11,1
Total	243	50,0	243	50,0	486	100

El análisis estadísticos de los resultados de los niveles de albúmina (Figura 1 y 2) y de la bilirrubina total (Figura 3 y 4) y fraccionada (Figura 5 y 6) indican que existen diferencias estadísticas altamente significativas respecto a la edad, más no según el sexo; encontrando que los valores aumentan gradualmente con la edad. En el caso de la bilirrubina directa, aunque no hay diferencias estadísticas respecto al sexo, se observó una interacción significativa entre la edad y este factor.

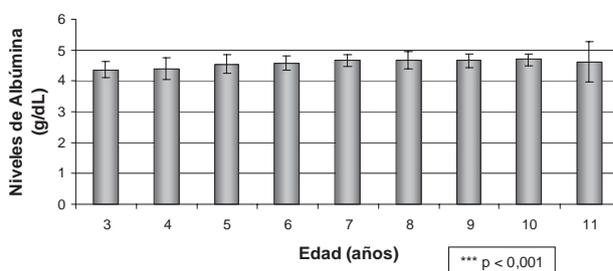


Figura 1. Valores promedio de los niveles séricos de albúmina (g/dL) por edad en niños sanos de Cumaná.

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

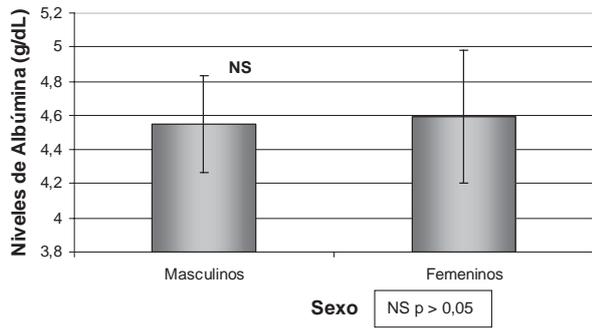


Figura 2. Valores promedio de los niveles séricos de albúmina (g/dL) por sexo en niños sanos de Cumaná.

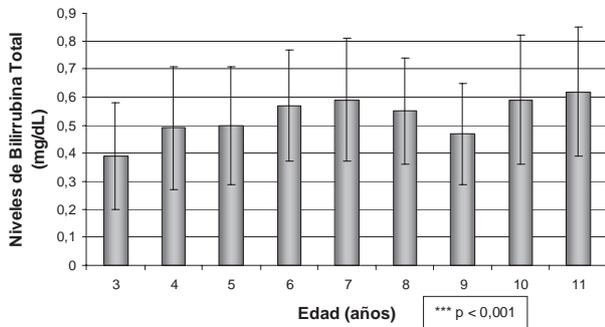


Figura 3. Valores promedio de los niveles séricos de bilirrubina total (mg/dL) por edad en niños sanos de Cumaná.

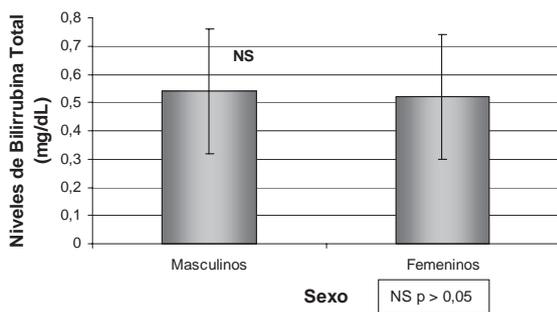


Figura 4. Valores promedio de los niveles séricos de bilirrubina total (mg/dL) por sexo en niños sanos de Cumaná.

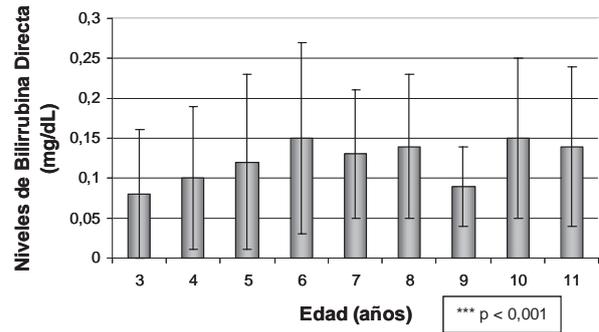


Figura 5. Valores promedio de los niveles séricos de bilirrubina directa (mg/dL) por edad en niños sanos de Cumaná.

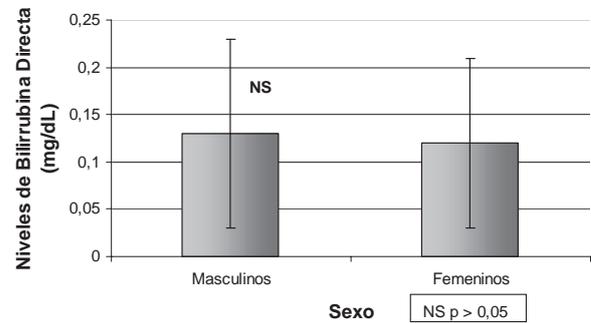


Figura 6. Valores promedio de los niveles séricos de bilirrubina directa (mg/dL) por sexo en niños sanos de Cumaná.

Los valores de referencia establecidos para los niveles séricos de albúmina, aunque dependen de la edad entran dentro de los límites de referencia establecidos para Olympus Diagnostica; mientras, que el límite superior de los valores de referencia establecidos, en el caso de la bilirrubina total y directa son más elevados que el de los valores de referencia de la casa comercial (Tabla 2).

Los resultados del análisis estadístico de los niveles de actividad de la enzima AST (Figura 7 y 8), indicaron que hubo un efecto diferencial altamente significativo entre los niveles de actividad respecto a la edad y muy significativo al sexo, observándose los valores más bajos a los 10 años y los más altos a los 4 años; siendo éstos más bajos en las niñas respecto a los de los niños.

Los límites superiores de los valores referencia para los niveles de actividad de la enzima AST, según la edad y el sexo de la población de referencia, se ubican por encima del límite superior de referencia de la casa comercial (Tabla 2). Al analizar, individualmente los niveles obtenidos en cada niño, se encontró que 176 (42,9%) niños presentaron niveles de actividad enzimática por encima de la media de los valores de referencia de Olympus Diagnostica, de los cuales 24 (13,6%) tenían niveles elevados (> 39 U/L).

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

Tabla 2. Comparación de los valores de referencia establecidos, para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en la población infantil del municipio Sucre, estado Sucre con los valores recomendados por Olympus Diagnóstica.

Analito	Edad (años)	Sexo	Valores de referencia establecidos	Valores de referencia olympus diagnostica
Albúmina (g/dL)	3 - 4	A	3,8 - 4,8	3,5 - 5,7
	5 - 11	A	3,9 - 5,1	
	Adultos*	A		
Bilirrubina total (mg/dL)	3	A	0,2 - 0,6	0,3 - 1,0
	4 - 10	A	0,3 - 1,1	
	11	A	0,4 - 1,4	
	Adultos*	A		
Bilirrubina Directa (mg/dL)	3	A	0 - 0,3	0,03 - 0,18
	4,5,7,9	A	0 - 0,5	
	6,8,10,11	A	0,1 - 0,4	
	Adultos*	A		
Bilirrubina Indirecta (mg/dL)	3	A	0,1 - 0,6	
	4 - 10	A	0,2 - 1,0	
	11	A	0,3 - 0,9	
AST (U/L)	3 - 4	M	24 - 45	13 - 39
		F	17 - 60	
	5 - 11	M	18 - 41	
		F	16 - 42	
Adultos*	A			
	3 - 11	A	16 - 42	7 - 52
Adultos*	A			
GGT (U/L)	3 - 11	A	7 - 26	9 - 64
Adultos*	A			
ALP (U/L)	3 - 6	M	145 - 341	34 - 104
		F	132 - 298	
	7 - 9	M	159 - 334	
		F	136 - 353	
	10 - 11	M	156 - 345	
		F	94 - 489	
Adultos*	A			

M: masculinos; F: femeninos; A: ambos sexos; * no especifica rango de edad.

Los resultados del análisis de varianza indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de actividad de la enzima ALT (Figura 9 y 10) y GGT (Figura 11 y 12), según la edad y el sexo de la población de referencia.

Los niveles de actividad de la enzima ALT, obtenidos en todos los grupos de la población infantil estudiada, según la edad y el sexo, son similares y están dentro de los valores de referencia establecidos para Olympus Diagnostica (Tabla 2). Al analizar los resultados obtenidos en cada niño, individualmente, se

observó que 24 (5,9%) niños poseen niveles por encima de la media de los valores de referencia (29,5 U/L), de los cuales 4 (0,98%) niños presentaron niveles elevados (> 52 U/L).

Los niveles de actividad de la enzima GGT, según la edad y el sexo, se ubican dentro del rango de referencia, pero con valores bajos (Tabla 2). Al analizar individualmente estos resultados encontramos que 408 (99,5%) niños tienen niveles inferiores a la media de los valores de referencia y de estos el 37 (9,0%) presentaron niveles bajos (< 9 U/L).

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

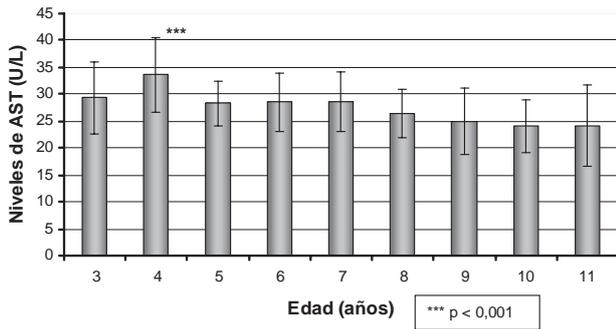


Figura 7. Valores promedio de la actividad de la enzima AST (U/L) por edad en niños sanos de Cumaná.

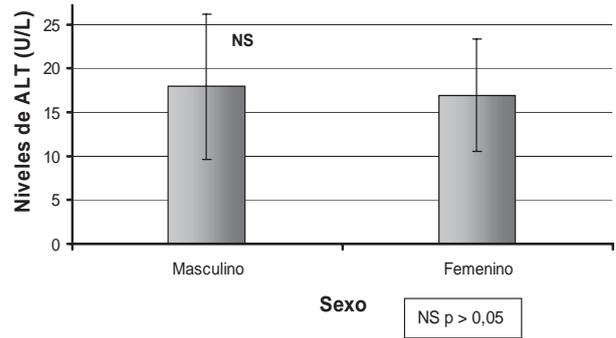


Figura 10. Valores promedio de la actividad de la enzima ALT (U/L) por sexo en niños sanos de Cumaná.

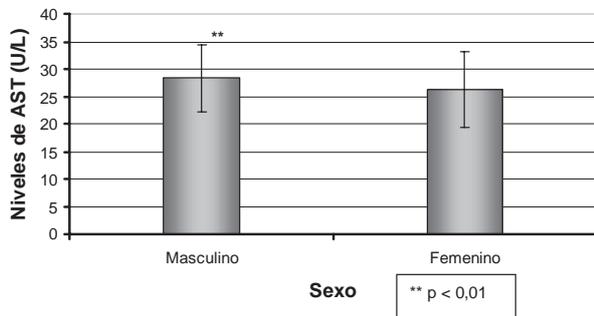


Figura 8. Valores promedio de la actividad de la enzima AST (U/L) por sexo en niños sanos de Cumaná.

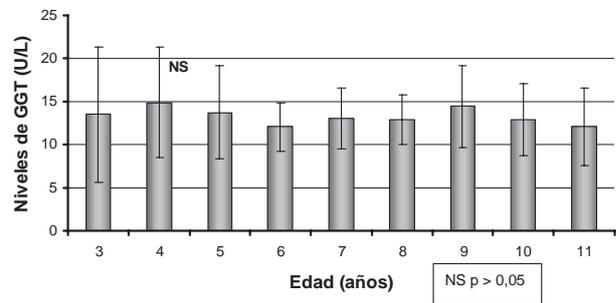


Figura 11. Valores promedio de la actividad de la enzima GGT (U/L) por edad en niños sanos de Cumaná.

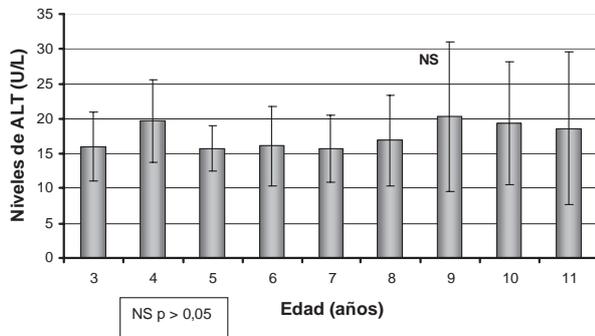


Figura 9. Valores promedio de la actividad de la enzima ALT (U/L) por edad en niños sanos de Cumaná.

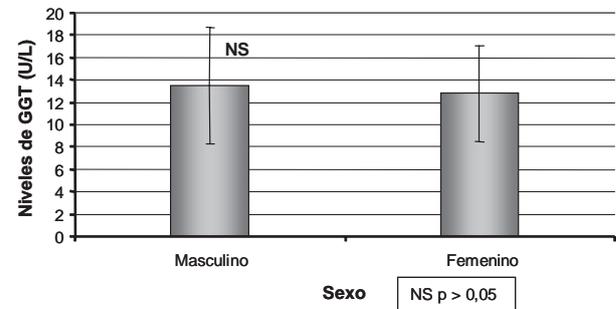


Figura 12. Valores promedio de la actividad de la enzima GGT (U/L) por sexo en niños sanos.

En cuanto a los niveles medios de actividad de la enzima ALP de todos los grupos, según la edad y el sexo (Tabla 2) están por encima del límite superior (104 U/L) de los valores de referencia de la casa comercial, con un rango general entre 132 - 489 U/L.

Los resultados del análisis de varianza, demostraron que existe una diferencia muy significativa de los niveles de la enzima ALP en cuanto a la edad (Figura 13) y aunque no hubo diferencia respecto al sexo (Figura 14), se encontró una interacción muy significativa entre estos dos factores (Figura 15). Estos resultados indican que los valores más bajos de los niveles de actividad se obtuvieron en los niños de 3 - 5 años y los más altos en los de 10 años y que los niveles de actividad en las niñas fueron similares al de los niños.

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

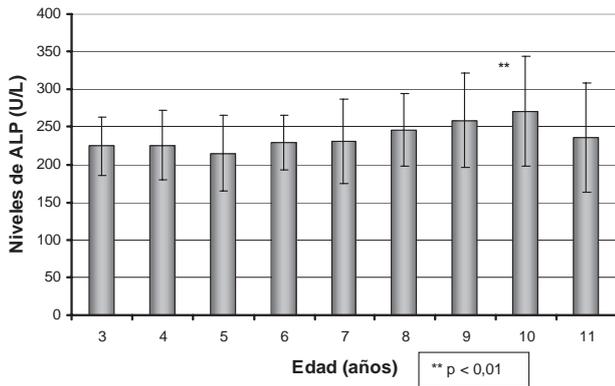


Figura 13. Valores promedio de la actividad de la enzima ALP (U/L) por edad en niños sanos de Cumaná.

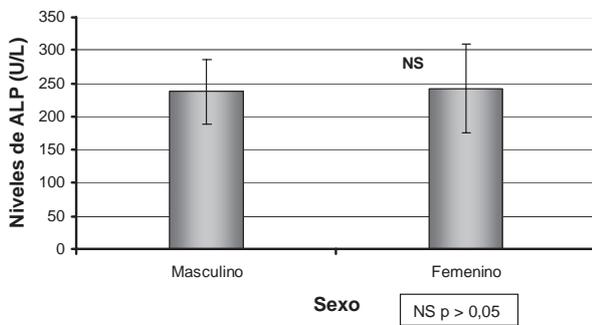


Figura 14. Valores promedio de la actividad de la enzima ALP (U/L) por sexo en niños sanos de Cumaná.

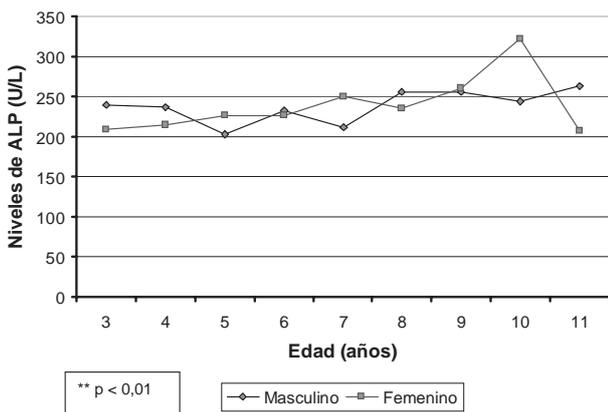


Figura 15. Valores promedio de la actividad de la enzima ALP (U/L) por edad y sexo en niños sanos de Cumaná.

Discusión

La Federación Internacional de Química Clínica (17) recomienda para estudios realizados en adultos, una población de referencia mínima de 120 sujetos, estratificados por edad y/o sexo; es decir, 120 de cada grupo.

En el caso de estudios realizados en población infantil sana, existe dificultad para la obtención de un gran número de muestra. Por ello, varios autores coinciden que el tamaño de la muestra se predice según las dificultades para su obtención, ya que no existe una fórmula estadística para calcularla; aunque, evidentemente cuanto mayor sea la muestra más representativa será de la población total y por ende especificará con mayor precisión el límite entre lo normal y lo anormal. Una muestra de 40 individuos es usualmente adecuada para valores de referencia locales (1,23).

En el presente estudio se logró una población promedio de 46 niños por cada grupo etareo. Mientras, que la población utilizada por Olympus Diagnostica, estuvo conformada por 200 sujetos donadores de sangre de Texas, la cual no fue estratificada por edad y/o sexo.

Los resultados del análisis estadístico obtenidos en este estudio indican que se requiere establecer los valores de referencia para los niveles séricos de albúmina y bilirrubina total y fraccionada en la población pediátrica, debido a que estos difieren de los valores típicos del adulto (valores de referencia de Olympus Diagnostica); coincidiendo así con los resultados de las investigaciones de Dufour (3) quien demostró, que los límites de referencia de los niveles séricos de albúmina y la bilirrubina total dependen de la edad, durante la niñez y la adolescencia, hasta los 20 años de edad. Pero difieren de el que en este estudio no se observó ninguna diferencia estadística entre los valores de referencia según el sexo.

Existe contradicción en la literatura respecto a los valores de referencia para la AST, algunos autores reportan que éstos varían con la edad, desde la niñez hasta la juventud y que no existen diferencias estadísticas, según el sexo (3,12). Mientras que otros, reportan que no existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de actividad de la AST, respecto a la edad en población infantil sana de 0 - 6 años de edad y que aunque la media de los valores obtenidos en cada grupo estaba dentro de los límites de referencia establecidos, 50,0% de los niños presentaron niveles elevados (7). En este estudio se determinó que los valores referencia dependen de la edad y del sexo y son más elevados a los valores recomendados por la casa comercial (valores de adultos).

Los resultados de este estudio deben tomarse en cuenta para no dar diagnósticos errados y someter a estos niños a procedimientos costosos, dolorosos e inútiles.

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

La elevación de los niveles de actividad de la enzima AST en la infancia (bajo condiciones fisiológicas) probablemente se debe al aumento en la síntesis de proteínas y del tejido muscular inducido por la acción de la hormona de crecimiento (5,13).

Durán-Chávez y cols. (7) no observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad, en los niveles de actividad de la enzima ALT en una población de niños sanos. Encontrando que si bien la media de los grupos estaba dentro de los valores de referencia establecidos, el 50,0% de los niños presentaron niveles elevados. Estos resultados coinciden con los de este estudio, aunque el porcentaje de niños con niveles elevados reportados por estos autores es mayor.

A diferencia de lo aquí reportado, Siest y cols. (12) determinaron que los límites superiores del intervalo de referencia para la ALT aumentan desde la niñez hasta aproximadamente los 40 años de edad y son significativamente más elevados en el sexo masculino que en el femenino.

Los niveles de actividad de la enzima AST son ligeramente mayores que los de ALT, hasta aproximadamente los 15 años de edad, con un patrón inverso para la edad de 15 años en los hombres, pero persistiendo hasta la edad de 20 años en las mujeres (3). En el presente estudio se encontró la misma relación entre los niveles de AST y ALT en todos los grupos de la población infantil estudiada, según la edad y sexo.

Según Dufour (3), los valores de referencia para la enzima GGT en niños aumentan gradualmente con la edad y son considerablemente más bajos que los niveles encontrados en los adultos de 25 - 60 años. Mientras Vanden y Geubelle (25), reportan que los valores de referencia en la población pediátrica de 0 - 15 años dependen de la edad, encontrando durante los primeros días después del nacimiento valores 10 veces mayores que los del adulto, los cuales disminuyen, entre los 2 a 3 años, a valores más bajos que los de éstos.

Siest y cols. (12), indican que los niños poseen valores de GGT más bajos que los adultos, los cuales van aumentando progresivamente con la edad hasta alcanzar los mismos valores de éstos a la edad de 25 años, aproximadamente. Por su parte, Cabrera y Green (8) indican que hasta los 5 - 7 meses después del nacimiento, la actividad de esta enzima es 6 - 7 veces mayor que en el adulto, luego comienza a disminuir alcanzando valores similares que en el adulto a los 5 - 7 meses.

Los resultados de los niveles de actividad de la enzima GGT obtenidos en este estudio, difieren de los de la literatura consultada, en cuanto a que no se halló diferencias estadísticamente significativas entre éstos respecto a la edad de la población de referencia, lo cual probablemente se debe a que el rango de edad estudiado fue de 3 - 11 años y no

contempla las edades (0 - 3 y 15 - 25 años) en donde los autores anteriormente citados reportan los cambios más notables en la actividad de esta enzima.

La dependencia de los niveles de actividad de la GGT respecto a la edad podría explicarse por la hipótesis de una GGT fetal, la cual es responsable de que los niveles estén tan elevados, respecto a los valores de referencia en adultos, en los primeros meses de vida y como ésta desaparece las primeras semanas después del nacimiento, entre los 2 - 3 años los niveles son inferiores a los de éstos (8,25) y en segundo lugar, debido a que la próstata posee una actividad de GGT considerable, los niveles aumentan entre los 15 - 25 años (después del desarrollo puberal) en los hombres, por lo que la actividad sérica de esta enzima es normalmente más elevada en hombres que en mujeres y niños (1).

Cadenas y cols. (11) en un estudio para determinar los valores de referencia para la ALP en una población de 366 niños sanos de 6 - 12 años, encontraron que éstos tienen una tendencia significativa al incremento conforme aumenta la edad, en el presente estudio la tendencia fue similar.

Por otra parte, Lockith y cols. (10) indican que los valores de la ALP aumentan progresivamente con la edad hasta los once años, sin existir diferencias entre el sexo hasta los nueve. Mientras que Gómez y cols. (9), reportaron que los valores de referencia determinados para la ALP, no mostraron diferencias significativas relacionadas con el sexo y que según la edad, sólo se observaron valores altos durante los periodos de crecimiento.

La ALP es una enzima presente en diferentes partes del organismo: hígado, hueso, mucosa ileal y riñón, pero solamente las fracciones producidas por el hueso y el hígado son detectada en el suero de personas normales y en condiciones fisiológicas, se producen casi por partes iguales; es decir 50% es de origen hepático y 50,0% de origen óseo; por lo que la ALP es igualmente un marcador bioquímico óseo (26). En pediatría todo marcador óseo refleja los cambios fisiológicos del crecimiento y la acumulación de mineral del hueso (27), debido a que el crecimiento en estatura estimulado por la HC implica un aumento en la talla corporal por crecimiento en longitud de los huesos (5).

Por otra parte, el patrón de crecimiento en niños y niñas es totalmente diferente y se presenta en tres periodos: periodo de crecimiento rápido que comprende los 3 primeros años de vida en las niñas y en los 4 primeros años en niños, el periodo de crecimiento lento y sostenido desde los 3 hasta aproximadamente los 9 años en las niñas y desde los 4 hasta aproximadamente los 10 años en los niños y el periodo de crecimiento rápido del desarrollo puberal entre los 9 - 10 años

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

en niñas y entre los 10 - 11 años en los niños (5). Esto podría explicar el hecho de que en este estudio, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo, se encontrará una correlación negativa muy significativa entre la edad y el sexo.

En base a todos estos resultados se puede concluir, que cuando se utilizan los valores propuestos por Olympus Diagnostica para comparar los resultados de la población infantil de la ciudad de Cumaná, se corre el riesgo de estar dando como resultados falsos, niveles séricos de GGT normales o de bilirrubina total, directa, AST, ALT o ALP elevados; lo cual tendría una grave repercusión en el diagnóstico de pacientes pediátricos con infección hepática, en el tratamiento de la hepatitis crónica ya que al paciente no se le indica tratamiento si los valores de ALT están normales (3); e igualmente, podrían pasarse por alto casos de enfermedad de hígado graso no alcohólico, la cual está asociada a niveles elevados de ALT y GGT en niños obesos (28).

Recomendaciones

Se deben establecer valores de referencia para la población pediátrica de todos los parámetros de laboratorio que se ven afectados, en condiciones fisiológicas, en la etapa de crecimiento por la acción de la HC.

No se deben utilizar valores de referencia establecidos en adultos para interpretar los resultados obtenidos en población infantil, debido a que podrían estarse dando resultados falsamente normales o elevados, en algunos casos.

Los profesionales del área de la salud (médicos y bioanalistas) deben realizar esfuerzos conjuntos para la realización de estudios similares, con el objeto de lograr un tamaño de población mayor, de ser posible la recomendada por la IFCC. Para establecer valores de referencia que puedan ser utilizados para interpretar los resultados de las pruebas de laboratorios de la población infantil de la región.

Referencias

1. Kaplan L y Pesces A. Química Clínica. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1991.
2. Ángel G y Ángel M. Interpretación clínica del laboratorio. Sexta edición. Editorial Médica Internacional. Bogotá, Colombia, 2000; 234 - 235
3. Dufour R. Guías del laboratorio para *screening*, diagnóstico y monitoreo de la Injuria hepática. Acta Bioquím. Clín Latinoamer, 2005;40(1): 89 - 96.
4. Santos A. Diagnóstico clínico y tratamiento. Editorial El Manual Moderno. México, 2001;317 - 318.
5. Muzzo S. Crecimiento normal y patológico del niño y del adolescente. Rev Chil Nutr, 2001; 30(2): 92- 100.
6. Enriori P, Vico C y Enriori C. El dilema de la obesidad en ambos sexos. Acta Bioquím. Clín Latinoamer. 2004;38(2): 165 - 171.
7. Durán - Chávez C, Sánchez - Herrera G y Robledo L. Valores de ALAT y ASAT en un grupo de niños mexicanos que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría. Acta Pediatr Mex. 1994;15(1): 19 - 23.
8. Cabrera - Abreu J y Green A. Gamma glutamyltransferase: Values of its measurent in paediatrics. Ann Clin Biochem. 2002; 39(1): 22 - 25.
9. Gómez P, Coca C, Acebillo J y Martínez A. Normal reference intervals for 20 biochemical variables in heathy infants, children and adolescents. Clin Chem. 1984; 30(3): 407 - 412.
10. Lockith G, Halstead A, Albersheim S, MacCallum C y Quigley G. Age and sex specific pediatric reference intervals for biochemistry analytes and measured with the Ektafchem-700 analyzer. Clin Chem. 1988; 34 (8): 1622 - 1625.
11. Cadenas J, Araujo L, Labrador Z y Peña J. Valores de referencia pediátricos para los parámetros bioquímicos glucosa y fosfatasa alcalina en una escuela rural del estado Mérida, Venezuela. Rev Fac Farm. 2005; 47(2):5-10.
12. Siest H, Henry J, Schiele F y Young D. Interpretation of clinical laboratory test: Reference values and their biological variation. Biomedical Publications, 1985.
13. Dufour R, Lott J y Nolte F. Guías del laboratorio para *screening*, diagnóstico y monitoreo de la lesión hepática. Acta Bioquím Clín Latinoamer. 2006; 39(3): 359 - 376.
14. Reborat T, Garofano M, Pérez B, Salmerón S y Ruíz A. Enfermedad de hígado graso no alcohólico en niños obesos. Anales de Pediatr. 2006; 65(3): 371.
15. López M, Colino E, Mustieles C, Golmayo L, Corbaton J, Barrios R y Alonso M. Esteatosis hepática e insulino-resistencia en población obesa pediátrica (póster). Anales de Pediatr., 2006; 65(3): 296.
16. Walker C, Boga S, García A y Patiño L. Eficacia de la reducción de peso en la curación de la esteatohepatitis no alcohólica en un adolescente obeso. Anales de Pediatr., 2007; 66(2): 184 - 187.
17. IFCC. Approved recomendación on the theory of reference values. J Clin Chem Clin Biochem. 1987; 25:650.
18. Gómez J, Bustinza E y Huarach A. Valores de referencia de algunas pruebas bioquímicas y hematológicas. Rev Mex Patol Clín., 2003; 50(1):41-49.
19. Pati D. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. Ann Intern Med. 2002; 137(1):1-10.
20. Henríquez G. Evaluación del estado nutricional. En : Nutrición en pediatría. Cania Editores. Caracas, Venezuela, 1999;17-62.
21. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial en: Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Asamblea General de la AMM. Tokio, 2004.
22. Sokal R y Rohf J. Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Ediciones Blume. Madrid, España, 1979; 832.
23. Barnett R y Weisbrot I. Estadística en el laboratorio clínico. Editorial Reverté, S.A. España, 1983;69 - 99.
24. Velasco R; Robledo P, Rodríguez R y Castilla L. Valores de referencia de algunos componentes de la química sanguínea en pediatría. Acta Pediatr Mex. 1998; 19(3): 108 - 111.

Valores de referencia para los parámetros bioquímicos que evalúan la función hepática, en población infantil sana

25. Vanden M y Geubelle F. Serum gamma-glutamyl-transferase activity in a pediatric Population. *Ann Biol Clin.* 1982; 40(5): 567 - 572.
26. Sánchez J, Soriano E, Girona R, Pérez P y Viñets C. Why do alkaline phosphatase increase. *Aten Prim.* 2002; 29(4): 241 - 245.
27. Zeni S. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo: determinación en saliva y su correlación con los niveles sanguíneos y urinarios. *Rev Med Chil.* 2003;13:256-268.
28. Ortega E, Koska J, Salbe A, Tataranni P y Bunt J. Serum gamma glutamyl transferase is a determinant of insulin resistente (HOMA-IR) independent of adiposity in Pima Indian Children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;24:537-545.

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.

Mecanografíese 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 (titulillo) 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* 1993:325-33.

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, Shibasaki 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, Rienhoff0, 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 múltiplos 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.

