



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 18 - No. 2

Año 2015

Organo Oficial de la SVBE

CONTENIDO

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 31

ARTÍCULOS ORIGINALES:

Estandarización del informe de resultados del uroanálisis, en el laboratorio clínico de rutina

Celsy Hernández, Hilda Stekman, María Fátima Garcés..... 32

Actividad diurna de la enzima α -amilasa salival en estudiantes de Bioanálisis de la UCV. Efecto de un estresor académico.

Matilde Medina-Martel, María V. Sanmartín, Leidy Quevedo, Bárbara Grimal..... 36

Coloración de Giemsa y Cultivo en el Diagnóstico de la Histoplasmosis

Xiomara Moreno C., Gustavo Martínez, Leopoldo Sánchez, Carolina Macero..... 45

ARTÍCULOS DE REVISIÓN:

Análisis comparativo entre la espectrometría de masas y las metodologías convencionales para la identificación de microorganismos a partir de muestras biológicas

Gabriela Tovar, Claudia Parra, Beatriz Ariza..... 51

AGRADECIMIENTOS PARA LOS ÁRBITROS EN 2015..... 63

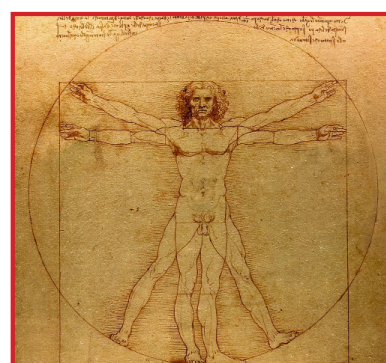
ÍNDICE ACUMULADO POR AUTORES..... 64

ÍNDICE ACUMULADO POR TÍTULOS..... 66

ÍNDICE ACUMULADO POR PALABRAS CLAVES..... 67

INFORMACIÓN PARA AUTORES..... 68

Revista arbitrada e indizada
LILACS (BIREME)
Depósito Legal 199202DF899
ISSN 1315-1746
Miembro ASEREME



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 18. No 2.
Año 2015



Revista arbitrada e indizada dedicada a publicar los trabajos de los profesionales del Bioanálisis en investigación básica y aplicada.

Dirección: Av. Ppal c/c Alfredo Jahn y Alvarez Michaud.
Casa Colegio de Bioanalistas. Nro. 13-01. Urb. Los
Chorros. Zona Postal 1070. Caracas - Venezuela.

ISSN: 1315-1746

Depósito Legal: pp 199202DF899

Indizada

LILACS (BIREME)

MIEMBRO ASEREME

Publicación Semestral de la SVBE

2014-2015

Consejo Directivo

Editora

Dra. María Fátima Garcés

Gerencia Editorial

Dra. María Fátima Garcés

Gerencia Administrativa

MSc. Yacelli Bustamante

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

Junta Directiva

Presidenta

MSc. Yaniska Fránquiz

Dirección General

Dra. María Fátima Garcés

Dirección Científica

Esp. Shasbleidy Díaz

Dirección Administrativa

MSc. Yacelli Bustamante

Dirección de Proyectos y Divulgación Científica

Esp. Valmore Rodríguez

Comisión evaluadora de credenciales:

MSc. Yacelli Bustamante

Esp. Valmore Rodríguez

Comisión para otorgar unidades crédito

Lic. Josefina Guariguata

Esp. Shasbleidy Díaz

Comité de Redacción

Dra. Priva Zabner de Oziel, Esp. Noel Silva

Esp. Shasbleidy Díaz, Esp. Valmore Rodríguez

Dra. María Fátima Garcés, Lic. Giuseppe Ferrara,

Dra. Marlyn Vivenes, Lic. Celsy Hernández,

MSc Hilda Stekman.



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENIDO

Vol. 18 - No 2

2015

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 31

ARTÍCULOS ORIGINALES:

Estandarización del informe de resultados del uroanálisis, en el laboratorio clínico de rutina

Celsy Hernández, Hilda Stekman, María Fátima Garcés..... 32

Actividad diurna de la enzima α -amilasa salival en estudiantes de Bioanálisis de la UCV. Efecto de un estresor académico.

Matilde Medina-Martel, María V. Sanmartín, Leidy Quevedo, Bárbara Grimal..... 36

Coloración de Giemsa y Cultivo en el Diagnóstico de la Histoplasmosis

Xiomara Moreno C., Gustavo Martínez, Leopoldo Sánchez, Carolina Macero..... 45

ARTÍCULOS DE REVISIÓN:

Análisis comparativo entre la espectrometría de masas y las metodologías convencionales para la identificación de microorganismos a partir de muestras biológicas

Gabriela Tovar, Claudia Parra, Beatriz Ariza..... 51

AGRADECIMIENTOS PARA LOS ÁRBITROS EN 2015..... 63

ÍNDICE ACUMULADO POR AUTORES..... 64

ÍNDICE ACUMULADO POR TÍTULOS..... 66

ÍNDICE ACUMULADO POR PALABRAS CLAVES..... 67

INFORMACIÓN PARA AUTORES..... 68



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 18 - No 2

2015

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 31

ORIGINAL ARTICLES:

Estandarización del informe de resultados del uroanálisis, en el laboratorio clínico de rutina

Celsy Hernández, Hilda Stekman, María Fátima Garcés..... 32

Diurnal salivary α -amylase activity in Bioanalysis students of UCV. Effect of an academic stressor

Matilde Medina-Martel, María V. Sanmartín, Leidy Quevedo, Bárbara Grimal..... 36

The Giemsa stain and culture in the diagnosis of Histoplasmosis

Xiomara Moreno C., Gustavo Martínez, Leopoldo Sánchez, Carolina Macero..... 45

REVIEW ARTICLE:

Comparative analysis between mass spectrometry and conventional methodologies for the identification of microorganisms from biological samples

Gabriela Tovar, Claudia Parra, Beatriz Ariza..... 51

ACKNOWLEDGMENT FOR REFEREES IN 2015 63

CUMULATIVE INDEX BY AUTHORS..... 64

CUMULATIVE INDEX BY TITLES..... 66

CUMULATIVE INDEX BY KEY WORDS..... 67

INFORMATION FOR AUTHORS..... 68

EDITORIAL

La Revista *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas* ha sido una herramienta importante de difusión de la productividad científica de los Bioanalistas de todo el país. Finalizamos este año 2015 con satisfacción gracias al arduo trabajo del Comité Editorial y de Redacción y por supuesto al excelente trabajo de los árbitros que hicieron posible una vez más mejorar la calidad de los artículos aquí publicados.

La investigación en los diversos saberes de las Ciencias de la Salud ha tenido en el país un gran desarrollo y notable crecimiento. Las Revistas Científicas han sido recursos fundamentales y fuentes primarias para proyectar los avances en las Ciencias y la Tecnología. La periodicidad y continuidad de edición de estas publicaciones permite a los investigadores acceder a información actualizada de significativo valor científico.

Queremos agradecer el apoyo y valiosos aportes de todos aquellos autores que han difundido sus trabajos, los cuales han contribuido a elevar la calidad de ésta publicación científica. La *Revista de la Sociedad de Bioanalistas Especialistas* está indexada en la base de datos LILACS y está disponible texto completo en formato electrónico en Saber-UCV.

Deseamos que la revista *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas* continúe siendo el foro ideal donde los profesionales Bioanálisis y ramas afines de Ciencias de la Salud encuentren el espacio necesario para actualizarse, hacer sus publicaciones y contribuir con la salud en el país. Invitamos a todos los lectores a colaborar con nuestra revista, ya sea con sus trabajos originales, revisiones o artículos de historia.

La *Revista de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas*, asumió el reto de seguir adelante y continuar con su periodicidad a pesar de las dificultades económicas que atraviesa el país, a pesar de ello finalizamos este año con una selección de trabajos de investigación que constituyen importantes aportes para el Bioanálisis.

Nuestros más cordiales saludos y afectos

Dra. María Fátima Garcés
Editora.

ESTANDARIZACIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS DEL UROANÁLISIS, EN EL LABORATORIO CLÍNICO DE RUTINA

Celsy Hernández¹, Hilda Stekman¹, María Fátima Garcés¹.

¹Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV.

Recibido para publicación el 21 de septiembre 2015. Aprobado para publicación el 5 de octubre 2015.

RESUMEN:

Introducción: El uroanálisis es el análisis de la orina mediante un procedimiento detallado que abarca los aspectos característicos de este líquido biológico, con la finalidad de evaluar preliminarmente el funcionalismo renal y genitourinario, así como revelar la existencia de afecciones de otro orden metabólico. El uroanálisis es una prueba de laboratorio clínico que proporciona información clínica útil, de una manera temprana, expedita, costo efectiva y no invasiva para el paciente. El informe de resultados, es el producto del uroanálisis, por lo que su estandarización impacta directamente en el nivel de calidad deseado para éste análisis clínico. **Objetivo:** Estandarizar el informe de los resultados del uroanálisis realizado en el laboratorio clínico de rutina, de acuerdo con los requisitos de las normas ISO y los estándares internacionales del Instituto de Estandarización Clínica y del Laboratorio (CLSI) y de la Confederación Europea de Laboratorios Médicos (ECLM). **Materiales y métodos:** El estudio se realizó mediante una investigación de tipo descriptiva documental en el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis de la U.C.V.; que consideró las variables que determinan la estandarización del informe de resultados del uroanálisis, de acuerdo a las Normas FONDONORMA-ISO 15.189, COVENIN ISO TR 10.013, CLSI GP16 A3 y "European Urinalysis Guidelines". **Resultados y discusión:** el informe de resultados del uroanálisis realizado en el laboratorio clínico de rutina fue estandarizado mediante el diseño y elaboración de un formulario para el informe de resultados del uroanálisis, de acuerdo a las normas y recomendaciones de la ISO, el CLSI y el ECLM. **Conclusiones:** El informe de resultados del uroanálisis, es el producto del examen simple de orina, y por ello, uno de los principales aspectos implicados en su calidad. La calidad del informe de resultados del uroanálisis está asociada con la veracidad y confiabilidad de los datos y valores reflejados así como con la estandarización y actualización del vocabulario, unidades de expresión y formato empleado por el laboratorio clínico.

Palabras claves: Informe de resultados, estandarización, uroanálisis, laboratorio clínico.

STANDARDIZATION OF URINALYSIS RESULTS REPORT IN THE ROUTINE CLINICAL LABORATORY

SUMMARY

Introduction: Urinalysis is the analysis of urine through a detailed process that includes the characteristic features of the biological fluid, in order to preliminarily evaluate renal and genitourinary functionalism as well as reveal the existence of other metabolic disorders. Urinalysis is a clinical laboratory test that provides useful clinical, early, expeditious, cost effective and non-invasive information for the patient. The report is the product of the urinalysis; standardization has a direct impact on the desired level of quality for this clinical analysis. **Aim:** Standardization of the report of results of urinalysis executed in the routine clinical laboratory, in accordance with the requirements of ISO standards and international standards of the Institute of Clinical and Laboratory Standardization (CLSI) and the European Confederation of Medical Laboratories (ECLM). **Materials and Methods:** The study was conducted by a documentary descriptive research in the Laboratory of Basic and Applied Research in the School of Bioanalysis of the UCV; considering all the variables that determine the standardization of the urinalysis results report, according to the ISO 15,189 FONDONORMA, COVENIN ISO TR 10.013, A3 and CLSI GP16 "European Urinalysis Guidelines" standards. **Results and discussion:** The standardization of the report for the results of the urinalysis performed in routine clinical laboratory was done by designing and developing a form for reporting results of urinalysis, according to the rules and recommendations of the ISO, CLSI and ECLM. **Conclusions:** The report for the results of the urinalysis is the product of a simple urine test, and therefore one of the main issues involved in the quality of the test. The quality of urinalysis results report is associated with the accuracy and reliability of the data observed during the analysis and the values reflected an updated vocabulary, expression units and a standardized format.

Key words: Results report, standardization, urinalysis, clinical laboratory.

Introducción

El uroanálisis es el análisis de la orina mediante un procedimiento detallado que abarca los aspectos característicos de este líquido biológico, con la finalidad

de evaluar preliminarmente el funcionalismo renal y genitourinario, así como revelar la existencia de afecciones de otro orden metabólico. El uroanálisis es una prueba de laboratorio clínico que proporciona información clínica útil, de una manera temprana, expedita, costo

Solicitar copia a: Celsy Hernández (e-mail: celsyhernandez@gmail.com)

efectiva y no invasiva para el paciente, por lo que al igual que cualquier otra prueba de laboratorio, debe llevarse a cabo en forma segura y bien controlada, bajo un sistema estandarizado que permita prevenir errores sistémicos y minimizar las variaciones aleatorias, que afectan la confiabilidad de los resultados, y que pueden ocurrir desde que se ordena la prueba hasta que el informe de resultados es interpretado por el médico solicitante. En la actualidad, a pesar de los grandes avances en el conocimiento de la calidad en el laboratorio clínico y que las normas y recomendaciones internacionales para el uroanálisis de la ISO, la Organización Internacional de Estandarización (del inglés, *International Organization for Standardization*), el Instituto de Estandarización Clínica y del Laboratorio, CLSI (del inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) y la Confederación Europea de Laboratorios Médicos, ECLM (del inglés, *European Confederation of Laboratory of Medicine*), establecen los requisitos para la calidad y la competencia en el análisis simple de orina, el uroanálisis continúa tradicionalmente rezagado en materia de calidad, llevándose a cabo mediante procedimientos y un informe de resultados muy poco estandarizado (1,2). El informe de resultados, es el producto del uroanálisis, por lo que su estandarización impacta directamente en el nivel de calidad deseado para éste análisis clínico. Es por ello que en el presente estudio se propuso estandarizar el informe de resultados de acuerdo con los requisitos de las normas ISO y los estándares internacionales del Instituto de Estandarización Clínica y del Laboratorio, (CLSI) y de la Confederación Europea de Laboratorios Médicos (ECLM).

Materiales y Métodos

El estudio se realizó mediante una investigación de tipo descriptiva documental en el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis de la U.C.V.; que consideró las variables que determinan la estandarización del informe de resultados del uroanálisis, de acuerdo a las Normas FONDONORMA-ISO 15.189:2007 (3), COVENIN ISO TR 10.013:2002 (4), CLSI GP16 A3 (5) y "European Urinalysis Guidelines" (6).

Resultados

El informe de resultados del uroanálisis realizado en el laboratorio clínico de rutina fue estandarizado mediante el diseño y elaboración de un "Formulario para el informe de resultados del uroanálisis", de acuerdo a las normas y recomendaciones de la ISO, el CLSI y el ECLM (Figura N°1). Este formulario de informe de

resultados del uroanálisis, fue diseñado y elaborado a fin de cumplir con los requisitos 5.4.1, 5.4.5, 5.4.6, 5.4.7 y 5.8.3 de la norma ISO-FONDONORMA 15.189:2007 y 10.1.1 de la guía "European Urinalysis Guidelines", referidos a la información clara, precisa y trazable que debe contener el informe de resultados en cuanto a la identificación y ubicación única y completa del paciente, identificación y ubicación del solicitante del análisis, identificación y ubicación completa del laboratorio, categoría de la solicitud, requerimiento o información clínica relevante, tipo de muestra y técnica empleada en la recolección, volumen de muestra recolectado, fecha y hora de recolección por el paciente y recepción por el laboratorio de la muestra, análisis realizados, métodos e instrumentos de análisis empleados, resultados obtenidos e intervalos de referencia (expresados de forma detallada y actualizada, sin tachaduras, abreviaciones o expresiones desambiguas, con un vocabulario, nomenclatura y sintaxis recomendada), identificación completa del responsable de la validación del resultado, formato o vía de entrega del resultado, identificación del responsable de la entrega o envío, fecha y hora de entrega o envío así como ítem para adicionar observaciones o comentarios en relación a que la calidad o adecuación de la muestra pudiera haber comprometido el resultado así como para adicionar interpretaciones del resultado o recomendaciones pertinentes (3,6).

Así mismo de acuerdo con las recomendaciones de los apartados 5.2.6 y 5.2.7 de la guía "Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens" (5) y 10.1.3 de la guía "European Urinalysis Guidelines" (6), los resultados del análisis del aspecto deben ser expresados como "Límpido, Ligeramente Turbio o Turbio". El color debe informarse de acuerdo a una escala preestablecida que incluya colores como "Incoloro, Amarillo, Ámbar, Anaranjado, Rojo, Marrón, Verde y Negro". El olor debe ser informado como Normal o Anormal. Los parámetros determinados cualitativamente se reportan como "Positivo o Negativo" (Nitritos Urinarios), los determinados semicuantitativamente se informan como "Negativo, Trazas o Positivo 1 +, 2 +, 3 + o 4 +" (proteínas, glucosa, hemoglobina, cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y esterasa leucocitaria), y los determinados cuantitativamente se reporta en números enteros con decimales (Densidad y pH). En el análisis de los elementos formes mediante la evaluación microscópica tradicional del sedimento urinario se informan como "Escasos, Moderados o Abundantes" aquellos elementos que se semicuantifican (Mucina, Bacterias, Cristales,

Logo del Laboratorio Clínico

Nombre del Laboratorio Clínico. Dirección del Laboratorio Clínico. Dirección Postal del Laboratorio Clínico. RIF del Laboratorio Clínico. Número de Teléfono del Laboratorio Clínico. Número de Fax del Laboratorio Clínico. Dirección de correo electrónico del Laboratorio Clínico.

DATOS DE IDENTIFICACION DEL PACIENTE					
Código	Nombres y Apellidos	C.I.	Fecha de Nacimiento	Edad	Sexo
Dirección/Ubicación		Teléfono		Correo electrónico	
DATOS DE SOLICITUD Y RECEPCIÓN DE LA MUESTRA					
Fecha de Recolección		Fecha de Recepción		Tipo de muestra	
Hora de Recolección		Hora de Recepción		<input type="checkbox"/> Primera micción <input type="checkbox"/> Chorro medio <input type="checkbox"/> Cateterismo <input type="checkbox"/> Punción <input type="checkbox"/> Micción aleatoria <input type="checkbox"/> Vesical <input type="checkbox"/> Suprapúbica <input type="checkbox"/> Otro	
Categoría de la solicitud		Solicitante		Dirección/Ubicación del Solicitante	
<input type="checkbox"/> Rutina <input type="checkbox"/> Emergencia					
Teléfono Solicitante		Requerimiento/Información clínica relevante		Responsable de la Recepción	
DATOS DEL ANÁLISIS Y RESULTADOS					
ANÁLISIS: UROANÁLISIS					
RESULTADOS:					
ANÁLISIS FISICO					
Método: Observación directa / marca Tira Reactiva Comercial					
PARAMETRO	RESULTADO			VALORES DE REFERENCIA	
Aspecto	<input type="checkbox"/> Límpido <input type="checkbox"/> Ligeramente turbio <input type="checkbox"/> Turbio			Límpido	
Color	<input type="checkbox"/> Incoloro <input type="checkbox"/> Amarillo <input type="checkbox"/> Ámbar <input type="checkbox"/> Anaranjado <input type="checkbox"/> Rojo <input type="checkbox"/> Verde <input type="checkbox"/> Marrón <input type="checkbox"/> Negro			Amarillo	
Olor	<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Cetónico <input type="checkbox"/> Amoniacaal <input type="checkbox"/> Fétido <input type="checkbox"/> Otro			Normal	
Densidad	<input type="checkbox"/> 1.000 <input type="checkbox"/> 1.005 <input type="checkbox"/> 1.010 <input type="checkbox"/> 1.015 <input type="checkbox"/> 1.020 <input type="checkbox"/> 1.025 <input type="checkbox"/> 1.030			Adultos:1010-1025/Niños:1000-1015	
ANÁLISIS QUIMICO			ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS FORMES		
Método: Lectura visual / marca Tira Reactiva Comercial			Método: Análisis manual microscópico del sedimento urinario		
Lectura instrumental/ marca y serial del instrumento/ marca Tira Reactiva Comercial			Análisis instrumental/marca y serial del instrumento		
PARAMETRO	RESULTADO	VALORES DE REFERENCIA	ELEMENTOS FORMES	RESULTADO	VALORES DE REFERENCIA
pH		Primera micción: 5.0 – 6.0 Micción aleatoria: 5.0 – 8.0	Células epiteliales escamosas		0 hasta 5 x cpo de 400x
Esterasa Leucocitaria		Negativo	Células epiteliales transicionales		0 hasta 5 x cpo de 400x
Nitrito		Negativo	Células epiteliales renales tubulares		No se observaron
Proteínas		Negativo	Leucocitos		0 hasta 5 x cpo de 400x
Glucosa		Negativo	Hematíes		0-2 x cpo de 400x
Cuerpos Cetónicos		Negativo	Bacterias		Escasas
Urobilinógeno		Negativo	Mucina		Escasa
Bilirrubina		Negativo	Cristales		No se observaron
Hemoglobina		Negativo	Cilindros		No se observaron
OBSERVACIONES:			Elementos Parasitarios		No se observaron
			Elementos Fúngicos		No se observaron
			DATOS DEL REPORTE DE RESULTADOS		
			Validación de Resultados		
			Responsable	Número Sanitario	Firma
Entrega/envío de Resultados					
Responsable	Forma/Vía	Fecha	Hora		
	<input type="checkbox"/> Física <input type="checkbox"/> Multimedia				

Figura N°1. Formulario para el informe de los resultados del uroanálisis

Fuente: Los investigadores

Elementos Fúngicos y Parasitarios), mientras que los elementos cuantificados (Células Epiteliales Escamosas, Células Epiteliales Transicionales, Células Epiteliales Renales, Leucocitos, Eritrocitos y Cilindros), se informan como un promedio de los elementos cuantificados por campo de observación. Este promedio debe ser expresado mediante un intervalo de números enteros que posean una diferencia no mayor a dos (2) elementos. El promedio numérico debe ir acompañado de la frase “observados por campo” y del objetivo de aumento al cual se realizó la cuantificación, es decir, 100X (bajo aumento) para los Cilindros y 400X (alto aumento) para las Células Epiteliales, Leucocitos y Eritrocitos.

Con respecto al informe de resultados Jiménez y colaboradores, en su propuesta para la estandarización del sedimento urinario establecen al igual que lo reflejado en los resultados de éste estudio, lo siguiente: *“debería elaborarse un tipo de informe de resultados estándar, que contemple datos no solo referentes al examen del sedimento y expresión correcta de los resultados, sino también todo lo referente a la muestra y su análisis como método de obtención, conservación, hora de recepción y de análisis, procesamiento manual o automático, metodología, lugar donde encontrar información adicional sobre la técnica empleada, su interpretación y posibles interferencias, etc. Además de aparecer el nombre de la persona que valida técnicamente los parámetros que contiene el análisis, el informe debería ir firmado manualmente, o mediante firma electrónica, por un facultativo de laboratorio que realiza la interpretación clínica de los resultados”* (7).

Es importante destacar, que el formulario de informe de resultados elaborado en éste estudio, denominado “Formulario para el informe de resultados del uroanálisis”, se diseñó considerando el requisito 4.3 de la norma ISO 15.189:2007 referido al control de documentos (1) y el apartado 3.2 y 4.7 de la norma COVENIN-ISO TR 10013:2002, “Directrices para la documentación de los sistemas de gestión de la calidad”, referidos a la estructura y contenido de los formularios del sistema de gestión de la calidad (4).

Conclusiones

El informe de resultados del uroanálisis, es el producto del examen simple de orina, y por ello, uno de los principales aspectos implicados en su calidad. La calidad del informe de resultados del uroanálisis está asociada con la veracidad y confiabilidad de los datos y valores reflejados así como con la estandarización y actualización del vocabulario, unidades de expresión y formulario empleado por el laboratorio clínico.

Referencias

1. Celsy Hernández, Hilda Stekman, María Fatima Garcés, Beatriz De La Torre. Estandarización del análisis de los elementos formes del sedimento urinario del uroanálisis, realizado en el laboratorio clínico de rutina. Acta Cient Soc Venez Bioanalistas Esp 2013;16(2):62-69.
2. Celsy Hernández, Hilda Stekman, María Fatima Garcés, Beatriz De La Torre. Estandarización de la fase preanalítica del uroanálisis, en el laboratorio clínico de rutina. Acta Cient Soc Venez Bioanalistas Esp 2014;17(1):12-16.
3. FONDONORMA-ISO 15189:2007. Laboratorios Clínicos. Requisitos Particulares para la Calidad y la Competencia. ISO: Suiza, 2006. FONDONORMA: Caracas, 2007.
4. COVENIN-ISO TR 10013:2002. Directrices para la documentación de los sistemas de gestión de la calidad. COVENIN: Caracas, 2002.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Approved Guideline GP16-A3: Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens. Approved Guideline - Third Edition, CLSI: Wayne, PA, 2009. [Fecha de acceso 12 de Junio de 2015]; Disponible en: <http://www.clsi.org/>.
6. European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM). European Urinalysis Guidelines. Scand J Clin Lab Invest 2000;60:1-96.
7. Jiménez J, Ruiz G. El Laboratorio Clínico 2: Estudio de los Elementos Formes de la orina. Estandarización del Sedimento Urinario. Editorial LABCAM (Asociación Castellano-Manchega de Análisis Clínicos). España 2010, 100p. [Fecha de acceso 30 de Mayo de 2015]; Disponible en: http://www.labcam.es/v1/component/option,com_docman/task,cat_view/gid,24/Itemid,26/

ACTIVIDAD DIURNA DE LA ENZIMA α -AMILASA SALIVAL EN ESTUDIANTES DE BIOANÁLISIS DE LA UCV. EFECTO DE UN ESTRESOR ACADÉMICO.

Matilde Medina-Martel¹, María V. Sanmartín¹, Leidy Quevedo^{1,2}, Bárbara Grimal¹.

¹Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV, ²Laboratorio Metropolitano, Caracas.

Recibido para publicación el 7 de noviembre 2015. Aprobado para publicación el 30 de noviembre 2015.

RESUMEN:

Se ha reportado que la actividad de la α -amilasa salival (AAS) podría ser un buen marcador de estrés en humanos ya que su secreción se incrementa por estimulación simpática. Esto ha sido poco estudiado en el contexto académico, sobre todo en nuestro país, por lo cual no se cuenta con valores de referencia locales. Los estudiantes de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela manifiestan con frecuencia que la carrera es muy estresante, por tanto sería útil disponer de un biomarcador poco invasivo, económico y fácil de medir para evaluar la respuesta biológica de los estudiantes a diferentes estresores académicos. Objetivos: 1) evaluar estrés académico y 2) medir actividad diurna de AAS en estudiantes del 8vo semestre de Bioanálisis de la UCV durante dos días diferentes, un día sin examen (día A) y un día con un examen escrito programado a las 10:00 a.m. (día B). Materiales y métodos: se evaluó estrés académico a través del Inventario SISCO (Barraza, 2006) y se determinó actividad de AAS en muestras de saliva tomadas a las 8:00 a.m., 10:00 a.m., 2:00 p.m. y 4:00 p.m. los días A y B mediante un método cinético colorimétrico. Resultados: el estrés general y el estrés percibido ante las evaluaciones mostraron valores altos. La actividad de AAS fue más baja a las 8:00 a.m. y aumentó a lo largo del día. El día B se observó un incremento significativo de la actividad a las 10:00 a.m. (hora del parcial) respecto al día A. Conclusiones: esta enzima podría ser un marcador útil para evaluar la respuesta simpática a diversos estresores académicos, sobre todo en épocas caracterizadas por altos niveles de estrés como la época de exámenes.

Palabras claves: Estrés académico, amilasa salival, Escuela de Bioanálisis, UCV.

DIURNAL SALIVARY α -AMYLASE ACTIVITY IN BIOANALYSIS STUDENTS OF UCV. EFFECT OF AN ACADEMIC STRESSOR

SUMMARY

It has been reported that salivary α -amylase could be a good acute stress biomarker since its secretion rises in response to sympathetic stimulation. Nevertheless, it has been poorly studied in our country and reference values do not exist in Venezuela. Bioanalysis students of Central University of Venezuela (UCV) frequently complain about the high level of stress of this career. It could be useful to have a low invasive, economical and easy to measure biomarker that permits evaluating the biologic response of the students to different academic stressors.

Objectives: 1) to evaluate academic stress and 2) to measure diurnal salivary α -amylase (SAA) activity of UCV Bioanalysis students enrolled in 8th semester during a day without evaluations (day A) and in a day with an academic examination scheduled at 10:00 a.m. (day B). Materials and methods: academic stress was evaluated with the SISCO questionnaire (Barraza, 2006) and SAA activity was measured in saliva samples obtained on days A and B at 8:00 and 10:00 a.m. and then at 2:00 and 4:00 p.m. by a kinetic colorimetric method. Results: general stress and evaluations perceived stress reflected high values. The lowest SAA activities were obtained at 8:00 a.m., which were progressively increasing during the day. On day B, a significant rise in activity was observed at 10:00 a.m. when compared to day A. Conclusions: SAA might be a useful non invasive biomarker to evaluate the sympathetic response to diverse academic stressors, specially during periods of high stress level such as examination periods.

Keywords: Academic stress, salivary α -amylase, Bioanalysis, UCV.

Introducción

El estrés académico es aquel que experimentan los estudiantes de educación media y superior en el ámbito académico durante la prosecución de sus estudios (1). Las carreras del área de la salud se encuentran entre las más estresantes (2, 3). En este sentido, la carrera de Medicina ha sido la más estudiada y muchos reportes señalan una

alta prevalencia de estrés entre sus estudiantes (4,5). El estrés académico ha sido vinculado con alteraciones inmunológicas que pueden comprometer las defensas de los individuos (6,7) haciéndolos más susceptibles a infecciones (8) o alergias (9) y con cambios en la calidad y hábitos de sueño (10) y alimentación (11) que predisponen a los estudiantes a trastornos de salud,

Solicitar copia a: linext2000@yahoo.com

tanto emocionales (12) como físicos de diversa índole (13,14).

Los individuos que muestran una intensa respuesta simpática ante situaciones estresantes podrían ser más susceptibles a enfermedades crónicas asociadas al estrés como: hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y metabólicas, entre otras. Así lo han demostrado varios investigadores, entre ellos Flaa y col. (15) a través de un estudio longitudinal, donde los sujetos que presentaron las concentraciones más altas de norepinefrina plasmática en respuesta a una prueba de estrés a los 19 años de edad, mostraron mayores valores de tensión arterial 18 años después. El poder identificar estos individuos a edades tempranas sería muy útil en la prevención de dichas enfermedades, ya que permitiría educarlos oportunamente en la adquisición de recursos que les permitan afrontar de manera apropiada las situaciones estresantes que se les presenten a lo largo de la vida.

La actividad simpática se ha medido clásicamente en el laboratorio a través de la determinación de catecolaminas y sus metabolitos en sangre y en orina, sin embargo, estas son pruebas complejas e invasivas, con numerosas limitaciones a la hora de evaluar de manera precisa la respuesta simpática al estrés (16,17,18). Por lo tanto, la aparición de nuevos marcadores, fáciles de medir, económicos y no invasivos es una posibilidad alentadora para quienes realizan investigación en esta área.

La actividad de la enzima α -amilasa salival (AAS) ha sido activamente estudiada en las últimas dos décadas por diversos grupos de investigadores como un biomarcador de estrés agudo (19,20,21). A diferencia de otros metabolitos salivales, como el cortisol y la testosterona, que son transportados desde el plasma, la AAS es una enzima producida localmente por las glándulas salivales (22) como resultado del aumento de la actividad simpática durante la respuesta al estrés, ya que las mismas poseen intervención simpática (23). Esta utilidad de la AAS ha sido muy poco estudiada en nuestro país, por lo tanto no se cuenta con valores de referencia locales. Uno de los pocos estudios realizados en Venezuela se llevó a cabo en la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (UCV), midiéndose la actividad de AAS en días con y sin examen a las 8:00 a.m.. sin embargo los resultados obtenidos dejaron más interrogantes que respuestas (24). Esta Escuela está adscrita a la Facultad de Medicina de la UCV y aunque sus estudiantes manifiestan

frecuentemente que la carrera es altamente estresante, el fenómeno del estrés académico y sus consecuencias sobre la salud han sido muy poco estudiados en dicha población.

En virtud de lo anterior y del interés por seguir estudiando dicho marcador en esta población estudiantil vulnerable, los principales objetivos del presente trabajo fueron: evaluar estrés académico autopercebido y medir actividad diurna de AAS en dos días diferentes, un día sin examen al inicio del semestre y un día con examen en estudiantes de 8vo semestre de la Escuela de Bioanálisis de la UCV a fin de comparar los valores basales (situación control) con los obtenidos en un día de evaluación (situación de estrés).

Materiales y Métodos

Sujetos. Se dictó una charla informativa sobre los objetivos del trabajo a los estudiantes de 8vo semestre (períodos lectivos Seg-14 y Pri-15), considerado éste como el más estresante de la carrera por los estudiantes de dicha Escuela (24) a fin de solicitar su participación voluntaria en el mismo.

Criterios de Inclusión. Estudiantes de 8vo semestre de la Escuela de Bioanálisis de la UCV, que expresaran su deseo voluntario de participar en el estudio y firmaran el Consentimiento informado. *Criterios de Exclusión.* Cualquier patología o tratamiento médico que pudiera alterar la respuesta al estrés, como esteroides, antidepresivos o ansiolíticos, padecimiento de infección activa o cirugía reciente o cualquier enfermedad inflamatoria crónica de las encías.

Recolección de datos y cuestionario. Se obtuvieron datos demográficos como: sexo, edad, condición regular o repitiendo y número de materias electivas inscritas y se aplicó el Inventario SISCO diseñado por Barraza (1), el cual consta de 31 ítems distribuidos de la siguiente manera: 1) 1 ítem filtro que en términos dicotómicos (si-no) permite determinar si el individuo es candidato o no a contestar el inventario, 2) 1 ítem que en un escalamiento tipo Likert de 5 valores numéricos (del 1 al 5, donde 1 significa poco y 5, mucho) permite identificar el nivel de intensidad del estrés académico, 3) 8 ítems que en un escalamiento tipo Likert de 5 valores categoriales (nunca, rara vez, algunas veces, casi siempre y siempre) permiten identificar la frecuencia en que las demandas del entorno son valoradas como estímulos estresores, 4) 15 ítems que a través de un escalamiento tipo Likert de cinco valores categoriales (nunca, rara vez, algunas

veces, casi siempre y siempre) permiten identificar la frecuencia con la que se presentan síntomas o reacciones al estímulo estresor y 5) 6 ítems que en un escalamiento tipo Likert de cinco valores categoriales (nunca, rara vez, algunas veces, casi siempre y siempre) permiten identificar la frecuencia de uso de las estrategias de afrontamiento. Este inventario fue respondido en forma individual, autoaplicada y anónima. Los datos obtenidos fueron tabulados y expresados como porcentajes y/o promedios \pm error estándar.

Obtención de muestras de saliva. Las muestras de saliva se obtuvieron a las 8:00 a.m., 10:00 a.m., 2:00 p.m. y 4:00 p.m., por salivación espontánea para la determinación de AAS. Los individuos debían estar en condición de ayuno a las 8:00 a.m. y con al menos una hora de ayuno para el resto de las tomas y realizar un enjuague de la boca con 60 ml de agua filtrada previo a la obtención de la muestra. Las muestras fueron recolectadas en recipientes de plástico, limpios y secos y posteriormente centrifugadas para precipitar las células epiteliales provenientes de la mucosa oral. El sobrenadante fue recuperado y congelado a -20°C en viales Eppendorf limpios y secos (16,39).

Esta investigación contó con el Aval del Comité de Bioética de la Escuela de Bioanálisis de la UCV.

Determinación de alfa-Amilasa salival. La actividad de AAS se determinó mediante un ensayo de tipo cinético de la marca comercial SIEMENS. Este se basa en la hidrólisis directa del sustrato sintético 2-cloro,4-nitrofenil, α -maltotriósido por la amilasa presente en la muestra para producir 2-cloro,4-nitrofenol el cual se determina espectrofotométricamente a 405 nm. La medición se efectuó en un equipo Dimension RXL previa dilución 1:200 de las muestras con solución salina fisiológica (23). Se emplearon sueros controles de calidad comerciales marca BioRad niveles 1 y 2, obteniéndose siempre valores dentro del rango establecido por el fabricante.

Estadística. Los resultados se presentan como porcentajes y media \pm error estándar de la media. Las medias se compararon empleando el método estadístico t de Student del programa Excel de Microsoft. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Características de la muestra en estudio

Un total de 28 participantes respondieron el cuestionario.

El 80,6% fue de sexo femenino, con edad promedio de $25,13 \pm 1,19$ años. El 93,50% de los estudiantes fue de condición regular. El 87% cursó entre 3 y 4 materias obligatorias y sólo un 19,3% cursó materias electivas.

Inventario SISCO de estrés académico

De los estudiantes evaluados, el 100% afirmó haber tenido momentos de preocupación o nerviosismo durante el semestre.

El nivel de preocupación o nerviosismo percibido por los estudiantes durante el semestre fue de $4,36 \pm 0,12$.

También se evaluó la frecuencia de situaciones preocupantes, reacciones al estrés y estrategias de afrontamiento empleando una escala tipo Likert, donde: 1 es "nunca", 2 es "rara vez", 3 es "algunas veces", 4 es "casi siempre" y 5 es "siempre". Los ítems (situaciones, reacciones, estrategias) con valor promedio igual o mayor a 3 fueron considerados como los de mayor frecuencia (Tabla 1).

Situaciones Inquietantes

Las situaciones percibidas como inquietantes con mayor frecuencia por los estudiantes fueron: "las evaluaciones de los profesores (exámenes, ensayos, trabajos de investigación, etc)" ($4,39 \pm 0,13$), "sobrecarga de tareas y trabajos" ($4,25 \pm 0,15$) y "tiempo limitado para hacer el trabajo" ($4,00 \pm 0,19$), "participación en clase" ($3,67 \pm 0,21$), "el tipo de trabajo que te piden los profesores" ($3,66 \pm 0,2$), "la personalidad y carácter del profesor" ($3,21 \pm 0,13$), "no entender los temas que se abordan en clase" ($3,0 \pm 0,13$) como se muestra en la Tabla 1.

Reacciones físicas en momentos de preocupación

Los estudiantes del 8vo semestre manifestaron con mayor frecuencia las siguientes reacciones físicas: "somnolencia o mayor necesidad de dormir" ($4,03 \pm 0,21$), "fatiga crónica" ($3,64 \pm 0,18$) y "trastornos del sueño (insomnio, pesadillas)" ($3,35 \pm 0,21$). Ver Tabla 1.

Reacciones psicológicas en momentos de preocupación

Las reacciones psicológicas manifestadas con mayor frecuencia fueron: "inquietud (incapacidad de relajarse y estar tranquilo)" ($3,67 \pm 0,19$), "ansiedad, angustia o desesperación" ($3,57 \pm 0,14$) y "problemas de concentración" ($3,21 \pm 0,17$). Ver Tabla 1.

Reacciones comportamentales en momentos de preocupación

La reacción comportamental experimentada con mayor frecuencia por los estudiantes fue: "aumento o reducción del consumo de alimentos" ($3,28 \pm 0,24$). Ver Tabla 1.

TABLA 1. Frecuencia promedio \pm error estándar registrada para cada uno de los ítems evaluados

	8vo Semestre (n=28) X \pm EE
Situaciones Inquietantes	
La competencia con los compañeros del grupo	1,96 \pm 0,15
Sobrecarga de tareas y trabajos escolares	4,25 \pm 0,15
La personalidad y el carácter del profesor	3,21 \pm 0,13
Las evaluaciones de los profesores (exámenes, ensayos, trabajos de investigación, etc.)	4,39 \pm 0,13
El tipo de trabajo que te piden los profesores (consulta de temas, fichas de trabajo, ensayos, mapas conceptuales, etc.)	3,66 \pm 0,2
No entender los temas que se abordan en la clase	3,00 \pm 0,13
Participación en clase (responder a preguntas, exposiciones, etc.)	3,67 \pm 0,21
Tiempo limitado para hacer el trabajo	4,00 \pm 0,19
Reacciones Físicas	
Trastornos en el sueño (insomnio o pesadillas)	3,35 \pm 0,21
Fatiga crónica (cansancio permanente)	3,64 \pm 0,18
Dolores de cabeza o migrañas	3,10 \pm 0,13
Problemas de digestión, dolor abdominal o diarrea	2,51 \pm 0,17
Rascarse, morderse las uñas, frotarse, etc.	2,71 \pm 0,29
Somnolencia o mayor necesidad de dormir	4,03 \pm 0,21
Reacciones Psicológicas	
Inquietud (incapacidad de relajarse y estar tranquilo)	3,67 \pm 0,19
Sentimientos de depresión y tristeza (decaído)	2,73 \pm 0,19
Ansiedad, angustia o desesperación.	3,57 \pm 0,14
Problemas de concentración	3,21 \pm 0,17
Sentimiento de agresividad o aumento de irritabilidad	2,29 \pm 0,2
Reacciones Comportamentales	
Conflictos o tendencia a polemizar o discutir	2,10 \pm 0,21
Aislamiento de los demás	1,96 \pm 0,23
Desgano para realizar las labores escolares	2,78 \pm 0,21
Aumento o reducción del consumo de alimentos	3,28 \pm 0,24
Estrategias de Afrontamiento	
Habilidad asertiva (defender nuestras preferencias ideas o sentimientos sin dañar a otros)	3,39 \pm 0,22
Elaboración de un plan y ejecución de sus tareas	3,42 \pm 0,22
Elogios a sí mismo	2,62 \pm 0,19
La religiosidad (oraciones o asistencia a misa)	2,82 \pm 0,24
Búsqueda de información sobre la situación	2,89 \pm 0,22
Ventilación y confidencias (verbalización de la situación que preocupa)	3,10 \pm 0,21

Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media, n=28.

Estrategias de afrontamiento a situaciones inquietantes

Las estrategias de afrontamiento empleadas con mayor frecuencia por los estudiantes del 8vo semestre fueron: "elaboración de un plan y ejecución de sus tareas" ($3,42 \pm 0,22$), "habilidad asertiva" (defender nuestras preferencias, ideas o sentimientos sin dañar a otros)" ($3,39 \pm 0,22$) y "ventilación y confidencias (verbalización de la situación que preocupa)" ($3,1 \pm 0,21$). Ver Tabla 1.

Amilasa salival

Los valores promedio \pm error estándar de actividad diurna de AAS se muestran detalladamente en la Tabla 2.

En la Figura 1 se muestra la curva de actividad diurna de la AAS con los valores obtenidos al inicio del semestre y el día del examen parcial, presentando la media \pm error estándar correspondiente a cada hora de toma de muestra. La actividad mas baja de AAS del día A (día sin evaluación, al inicio del semestre) se observó a las 8:00 a.m.. Las actividades de AAS medidas a las 10:00 a.m., 2:00 p.m. y 4:00 p.m. fueron significativamente mas altas que las de las 8:00 a.m. ($p=0,0411$; $0,0025$; $0,0049$, respectivamente). La actividad obtenida a las 2:00 p.m.

TABLA 2. Actividad promedio de la enzima alfa-amilasa salival de los estudiantes de 8vo semestre.

	Inicio del semestre U/ml (X \pm EE)	Día del examen U/ml (X \pm EE)
08:00 a.m.	29,39 \pm 4,44	36,50 \pm 5,20
10:00 a.m.	40,83 \pm 5,05(a)	65,71 \pm 9,47(a,c)
02:00 p.m.	60,12 \pm 10,32(a,b)	72,02 \pm 9,87(a)
04:00 p.m.	72,10 \pm 12,38(a)	77,08 \pm 12,40(a)

Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media. (a)= $p<0,05$ respecto a las 8:00 a.m. del mismo día, (b)= $p<0,05$ respecto a las 10:00 a.m. del mismo día, (c)= $p<0,05$ respecto a las 10:00 a.m. del día sin examen al inicio del semestre.

fue significativamente mayor a la registrada a las 10:00 a.m. ($p=0,0189$). Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los valores obtenidos a las 2:00 y a las 4:00 p.m. ($p=0,1729$).

El día B (día del examen) se observó que la actividad de AAS mas baja se obtuvo a las 8:00 a.m., de manera semejante a lo ocurrido el día A. Los valores de actividad correspondientes a las 10:00 a.m, 2:00 p.m. y 4:00 p.m. fueron significativamente mayores a los registrados a las 8:00 a.m. ($p=0,4744$; $0,7190$; $0,3314$; respectivamente). Sin embargo los valores obtenidos a las 10:00 a.m., 2:00 p.m. y 4:00 p.m. no fueron diferentes entre sí

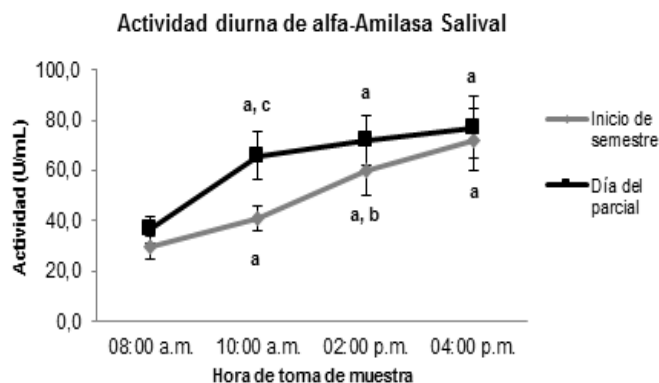


FIGURA 1.- En la gráfica se muestra la actividad diurna de la enzima alfa-amilasa salival correspondiente a un día sin examen al inicio del semestre (línea gris) y al día del parcial (línea negra) en estudiantes de 8vo semestre de la Escuela de Bioanálisis de la UCV. Los datos se presentan como media \pm error estándar. (a)= $p<0,05$ respecto a las 8:00 a.m. del mismo día, (b)= $p<0,05$ respecto a las 10:00 a.m. del mismo día, (c)= $p<0,05$ respecto a las 10:00 a.m. del día sin examen al inicio del semestre.

($p=0,0010$; $0,0002$; $0,0010$; respectivamente). Cuando se compararon los valores de actividad obtenidos en los días A y B, sólo hubo una diferencia significativa en el valor correspondiente a las 10:00 a.m. ($p=0,0119$), hora que coincidió con el inicio del examen.

Discusión

Los individuos participantes en este estudio fueron mayoritariamente del sexo femenino, lo cual se asocia a la mayor proporción de estudiantes de sexo femenino que constituyen la población estudiantil de la Escuela de Bioanálisis de la UCV (24) y que concuerda con lo observado en otras Escuelas de Bioanálisis del país (25) y del extranjero (26). La edad promedio fue aproximadamente 2 años mayor a la encontrada en otros estudios realizados con estudiantes universitarios de 8vo semestre (24) o 4to año de la carrera (25). Este hallazgo podría deberse a que un 29% de los estudiantes participantes fueron mayores de 24 años (25 a 31 años) y a los retrasos producidos en el normal transcurso de los últimos períodos lectivos, lo cual ha generado que se culmine aproximadamente un semestre por año en los últimos 5 años, en vez de dos como corresponde al régimen semestral de la carrera. La mayoría de los estudiantes fueron regulares, el 67,7% cursó las 4 materias obligatorias del semestre y una minoría, representada por el 19,3% inscribió materias electivas.

Porcentajes similares fueron reportados por Bello y Jiménez (27) durante el período lectivo Pri-2014. Esto sustenta la observación de dichos autores en referencia al aumento en la proporción de estudiantes del 8vo semestre que inscriben la carga académica completa a fin de evitar postergar aún mas su salida a Pasantías Hospitalarias y en consecuencia, su fecha de Grado, ya que anteriormente era mas frecuente la inscripción de la mitad de esta carga.

El 100% de los estudiantes afirmó haber tenido momentos de preocupación o nerviosismo durante el semestre. El nivel de preocupación o nerviosismo percibido por los estudiantes fue de $4,36 \pm 0,12$. Este corresponde a un valor alto en la escala tipo Likert empleada, donde 1 corresponde a "poco" y 5 a "mucho". Este valor es mayor al obtenido por Barraza (28) al aplicar este inventario a alumnos de licenciatura de la Universidad Pedagógica de Durango (México) y refleja el alto nivel de estrés autopercibido por los estudiantes del 8vo semestre de Bioanálisis de la UCV, coincidiendo con lo expresado reiteradamente por los mismos. Este resultado además se corresponde con reportes previos que señalan que las carreras de la salud como Medicina y Enfermería, producen niveles de estrés moderados a altos entre sus estudiantes (5,29,30).

Las situaciones percibidas como inquietantes con mayor frecuencia por los estudiantes fueron aquellas asociadas a la sobrecarga de tareas, las evaluaciones de los profesores y la falta de tiempo para hacer el trabajo, lo cual concuerda con lo reportado para estudiantes de Bioanálisis (24), así como de otras carreras y diferentes semestres por otros investigadores (28,31,32). De lo cual se podría inferir que estas situaciones son fuertes estresores académicos para los estudiantes en general, independientemente de la carrera o el semestre en estudio.

Las reacciones de naturaleza física y psicológica fueron las mas frecuentes en la muestra estudiada, entre ellas: somnolencia, fatiga, trastornos del sueño, inquietud, ansiedad y problemas de concentración. Se ha demostrado una alta prevalencia de estrés y alteraciones de los hábitos y calidad de sueño en estudiantes de Medicina (5,32), asociándose de manera significativa los desórdenes del sueño con un menor rendimiento académico (33). Las alteraciones del patrón de sueño podrían tener efectos negativos sobre el ritmo circadiano, el patrón de secreción de cortisol y otros metabolitos, lo cual podría relacionarse con la fisiopatogenia de trastornos emocionales como la depresión y la ansiedad (12) y enfermedades metabólicas entre las que se encuentran la obesidad, la resistencia a la insulina y la

diabetes (14).

La única reacción comportamental que se presentó con alta frecuencia fue: aumento o reducción del consumo de alimentos, lo cual coincide con lo encontrado por Olivetti en estudiantes universitarios (32). Esto podría relacionarse con la mayor tendencia que tienen los estudiantes a modificar sus hábitos alimentarios durante los períodos de mayor estrés académico, inclinándose por el consumo de alimentos dulces (34). Se ha sugerido que los incrementos en las concentraciones de cortisol que se producen durante las situaciones de estrés aumentan el apetito y la ingesta de alimentos de alto contenido energético (35). Adicionalmente, el cortisol favorece la acumulación de grasa visceral, conduciendo a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como obesidad, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular (36). De todo lo anterior se desprende que esta población estudiantil podría tener un mayor riesgo de desarrollar trastornos metabólicos como resultado del elevado nivel de estrés que experimentan durante la época de exámenes y que se manifiesta con reacciones físicas como las alteraciones en sus patrones de sueño y comportamentales al modificar sus hábitos de alimentación. No obstante, esto habría que estudiarlo a futuro con mayor detalle.

Las estrategias de afrontamiento mas empleadas fueron: habilidad asertiva (defender nuestras preferencias ideas o sentimientos sin dañar a otros), elaboración de un plan y ejecución de sus tareas y ventilación y confidencias (verbalización de la situación que preocupa), de manera muy similar a lo reportado por Olivetti (32). En el estudio realizado por Barraza (28), la habilidad asertiva y la elaboración de un plan y ejecución de sus tareas fueron las dos estrategias de afrontamiento mas frecuentes.

Los valores de actividad de AAS obtenidos en el presente trabajo están en concordancia con los reportados en adolescentes por Adam y col (37) y en estudiantes universitarios de Psicología en un día control (sin examen) y el día de un examen oral por Schoofs y col (38).

Varios investigadores han reportado que la AAS tiene un patrón de secreción diurno. Nater y col (20), quienes evaluaron la actividad diurna de la enzima en 76 adultos sanos, revelaron que ésta disminuye marcadamente al despertar para aumentar luego de 30-60 minutos y de manera constante a lo largo del día hasta alcanzar sus valores mas altos en horas de la tarde. Adam y col (37) al realizar un estudio en adolescentes, demostraron valores de AAS más bajos en la mañana que se fueron incrementando en el transcurso del día. Nuestros

resultados coinciden con los mencionados, ya que el patrón de actividad observado el día A (sin examen) se caracterizó por presentar los valores mas bajos a las 8:00 a.m. con un aumento progresivo durante el día, de tendencia lineal ($R^2=0,98945$). El día B (día del examen) se registró el valor de actividad mas bajo a las 8:00 a.m. con valores subsiguientes mas altos, de manera similar a lo ocurrido el día A. Sin embargo, se observó un incremento muy significativo en la actividad de la enzima a las 10:00 a.m. (hora que coincidió con el inicio del examen) y que a su vez, fue significativamente mayor a la correspondiente del día A. La semejanza entre los valores obtenidos el día A y el día B a las 8:00 a.m., podría indicar que la anticipación no tuvo un efecto importante sobre la secreción de esta enzima salival y que probablemente, su elevación sólo se produce ante situaciones de estrés inmediatas o agudas, en este caso la inminencia del examen, como han señalado otros investigadores (17,39). Estos resultados contribuirían a explicar lo reportado por Medina-Martel y col (24), quienes no observaron diferencias significativas entre los valores de actividad de AAS medida a las 8:00 a.m. en tres días diferentes: el día de un parcial programado para las 10:00 a.m. y 4 días antes o 4 días después del mismo.

La mayoría de los trabajos consultados han estudiado la actividad de AAS en respuesta a pruebas de estrés controladas en el laboratorio, como el Trier Social Stress Test (TSST) (23,40,41,42). Sin embargo, un menor número de trabajos han evaluado dicha respuesta ante estresores reales de la vida cotidiana (38,43,44). El modelo académico empleado en la presente investigación quizás sea uno de los que se aproxima mejor a la respuesta de los individuos ante situaciones de estrés psicosocial (45) que significan un verdadero peligro o amenaza para ellos, por las consecuencias reales que éstas podrían tener en su vida (13,38). Por todo lo antes expuesto, este podría ser uno de los aportes mas importantes de este estudio, resaltando además que es uno de los pocos realizados en nuestro país sobre la utilidad de la AAS como biomarcador de estrés en el ámbito académico. No obstante, aún queda un largo camino por recorrer en el estudio de este biomarcador y su utilidad en la evaluación biológica de la respuesta simpática al estrés incluyendo a un mayor número de individuos, establecer valores de referencia según edad y sexo, evaluar la respuesta ante diversos tipos de estresores y a diferentes horas del día, entre otros.

Conclusiones

Los estudiantes de 8vo semestre de la Escuela de

Bioanálisis de la UCV, períodos lectivos Seg-14 y Pri-15, mostraron un alto nivel de nerviosismo y preocupación durante el semestre y percibieron las evaluaciones como situaciones altamente estresantes. Las reacciones físicas y psicológicas al estrés fueron las mas frecuentes. A nuestro entender y según la revisión bibliográfica realizada, este trabajo es pionero en nuestro país, ya que presenta los primeros valores de actividad diurna de AAS en jóvenes universitarios venezolanos. El patrón diurno de actividad de la AAS fue similar al reportado por otros investigadores, con valores mas bajos en la mañana que se fueron elevando a lo largo del día. Se demostró además que la elevación de este parámetro ante un examen escrito se produjo de manera aguda, ya que los incrementos de AAS coincidieron con la hora de inicio del parcial pero no se observaron dos horas antes del mismo.

Agradecimiento

Al CDCH y a la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina de la UCV por el financiamiento de los reactivos empleados en la realización de este trabajo. A la Lic. Margarita Iturriza por permitirnos el uso del equipo Dimension RXL para el procesamiento de las muestras. A la Prof. María Fátima Garcés por su apoyo constante y colaboración. A la Prof. Sabrina Ferraz por sus valiosas observaciones. Al personal Docente de las Cátedras de Fisiología, Bioquímica "A" y "C" de la Escuela de Bioanálisis. A los estudiantes voluntarios participantes en este estudio.

Referencias

1. Barraza A. Un modelo conceptual para el estudio del estrés académico. Revista Electrónica de Psicología Iztacala 2006;26(2):270-289. [serie en Internet]. [citado 4 junio 2014] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/799/79926212.pdf>
2. Lacey K, Zaharia MD, Griffiths J, Ravindran AV, Merali Z, Anisman H. A prospective study of neuroendocrine and immune alterations associated with the stress of an oral academic examination among graduate students. Psychoneuroendocrinology 2000;25:339-356.
3. Takatsuji K, Sugimoto Y, Ishizaki S, Ozaki Y, Matsuyama E, Yamaguchi Y. The effects of examinations stress of salivary cortisol, immunoglobulin A and chromogranin A in nursing students. Biomed Res 2008;29(4):221-224.
4. Joshi RM, Sanghavi S, Upadhyaya DP, Chauhan A, Halvadia S. Effect of examination stress on the plasma cortisol level. Natl J Med Res 2012;2(4):435-438.
5. Giri P, Baviskar M, Phalke D. Study of sleep habits and sleep problems among medical students of Pravara Institute of Medical Sciences Loni, Maharashtra, India. Annals of Medical and Health Sciences Research 2013;3(1):51-54.

6. Kiecolt Glaser JK, Dura JR, Speicher CE, Trask OJ, Glaser R. Spousal caregivers of dementia victims: longitudinal changes in immunity and health. *Psychosom Med* 1991;53:345-362.
7. Guarino L, Gavidia I, Antor M y Caballero H. Estrés, salud mental y cambios inmunológicos en estudiantes universitarios. *Psicología Conductual* 2000;8(1):57-71.
8. Cohen F, Kemeny ME, Zegans LS, Johnson P, Kearney KA, Stites DP. Immune function declines with unemployment and recovers after stressor termination. *Psychosom Med* 2007;69(3):225-234.
9. Montoro J, Mullol J, Jáuregui I, Dávila I, Ferrer M, Bartra J, del Cuvillo A, Sastre J y col. Stress and allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009;19(Suppl 1):40-47.
10. Abdulghani H, Alrowais N, Bin-Saad N, Al-Subaje N, Haji A, Alhagwi A. Sleep disorder among medical students: relationship to their academic performance. *Med Teach* 2012; 34(Suppl 1):37-41.
11. Costarelli V, Patsai A. Academic examination stress increases disordered eating symptomatology in female university students. *Eat Weight Disord* 2012;17(3):e164-e169.
12. Concepcion T, Barbosa C, Velez J, Pepper M, Andrade A, Gelaye B y col. Daytime Sleepiness, Poor Sleep Quality, Eveningness Chronotype, and Common Mental Disorders Among Chilean College Students. *J Am Coll Health* 2014;62(7):441-448.
13. Ekpenyong CE, Daniel NE, Aribo EO. Associations between academic stressors, reaction to stress, coping strategies and musculoskeletal disorders among college students. *Ethiop J Health Sci* 2013;23(2):98-112.
14. Davies S, Ang J, Revell V, Holmes B, Mann A, Robertson F, Cui N, Middleton B y col. Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *PNAS* 2014;111(29):10761-10766.
15. Flaa A, Eide IK, Rostrup M. Sympathoadrenal stress reactivity is a predictor of future blood pressure. An 18-year follow-up study. *Hypertension* 2008;52(2):336-341.
16. Rohleder N, Nater M, Jutta M, Wolf M, Ehlert U, Kirschbaum C. Psychosocial Stress- Induced Activation of Salivary Alpha- Amylase An Indicator of Sympathetic Activity?. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1032:258-263.
17. Koh D, Ng V, Lin A. Alpha amylase as a salivary biomarker of acute stress of venepuncture from periodic medical examinations. *Front Public Health* 2014;26(2):121-125.
18. Marques AH, Silverman MN, Sternberg EM. Evaluation of stress systems by applying noninvasive methodologies: measurements of neuroimmune biomarkers in the sweat, heart rate variability and salivary cortisol. *Neuroimmunomodulation* 2010;17(3):205-208.
19. Bosch JA, de Geus EJ, Veerman EC, Hoogstraten J, Nieuw A. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosom Med* 2003;65(2):245-258.
20. Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32(4):392-401.
21. Bosch JA, Veerman EC, de Geus EJ, Proctor GB. α -Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet! *Psychoneuroendocrinology* 2011; 36(4):449-453.
22. Tanaka Y, Maruyama Y, Ishitobi Y, Kawano A, Ando T, Ikeda R, Inoue A, Imanaga J y col. Salivary alpha-amylase and cortisol responsiveness following electrically stimulated physical stress in bipolar disorder patients. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2013;8:1899-1905.
23. Engert V, Vogel S, Efanov S, Duchesne A, Corbo V, Ali C, Pruessner J. Investigation into the cross-correlation of salivary cortisol and alpha-amylase response to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* 2011;36(9):1294-1302.
24. Matilde Medina-Martel, Engelbert Jiménez, Isis Bello, Fariel Casadiegos, Marlene Briceño. *Acta Cient Soc Bioanalistas Esp* 2014;17(2):66-74.
25. Labrador C. Estrés académico en estudiantes de la facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tesis Doctoral. Mérida-Venezuela, Universidad de los Andes. 2012;76-121pp.
26. Hernández C, González S, González J, Pérez J, Roque I. Variación de la cuenta de linfocitos en estudiantes de la facultad de Bioanálisis bajo estrés. *Rev Med UV* 2011:14-17.
27. Bello I, Jiménez E. Evaluación de estrés académico autopercibido, cortisol sérico y alfa-amilasa salival en estudiantes de Bioanálisis de la UCV. Trabajo Especial de Investigación presentado como requisito parcial para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 2014;35-62pp.
28. Barraza A. Estrés académico y burnout estudiantil. Análisis de su relación en alumnos de licenciatura. *Psicogente* 2009;12(22):272-283.
29. Al-Daghri NM, Al-Othman A, Albanyan A, Al-Attas O, Alokail M, Sabico S, Chrousos G. Perceived Stress Scores among Saudi Students Entering Universities: A Prospective Study during the First Year of University Life. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11(4):3972-3981.
30. Liébana-Presa C, Fernández-Martínez ME, Gándara AR, Muñoz-Villanueva MC, Vásquez-Casares AM, Rodríguez-Borrego MA. Psychological distress in health sciences college students and its relationship with academic engagement. *Rev Esc Enferm USP* 2014;48(4):715-722.
31. Feldman L, Goncalves L, Chacón G, Zaragoza J, Bagés N, De Pablo J. Relaciones entre estrés académico, apoyo social, salud mental y rendimiento académico en estudiantes universitarios venezolanos. *Universitas Psychologica* 2008;7:739-751.
32. Oliveti S. Estrés académico en estudiantes que cursan primer año del ámbito universitario. Licenciatura en Psicología, Universidad Abierta Interamericana, Facultad de Psicología y Relaciones Humanas, Argentina, 2010.
33. Wagas A, Khan S, Sharif W, Khalid U, Ali A. Association of academic stress with sleeping difficulties in medical students of Pakistani medical school: a cross sectional survey. *Peer J* 2015;3:e840.

34. Kim Y, Yang HY, Kim A-J, Lim Y. Academic stress levels were positively associated with sweet food consumption among Korean high-school students. *Nutrition* 2013;29:213-218.
35. Bjorntorp P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes Rev* 2001;2(2):73-86.
36. Kyrou I, Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9(6):787-793.
37. Adam EK, Till Hoyt L, Granger DA. Diurnal alpha amylase patterns in adolescents: associations with puberty and momentary mood states. *Biol Psychol* 2011;88(2-3):170-173.
38. Schoofs D, Hartmann R, Wolf O. Neuroendocrine stress responses to an oral academic examination: No strong influence of sex, repeated participation and personality traits. *Stress* 2008;11(1):52-61.
39. Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF, Kirschbaum C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology* 2006;43(6):645-652.
40. Van Stegeren A, Wolf O, Kindt M. Salivary alpha amylase and cortisol responses to different stress tasks: Impact of sex. *Int J Psychophysiol* 2008;69(1):33-40.
41. Thoma V, Kirschbaum C, Wolf J, Rohleder N. Acute stress responses in salivary alpha-amylase predict increases of plasma norepinephrine. *Biol Psychol* 2012;91(3):342-348.
42. Petrakova L, Doering B, Vits S, Engler H, Rief W, Schedlowski M, Grigoleit J. Psychosocial Stress Increased Salivary Alpha-Amylase Activity Independently from Plasma Noradrenaline Levels. *PLOS ONE* 2015;10(8):e0134561 Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134561>
43. Guglielminotti J, Dehoux M, Mentre F, Bedaira E, Montravers P, Desmots J, Longrois D. Assessment of salivary amylase as a stress biomarker in pregnant patients. *Int J Obstet Anesth* 2012;21(1):35-39.
44. Edmonds R, Burkett B, Leicht A, McKean M. Effect of chronic training on heart rate variability, salivary IgA and salivary alpha-amylase in elite swimmers with a disability. *PLOSOne* 2015;10(6):e0127749 Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0127749>
45. Al-Ayadhi LY. Neurohormonal changes in medical students during academic stress. *Ann Saudi Med* 2005;25(1):36-40.

COLORACIÓN DE GIEMSA Y CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA HISTOPLASMOSIS

Xiomara Moreno C.¹, Gustavo Martínez¹, Leopoldo Sánchez², Carolina Macero¹

¹Departamento de Microbiología. Instituto Médico la Floresta. Caracas-República Bolivariana de Venezuela. ² Cátedra de Salud Pública. Departamento de Medicina Preventiva y Social (MPS). Escuela de Medicina "J. M. Vargas". Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas. República Bolivariana de Venezuela.

Recibido para publicación el 1 diciembre 2015. Aprobado para publicación el 18 diciembre 2015.

RESUMEN:

La coloración de Giemsa (CG) es el clásico examen directo para el diagnóstico presuntivo y precoz de histoplasmosis causada por el *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*), sin tener que esperar el crecimiento en cultivo. Sin embargo, la CG tiene una baja sensibilidad y en algunos casos no hay crecimiento del hongo en el cultivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad de la CG frente al cultivo de *H. capsulatum*, como un aporte en el diagnóstico micológico de esta infección en el Instituto Médico la Floresta. Se tomaron 28 cultivos, los cuales tenían CG positiva con crecimiento o ausencia del hongo en el cultivo y CG negativa con crecimiento en el cultivo durante el período 2006-2014. Las muestras provenían de médula ósea (17), ganglio (8), sangre (2) y tejido pleural (1). Los aislados fueron clasificados de acuerdo a la enfermedad de base del paciente: VIH (11), Cáncer (10) y no VIH/no Cáncer (7). El intervalo de confianza fue de 95% con una significancia de $p < 0.05$. Se aplicó la prueba exacta de Fischer de dos colas, y cálculo de porcentajes. Se obtuvo un 67.9% (19) de coloraciones positivas y 89.3% (25) de crecimiento en cultivo. El porcentaje de sensibilidad de la CG frente al cultivo fue de 84% y el valor de $p > 0.05$. La sensibilidad de la coloración respecto al cultivo en este estudio fue baja, pero no despreciable para el diagnóstico de esta infección. La experiencia del observador aumenta la probabilidad de diagnóstico de la enfermedad. Un CG negativa no confirma que el paciente no tenga la infección.

Palabras claves: Coloración de Giemsa, cultivo, *Histoplasma capsulatum*, VIH, Cáncer.

THE GIEMSA STAIN AND CULTURE IN THE DIAGNOSIS OF HISTOPLASMOSIS

SUMMARY

The Giemsa stain (GS) is the classic direct test for presumptive and early diagnosis of histoplasmosis caused by *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*), without waiting for culture growth. However, the GS has a low sensitivity and in some cases no fungal growth in culture. The aim of this study was to evaluate the sensibility of the GS versus culture of *H. capsulatum*, as a contribution to mycological diagnosis of this infection in the Floresta Medical Institute. 28 cultures were taken, which had positive GS with growth or absence of fungus in culture and positive or negative GS with growth of fungus in culture in the period 2006-2014. The samples were from bone marrow (17), node (8), blood (2) and pleural tissue (1). The isolates were classified according to the patient's underlying disease: HIV (11), Cancer (10) and no HIV / no cancer (7). The confidence interval was 95% and a significance of $p < 0.05$. Fisher's exact test two-tailed and percentages applied. It was obtained 67.9% (19) of positive stains and 89.3% (25) growth in culture was obtained. The percentage of sensibility of the GS versus culture was 84% and the value was $p > 0.05$. The sensibility of staining in from culture in this study was low, but not negligible for the diagnosis of infection. The observer experience increases the probability of disease diagnosis. A negative GS stain does not confirm that the patient is not infected.

Key words: Giemsa stain, culture, *Histoplasma capsulatum*, HIV, Cáncer.

Introducción

La histoplasmosis es una micosis sistémica granulomatosa y de presencia endémica en las Américas, India, Sur Africa, Oceanía y Europa (1) causada por un hongo dimorfo denominado *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) (2). Se han descrito tres variedades de especie para este hongo: var. *capsulatum* encontrado en el continente americano, var. *duboisii* confinado en África,

que son patógenos en humanos; y var. *farciminosum* patógeno en equinos en África, Oriente Medio y Asia (3). La histoplasmosis se conoce como una infección marcador de sida, así como en otras enfermedades que puedan tener una alteración en la respuesta celular, también se ha relacionado con diversas actividades laborales o hobbies (4). La enfermedad se adquiere por la inhalación de los propágulos en forma de aerosoles

Solicitar copia a: Xiomara Moreno Calderón (e-mail: x.morenoc@hotmail.com)

presentes en la naturaleza, a los que se exponen un gran número de personas; no se transmite de persona a persona (2). La principal técnica diagnóstica de esta infección se hace por métodos directos para la visualización del hongo y el aislamiento en cultivo (5). La coloración de Giemsa (CG) es la coloración clásica como método directo para el análisis e interpretación del diagnóstico presuntivo y precoz de *H. capsulatum*, en dicha coloración se observan blastoconidias muy pequeñas de formas redondas u ovoides de manera intracelular y extracelular en los macrófagos; permitiendo en algunos casos hacer un diagnóstico certero sin tener que esperar el crecimiento del cultivo (2). Sin embargo la CG tiene una baja sensibilidad, que puede ir de un 9% a un 43% durante el padecimiento de la enfermedad (4). El cultivo es el *Gold standard*, por lo que es considerado el diagnóstico definitivo, pero tiene una baja sensibilidad en la forma autolimitada de 15%, y de 85% en la forma pulmonar crónica y diseminada. En algunos casos este hongo no se llega a aislar en cultivo (4, 6). El objetivo de esta investigación es evaluar la sensibilidad de la CG negativa y positiva frente al crecimiento o ausencia en cultivo de *H. capsulatum*, provenientes de diferentes muestras clínicas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto Médico la Floresta como un aporte al diagnóstico micológico de esta infección.

Materiales y Métodos

Durante el 01 de enero de 2006 hasta el 31 de diciembre de 2014 en el departamento de Microbiología del Instituto Médico la Floresta se procesaron 3579 cultivos para investigación de hongos. Previa revisión y análisis de las boletas con los registros de los pacientes que tuvieron sospecha o diagnóstico clínico de histoplasmosis se encontraron 28 cultivos, los cuales presentaron CG positiva con crecimiento o ausencia del agente causal

en el cultivo y CG negativa con crecimiento del agente causal en el cultivo.

La CG es la coloración utilizada para la evaluación y descripción de la población de células sanguíneas en hematología y parásitos intracelulares (7). En micología es el examen básico directo de rutina en los laboratorios de baja y alta complejidad, esta coloración fue utilizada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para observar las estructuras fúngicas de *H. capsulatum* en su fase parasitaria, Figura 1.

Las muestras provenientes de sangre y médula ósea fueron procesadas por la técnica de lisis centrifugación y sistema BACTEC 9240® (botellas Myco/F Lytic®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tejidos y ganglios fueron cortados finamente y macerados para su posterior siembra; también fueron procesados fluidos orgánicos y secreciones respiratorias. Todas estas muestras al ser recibidas en el laboratorio fueron cultivadas en agar dextrosa Sabouraud con y sin antibiótico (cloranfenicol) y agar mycosel, estas fueron incubados a 25°C para obtener la fase micelial, Figura 2; también se cultivaron en agar infusión cerebro corazón y agar sangre, los cuales se incubaron a 35°C para la obtención de la fase levaduriforme, observándose consecutivamente por unas 10 semanas. Secuencialmente se estuvieron observando los cultivos hasta la 10 semana. Los cultivos que presentaron crecimiento del hongo con características macroscópicas de *Histoplasma* se les elaboró un examen directo con azul de cotton, donde se observó microconidios y macroconidios simples y tuberculados e hifas hialinas septadas, Figura 3. Cabe aclarar que el crecimiento del hongo con las características macro y microscópicas descritas permiten identificar el agente causal, y si no crece, hay ausencia del agente fúngico ya que no se describen cultivos positivos o negativos.

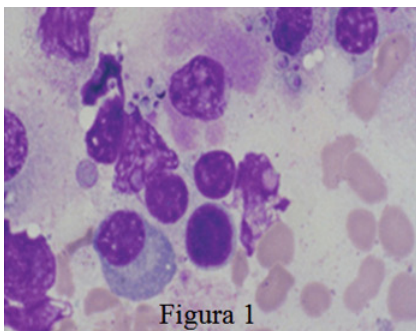


Figura 1

FIGURA 1. Blastoconidias intracelulares y aisladas compatibles con *H. capsulatum* en una coloración de Giemsa provenientes de médula ósea.

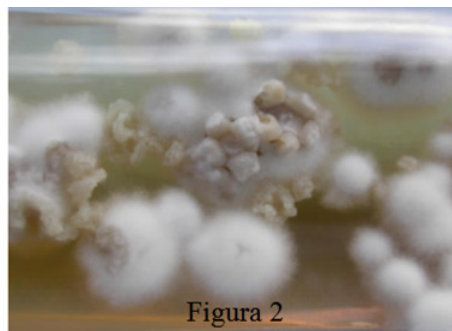


Figura 2

FIGURA 2. Colonias algodonosas y cerebriformes de color blanco y tonalidad marrón claro en medio agar Sabouraud dextrosa a 25°C.

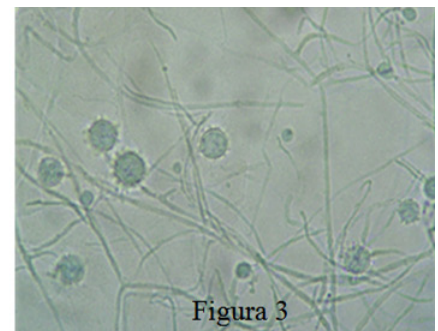


Figura 3

FIGURA 3. Microconidias de pared lisa, macroconidias tuberculadas o hifas hialinas tabicadas de *H. capsulatum* en medio agar Sabouraud dextrosa a 25°C.

En la metodología estadística se aplicó la prueba exacta de Fischer de dos colas y cálculo de porcentajes. Para la significancia estadística del estudio se tomó un nivel de confianza del 95 % y una significancia de $p < 0.05$.

Resultados

Las diferentes muestras analizadas que tuvieron relación con histoplasmosis se observan en la Figura 4. Los pacientes a quienes se les aisló *H. capsulatum* fueron clasificados de acuerdo a la enfermedad de base presente, como se observan en la Figura 5. De 28 coloraciones y cultivos procesados se obtuvieron: 19 (67.9%) coloraciones positivas y 25 (89.3%) cultivos con crecimiento del hongo. Tres pacientes tuvieron CG positiva y no hubo crecimiento en cultivo del hongo. Seis pacientes tuvieron CG negativa y hubo crecimiento del hongo en cultivo, Tabla 1. El porcentaje de sensibilidad de la CG frente al crecimiento en cultivo, fue de 84%. El cultivo para *Histoplasma* tiene un grado de evidencia A-I, siendo el estándar de oro en el diagnóstico de la histoplasmosis (8). No se pudo establecer una relación estadística entre tipos de muestra y enfermedad de base frente a la CG y el cultivo por el escaso número de las mismas, Tabla 1.

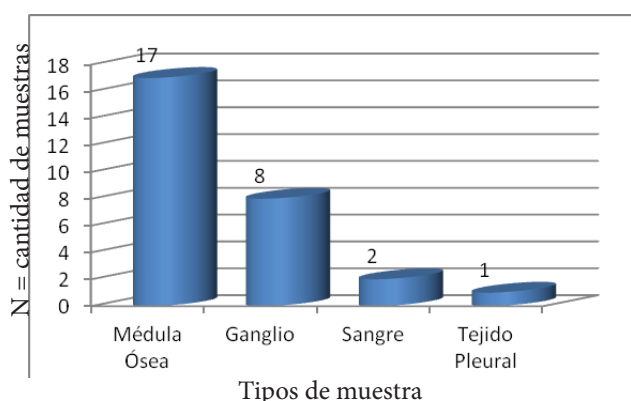


FIGURA 4. Cantidad y tipos de muestra de donde se aisló *H. capsulatum*.

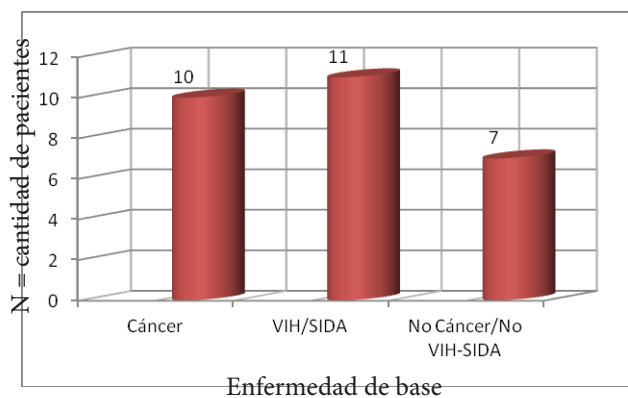


FIGURA 5. Pacientes clasificados de acuerdo a la enfermedad de base.

TABLA 1. A) Número de pacientes de acuerdo a su enfermedad de base, con y sin crecimiento del hongo en estudio. B) Tipos de muestra con CG positiva y negativa. C) Tipos de muestras con cultivo donde hubo crecimiento o ausencia del hongo en estudio.

A) Enfermedad Paciente	Cultivo		TOTAL
	Cult (cch)	Cult (sch)	
Cáncer	10	0	10
VIH-SIDA	11	0	11
No Cáncer/No VIH-SIDA	4	3	7
TOTAL	25	3	28

B) Origen Muestra	Coloración		TOTAL
	CG +	CG -	
Médula Ósea	11	6	17
Ganglio	6	2	8
Sangre	1	1	2
Tejido Pleural	1	0	1
TOTAL	19	9	28

C) Origen Muestra	Cultivo		TOTAL
	Cult(cch)	Cult(sch)	
Médula Ósea	16	1	17
Ganglio	6	2	8
Sangre	2	0	2
Tejido Pleural	1	0	1
TOTAL	25	3	28

Cult (cch): cultivo con crecimiento del hongo. Cult (sch): cultivo sin crecimiento o ausencia del hongo. VIH-SIDA: virus de inmunodeficiencia humana-síndrome de inmunodeficiencia adquirida. CG+: coloración de giemsa positiva. CG-: coloración de giemsa negativa.

Discusión y Conclusiones

La gran mayoría de personas que han estado expuestas al hongo *H. capsulatum* no presentan ningún síntoma o solo una enfermedad muy leve que no es diagnosticada como histoplasmosis (1,6). Las manifestaciones clínicas relacionadas con histoplasmosis son: histoplasmosis pulmonar, histoplasmosis crónica cavitaria pulmonar, mediastinitis granulomatosa, fibrosis mediastinal e histoplasmosis diseminada, y estas ocurren en un 1%. La infección por histoplasmosis va a estar asociada al estado inmune del hospedero, relacionándose con pacientes con SIDA, trasplantados de órganos sólidos, neoplasias malignas hematológicas, inmunosupresión por corticoesteroides, entre otros (6). El SIDA ha ayudado a instaurar el espectro de la enfermedad diseminada, pacientes con recuentos de CD4 <150 células/μl se encuentran en mayor riesgo de padecerla por lo que es una enfermedad definitiva de SIDA, a la vez sigue siendo una infección oportunista importante (1). Los casos más graves actualmente son las histoplasmosis severas en pacientes que reciben antagonistas del

factor de necrosis tumoral. La deficiencia del receptor de interferon gamma se ha descrito como un factor de riesgo refractario para histoplasmosis diseminada recurrente, también han sido asociadas a histoplasmosis diseminada el síndrome de hiperinmunoglobulemia M y deficiencias de inmunoglobulinas (6,9). La infección en estos pacientes viene dada en meses y si no es tratada las consecuencias son fatales, en contraste con la forma aguda fatal que se produce en los lactantes e inmunocomprometidos de otro tipo (6).

El diagnóstico de histoplasmosis en el laboratorio esta dado por la utilización de la CG y la técnica del cultivo como paso inicial; existen otras técnicas en coloraciones, detección de antígenos y anticuerpos, biología molecular entre otros, pero no son el objetivo de esta investigación. La observación microscópica de la CG como una técnica de coloración directa nos permite detectar en grupos o en solitario blastoconidias esféricas u ovoides con una sola gemación o aisladas y un diámetro que puede ir de 1 a 4 μm ; con una pared que no se tiñe muy bien, un núcleo que se colorea de violeta oscuro y el citoplasma en azulado tenue, casi incoloro, semejante a una cápsula en el interior de los macrófagos o de células gigantes en menor proporción (2, 3,5).

En el presente estudio 19 de 28 CG, se observó microscópicamente levaduras compatibles con *H. capsulatum* lo que representa un 67.9% del hallazgo global, no se pudo discriminar la variantes de las manifestaciones clínicas reportadas por la literatura internacional donde en la enfermedad autolimitada la sensibilidad es del 9%, en la pulmonar crónica va del 17-40% y en la enfermedad diseminada es de un 43% aproximadamente (4), debido a que no se disponía de datos clínicos y epidemiológicos completos en el momento de la recepción de la muestra en el laboratorio.

La observación de este tipo de blastoconidias intracelulares en cualquier tipo de muestra con las características antes descritas son muy sugestivas y compatibles con *H. capsulatum*; sin embargo existen algunas blastoconidias pequeñas de *Cryptococcus neoformans* que presentan una cápsula pobre, blastoconidias de *Candida glabrata*, conidias de *Penicillium marneffeii*, quistes de *Pneumocystis jirovecii* y amastigotas de *Leishmaniasis* spp. (6,10), que pueden confundirse y dar un diagnóstico incorrecto, por lo que la experiencia del observador es indispensable ya que aumenta la probabilidad del diagnóstico de la enfermedad. Una CG negativa no confirma que el paciente no tenga la infección por este tipo de hongo y

que no vaya a crecer en el cultivo. De ahí la importancia de no utilizar la CG como única herramienta diagnóstica.

En cuanto al cultivo, es el método *Gold Standard*, y es quien da el diagnóstico definitivo de la histoplasmosis (6). La identificación del hongo se realiza con base en las características macro y microscópicas de las colonias crecidas en los medios antes mencionados, donde la utilidad del antibiótico es inhibir el crecimiento bacteriano y la cicloheximida inhibe el crecimiento de hongos saprofitos contaminantes (10). La incubación de los medios descritos a 28-30°C se obtiene la fase micelial, mientras que incubados a 37°C en agar sangre o infusión cerebro corazón se obtiene la fase levaduriforme, este es un proceso gradual que se consigue haciendo pases consecutivos, aunque no siempre se obtiene esta conversión (4).

La sensibilidad del cultivo en la fase autolimitada de la enfermedad es de un 15%, en la pulmonar crónica y la diseminada es de un 85% (4,11), en el presente estudio se obtuvo un 89.3% en forma global debido a la ausencia de datos epidemiológicos referidos anteriormente. En este estudio, 25 de 28 cultivos hubo crecimiento de *H. capsulatum* en su fase micelial y en 18 (72%) de los 25 se obtuvo la fase levaduriforme. Cuando se realizó el examen directo de colonias crecidas a las 3 semanas de incubación se observó microconidios de pared lisa, esta característica se puede confundir con microconidios del complejo *Scedosporium* por lo que se sugiere incubar por más tiempo para conseguir una mayor esporulación (12). También hay que considerar que la observación de macroconidios tuberculados puede ser similar a los observados en los géneros *Sepedonium* y *Chrysosporium* (6) por lo que se debería tratar de conseguir el crecimiento de las dos fases: micelial y levaduriforme para poder dar un diagnóstico certero, sin olvidar la importancia que tiene la observación de las estructuras fúngicas coloreadas con Giemsa en muchos casos con el examen directo de la muestra clínica. Muchos investigadores recomiendan observar el cultivo hasta 12 semanas, otros recomiendan observar por 4 semanas sobre todo en zonas endémicas (9,13), por lo que se debería estandarizar en cada laboratorio el tiempo del cultivo de acuerdo al lugar geográfico, tipos de pacientes relacionados con su enfermedad de base y tratamiento para obtener un resultado confiable.

En tres cultivos no hubo crecimiento de *H. capsulatum*, pero las CG estaban positivas; dos de ellos pertenecían a pacientes cuyo diagnóstico fue hecho hace 6 y 8 meses respectivamente en otro centro de salud y que

estaban en tratamiento, mientras que el otro cultivo negativo pertenecía a un paciente inmunocompetente que había visitado la cueva del indio (hábitat natural de *H. capsulatum* en Caracas-Venezuela), el cual no fue tratado debido a que sus manifestaciones clínicas y radiológicas no pasaron de ser una neumonía controlable, representando en este estudio un 10,7% de la enfermedad autolimitada, resultado menor pero no despreciable con lo reportado por Fernández et al., en su revisión en cuanto a la clasificación de la enfermedad respecto al cultivo.

El aislamiento de *H. capsulatum* también es posible a partir de muestras provenientes del torrente sanguíneo de pacientes con infección crónica y diseminada, utilizando el sistema de lisis-centrifugación que incluye los tubos Isolator, el cual es más eficaz que los medios convencionales; de igual manera han diseñado equipos automatizados como BACTEC 9240®, que utiliza frascos de hemocultivo Myco/F Lytic® específicos para la recuperación de patógenos intracelulares además de levaduras, hongos filamentosos, micobacterias, entre otros (2,3,10). En las 19 muestras provenientes tanto de médula ósea como de sangre en este estudio se utilizaron las dos metodologías, resaltando la importancia de estas técnicas en la recuperación del hongo.

En esta investigación se procesaron 966 muestras provenientes del tracto respiratorio inferior (esputo, secreción traqueal, lavado bronquial y lavado broncoalveolar) pero no fue posible recuperar *H. capsulatum*, debido a que no se usó ningún agente mucolítico y la mayoría de los cultivos les creció flora asociada o contaminante. Debido a esto Peman et al., recomiendan el uso de algún mucolítico como N-acetil-L-cisteína (NALC) en muestras muy viscosas antes de la siembra, con volúmenes iguales de muestra, dejando actuar a temperatura ambiente por unos 10 minutos o hasta que se consiga la fluidificación de la muestra antes de la siembra. Esta metodología se debería implementar de rutina para todas las muestras respiratorias exceptuando los lavados broncoalveolares los cuales vienen diluidos, salvo los muco-sanguinolentos (14). Smith et al. (15), recomiendan la utilización de hidróxido de amonio (NH₄OH) cubriendo el medio selectivo para aumentar el pH, el cual va disminuir el crecimiento de hongos comensales y permitir el crecimiento lento de *H. capsulatum*. Esta técnica es muy útil en aquellos pacientes con histoplasmosis pulmonar cavitaria crónica y pulmonar aguda, después de la exposición a un gran inoculo del hongo.

En la presente investigación se observó que el porcentaje de sensibilidad de la coloración es bajo (84%), respecto al cultivo, pero no despreciable para el diagnóstico de esta infección, resultado que se correlaciona con los reportados por la literatura internacional (4,6). No hubo significancia estadística entre CG y el cultivo ($p > 0,05$), debido a que los resultados se presentaron de forma independiente y al azar.

La histoplasmosis es y seguirá siendo una micosis sistémica de gran impacto clínico y social en los pacientes con un compromiso inmunológico. Los métodos convencionales como la CG y el cultivo son las principales herramientas de diagnóstico en un laboratorio microbiológico de rutina y de mayor complejidad. El cultivo nunca será reemplazado por otro tipo de diagnóstico, pues es quien pone en evidencia al microorganismo. No todos los laboratorios tiene accesibilidad a pruebas inmunoserológicas, serológicas y moleculares por lo que se hace indispensable utilizar la CG y el cultivo como métodos diagnósticos de histoplasmosis. Cabe destacar que la experiencia del observador aumenta la probabilidad de diagnóstico de la enfermedad con una CG. Un CG negativa no confirma que el paciente no esté relacionado con la enfermedad, por lo que la CG debe ir de la mano con el cultivo microbiológico para poder aportar un diagnóstico veraz y confiable.

Referencias

1. Bahr N, Antinori S, Wheat L, Sarosi G. Histoplasmosis Infections Worldwide: Thinking Outside of the Ohio River Valley. *Curr Trop Med Rep* 2015;2:70-80.
2. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. México D.F: Interamericana McGraw; 2010. p. 279-293.
3. Quindós Guillermo. *Micología clínica*. Elsevier. Barcelona-España 2015.
4. Fernández CC, Illnait MT, Martínez G, Perurena MR, Monroy E. Una actualización acerca de histoplasmosis. *Rev Cub Med Trop* 2011;63(3):189-205.
5. Muñoz C, Cano LE, González A. Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infecto* 2010; 14(S2):S145-S158.
6. Kauffman C A. Histoplasmosis: a clinical and Laboratory update. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:115-132.
7. Bava AJ, Zuiani MF. Comparación de las coloraciones de Giemsa y Grocott en el diagnóstico de la histoplasmosis.

- Acta Bioquim Clin Latinoam 2007;41:395-398.
8. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, Guarro J, Guinea J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. Grupo de Estudio de Micología Médica de la SEIMC (GEMICOMED). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(1):39.e1–39.e15.
 9. Crum NF, Lederman ER, and Wallace MR. 2005. Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Medicine (Baltimore)* 2005;84(5):291–302.
 10. Guimaraes AJ, Nosanchuck JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. *Braz J Microbiol* 2006;37(1):1-13.
 11. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Bladdley JN, McKinsey DS, Loyd JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by de Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2007;45(7):807-825.
 12. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas digital of Clinical Fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht Universitat Rovira i Virgili, Reus;2002.
 13. Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(2):192-198.
 14. Sánchez F. Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior (Capítulo 5). En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC, editores. *Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. 1era ed. España: Rev Iberoam Micol 2001;5.1-5.12.
 15. Smith CD, and Goodman NL. Improved culture method for the isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* from contaminated specimens. *Am J Clin Pathol* 1975;63:276–280.

ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y LAS METODOLOGÍAS CONVENCIONALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Gabriela Tovar¹, Claudia Parra², Beatriz Ariza³

¹Lcda. Bioanálisis Universidad Central de Venezuela. Esp. Microbiología Médica, Pontificia Universidad Javeriana.

²Bacterióloga Pontificia Universidad Javeriana, MSc. Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana, PhD Microbiología y parasitología Universidad Complutense de Madrid. ³Bacterióloga Pontificia Universidad Javeriana. MSc. Microbiología Médica, Universidad Nacional de Colombia.

Recibido para publicación 29 de junio 2015. Aprobado para publicación 30 de julio 2015.

RESUMEN:

Actualmente la identificación microbiológica en los laboratorios clínicos depende de las metodologías convencionales como técnicas de identificación fenotípica y pruebas bioquímicas en conjunto con la biología molecular, lo que se traduce en un dilatado tiempo de respuesta de aproximadamente 48 a 72 horas para emitir un informe con la identificación del agente etiológico de la infección. Debido a esto, los científicos han buscado nuevas metodologías que puedan ser estandarizadas y de alcance universal, capaz de identificar microorganismos patógenos de manera confiable, en tiempos muy cortos, con buena reproducibilidad y optimizando el flujo de trabajo con un mínimo costo; es aquí donde sale a relucir el sistema MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry). Desde 1975 la tecnología MALDI-TOF o la espectrometría de masas se introdujo en el campo de la microbiología, con la cual se ha logrado la identificación de microorganismos como bacterias grampositivas, gramnegativas, levaduras y hongos filamentosos a partir de cultivos puros, sin embargo, el reto continua en lograr minimizar aún más los tiempos de respuesta en el laboratorio, y es por eso que las investigaciones recientes están volcadas en la búsqueda de la aplicación de la espectrometría de masas para la identificación de microorganismos a partir de muestras biológicas tales como hemocultivos, orina y otros líquidos estériles principalmente líquido cefalorraquídeo.

Palabras Clave: Espectrometría de masas, MALDI-TOF MS, hemocultivo, orinas, diagnostico microbiológico, líquido cefalorraquídeo.

COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN MASS SPECTROMETRY AND CONVENTIONAL METHODOLOGIES FOR THE IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS FROM BIOLOGICAL SAMPLES

SUMMARY

Currently, microbiological identification in clinical laboratories relies on conventional methodology as phenotypic identification techniques and biochemical tests in conjunction with molecular biology, leading to increment in turnaround time of approximately 48 to 72 hours to report the correct pathogen. Scientists have sought new methodologies that can be standardized, capable of identifying pathogens reliably in short times, with good reproducibility and optimizing workflow with minimum cost; It is at this point where MALDI-TOF MS system (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) comes into place. Since 1975 MALDI-TOF or mass spectrometry was introduced into the field of microbiology, it have achieved the identification of microorganisms such as gram-positive bacteria, gram negative, yeast and filamentous fungi from pure cultures, however, the challenge continues to find the way to reduce time and generate potentially beneficial impacts on the patients, that is why recent research is overturned in the search for the application of mass spectrometry for identifying microorganisms from biological samples such as blood cultures, urine and other fluids as cerebrospinal fluid.

Key words: Mass Spectroscopy, MALDI-TOF MS, blood culture, urine, microbial diagnostic, cerebrospinal fluid.

Introducción

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que genera características de espectros de masas como huellas espectrales, que son únicas para cada microorganismo y por ende ideales para una precisa identificación en niveles de género y especie. Un

espectrómetro de masas se compone de tres unidades funcionales, (a) una fuente de iones para ionizar y transferir de la muestra moléculas de iones en una fase gaseosa, (b) un analizador de masas que separa los iones en función de su relación masa-carga (m/z), y (c) un dispositivo de detección para realizar la lectura de iones

Solicitar copia a: Gabriela Tovar (e-mail: gath1990@hotmail.com, tovarh1990@gmail.com)

separados. MALDI-TOF es una técnica de ionización suave que permite ionización de grandes biomoléculas no volátiles tales como proteínas intactas (1).

Los resultados obtenidos se generan cuando el detector de iones que mide la masa y carga, genera espectros los cuales el software del instrumento los compara con una base de datos de referencia definida, lo que conduce a la identificación del microorganismo arrojando los resultados a través de un puntaje (SCORE) o porcentaje de probabilidad del espectro que indica el grado de confianza en el resultado emitido, el cual puede ser identificación correcta de género y especie (score ≥ 2), identificación correcta de solo de género (score 1.7-1.9) o una identificación incorrecta del microorganismo en género y especie (< 1.7). La identificación de los microorganismos lo hace a través del análisis de las proteínas ribosomales y chaperonas de los mismos; como las composiciones de proteínas difieren entre especies bacterianas, incluso entre variedades, especies y subespecies, se generaran diferentes espectros, lo que permite la discriminación entre organismos estrechamente relacionados (2).

Numerosos reportes (3) han demostrado un excelente desempeño de MALDI-TOF MS para la identificación de bacterias y levaduras a partir de cultivos. En todos los estudios, esta tecnología ha resultado superior o equivalente con los métodos actuales usados para la identificación de microorganismos, sin embargo, la reducción del tiempo y disminución de los costos en cuanto a reactivos es lo que hace pensar en la superioridad de la técnica. Estas características hacen que la aplicación del MALDI-TOF MS a partir de muestras biológicas, principalmente hemocultivos y líquidos estériles, sea una llamativa opción para obtener una mayor rapidez en la entrega del resultado.

A continuación se presenta una revisión del tema realizada a partir de artículos de revistas indexadas en bases de datos como Pubmed, Clinical Key, Science Direct, publicados en los últimos 5 años, en los cuales se analizan las posibles variables que puedan influir en los resultados de identificación de microorganismos a partir de muestras biológicas, las diferencias entre los protocolos pre analíticos establecidos por los investigadores y la oportunidad ofrecida por esta tecnología en comparación con las metodologías convencionales.

Revisión de Tema

El sistema MALDI-TOF surge en la microbiología como una opción que permite llevar a cabo la identificación

rápida de microorganismos. En la literatura científica se observan reportes de las diferentes limitaciones y dificultades encontradas en los experimentos realizados para la identificación de los microorganismos a partir de muestras biológicas, dentro de las cuales se pueden citar la cantidad de bacterias que pueda estar presente en la muestra (Limite de detección del MALDI-TOF para lograr un buen Score), el volumen necesario de la muestra, la pureza de las mismas (monomicrobianas y polimicrobianas), interferencias propias de la muestra y protocolos previos a la identificación de los microorganismos, entre otros.

Hemocultivos:

Los estudios más notables para identificación de microorganismos en muestras son a partir de hemocultivos. Las bacteriemias se han convertido en una causa importante de morbimortalidad; European Antimicrobial Resistance Surveillance System muestra un incremento anual del 6,4 % de los episodios de bacteriemia en Europa durante los últimos años, además de un preocupante aumento del aislamiento de bacterias resistentes en la sangre, hecho que limita las opciones terapéuticas de estas infecciones. Agency for Healthcare Research and Quality observa que la tasa de mortalidad en pacientes con bacteriemia es ocho veces mayor que la de pacientes sin esta patología, pudiendo alcanzar hasta el 80 % de los casos. Por otro lado los pacientes que se complican con sepsis suelen requerir el ingreso en unidades de cuidados intensivos y frecuentemente presentan bacteriemia, ésta asciende hasta el 11% de los casos en ICI, y en general en el hospital las tasas de mortalidad por bacteriemia oscilan entre 25 y 80%. El diagnóstico precoz y tratamiento de la sepsis bacteriana es esencial para un resultado favorable del paciente. Kumar et al, informan un descenso promedio del 7,6% en la supervivencia del paciente por cada hora de retraso en la identificación del agente causal y por lo tanto en el reporte del tratamiento antibiótico, después de la aparición de la hipotensión, relacionada con la sepsis (4).

No obstante las candidemias también pueden llevar a complicaciones devastadoras y generar un marcado incremento en el costo de hospitalización. La mortalidad sigue siendo elevada, al igual que las bacteriemias, sobre todo cuando la terapia con medicamentos antimicóticos no se administra de inmediato. La prevalencia de las diferentes especies de *Candida* varía de región a región, y los patrones de susceptibilidad son especie específicos. En consecuencia la rápida y precisa identificación del agente causal es fundamental para el éxito del tratamiento (5).

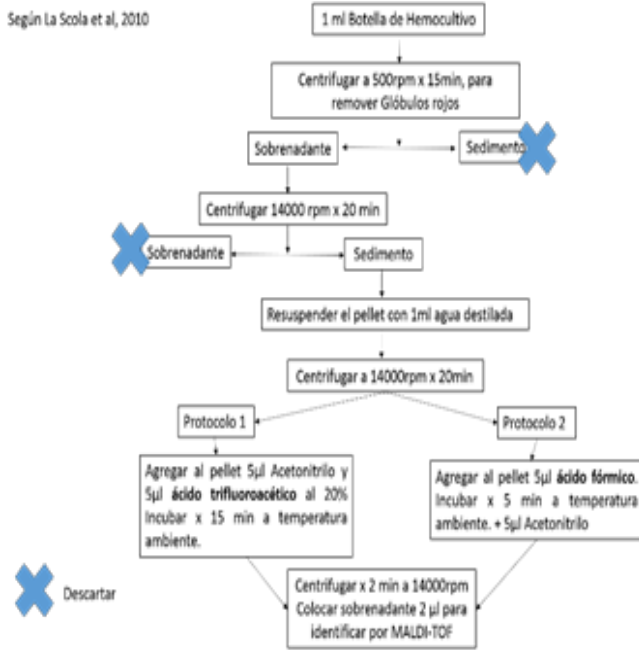


Figura 1: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de La Scola y col, 2010 (6).

Gramnegativos

En gramnegativos, los resultados reportados han sido constantes en cuanto al buen score y al mayor grado de concordancia con los métodos convencionales. Este hecho se ha visto repetidamente; en el caso de La Scola y col. en el 2010, ellos realizan un estudio con 599 hemocultivos positivos, a partir de los cuales reportan la aplicación de dos protocolos pre analíticos (ácido tricloroacético y ácido fórmico) para tratar las muestras (Figura 1), con los cuales obtuvieron un porcentaje de concordancia con la metodología convencional a nivel de especies de un 94%; hecho similar que reporta Kok y col en el 2011 (7), teniendo una cantidad de muestra de 507 análogo a La Scola (6). Juiz y col en el 2012 (8) a pesar de contar con una muestra mucho menor que la de los investigadores anteriores (n=85), logra comparar dos protocolos pre analíticos, un método casero y el método comercial sepsityper (Figuras 2 y 3 respectivamente), obteniendo en ambos un buen score de concordancia y un alto porcentaje de identificación para microorganismos gramnegativos, (por el método casero 94.74% para género y 84,21% para especie y por el kit Sepsityper 94.74% tanto para género como para especie). Resultados similares reportan Buchan(4), Foster(9) y Schubert(10).

Una ventaja que los investigadores han observado

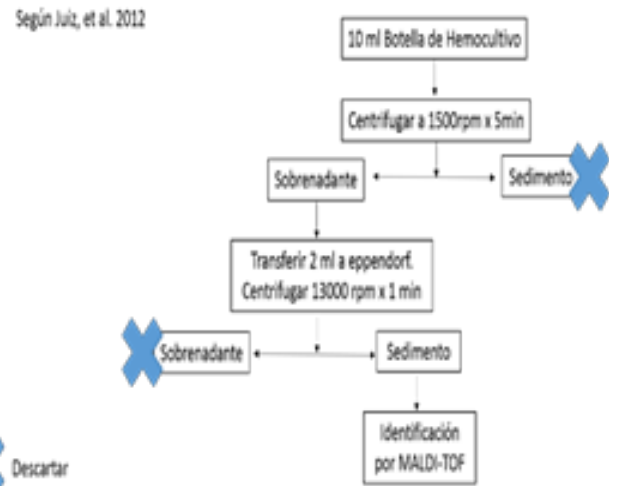


Figura 2: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de Juiz y col 2012 (8).

en la tecnología MALDI con respecto a los procesos convencionales, es que estos últimos no tiene la capacidad de disgregar complejos de microorganismos. El caso puntual y más visto en los estudios corresponde al complejo *Enterobacter Cloacae*; Buchan(4) y Ferreira (11) coinciden en encontrar casos en los que por microbiología convencional la identificación fue *Enterobacter cloacae*, mientras que por MALDI-TOF fue *E. asburice*.

Pese a que la mayoría de estudios muestran la correcta



Figura 3: Método Sepsityper®, Casa Bruker (7)

identificación a nivel de género y especie de las bacterias gramnegativas por MALDI-TOF, otros investigadores han reportado ciertos errores, como es el caso de Prod'hom y col en el 2010; este grupo obtuvo en su investigación (n= 126), cinco identificaciones erradas en gramnegativos con scores bajos, la mayoría debido a la presencia de cápsula, la cual generó interferencia en la identificación del perfil proteómico del microorganismo (2 *K. pneumoniae* y 2 *Haemophilus influenzae*)(12). Este mismo fenómeno también fue observado por Foster en el 2013, con identificaciones erróneas de *Klebsiella pneumoniae* que registraban como falso resultado *Enterobacter aerogenes* (9). Otro fenómeno negativo visto en la metodología MALDI-TOF son aquellos casos en los que existe homología entre las proteínas ribosomales de los microorganismos; caso puntual de *E. coli* vs. *Shigella* spp, en donde el sistema MALDI-TOF identifica erradamente *E.coli* como *Shigella* spp.(13).

Grampositivos

En grampositivos la concordancia entre las metodologías convencionales y la tecnología MALDI-TOF, fue mucho más baja que en el caso de gramnegativos. La Scola, en sus dos protocolos de extracción de proteínas, (Imagen 1) obtuvo muy bajo desempeño del MALDI-TOF para la identificación de grampositivos, teniendo como resultado para el protocolo con ácido trifluoroacético un 37% de concordancia y aunque mejoró en un 30% más con el segundo protocolo (Acido fórmico), la concordancia permaneció baja, de 67% (6). Resultados similares se encuentran en el estudio de Ferreira (11), obteniendo una concordancia de apenas 64,8% a nivel de género, y mucho menor a nivel de especies 31.8%.

En otros estudios, en los cuales el protocolo pre analítico utilizado fue el kit comercial sepsityper, los resultados para grampositivos, mejoraron enormemente; Buchan y col en el 2011 reportan una concordancia a nivel de genero un 98,1% y para especies de un 93,3%, en este mismo año (4), Schubert reporta un 86,3% a nivel de especies (10); pero a pesar de la buena correlación que se observó en estos dos estudios, Kok y col en 2011, utilizando igualmente el Kit sepsityper reportan para grampositivos apenas un 67% de identificación correcta (7); lo que hace pensar que aunque efectivamente el sepsityper podría ser un buen protocolo pre analítico para identificación de microorganismos grampositivos a partir de hemocultivos, éste presenta ciertas deficiencias que afectan los resultados, posiblemente porque no se realizaron lavados previos de las células ya que este paso no se encuentra dentro de su protocolo o insuficiente cantidad de muestra utilizada (14).

Las principales limitaciones que han visto los investigadores para lograr una identificación precisa de los grampositivos son a) la composición de la pared celular de las bacterias gram-positivas que confieren mayor resistencia a la lisis, b) posible presencia de proteínas residuales de la sangre que produzcan interferencia.

Tomando en cuenta la regular experiencia de trabajar espectrometría a partir de hemocultivos para grampositivos, Foster en 2013, aplica un protocolo pre analítico (Figura 4), basado no solo en procesos de lavados y centrifugación, sino que agregó una sustancia detergente para poder destruir las paredes de los grampositivos, obteniendo excelentes resultados de concordancia con la metodología convencional, tanto a nivel de género (95,1%) como a nivel de especies (88.1%), por lo que se puede decir que la teoría de utilizar protocolos pre analíticos con sustancias más fuertes y capaces de destruir la pared bacteriana gruesa de los grampositivos, pueda mejorar el rendimiento del MALDI-TOF con respecto a los mismos (9).

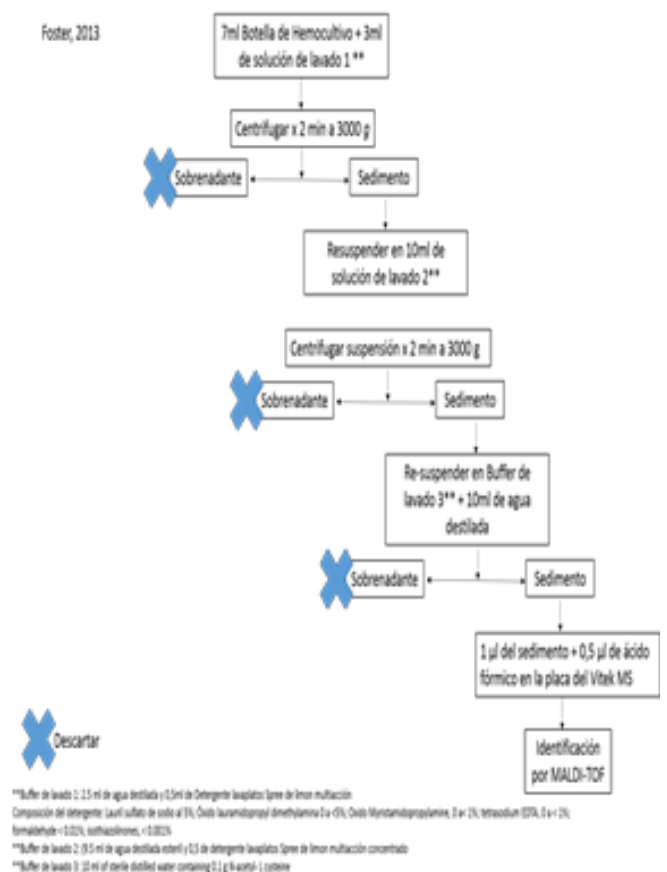


Figura 4: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de Foster, 2013(9).

Además del bajo rendimiento observado en las diversas investigaciones revisadas, todas en su mayoría coinciden en el hecho de la identificación discordante del género *Streptococcus* a nivel de especies. Se ha visto en varios estudios, como es en el caso de Stevenson y col 2010, discordancias en la identificación de 8 botellas de hemocultivos con *Streptococcus*, los cuales fueron identificados como *Streptococcus pneumoniae* por MALDI-TOF Bruker, siendo *Streptococcus mitis/oralis* por metodología convencional (15); resultados similares fueron obtenidos por Kok (7), Ferroni (16), Buchan (4) y Schubert (10).

Foster, en 2013 en un estudio similar a los anteriores, en el cual utiliza el espectrómetro de masas de Biomerieux (Vitek-MS), encuentra un mejor rendimiento en los *Streptococcus*, habiendo obtenido un 80,1% de identificación correcta del total de los *Streptococcus* encontrados en su investigación (18/21), lo que sugiere que la base de datos que utiliza el Vitek MS, pudiese ser un poco más robusta que la de MALDI-TOF Bruker, o que el protocolo pre analítico empleado por este investigador, permitió una mejor diferenciación a nivel de especies de este género (9).

Este error recurrentemente reportado por los investigadores se ha justificado a través de la incapacidad que tiene el sistema MALDI-TOF de diferenciar entre las especies de los *Streptococcus*, debido a la estrecha relación filogenética existente entre las diversas especies de este género; no obstante el sistema MALDI-TOF es capaz de equivocarse en la identificación de *Streptococcus mitis/oralis* como *Streptococcus pneumoniae*, pero no viceversa, ya que el software no permite escapar microorganismos de tanta relevancia (10).

Debido a esta limitante del MALDI-TOF, los autores sugieren que ante la identificación de *Streptococcus*, se recurra a métodos convencionales rápidos como pruebas adicionales, por ejemplo, el uso de métodos inmunológicos para la detección de antígenos en látex como el Slidex pneumo kit, el cual fue usado en el estudio de Ferroni y col en el 2010, dando una excelente sensibilidad y especificidad del 100% y 95% respectivamente (16) o el uso de la optoquina y la solubilidad en bilis para diferenciar otras especies de *Streptococcus pneumoniae* (7)

Con respecto al género *Staphylococcus*, los reportes de los diferentes investigadores son variados; Se han obtenido un 100% de concordancia entre los métodos convencionales y MALDI-TOF, para lograr diferenciar con alta precisión los *Staphylococcus aureus*, de los *Staphylococcus coagulasa* negativo

(S. CoNS) estableciendo un protocolo pre analítico bastante efectivo para grampositivos, como es el uso de un detergente Saponina al 5% (Figura 5), hecho de gran relevancia, por la importancia de diferenciar entre una bacteriemia por *Staphylococcus aureus* o por *Staphylococcus coagulasa* negativos, siendo estos últimos usualmente contaminantes en la toma de muestra (16). En ocasiones se observa, un porcentaje relativamente alto de identificación de genero *Staphylococcus*, pero sumamente baja la concordancia a nivel de especies, e incluso no se logra ningún espectro de identificación (11) las posibles causas de esto no son discutidas por los investigadores en sus ensayos.

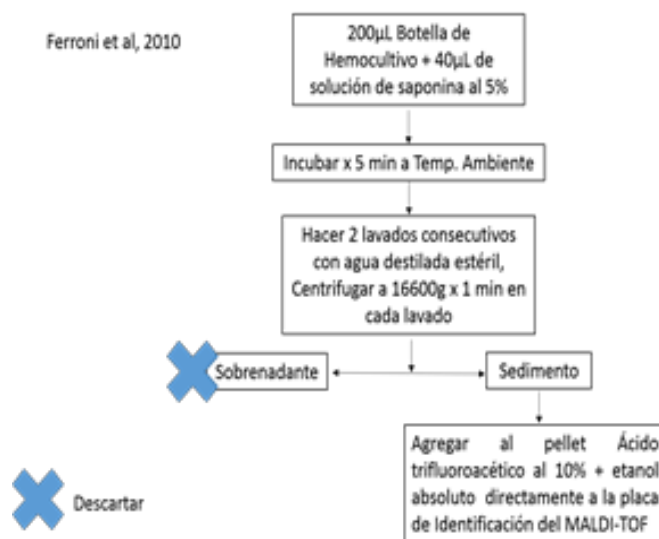


Figura 5: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de Ferroni y col 2010 (16).

Levaduras

Con respecto a levaduras, los resultados son mucho más deficientes que para bacterias, hecho que se adjudica a las características propias de las levaduras (membranas abundantes de lípidos como el ergosterol, y pared celular rica en quitina) lo que convierte en una tarea muy difícil la identificación de las levaduras a partir de hemocultivos; es por esto que se debe encontrar un protocolo lo suficientemente efectivo que destruya la estructura de la levadura y de esta manera lograr una confiable identificación de las mismas a nivel de especies a partir de MALDI-TOF. En los artículos revisados se ha evidenciado el impacto que tienen los protocolos pre analíticos, donde repetidamente se observa la necesidad de utilizar agentes detergentes fuertes que puedan disolver su estructura.

Hoy en día hay numerosos estudios únicamente enfocados a la identificación de candidemias, como es el caso de Marinach-Patrice y col en 2010 los cuales

obtuvieron excelentes resultados, aplicando un protocolo pre analítico basado en SDS al 0.1% (Figura 6), sustancia detergente capaz de disolver las membranas y paredes de la levadura. La identificación por MALDI-TOF correspondió en un 100% con la identificación realizada por metodología convencional (17). El estudio de Spanu y colaboradores, también utiliza una sustancia detergente en su protocolo pre analítico en este caso Tween 80 al 0.1% (Figura 7), logrando la identificación de 91.3% a nivel de especies de los 346 hemocultivos positivos (5). A pesar de la buena identificación de levaduras, estos investigadores encontraron deficiencias en la identificación de una especie en específico, *Candida guilliermondii*, al parecer por características propias de pared de la especie o de la base de datos que no permite establecer una comparación de huellas espectrales, hecho que reportan también otros autores, los cuales encontraron problemas incluso en la identificación de la levadura a partir de colonia pura.

Como se ha venido discutiendo, es mucho más complicada la identificación de las levaduras a partir de hemocultivos, que gramnegativos e incluso que grampositivos, por lo que se deben establecer protocolos mucho más eficientes que incluyan sustancias tensioactivas como los detergentes, para lograr identificaciones correctas a nivel de especie, ya que sabemos que el tratamiento de estas infecciones es especie-dependiente.

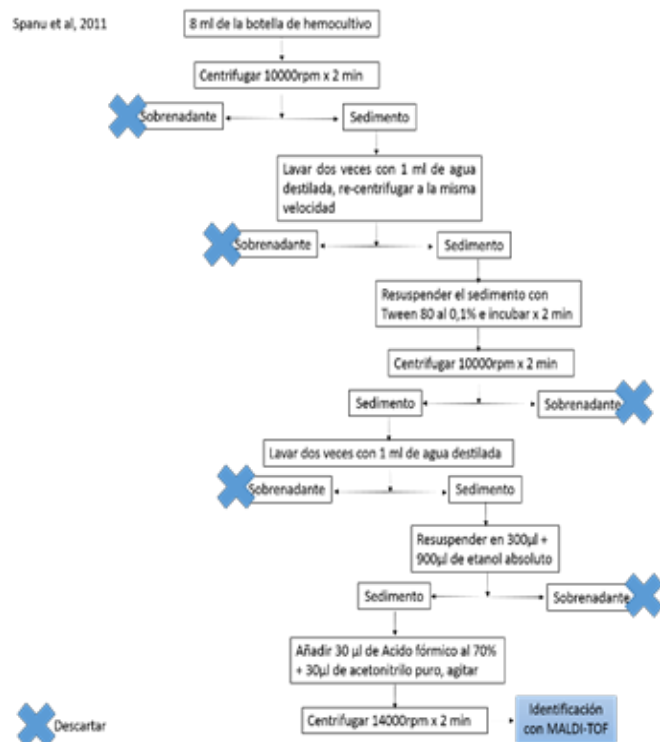


Figura 7: Protocolo pre analítico para hemocultivos. Tomado de Spanu y col 2011 (5).

identificable en la base de datos, debido a que se solapan los perfiles de los microorganismos implicados (18) otros estudio evidencian que solo es capaz de identificar a aquel microorganismo que se encuentra en mayor concentración e incluso reportando muy buenos scores (4,10). Estos datos son un poco desalentadores ya que estudios previos calculan alrededor de un 5% de los hemocultivos tienen más de un microorganismo. Según los investigadores, se deben realizar ajustes en los software de los espectrómetros de masas, para lograr la diferenciación en cultivos mixtos, es por esto que nunca se podrá dejar de lado la tinción de gram, ya que además de proveer un informe preliminar para el médico, orienta al analista en si la infección es mono o polimicrobiana.

Límite inferior de detección

Reportan algunos investigadores que la concentración de los microorganismos en la botella de hemocultivos, es crucial ya que dependiendo de la concentración del microorganismo los resultados darán con mayor o menor puntaje de concordancia con los espectros de la base de datos. Stevenson y col determinaron que la concentración idónea de bacterias para obtener un buen score de concordancia con la base de datos, es de 106UFC/ml (15), datos que coinciden con los de Christner y col la cual indica que la concentración para tener un buen score (≥ 2) debe ser de 106 a 109

Según Marinach-Patrice et al., 2010

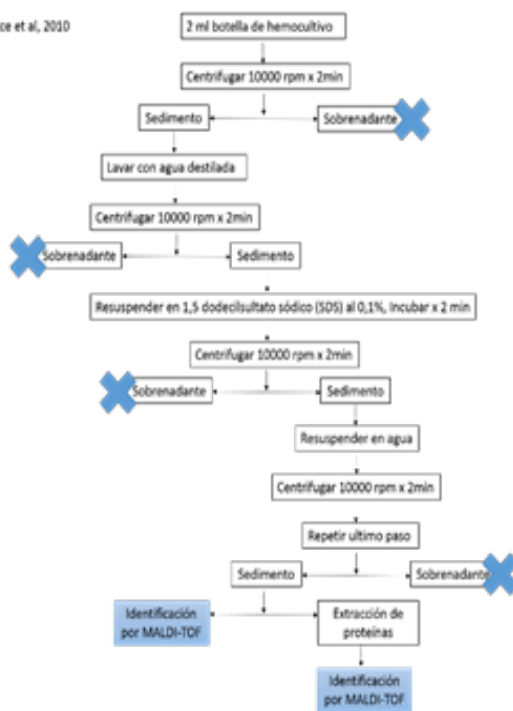


Figura 6: Protocolo pre analítico para levaduras a partir hemocultivos. Tomado de Marinach-Patrice y col 2010 (17).

UFC/ml (18). Yan y col, reportan como límite inferior de detección para el MALDI-TOF en identificación de levaduras 5.9×10^5 UFC/ml, el cual realizó este estudio inoculando a las botellas de hemocultivos *Candida parapsilosis* a distintas concentraciones, hasta encontrar la concentración a la que fue detectada por MALDI-TOF correctamente (14).

Tipo de Botella de Hemocultivo para análisis por Espectrometría

Finalmente, algunos estudios han sugerido diferencias significativas en la eficacia de la identificación mediante MALDI-TOF MS entre los diferentes sistemas de hemocultivos disponibles comercialmente. Así mientras la mayor parte de los estudios realizados usan el sistema BACTEC (Becton Dickinson, EE.UU) y obtiene identificaciones correctas en más del 85% de los casos, otros estudios realizados mediante el sistema Bact/Alert (bioMérieux, Francia) obtienen resultados muy inferiores, en torno al 30% (19). Sin embargo la mayoría de los estudios se realizan con el sistema BACTEC (Becton Dickinson, EE.UU) y muy pocos con el sistema Bact/Alert (bioMérieux, Francia), se recomienda que se hagan más estudios comparativos entre estos sistemas de hemocultivos. Para el 2011, Romero-Gómez compara tres sistemas de hemocultivos (BACTEC, Bact/Alert y VERSATREK (TREK Diagnostic Systems, Thermo Fisher, EE.UU) muestra diferencias a favor de BACTEC 76.1% (32/42), frente a Bact/Alert 61.5% (32/52) y VERSATREK con un 68.57% (24/35), sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas; a su vez este estudio reveló que los sistemas de hemocultivo con carbón, no dan buenos scores de identificación en equipos de espectrometría (20).

Orinas

Las infecciones del tracto urinario (ITU) constituyen una de las patologías infecciosas más frecuentes, tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario. La confirmación microbiológica de las ITU toman entre 24-48 horas por métodos convencionales, durante este tiempo los pacientes se encuentran con terapia empírica, para algunos innecesarias o inadecuadas. Tradicionalmente el rápido diagnóstico de ITU se basa en el gram de orina, el cual provee un rápido resultado, confiable y económico para la identificación de bacteriuria. Siendo el urocultivo el gold standar en el diagnóstico de las ITU sigue siendo demorado en su resultado. De este modo tratando de minimizar costos y tiempo, se ha intentado emplear el uso del sistema MALDI-TOF para la identificación microbiana a partir de las muestras de orinas, utilizando igualmente como

en los hemocultivos, protocolos pre analíticos para lograr la disminución o eliminación de interferencias analíticas propias de las muestras y tratar de concentrar al máximo los microorganismos.

Actualmente la mayoría de las investigaciones orientadas a la identificación de microorganismos a partir de muestras de orinas, buscan determinar el límite inferior de detección por el sistema MALDI-TOF, ya que a pesar de que el conteo considerado por la mayoría de los médicos es $\geq 10^5$ UFC/ml en ciertos pacientes, como mujeres embarazadas, niños, pacientes con sondas o catéteres, pacientes inmunocomprometidos, o con enfermedades de bases como la diabetes mellitus, o cáncer, una infección del tracto urinario puede ser considerada hasta con un conteo de 10^2 , y es en estos pacientes donde se necesitaría el resultado con mayor prontitud.

Con la idea de poder identificar la mínima concentración de bacterias en orinas que pueda detectar el sistema MALDI-TOF MS, en 2013 Wang y col, establecen diferentes diluciones de los microorganismos más comunes implicados en infecciones urinarias, para determinar la mínima concentración a la que podían ser identificados por MALDI-TOF MS, teniendo como resultado más bajo requerido para la identificación para *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* 3.0×10^4 UFC/ml, lo que significa se necesita un conteo bastante alto (21). Kohling y col en el 2014 evidencian que el sistema MALDI-TOF MS logra identificar correctamente el uropatógeno cuando éste se encuentra en un conteo más bajo que el reportado por Wang, de 10^3 UFC/ml (22). Ferreira en 2011 determinó que los resultados para límite inferior de detección del MALDI-TOF, dieron similares a sus resultados de las muestras clínicas, ya que todas las muestras que tenían un conteo bacteriano entre 5×10^4 y 9×10^4 UFC/ml dieron una correcta identificación con un alto score, mientras que las que tenían un conteo $< 5 \times 10^4$ UFC/ml, no generaron una identificación confiable (Score < 1.7) (23). Esto revela junto con los dos estudios anteriormente nombrados que uno de los factores más influyentes en la identificación correcta de los microorganismos a partir de muestras de orinas, es la concentración a la cual se encuentra la bacteria en la muestra; MALDI-TOF no es capaz de identificar correctamente la bacteria en muestras en que ésta se encuentre por debajo de 10^3 UFC/ml.

Los resultados correctos de identificación también están influenciados por el protocolo preestablecido por los investigadores, este paso al igual que en los hemocultivos,

es fundamental para lograr una identificación correcta. Una posible causa que permitió que los estudios de Kohling en 2014, pudieran detectar hasta 103 UFC/ml, pudo haber sido el protocolo establecido por estos investigadores.

Como técnica rápida y de apoyo al MALDI-TOF, en 2014 Burillo y col, toman la tinción de gram como guía en la identificación del uropatógeno, concluyendo que la tinción de gram si ayuda a predecir ausencia o presencia de bacteriuria y conjuntamente con el resultado del MALDI-TOF MS pueden ayudar a la instauración de la terapia adecuada en tan solo una hora (24). Con respecto a dificultades encontradas en la identificación de microorganismos a partir de muestras de orina, Burillo, en su trabajo, demuestra que al igual que ocurre con los hemocultivos la identificación de levaduras no es fácil y que se deben establecer protocolos pre analíticos más fuertes que logren destruir la pared de la levadura para lograr la identificación no solo a nivel de genero sino también a nivel de especies.

En el caso de infecciones mixtas, los estudios de Wang (21) demuestran que la identificación de los microorganismos dependerá de su relación en cuanto a cantidad en la muestra; éste grupo realizó diluciones 1:1, 1:2, 1:4 y 1:9 y viceversa de *E.coli* con *Paeruginosa* y de *E.coli* con *E. faecium*, determinando que si la relación es 1:1 o 1:2, MALDI-TOF MS será capaz de identificar ambos, pero si la relación es 1:4 en ocasiones si se logra identificar ambos, pero definitivamente en 1:9 sólo se podrá identificar al que se encuentra en mayor proporción.

En las investigaciones de Kohling (22) y Burillo (24), detectaron un triplete de picos proteicos de alta intensidad con m/z de 3371.0 3342.5 y 3486.5 Da propios de la muestra del paciente, que correspondían a proteínas α defensinas las cuales se han visto que aumentan en aquellos pacientes con pielonefritis, o cáncer de vejiga; en ambos estudios, las defensinas suprimieron los picos péptidicos generados por el microorganismo en la muestra, por lo que no se logra identificar el mismo. De acuerdo con Kohling y col, es necesario establecer un protocolo que permita separar correctamente estas proteínas de las bacterias, pero resulta bastante difícil, ya que estas moléculas son anfipáticas e interactúan con la membrana bacteriana, por atracción electrostática (22). Ferreira y colaboradores igualmente detectaron estos picos de m/z pero no indican a que se deben si no que son probablemente de proteínas del paciente (23).

El uso del sistema MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos en orina disminuye el tiempo de

diagnóstico enormemente, pudiendo dar resultados confiables en tan solo una hora, variando este tiempo de acuerdo al protocolo pre analítico empleado, sin embargo, en infecciones del tracto urinario vale la pena reevaluar su utilidad, debido a que los resultados fiables son obtenidos cuando se tiene un conteo ≥ 105 UFC/ml, y no todas las infecciones cursan con este conteo tan alto, de hecho en pacientes que llegan de emergencia, que estén hospitalizados con enfermedades de base, o que se encuentren inmunocomprometidos, se deben considerar múltiples factores y en estos casos el punto de corte del conteo puede disminuir, por lo que MALDI-TOF no sería de gran utilidad en estos pacientes a pesar de ofrecer oportunidad en el resultado. MALDI-TOF efectivamente es capaz de identificar microorganismos, pero su utilidad real debe ser lograr la detección de infección urinaria, por lo que se debe buscar un algoritmo que permita diagnosticar infecciones del tracto urinario por este sistema, como el que recomienda el estudio de Burillo (24), sin olvidar relacionarlo con los factores propios del paciente.

Líquidos estériles (líquido cefalorraquideo)

La meningitis bacteriana representa una de los tipos de infecciones más serias e importantes debido a la alta tasa de mortalidad y morbilidad en los pacientes, por lo que se necesita de rapidez y precisión en la identificación del agente causal. Debido a la inmediatez que se necesita para este tipo de infecciones, el sistema MALDI-TOF puede ser de gran utilidad, sin embargo, en la literatura científica hay muy pocos artículos que hablan sobre su uso para la identificación directa de microorganismos a partir de LCR. Nyvang y col en 2010 presentan un caso de un hombre de 46 años con sintomatología meníngea, el LCR es procesado de la siguiente manera: Centrifugación a baja velocidad para remover leucocitos, seguido por centrifugación a alta velocidad, para obtención del pellet bacteriano. El pellet fue solubilizado con ácido fórmico y acetonitrilo, centrifugado y analizado por MALDI-TOF MS. La identificación generada por MALDI-TOF MS fue *Streptococcus pneumoniae* la cual se interpretó como válida a nivel de especies después de la manipulación manual de los datos, aunque el análisis automático habría permitido sólo una identificación a nivel de género (25).

El uso de esta técnica en combinación con tinción de Gram y cultivo tradicional podría mejorar el diagnóstico de meningitis bacteriana, mejorando el tiempo de diagnóstico, lo que permitiría instaurar una terapia antimicrobiana adecuada y agresiva para la población que se encuentra en estado crítico, y de esta manera

tratar de disminuir las tasas de morbi-mortalidad. Sin embargo se requiere de más estudios para poder generar conclusiones con respecto a la identificación de microorganismos en otros líquidos estériles por MALDI-TOF MS, ya que el único artículo encontrado únicamente habla de líquidos cefalorraquídeo.

Protocolos pre analíticos aplicados a muestras biológicas para la identificación de microorganismos por espectrometría de masas.

La etapa crucial que garantiza resultados fiables con el sistema MALDI-TOF MS, es el protocolo pre analítico que se establece para poder lograr obtener el microorganismo lo más puro posible a partir del hemocultivo, sin necesidad de cultivos previos en agar. En todos los artículos discutidos, se ha evidenciado que para los microorganismos gramnegativos, cualquiera de los protocolos son válidos para obtener excelentes scores de identificación, ya que por sus características morfológicas con respecto a grampositivos y levaduras, con un simple proceso de centrifugación a diferentes velocidades y varios lavados, se puede lograr una identificación con scores altos, garantizando fiabilidad en el resultado. Estos hechos que se han evidenciado en diversos estudios, en especial el de Juiz y col (8), que comparó dos protocolos uno simple casero, basado en diferencial de centrifugación, y el otro fue el kit comercial de sepsityper, obtuvo tanto para el primero como para el segundo protocolo, excelentes resultados. Para el protocolo casero obtuvo un nivel de concordancia con respecto a la metodología convencional, para gramnegativos del 94,7% a nivel de género, y 84,62% a nivel de especies, y con protocolo del kit Sepsityper de Bruker, obtuvo un mayor porcentaje de concordancia tanto a nivel en género como de especies de 94,74%; esto debido a que sepsityper incluye más pasos en los cuales se agregan buffer de lisis celular, además de un proceso de extracción de proteínas, por lo que se logra eliminar o disminuir los posibles interferentes relacionados con la muestra. Ha quedado evidenciado que si se utilizan protocolos pre analíticos más agresivos con buffer de lisis, diferencial de centrifugación, múltiples lavados, se logra la eliminación de los interferentes y se obtienen resultados más precisos y con altos score.

En el caso de grampositivos y las levaduras, se demostró que protocolos sencillos basados en procesos de centrifugación a diferentes velocidades y lavados, no generan un buen rendimiento del MALDI-TOF MS incluso aplicando protocolos de extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico o trifluoroacético (La Scola 37% (6), Juiz 44.3% (8), Ferreira 31.8% (26)) por lo

que es necesario agregar sustancias detergentes o tensioactivas como lo son el SDS, Tween 80, saponina, entre otros (4,9,16,17) que sean capaces de romper la pared bacteriana gruesa del grampositivo y la pared y la quitina de las levaduras de manera tal que se liberen las proteínas y pueda generarse un espectro de identificación a nivel de especies.

Igualmente que en los gramnegativos el kit sepsityper arroja buenos resultados con los grampositivos, de acuerdo con Buchan y col el porcentaje de concordancia con metodología convencional a nivel de género y especies fue de 98.1% y 93.3% respectivamente (4) y Schubert, arrojó un porcentaje de concordancia del 86.3% a nivel de especies, utilizando este kit y para levaduras de 70.6%(10). Yan y col realizó un pretratamiento a los hemocultivos con levaduras de dos lavados previos y centrifugación antes de utilizar el kit sepsityper, con lo que obtuvo una identificación correcta de todas las especies de levaduras en su estudio, que generó resultados reproducibles y confiables (14).

En el caso de las orinas se ha evidenciado lo mismo con respecto al uso de sustancias detergentes como el SDS; en 2014 Juanes-Sánchez (27), realiza un pretratamiento con SDS al 10% en 71 muestras que habían dado en estudios anteriores scores < 2 pero que tenían un conteo ≥ 105 UFC/ml en estudios anteriores a los que se le había aplicado el protocolo pre analítico de Ferreira y col (26), (Figura 8) obteniendo una mejora del 46.5% en el score de aquellos que habían sido identificados correctamente, y logrando la identificación del 31%

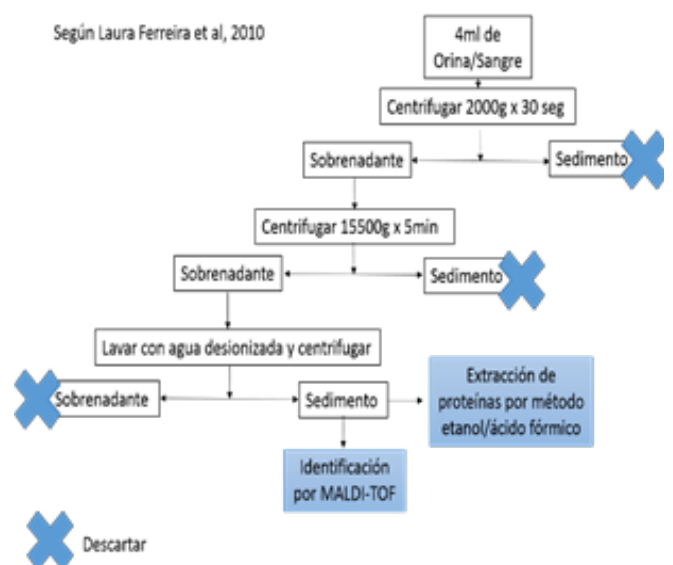


Figura 8: Protocolo pre analítico para hemocultivos y orina. Tomado de Ferreira y col 2010 (26)

de las muestras que en el estudio anterior no habían logrado ser identificadas, con lo que demuestra que el pretratamiento al igual que en hemocultivos, puede mejorar enormemente los resultados de identificación debido a que este detergente es capaz de lisar las células bacterianas y demás células propias de las muestras de orinas (leucocitos, eritrocitos), logrando eliminar la mayoría de los interferentes y mejorando el rendimiento del MALDI-TOF (27). Budillo y col, (Figura 9) en su estudio tienen un proceso de incubación con Tween 80 al 0.1% con lo cual obtuvo muy buenos resultados de concordancia a nivel de especies con la metodología convencional (93.8%)(24).

Burillo et al., 2014

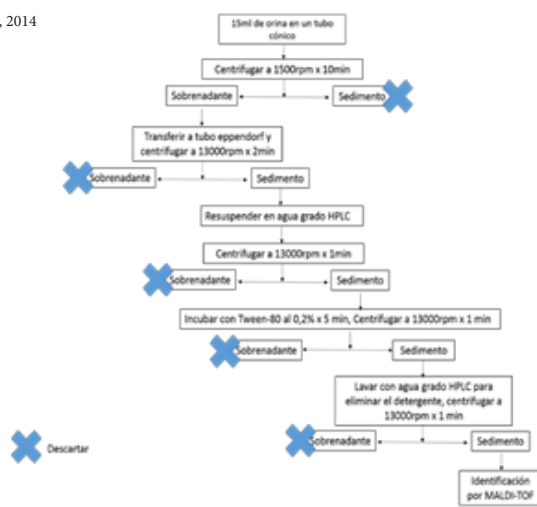


Figura 9: Protocolo pre analítico para orinas. Tomado de Burillo y col 2014 (24).

Oportunidad de la espectrometría de masas

En 2012 Lagacé-Wiens y col (28), realizan un análisis de desempeño, costo y tiempo de respuesta del MALDI-TOF cuando es utilizado para identificación de microorganismos a partir de hemocultivos comparado con metodología convencional. El tiempo de respuesta fue determinado por dos enfoques, el primero reflejando una situación ideal, en la cual una vez que el hemocultivo marcara positivo por el equipo automatizado, éste fuera procesado por MALDI-TOF y un segundo enfoque, en donde se evalúa el tiempo en aquellos microorganismos que dan un score insuficiente para lograr una identificación definitiva o que el microorganismo requiera confirmación (como en el caso de los Streptococcus del grupo mitis) con metodología convencional. Los resultados obtenidos, refieren una reducción en el tiempo de respuesta de

34.3 horas, asumiendo la situación ideal, y de 26,5 horas en la segunda situación ya que se requiere de identificación por sub cultivos (28). Estas observaciones fueron similares en el trabajo de Buchan y col en 2011 el cual reporta un rango de 23-83 horas más rápido para aislamientos de grampositivos y de 34-51 horas para aislamientos de gramnegativos (4). Igualmente estudios como el de Stevenson y col (15), Kok y col (7), Christner y col (18), entre muchos otros reportan resultados fiables con un alto desempeño del MALDI-TOF, entre 1 y 2 horas, dependiendo del protocolo pre analítico establecido, por lo que se reduce el tiempo de respuesta de 24-48 horas.

Con respecto a las muestras de orinas, no se encontró ningún artículo que evalúe la reducción del tiempo en horas, como en el caso de los hemocultivos, únicamente indican que se disminuye el tiempo entre 30 y 1 hora para dar el resultado (21).

Conclusiones

Existen múltiples variables que interfieren en la obtención de un resultado correcto por espectrometría de masas a partir de muestras biológicas, como lo son la concentración del microorganismo en la muestra, volumen necesario de muestra, el protocolo pre analítico establecido por el investigador, el tipo de microorganismo y su estructura, si es grampositivos, gramnegativo o levaduras, pureza de las muestras (monomicrobianas y polimicrobianas); Todas deben ser consideradas en conjunto para lograr resultados que brinden oportunidad al paciente y confiabilidad al médico.

La falta de protocolos estandarizados contribuye a las diferencias reportadas en el desempeño de MALDI-TOF MS en la identificación directa de patógenos a partir de muestras biológicas. Actualmente el único kit pre analítico patentado y estandarizado es el de la casa Bruker, que se denomina Sepsityper® y puede ser utilizado únicamente a partir de hemocultivos.

Microorganismos con proteínas ribosomales homologas o correlación filogenética, el sistema MALDI-TOF tiende a identificarlos erróneas a partir de hemocultivos, por lo que se debe recurrir a pruebas confirmatorias.

Una de las variables más importantes a tomar en cuenta para trabajar espectrometría de masas a partir de muestras biológica es el tipo de microorganismo (gramnegativos, grampositivos y levaduras) y a partir de esto establecer el protocolo pre analítico, ya que de esto depende el éxito del resultado.

Los estudios realizados a partir de muestra de orina

buscan la disminución del tiempo de respuesta ante una infección pero no han logrado identificar microorganismos con un buen score, cuando hay contajes bacterianos menores a 10³UFC/ml.

Se requieren más estudios a partir de otros líquidos estériles como líquido cefalorraquídeo, líquido pleural o sinovial, para poder generar conclusiones sobre estos. Finalmente la emisión de resultados empleando el sistema MALDI-TOF MS, a partir de muestras biológicas, disminuye el tiempo de respuesta en días, cuando se compara con la metodología convencional implementada actualmente en nuestros laboratorios.

Referencias

1. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A and Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(11):1604-1613. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03368.x
2. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A and Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption Ionization–Time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 2013;26(3):547-603. Disponible en: doi:10.1128/CMR.00072-12.
3. Neville SA, LeCordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW and Van Hal SJ Utility of matrix-assisted laser desorption Ionization–Time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology* 2011;49(8):2980-2984. Disponible en: doi:10.1128/JCM.00431-11
4. Buchan BW, Riebe KM and Ledebner NA. Comparison of the MALDI biotyper system using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microb* 2012;50(2):346-352. Disponible en: doi:10.1128/JCM.05021-11
5. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, Fadda G. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of candida species causing bloodstream infections: An observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2012;50(1):176-179. Disponible en: doi:10.1128/JCM.05742-11
6. La Scola B, Raoult D. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry. *PLoS One* 2009;4(11):e8041. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0008041
7. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of Bacteria in Blood Culture Broths Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper™ and Time of Flight Mass Spectrometry. *PLoS One* 2011;6(8):e23285. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0023285
8. Juiz PM, Almela M, Melción C, Campo I, Esteban C, Pitart C, Marco F, Vila JA. Comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(7): Disponible en: 1353-1358 doi: 10.1007/s10096-011-1449-
9. Foster AG. Rapid identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek MS matrix-assisted laser desorption Ionization–Time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol* 2013;51(11):3717-3719. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01679-13
10. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T and Kostrzewa M. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser Desorption/Ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Mol Diagn* 2011;13(6):701-706. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.07.004
11. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM and Muñoz-Bellido JL. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(4):546-551. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x
12. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J and Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4):1481-1483. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01780-09
13. Machen A, Drake T, Wang YF. Same Day Identification and Full Panel Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles Made Possible by a Combined Lysis-Filtration Method with MALDI-TOF VITEK Mass Spectrometry and the VITEK2 System. *PLoS One* 2014;9(2):e87870. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0087870
14. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton CW, Kostrzewa M, et al. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining sepsityper specimen processing and microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization biotyper system. *J Clin Microbiol* 2011;49(7):2528-2532. Disponible en: doi:10.1128/JCM.00339-11
15. Stevenson LG, Drake SK and Murray PR. Rapid

- identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(2):444-447. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01541-09
16. Ferroni A, Suarez S, Beretti J, Dauphin B, Bille E, Meyer J, Bougnoux ME, Alanio A et al. Real-time identification of bacteria and candida species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(5):1542-1548. Disponible en: doi:10.1128/JCM.02485-09
 17. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas JY, Meyer I, Buffet P, et al. Rapid Species Diagnosis for Invasive Candidiasis Using Mass Spectrometry. *PLoS One* 2010;5(1):e8862. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0008862
 18. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K and Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48(5):1584-1591. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01831-09
 19. Szabados F, Michels M, Kaase M and Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT™ (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(2):192-195. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03229.x
 20. Romero-Gomez MP, Mingorance J. The effect of the blood culture bottle type in the rate of direct identification from positive cultures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Infect* 2011;62(3):251-253.
 21. Wang X, Zhang G, Fan Y, Yang X, Sui W and Lu X. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *J Microbiol Methods* 2013;92(3):231-235. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.016
 22. Kohling H, Bittner A, Muller K, Buer J, Becker M, Rubben H, Rettenmeier AW, Mosel F. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol* 2012;61(3):339-344. Disponible en: DOI 10.1099/jmm.0.032284-0
 23. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM and Muñoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(6):2110-2115. doi:10.1128/JCM.02215-09
 24. Burillo A, Rodríguez-Sánchez B, Ramiro A, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Gram-Stain Plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infection. *PLoS One* 2014;9(1):e86915. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0086915.
 25. Nyvang G, Kvistholm A, Böcher S, Damkjaer M, Pedersen M, Engell M, Abdul-Redha R, Dargis R. Mass spectrometry: Pneumococcal meningitis verified and Brucella species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis* 2010;42(9):716-718. Disponible en: DOI: 10.3109/00365541003754493.
 26. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, and González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Intact cell vs. extraction method. *Clin Microb Infect* 2011;17(7):1007-1012. Disponible en: doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03339.x
 27. Sánchez-Juanes F, Siller M, Moreno F, Criado M, Hernández S, de Frutos Serna M, González-Buitrago JM Muñoz-Bellido JL. Pretreatment of Urine Samples with SDS Improves Direct Identification of Urinary Tract Pathogens with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2014; 52(1):335-338. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01881-13
 28. Lagacé-Wiens P, Adam H, Karlowsky J, Nichol K, Pang P, Guenther J, Webb A, Miller C., et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: Analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol* 2012;50(10):3324-3328. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01479-12

AGRADECIMIENTO PARA LOS ÁRBITROS DE 2015

La contribución de los árbitros es esencial para mantener y mejorar la calidad de los trabajos publicados en la Revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Por esta razón queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a los colegas quienes han dedicado tiempo y esfuerzo para el arbitraje de los trabajos publicados en nuestra revista durante el año 2015.

Priva Zabner de Oziel
Arelis Torres
Edith Ortega
Angélica Castro
Luis Torres
Daniel Marcano
Valmore Rodríguez
Giuseppe Ferrara
Hilda Stekman
Jenny Figueira
María del Pilar Navarro
Merlyn Vivenes
Noel Silva
Rafael Apitz
Yacelly Bustamante

ÍNDICE POR AUTORES AÑO 2015

A		véase Michelli, Pedro	2015;18(1):14-22
Aguilar, Marwan			
véase Michelli, Pedro	2015;18(1):14-22		
Ariza, Beatriz			
véase Tovar, Gabriela	2015;18(2):51-62		
B			
Bermúdez-González, José Luís			
véase Gómez-Gamboa, Liliana	2015;18(1):2-5		
C			
Carrillo, Jesuelith			
véase Michelli, Pedro	2015;18(1):14-22		
Celaya, Joseba			
véase Michelli, Pedro	2015;18(1):14-22		
Ciaccia, Rosa			
véase Michelli, Pedro	2015;18(1):14-22		
D			
Di Mauro, Mariom			
véase Michelli, Pedro	2015;18(1):14-22		
F			
Fernández, Ana Z			
Epigenética I: Conceptos básicos para entender este campo de moda.	2015;18(1):23-28		
G			
Garcés, María Fatima			
Editorial	2015;18(1):1		
Editorial	2015;18(2):31		
véase Michelli, Pedro	2015;18(1):14-22		
véase Hernández, Celsy	2015;18(2):32-35		
Gómez-Gamboa Liliana			
Emergencia de <i>Acinetobacter baumannii</i> con resistencia extrema a los antibióticos en un Hospital de Maracaibo, Venezuela.	2015;18(1):2-5		
Grimal, Bárbara			
véase Medina-Martel, Matilde	2015;18(2):36-44		
Guerrero De Abreu, Arli Marlinet			
véase Hernández Ericka	2015;18(1):6-13		
Guzmán, Horbelys			
		véase Michelli, Pedro	2015;18(1):14-22
		H	
		Hernández, Celsy	
		Estandarización del informe de resultados del uroanálisis, en el laboratorio clínico de rutina	2015;18(2):32-35
		Hernández, Ericka	
		Prevalencia de parasitosis intestinales y parámetros hematológicos en pacientes de tres comunidades urbanas del estado Carabobo.	2015;18(1):6-13
		M	
		Macero, Carolina	
		véase Moreno C Xiomara	2015;18(2):45-50
		Martínez, Gustavo	
		véase Moreno C Xiomara	2015;18(2):45-50
		Medina-Martel, Matilde	
		Actividad diurna de la enzima α -amilasa salival en estudiantes de Bioanálisis de la UCV. Efecto de un estresor académico.	2015;18(2):36-44
		Michelli, Pedro	
		Polimorfismos del gen de la Apolipoproteína-E relacionado con la Enfermedad de Membrana Hialina del Neonato.	2015;18(1):14-22
		Moreno C, Xiomara	
		Coloración de Giemsa y Cultivo en el Diagnóstico de la Histoplasmosis	2015;18(2):45-50
		P	
		Parra, Claudia	
		véase	2015;18(2):51-62
		Perozo-Mena, Armindo	
		véase Gómez-Gamboa, Liliana	2015;18(1):2-5
		Q	
		Quevedo, Leidy	
		véase Medina-Martel, Matilde	2015;18(2):36-44
		S	
		Sánchez, Leopoldo	
		véase Moreno C Xiomara	2015;18(2):45-50

Sanmartín, María V.		de muestras biológicas	2015;18(2):51-62
véase Medina-Martel, Matilde	2015;18(2):36-44	Tang, Yasmin	
Stekman, Hilda		véase Hernández Ericka	2015;18(1):6-13
véase Hernández, Celsy	2015;18(2):32-35	Triolo, María	
T		véase Hernández Ericka	2015;18(1):6-13
Tovar, Gabriela		Villasmil, Jessica	
Análisis comparativo entre la		véase Gómez-Gamboa, Liliana	2015;18(1):2-5
espectrometría de masas y las		Z	
metodologías convencionales		Zabala, Irene	
para la identificación de		véase Gómez-Gamboa, Liliana	2015;18(1):2-5
microorganismos a partir			

ÍNDICE POR TITULOS 2015

A			
Actividad diurna de la enzima α -amilasa salival en estudiantes de Bioanálisis de la UCV. Efecto de un estresor académico.	2015;18(2):36-44	de Maracaibo, Venezuela.	2015;18(1):2-5
Análisis comparativo entre la espectrometría de masas y las metodologías convencionales para la identificación de microorganismos a partir de muestras biológicas.	2015;18(2):51-62	Epigenética I: Conceptos básicos para entender este campo de moda.	2015;18(1):23-28
C		Estandarización del informe de resultados del uroanálisis, en el laboratorio clínico de rutina.	2015;18(2):32-35
Coloración de Giemsa y Cultivo en el Diagnóstico de la Histoplasmosis.	2015;18(2):45-50	P	
E		Polimorfismos del gen de la Apolipoproteína-E relacionado con la Enfermedad de Membrana Hialina del Neonato.	2015;18(1):14-22
Emergencia de <i>Acinetobacter baumannii</i> con resistencia extrema a los antibióticos en un Hospital		Prevalencia de parasitosis intestinales y parámetros hematológicos en pacientes de tres comunidades urbanas del estado Carabobo.	2015;18(1):6-13

ÍNDICE PALABRAS CLAVES AÑO 2015

A		I	
Amilasa salival	2015;18(2):36-44	Informe de resultados	2015;18(2):32-35
APOE	2015;18(1):14-22	L	
B		Laboratorio clínico	2015;18(2):32-35
Blastocystis spp	2015;18(1):6-13	Líquido cefalorraquídeo	2015;18(2):51-62
C		M	
Cáncer	2015;18(2):45-50	Metilación del ADN	2015;18(1):23-28
Coloración de Giemsa	2015;18(2):45-50	MALDITOF MS	2015;18(2):51-62
Cultivo	2015;18(2):45-50	O	
D		Orinas	2015;18(2):51-62
Diagnóstico microbiológico	2015;18(2):51-62	P	
E		Parasitosis intestinal	2015;18(1):6-13
Enfermedad de membrana hialina	2015;18(1):14-22	Polimorfismo	2015;18(1):14-22
Eosinofilia adultos	2015;18(1):6-13	R	
Epigenética	2015;18(1):23-28	Recién nacido prematuro	2015;18(1):14-22
Epigenóma	2015;18(1):23-28	S	
Escuela de Bioanálisis	2015;18(2):36-44	Síndrome de dificultad respiratoria neonatal	2015;18(1):14-22
Espectrometría de masas	2015;18(2):51-62	Surfactante pulmonar	2015;18(1):14-22
Estandarización	2015;18(2):32-35	U	
Estrés académico	2015;18(2):36-44	UCV	2015;18(2):36-44
F		Uroanálisis	2015;18(2):32-35
Fenotipo	2015;18(1):23-28	V	
H		VHI	2015;18(2):45-50
Hemocultivo	2015;18(2):51-62		
Histoplasma capsulatum	2015;18(2):45-50		
Histonas	2015;18(1):23-28		

INFORMACION PARA LOS AUTORES

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, publica artículos originales, revisiones, cartas al editor y comunicaciones breves relacionadas con biología humana, bioanálisis y áreas afines, que contribuyan al avance de la investigación y difusión científica.

Envío del Trabajo

El autor debe enviar un original del artículo, con una carta de presentación firmada por todos los autores como constancia escrita que han contribuido en el diseño, ejecución, análisis e interpretación de los datos, redacción del artículo y, en la revisión crítica del contenido del artículo original a ser publicado. Debe dejar constancia que el trabajo no ha sido publicado ni enviado a otra revista. También indicar el orden de los autores y el autor de correspondencia con su dirección y correo electrónico. Los autores cuando presentan el manuscrito, deben revelar todas las entidades financieras y las relaciones personales que puedan haber influido en el trabajo, es decir deben declarar explícitamente si existen o no conflicto de intereses.

La revista utiliza en forma preferencial el sistema electrónico, por lo tanto debe acompañar el envío de un CD, en "Word for Windows", en cuya etiqueta se indique el nombre del autor principal.

Sistema de Arbitraje

Todos los artículos originales pasan por un proceso de arbitraje externo, realizado por tres árbitros con experticia en el tema específico. Las revisiones igualmente son evaluadas por especialistas. La decisión se tomará de acuerdo a la opinión de los árbitros aprobada por el Comité Editorial. La autoría del artículo y el arbitraje, son del dominio exclusivo del Comité Editorial. Los autores recibirán la opinión de los árbitros con las recomendaciones por parte del Comité en cuanto a modificaciones de forma y redacción. Las respuestas deben enviarse en un lapso prudencial, con una carta donde el autor señale las modificaciones realizadas y argumente aquellas que no considera adecuadas.

Normas Editoriales

Todas las partes del manuscrito deben estar escritas a doble espacio. Cada sección comenzará en página nueva, todas numeradas, con la siguiente secuencia: página del título, nombre completo de los autores (sin títulos profesionales), dirección de la(s) institución(es) donde fue realizado, y señalar con números consecutivos la que corresponde a cada autor.

Los artículos originales deben guardar la siguiente estructura:

Título en español e inglés (corto, no más de 15 palabras, 75 caracteres), Titulillo en español Resumen y Palabras Clave en español e inglés), Introducción, Metodología, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Referencias. Cuadros e Ilustraciones. Cada sección debe comenzar en hoja aparte, así como también los cuadros e Ilustraciones con sus respectivos pies o epígrafe.

Resumen debe establecer los objetivos del estudio, los procedimientos básicos (selección, métodos de observación y análisis) los hallazgos más importantes, proporcionar datos específicos y, significación estadística y las conclusiones principales sobre la base de los resultados del estudio.

No debe contener referencias ni siglas que no estén identificadas. El límite máximo son 250 palabras y no debe ser estructurado.

Al final del resumen deben estar 3 a 10 palabras clave, que incluyan descriptores en inglés, de la lista del "Medical Subject Headings (MeSH) y en español de la lista de "descriptores en Ciencias de la Salud" (DECS).

Introducción expresa el propósito del artículo, los antecedentes internacionales y nacionales, mediante referencias actualizadas. En el último párrafo de la introducción debe aparecer en forma clara y precisa el objetivo del estudio.

Metodología describa claramente como se eleccionaron los sujetos que participaron en el estudio, edad, sexo y otras características importantes. En los manuscritos de revisión se incluirá una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar o extraer los datos.

Los estudios con humanos deben dejar constancia escrita de la aprobación por parte del Comité de Ética de la institución donde se realizó la investigación, así como el consentimiento de los individuos que participaron y, evitar en todo momento que puedan ser identificados, tener especial cuidado con las fotografías. Cuando se trate de experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución acerca del cuidado y uso de animales en el laboratorio.

Describa los métodos estadísticos con detalle suficiente para que puedan verificarse los resultados. Defina los términos, las abreviaturas y los símbolos estadísticos. Cuando sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de medición de error o incertidumbre (como intervalos de confianza).

Resultados. Presente los resultados en el texto, cuadros, ilustraciones y figuras en una secuencia lógica. No repita en el texto la información que contienen los cuadros y figuras, sólo destaque lo más importante. Utilice en esta sección el tiempo pretérito.

Discusión. Destaque los aspectos nuevos e importantes del estudio y las conclusiones que se derivan de los resultados. Cuidese de no repetir la información ya presentada en las secciones anteriores. Relacione las observaciones con la de otros estudios internacionales y nacionales, incorporando en la discusión el análisis de las referencias bibliográficas actualizada relacionadas con el estudio. Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, y cierre la discusión con la conclusión más importante del estudio o con la propuesta de nuevas hipótesis, cuando estén justificadas.

Las Revisiones pueden ser solicitadas por el Editor preferentemente a especialistas sobre un tema de importancia científica en la actualidad, pero también se aceptan revisiones de autores, las cuales seguirán el proceso de arbitraje externo. En la revista también se publican reportes cortos de hallazgos de interés para el ámbito de la revista, así como casos clínicos cuya ocurrencia sea un verdadero hallazgo.

Las cartas al editor, por lo general están referidos a comentarios de artículos recientes publicados en la revista y su extensión no debe ser mayor a dos páginas.

Cuadros. Cada cuadro debe escribirse a doble espacio, sin líneas verticales ni horizontales internas y en hoja aparte. Numérelolos consecutivamente con números arábigos y asigne un título breve en minúscula. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en el cuadro. Si incluye datos publicados o inéditos o de otra fuente, obtenga la autorización

para reproducirlos y conceda el reconocimiento al autor. No incluya más de 5 cuadros, máximo de 5 columnas y 8 filas.

Ilustraciones (Figuras) Las figuras deben estar dibujadas en forma profesional (archivos electrónicos de las figuras en formato JPEG o GIF). Se numeran en forma consecutiva con números arábigos. Las fotografías deben ser en blanco y negro, con buen contraste, en papel satinado con las siguientes medidas 127x173 mm, sin exceder 203x 254 mm. Ubicar una por página, título breve y una leyenda que facilite la comprensión del contenido.

Agradecimientos Aparecen al final del texto, allí se incluyen las colaboraciones que deben ser reconocidos pero que no justifican la autoría, ayuda técnica, apoyo financiero y material y las relaciones que puedan suscitar conflicto de intereses.

Referencias Las referencias bibliográficas dan el soporte científico al estudio realizado, por lo tanto deben ser recientes, preferiblemente de los últimos cinco años. Las referencias internacionales y nacionales constituyen antecedentes del estudio que se está publicando, de esta manera, también reconocemos la labor de los investigadores venezolanos que han aportado al tema en estudio. Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden como se mencionan por primera vez en el texto. Cite cuidadosamente en el texto, cuadros y figuras todas las referencias con un número entre paréntesis. Cuide que la escritura reproduzca fielmente el artículo original y vigile la escritura en inglés, para evitar cometer errores al transcribir la información.

Las referencias bibliográficas en Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, siguen el estilo de las normas de Vancouver. (<http://www.icmje.org>). Abrevie los títulos de las revistas de acuerdo con el estilo del Index Medicus y consulte la lista de revistas indizadas en (<http://www.nlm.nih.gov>). No se aceptan como referencias resúmenes. Los artículos aceptados pero que todavía no se han publicado, se indican como "en prensa", con la información de la revista donde fue aceptado.

Ejemplos de referencias:

Artículos de revista

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión "et al"

1. Artículo de revista ordinario

Bremer AA, Byrd RS, Auinger P. Racial trends in sugar sweetened beverage consumption among US adolescents: 1988-2004. *Int J Adolesc Med Health* 2011; 23(3):279-86.

Libros

2. Individuos como autor:

Casademunt J. Sobrepeso y obesidad infantil. Barcelona: Editorial Océano; 2005.

3. Editores como autor:

Alemán M, Bernabeu-Mestre JB, editores. *Bioética y Nutrición*. Alicante. Universidad de Alicante: Editorial Agua Clara; 2010.

4. Capítulo de libro:

López de Blanco M, Landaeta-Jiménez M. Los estudios de crecimiento y desarrollo físico en Venezuela. En: Fano V, Del Pino M, Cano S, compiladores.

Ensayo sobre crecimiento y desarrollo presentado al Dr. Horacio Lejarraga por sus colegas y discípulos. Buenos Aires: Paidós; 2011. p. 431-454

Material electrónico

5. Artículo de revista en Internet:

Vázquez de la Torre MJ, Vázquez Castellanos JL, Crocker Sagastume R. Hipertensión arterial en niños escolares con sobrepeso y obesidad. *Respyn [Serie en Internet]* 2011 Jul-Sep [citada 5 nov 2011]; 12(3): [6 pantallas]. Se consigue en: URL: http://www.respyn.uanl.mx/xii/3/articulos/Hipertension_arterial.htm.

Para otros ejemplos de formato de referencias bibliográficas, los autores deberían consultar la página web: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Para cualquier otro tipo de información se sugiere consultar: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication Updated April 2010. <http://www.icmje.org>.

Antes de enviar el artículo, revise cuidadosamente las instrucciones a los autores y verifique si el artículo cumple con los requisitos editoriales de la revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas.

Artículo de revisión:

El artículo de revisión facilita la actualización y revisión de un aspecto científico, realizado por especialistas en el tema: ofrece al lector interesado una información condensada sobre un tema, realiza interpretaciones y adelanta explicaciones en tópicos específicos relacionados al área del Bioanálisis.

El número máximo de autores es cuatro. El artículo requiere de, al menos, 40 referencias con prioridad de los últimos cinco (5) años. En caso de que esto no sea posible, deben especificarse las razones (tópicos muy poco frecuentes o muy poco investigados previamente). El texto deberá expresar con claridad las ideas a ser desarrolladas, y tratará de transmitir un mensaje útil para la comprensión del tema central del artículo de revisión.

Las secciones básicas del artículo de revisión son: página inicial, resumen, (en español y en inglés), introducción, texto, referencias bibliográficas. El cuerpo de las revisiones es libre, aunque es conveniente subdividirlo en secciones.

El autor o los autores de un artículo de revisión deben plasmar su interpretación crítica de los resultados de la revisión bibliográfica con claridad y precisión, y dejar siempre la inquietud sobre aquellos tópicos del tema que requieren una mayor o más profunda investigación. La extensión de los artículos de revisión no debe ser mayor de 6000 palabras, excluyendo las referencias.



Acta Científica

de la Sociedad Venezolana
de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 18 - No 2

2015

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 31

ORIGINAL ARTICLES:

Estandarización del informe de resultados del uroanálisis, en el laboratorio clínico de rutina

Celsy Hernández, Hilda Stekman, María Fátima Garcés..... 32

Diurnal salivary α -amylase activity in Bioanalysis students of UCV. Effect of an academic stressor

Matilde Medina-Martel, María V. Sanmartín, Leidy Quevedo, Bárbara Grimal..... 36

The Giemsa stain and culture in the diagnosis of Histoplasmosis

Xiomara Moreno C., Gustavo Martínez, Leopoldo Sánchez, Carolina Macero..... 45

REVIEW ARTICLE:

Comparative analysis between mass spectrometry and conventional methodologies for the identification of microorganisms from biological samples

Gabriela Tovar, Claudia Parra, Beatriz Ariza..... 51

ACKNOWLEDGMENT FOR REFEREES IN 2015 63

CUMULATIVE INDEX BY AUTHORS..... 64

CUMULATIVE INDEX BY TITLES..... 66

CUMULATIVE INDEX BY KEY WORDS..... 67

INFORMATION FOR AUTHORS..... 68

Diseño y diagramación: Ana María Reyes, digivi@gmail.com

Impresión: Operagráfica Publicidad, c.a., operapublicidad@gmail.com

Soporte Web: Nexus Radical, Altemar Pérez, aperez@estudiopro.com