



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 19 - No. 1

Año 2016

Organo Oficial de la SVBE

CONTENIDO

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 1

ARTÍCULOS ORIGINALES:

Distribución de polimorfismos genéticos de las Glutathion S-Transferasas GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en individuos venezolanos

Marycarmen Chacín, Sabrina Ferraz, Martha Bravo, Andrea Rivas, Greisly Suarez, Carmen Clavijo, Gloria Garcia y Anabel Arends..... 2

Control de calidad analítico en el uroanálisis realizado en los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas

Celsy Hernández, M^a Fátima Garcés, Hilda Stekman, Jonattan Ramos..... 11

Anticuerpos antifosfolípidos en embarazo normal a término y aborto espontáneo recurrente

Sarah Bethencourt, Robert Tovar, Francisco Mendoza, Loida Ponce, Julie Verzura, José Corado, Sioly de Orta..... 20

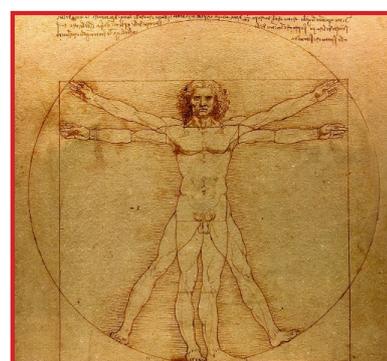
ARTÍCULOS DE REVISIÓN:

Blastocystis spp.: actualización en morfología, biología, diagnóstico y tratamiento quimioterapéutico

Emilia E Barrios, Génesis Ochoa, Angel Castillo, Eva Velasquez..... 26

INFORMACIÓN PARA AUTORES..... 34

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



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 19. No 1.
Año 2016



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. 19 - No 1

2016

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 1

ARTÍCULOS ORIGINALES:

Distribución de polimorfismos genéticos de las Glutathion S-Transferasas GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en individuos venezolanos

Marycarmen Chacin, Sabrina Ferraz, Martha Bravo, Andrea Rivas, Greisly Suarez,
Carmen Clavijo, Gloria Garcia y Anabel Arends..... 2

Control de calidad analítico en el uroanálisis realizado en los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas

Celsy Hernández, M^a Fátima Garcés, Hilda Stekman, Jonattan Ramos..... 11

Anticuerpos antifosfolípidos en embarazo normal a término y aborto espontáneo recurrente

Sarah Bethencourt, Robert Tovar, Francisco Mendoza, Loida Ponce,
Julie Verzura, José Corado, Sioly de Orta..... 20

ARTÍCULOS DE REVISIÓN:

Blastocystis spp.: actualización en morfología, biología, diagnóstico y tratamiento quimioterapéutico

Emilia E Barrios, Génesis Ochoa, Angel Castillo, Eva Velasquez..... 26

INFORMACIÓN PARA AUTORES..... 34



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 19 - No 1

2016

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 31

ORIGINAL ARTICLES:

Glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 AND GSTP1 distribution in Venezuelan population

Marycarmen Chacin, Sabrina Ferraz, Martha Bravo, Andrea Rivas, Greisly Suarez,
Carmen Clavijo, Gloria Garcia y Anabel Arends..... 2

Analytical quality control in the urinalysis carried out in the clinical laboratories of the Metropolitan District of Caracas

Celsy Hernández, M^a Fátima Garcés, Hilda Stekman, Jonattan Ramos..... 11

Antiphospholipid antibodies in normal pregnancy and spontaneous abortions to repetition

Sarah Bethencourt, Robert Tovar, Francisco Mendoza, Loida Ponce,
Julie Verzura, José Corado, Sioly de Orta..... 20

REVIEW ARTICLE:

Blastocystis spp.: Update on morphology, biology, diagnosis and chemotherapeutic treatment

Emilia E Barrios, Génesis Ochoa, Angel Castillo, Eva Velasquez..... 26

INFORMATION FOR AUTHORS..... 34

EDITORIAL

La Revista *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas* es una publicación de gran significado e importancia en la difusión de la productividad científica de los profesionales del Bioanálisis de todo el país. Iniciamos el año 2016 con nuevos retos y la esperanza de que sea un año muy fructífero para la investigación en nuestra Venezuela.

En esta oportunidad les presentamos diversos tópicos relacionados con distintas áreas del Bioanálisis. Comenzamos este número con un artículo sobre la distribución de los polimorfismos GSTM1, GSTT1 y GSTP1 de la Glutathion S-transferasas (GSTs) en individuos venezolanos, obteniendo a través de esta investigación, datos importantes para la realización de estudios de asociación de estos polimorfismos con efectos de riesgo de enfermedades y respuesta a tratamiento y estudios etnográficos en Venezuela. El lector encontrará un trabajo en el que se evalúa el cumplimiento de requisitos de control de calidad analítico interno y externo en los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas, de acuerdo a las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM, evidenciando a través de este interesante trabajo que la mayoría de los laboratorios no cumplen ningún requisito para el control de calidad interno y externo del uroanálisis, y que los pocos servicios que implementan algún tipo de control de calidad, cumplen con muy pocos requisitos de los previstos en las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM, un tema que nos obliga a reflexionar sobre la práctica y operatividad analítica que repercute en la confiabilidad de los resultados.

Otro tema hoy muy discutido, es la posible relación entre los autoanticuerpos antifosfolípidos con complicaciones obstétricas, principalmente abortos a repetición. Este grupo de investigadores encontró una asociación significativa entre niveles de IgG anticardiolipinas y de IgM anti β 2 glicoproteína I con los abortos, sin embargo, una parte de la población estudiada a pesar de tener niveles positivos para estos anticuerpos, no manifestaron complicaciones obstétricas. Finalizamos este volumen con una actualización sobre *Blastocystis* spp, un parásito humano con un controversial rol patógeno; estos investigadores concluyen en su trabajo, que es sumamente importante el identificar los subtipos de *Blastocystis* spp. que se encuentran presentes en Venezuela, con especial énfasis aquellos que son identificados en pacientes con sintomatología gastrointestinal o extra-intestinal, a fin de caracterizar la virulencia, susceptibilidad y resistencia a los fármacos de primera y segunda línea de elección.

Queremos invitarlos a participar en nuestro magno evento el XVII Congreso Venezolano de Bioanálisis a celebrarse en Puerto La Cruz y cuyo presidente es el MSc. Valmore Rodríguez, que nuevamente asumió el reto de la realización de este evento con el apoyo de un excelente equipo de colegas que lo acompañan asegurando un alto nivel científico.

La *Revista de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas*, continúa trabajando para llevarle a sus lectores artículos de gran interés y rigurosidad científica, a pesar de las dificultades económicas que atraviesa el país, porque creemos en Venezuela.

Nuestros más cordiales saludos y afectos.

Dra. María Fátima Garcés
Editora.

DISTRIBUCION DE POLIMORFISMOS GENETICOS DE LAS GLUTATION S-TRANSFERASAS GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 EN INDIVIDUOS VENEZOLANOS

Marycarmen Chacin, Sabrina Ferraz, Martha Bravo, Andrea Rivas, Greisly Suarez, Carmen Clavijo, Gloria Garcia y Anabel Arends.

Laboratorio de Investigación Hemoglobinas Anormales, Instituto Anatómico "José Izquierdo",
Facultad de Medicina-Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela
Recibido para publicación el 11 de marzo 2016. Aprobado para publicación el 9 de mayo 2016.

RESUMEN:

Las glutatión S-transferasas (GSTs) son una familia de enzimas implicadas en la protección frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) catalizando su conjugación con el glutatión. En este estudio se planteó evaluar la presencia y frecuencia de los polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en individuos venezolanos. Las GSTM1 y GSTT1 fueron estudiadas en 322 individuos: 116 indígenas provenientes de las etnias Warao (Winikina) y Panare (Maniapure), 53 afrodescendientes (Chua), 100 caucásicos (Distrito Capital) y 50 mestizos (Distrito Capital), por medio del método de reacción en cadena de polimerasa multiplex. GSTP1 fue estudiada en 291 individuos: 113 indígenas, 53 africanos, 75 caucásicos y 50 mestizos, provenientes de las mismas localidades antes mencionadas mediante la técnica de PCR-RFLP. Las poblaciones estudiadas se observaron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$). Los genotipos nulos para GSTM1 y GSTT1 se encontraron en un 41% y un 15% de los individuos, respectivamente y el genotipo nulo para ambos genes se observó en un 5%. La distribución de los genotipos nulo GSTM1 y GSTT1 varía entre los diferentes grupos estudiados. Las frecuencias generales de los genotipos de GSTP1 fueron de 33,67% para Ile/Ile, 52,92% para Ile/Val y 13,40% para Val/Val. El polimorfismo más frecuente fue el Ile/Val y en el grupo de los afrodescendientes se observó la mayor frecuencia el Val/Val. Estos resultados proporcionan datos importantes para la realización de estudios de asociación de enfermedades y estudios etnográficos en Venezuela.

Palabras claves: GSTM1, GSTT1, GSTP1, Genotipo nulo, Polimorfismos, farmacogenética, Población Venezolana.

GLUTATHIONE S TRANSFERASE GSTM1, GSTT1 AND GSTP1 DISTRIBUTION IN VENEZUELAN POPULATION

SUMMARY

The glutathione S transferases (GSTs) are a family of enzymes involved in protection against reactive oxygen species (ROS) by catalyzing its conjugation with glutathione. The aims of this study was to evaluate the prevalence of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 gene polymorphisms in Venezuelan individuals. Genotyping the polymorphisms in GSTT1 and GSTM1 genes were studied in 322 individuals: 116 Indians from the Warao (Winikina) and Panare Ethnicities (Maniapure), 53 African descent (Chua), 100 Caucasians (Capital District) and 50 mestizos (Capital District), using the multiplex polymerase chain reaction (PCR) method. The GSTP1 Ile105Val polymorphism was studied in 291 individuals: 113 Indians, 53 African, 75 Caucasians and 50 mestizos, from the same locations above using PCR-restriction fragment length polymorphism. The populations studied were observed in Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). GSTM1 null and GSTT1 genotypes were found in 41% and 15% of individuals, respectively and the null genotype for both genes were observed in 5%. The distribution of GSTM1 and GSTT1 null genotypes varies among different groups. The general frequency of GSTP1 genotypes were of 33.67% for Ile / Ile, 52.92% for Ile / Val and Val 13.40% for / Val. The most common polymorphism was the Ile / Val and the group of African descent the most frequent was the Val / Val. These results provide important data for studies of disease association and ethnographic studies in Venezuela.

Keywords: GSTM1, GSTT1, GSTP1, Null Genotype, Polymorphisms, Pharmacogenetic, Venezuelan Populations.

Introducción

Las glutatión S-transferasas (GSTs) (EC 2.5.1.18) son una familia de enzimas involucradas en la protección de las células contra las especies de oxígeno reactivas (ROS) catalizando su conjugación con el glutatión (1). Las GSTs están involucradas en reacciones de fase II de biotransformación de drogas, clínicamente

importantes, así como una variedad de xenobióticos, incluyendo precarcinógenos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (2). Además, las GSTs actúan como un inhibidor de la ruta de la Jun kinasa, la cual es un mecanismo de señalización importante para la activación de genes citoprotectores (3).

En mamíferos se han identificado ocho clases de GSTs:

Solicitar copia a: marthabravo@hotmail.com

alfa (GSTA), mu (GSTM), teta (GSTT), pi (GSTP), zeta (GSTZ), sigma (GSTS), kappa (GSTK) y omega (GSTO), basada en su secuencia de homología y especificidad de sustrato. Los genes que codifican la enzima GSTM1 están localizados en un grupo de genes en el cromosoma 1p13.3 y codifica para un enzima de 218 aminoácidos (4,5)

Las GSTs citosólica en humanos ha sido bien caracterizada y se conoce que algunas de ellas son polimórficas. En Caucásicos el 50% de estos no expresan GSTM1, debido a la presencia de una delección homocigota en el gen conocida como GSTM1- o nulo (6). El porcentaje de individuos que no expresan la GSTM1 es mayor en caucásicos y asiáticos que en africanos (7).

El gen GSTT1 está localizado en el cromosoma 22q11.2 y codifica para un enzima de de 240 aminoácidos. Del 20 al 60% de los individuos no expresan la enzima, debido a delección del gen conocida como GSTT1- o nulo (8). Aproximadamente el 60% de los asiáticos, el 40% de los africanos y el 20% de los caucásicos no expresan esta enzima (9).

El gen GSTP1 ha sido localizado en el cromosoma 11q13, cerca de algunos proto-oncogenes (10). Codifica para una proteína de 210 aminoácidos y se expresa en varios tejidos extrahepáticos como cerebro, y en menor cantidad en corazón, pulmones, testículos, riñón y páncreas (11). Cada vez hay más evidencias que sugieren el papel importante de las enzimas metabolizadoras de drogas en la determinación de las variaciones interindividuales en la respuesta terapéutica. La GSTP1 tiene dos polimorfismos de nucleótido simples (cSNPs) comunes que se traducen en alteraciones en la posición Ile105Val y Ala114Val en la secuencia codificada de aminoácidos. La transición polimórfica de adenina a guanina en el nucleótido 313 (A313G) en el exón 5 resulta en una sustitución de isoleucina por valina en el codón 105 (I105V) (12,13). La sustitución Val105 resulta en la restricción estérica del sitio-H, debido a los cambios en las cadenas laterales de varios aminoácidos. Por lo tanto, la aloenzima variante Val105 puede ser capaz de adaptarse más a los sustratos menos voluminosos que la aloenzima Ile105, y, como resultado puede mostrar especificidades de sustrato que se diferencian de los de la aloenzima normal.

Diversos estudios han registrado asociación entre los genotipos de GSTs, particularmente: mu (GSTM), pi (GSTP), omega (GSTO) y teta (GSTT) y el riesgo de varias enfermedades, tales como la leucemia linfocítica crónica, cáncer de tiroides, mama, vejiga, pulmón y

colorrectal, así como carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas, la resistencia a la quimioterapia, la respuesta a drogas y la susceptibilidad a la aparición y evolución de enfermedades representando un área de intensa investigación (9,14,15,16-21). El cáncer es en Venezuela una las causas más frecuentes de enfermedad o de muerte, que ocupa la segunda posición en la mortalidad general, después de las enfermedades cardíacas. La proporción indica que uno de cada cuatro personas se verá afectado a la edad de 74 años por algún tipo de cáncer y siete están en riesgo de morir por la misma razón. El cáncer representa el 15% de las principales causas de muerte en Venezuela. El cáncer de próstata es el más frecuente, con una incidencia de 4408 casos por año, seguido de cuello uterino con 3685 casos por año, de mama con 3549 casos por año, de pulmón con 3185 casos por año y de colon con 2108 casos por año (22).

La población Venezolana es muy heterogénea desde el punto de vista étnico como resultado de la mezcla entre Amerindios, europeos y descendientes africanos. Se han realizado diversos estudios sobre la frecuencia de los polimorfismos genéticos en los genes CYP2C19, CYP2D6, GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2, MTHFR, LEP, LEPR, LTC4S y ADR β 2. Algunos de estos estudios han sido realizados en grupos nativos que viven en el país arrojando resultados interesantes que pueden contribuir al campo de la investigación en el área de la farmacogenética (23). Cabe destacar que en un estudio realizado sobre la frecuencia de los polimorfismos genéticos de GST (GSTM1, GSTP1 y GSTT1) en varios grupos poblacionales como los individuos de las etnias Bari, Panare, Pemon, Warao y Wayuu así como en individuos mestizos se encontró una frecuencia del genotipo de 51% para GSTM1 nulo y de 11% para GSTT1 nulo en la población mestiza. Mientras que en las poblaciones nativas la frecuencia de GSTM1 nulo vario de 15.2% a 54.3% y de 0 – 11% para GSTT1 nulo. El alelo GSTP1 Val fue encontrado más frecuente en la etnia Bari (88.6%) y Panare (63.0%) (24).

La importancia del estudio de los polimorfismos en los genes para las glutathion S-transferasas (GSTs) radica en que no se ha registrado un estudio sistemático de las variaciones genéticas comunes en estos genes en ausencia de una patología determinada. Es por ello, que en este estudio se planteó evaluar la presencia y frecuencia de los polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de xenobióticos GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en individuos venezolanos para proporcionar una base de datos para los futuras estudios clínicos y genéticos relacionados a la

predisposición a enfermedades y a la variabilidad en la respuesta y/o la toxicidad de los medicamentos que sean sustratos de las GSTs.

Materiales y Métodos

Población

El genotipaje de GSTM1 y GSTT1 se realizó en 322 individuos (212 mujeres y 110 hombres), de los cuales 116 fueron indígenas provenientes de las etnias Warao (Winikina, Delta Amacuro) y Panare (Maniapure, Amazonas), 53 afrodescendientes (Chuao, Aragua), 100 caucásicos (Distrito Capital) y 50 mestizos (Distrito Capital). Por otro lado, el estudio de GSTP1 se realizó en 291 individuos: 113 indígenas, 53 afrodescendientes, 75 caucásicos y 50 mestizos, provenientes de las mismas localidades antes mencionadas, aparentemente sanos, no relacionados, de diferente sexo (194 mujeres y 97 hombres) y edades comprendidas entre 5 y 71 años, durante diferentes periodos de tiempo comprendidos entre el año 2008 y el 2015, quienes se prestaron voluntariamente a este estudio, después de ser informados de la finalidad del mismo y firmar un Consentimiento Informado. Hay que hacer notar que la elección de los individuos caucásicos (inmigrantes españoles, portugueses, italianos, rumanos, yugoeslavos y alemanes) y afrodescendientes fue hecha tomando en cuenta hasta 3 generaciones para asegurarnos del origen de dichas poblaciones. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki y del Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT.

Muestras

Por cada individuo se extrajeron 5 ml de sangre periférica, mediante la técnica rutinaria de extracción venosa en la región del antebrazo, utilizando un tubo al vacío con sal sódica de ácido etilendiaminotetraacético al 10% (EDTA) como anticoagulante. Todos los tubos con las muestras fueron enviados al Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, Instituto Anatómico José Izquierdo de la Universidad Central de Venezuela, para su estudio genético.

Genotipaje

La presencia de los polimorfismos genéticos de GSTM1 y GSTT1 fue realizado por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa multiplex siguiendo el protocolo empleado por Arand et al., (25), utilizando los siguientes cebadores: GSTM1-F: 5'GTTGGGCTCAAATATACGGTGG3', GSTM1-R: 5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3', GSTT1-F: 5'TTCCTTACTGGTCCTCAATCTC3', GSTT1-R: 5'TCACCGGATCAGGC CAGCA3', ALB-F: 5'GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC3', ALB-R: 5'GCCCTAAAAAGA AAATCGCCAATC3'. Los productos de amplificación fueron corridos en una electroforesis en gel de agarosa al 3%, a 150V por 20 minutos y fueron visualizados con luz UV en un equipo de foto documentación (Digi Doc-IT imaging system UVP) por tinción con Bromuro de Etidio.

Los genotipos para GSTM1 y GSTT1 fueron determinados por la presencia y ausencia (nulo) de las bandas de 219 y 480 pb, respectivamente (Fig. 1). El gen albumina fue amplificado como control interno de la reacción.

Leyenda: PM: Marcador de Peso Molecular, M1DEL: deleción de GSTM1, T1 DEL: deleción de GSTT1, M1 DEL/T1 DEL: deleción de ambos GSTM1 y GSTT1, Alb: Albumina

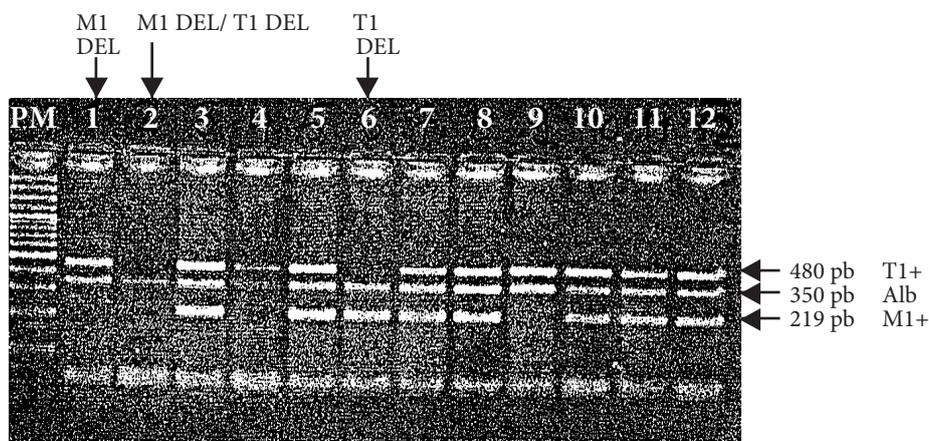


FIGURA 1: Electroforesis en gel de agarosa al 3% donde se muestra el PCR Multiplex para GSTM1 y GSTT1. Líneas 3, 5, 7, 8, 10, 11 y 12: M1+/T1+; líneas 1, 4 y 9: M1-/T1-; línea 6: M1-/T1+; línea 2: M1-/T1-

Los polimorfismos genéticos de GSTP1 fueron determinados por el método de PCR/RFLP, utilizando condiciones y cebadores descritos previamente por Casson et al., (26). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue la siguiente: GSTP1-F: 5'TAG TTTGCCCAAGGTCAAG3' y GSTP1-R: 5'AGCCAACCTGAGGGGTAAG3'. El amplicón de 432 pb obtenido fue digerido con la enzima BsmAI a 55°C, durante toda la noche. Tres variantes fueron identificadas: Ile/Ile (tipo salvaje) compuesta por dos bandas (328 pb y 104 pb); Ile/Val (heterocigoto) por cuatro bandas (328 pb, 221 pb, 107 pb y 104 pb) y Val/Val (homocigoto mutante) por tres bandas (221 pb, 107 pb y 104pb). (Fig. 2)

Analisis estadistico

Se utilizó la Prueba de Chi Cuadrado (X^2 , $P < 0.05$) con 2 grados de libertad para conocer si las poblaciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). Se usó el paquete estadístico IBM SPSS v19.0 (Statistical Package for the Social Science, IBM Inc., NY, USA) y la hoja de cálculo Excel, ambos en ambiente Windows, utilizando estadística descriptiva e inferencial para el análisis.

Resultados

Todas las poblaciones estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tablas 2 y 3). La frecuencia de los genotipos nulos para GSTM1 y GSTT1 en la población estudiada es mostrada en la Tabla I. Los genotipos



Leyenda: PM: Marcador de Peso Molecular

FIGURA 2: Electroforesis en gel de agarosa al 3% donde se muestra la digestión enzimática con Bms AI para GSTP1. Líneas 1,4, 5, 6 y 7: Ile/Ile; líneas 2, 8 y 9: Ile/Val; línea 3: Val/Val

TABLA 1. Frecuencia de los genotipos nulos de GSTM1 y GMTT1 en los grupos de individuos estudiados

GENOTIPO	AMERINDIO (n = 116)	AFRODESCENDIENTE (n = 53)	CAUCASICO (n = 100)	MESTIZO (n = 53)	GENERAL (n = 322)
GSTM1					
Presente + n(%)	75 (65%)	36 (68%)	46 (46%)	33 (62%)	190 (59%)
Nulo- n(%)	41 (35%)	17 (32%)	54 (54%)	20 (38%)	132 (41%)
GSTT1					
Presente + n(%)	107 (92%)	40 (75%)	79 (79%)	47 (89%)	273 (85%)
Nulo- n(%)	9 (8%)	13 (25%)	21 (21%)	6 (11%)	49 (15%)

nulos para GSTM1 y GSTT1 fueron encontrados en un 41% y 15% de los individuos, respectivamente. El genotipo nulo para ambos genes fue encontrado en un 5% (Tabla 2).

La distribución del genotipo nulo GSTM1 fue más frecuente entre los individuos caucásicos y amerindios, mientras que la frecuencia del genotipo nulo GSTT1 fue más alta en caucásicos y afrodescendientes. La frecuencia más alta del genotipo doble nulo fue observada en individuos Caucásico seguidos de los

afrodescendientes.

Las frecuencias generales de los genotipos de GSTP1, tipo salvaje (Ile/Ile), heterocigoto (Ile/Val) y mutante (Val /Val) en los individuos estudiados fueron 33,67% Ile/Ile, 52,92% Ile/Val y 13,40% Val/Val, respectivamente. En los cuatro grupos estudiados la frecuencia de los heterocigotos fue la más alta, mientras que la frecuencia de homocigotos mutantes fue mayor en individuos afrodescendientes (Tabla 3).

TABLA 2. Frecuencia de los genotipos de GSTM1 y GSTT1 combinados en los grupos de individuos estudiados

GENOTIPO	AMERINDIO (n = 116)	AFRODESCENDIENTE (n = 53)	CAUCASICO (n = 100)	MESTIZO (n = 53)	GENERAL (n = 322)
GSTM1+/ GSTT1+	68 (58%)	27 (51%)	33 (33%)	29 (55%)	157 (49%)
GSTM1-/GSTT1+	39 (34%)	13 (25%)	46 (46%)	18 (34%)	149 (36%)
GSTM1+/ GSTT1-	7 (6%)	9 (17%)	13 (13%)	4 (8%)	33 (10%)
GSTM1-/GSTT1-	2 (2%)	4 (7%)	8 (8%)	2 (3%)	16 (5%)
X2 [a]	2,640	0,040	3,495	1,335	4,128
Valor-P [b]	0,267	0,098	0,174	0,513	0,127

n = número de individuos, [a] Prueba de Chi Cuadrado de Pearson (χ^2), [b] Diferencia significativa entre genótipos ($P < 0.05$)

TABLA 3. Frecuencia de los polimorfismos genéticos de GSTP1 en los grupos de individuos estudiados

GENOTIPO	AMERINDIO (n = 113)	AFRODESCENDIENTE (n = 53)	CAUCASICO (n = 75)	MESTIZO (n = 50)	GENERAL (n = 291)
ILE/ILE	39 (34,52%)	18 (33,97)	25 (33,33%)	16 (32%)	98 (33,67%)
ILE/VAL	57(50,44%)	26 (49,05)	45 (60,0%)	26 (52%)	154 (52,92%)
VAL/VAL	17 (15,04%)	9 (16,98)	5 (6,67%)	8 (16%)	39 (13,40%)
X2 [a]	0.153	0	6.19	0.337	2.932
Valor-P [b]	0,9262	1	0.0452	0.8450	0.2308

n = número de individuos, [a] Prueba de Chi Cuadrado de Pearson, [b] Diferencia significativa entre genótipos ($P < 0.05$)

Discusión

La población venezolana es multiétnica, se compone principalmente de personas de origen Ibérico, africano y nativo americano (amerindio). La explicación de estos hallazgos se relaciona con la historia de la fundación de nuestro país. Venezuela recibió una gran inmigración de países como España, Italia, Portugal y Alemania en la última etapa del siglo XIX y en la primera etapa del siglo XX. Además de la alta inmigración africana en la época de la colonia debido al tráfico de esclavos, por esto no es extraño encontrar interesante las frecuencias de los polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan fármacos. Los polimorfismos en los genes GSTs pueden conducir, a la pérdida o a la expresión de la enzima que posee una actividad catalítica diferente de la proteína de tipo salvaje. Dado que las enzimas GSTs desempeñan un papel vital en la defensa celular contra compuestos tóxicos, tales como los carcinógenos, el polimorfismo de los genes GSTs en los venezolanos puede predisponer a enfermedades causadas por xenobióticos.

La distribución de los genotipos nulo GSTM1- y GSTT1- varía entre los diferentes grupos étnicos. Varios estudios poblacionales han reportado una prevalencia que oscila de 47 a 58% para GSTM1- y de 13% a 25% para GSTT1- en poblaciones europeos. En las poblaciones africanas la frecuencia de GSTM1- va desde 23% a 48% y de GSTT1- va desde 15 a 26% y en las poblaciones asiáticas la frecuencia va de 33% a 63% para el genotipo GSTM1- y de 20% a 53% para el GSTT1- (27, 28, 29).

El genotipo nulo de GSTM1- en la población general de Venezuela fue de 41%. En la población afrodescendiente fue de 32%, lo cual es consistente con lo observado previamente en poblaciones afroamericanas donde se reportó alrededor de un 28 % (27, 28). Por otra parte, se encontró que la frecuencia de GSTM1- en la población mestiza Venezolana fue de 38%, similar a lo reportado en poblaciones mestizas mexicanas con un 42% (30) y mestizos urbanos venezolanos con un 52% (24). En cuanto a la población amerindia, la frecuencia del genotipo GSTM1- fue del 35%, frecuencia muy similar a la reportada en poblaciones asiáticas, particularmente en Japón (29), así como en otras poblaciones amerindias de América del Sur como en Argentina, Paraguay (31, 32) y Brasil (33, 34), sin embargo en un estudio llevado a cabo en 5 tribus amerindias venezolanas el GSTM1- varió entre 15 y 54% (24). Por otro lado, la frecuencia de GSTM1- en los caucásicos fue 54% similar a lo reportado para las poblaciones caucásicas de América (9, 28) y europea (27, 35), donde se encontró alrededor del 53%.

En lo que se refiere al genotipo nulo GSTT1- se encontró en una frecuencia de 15% en la población en general, en

un 25% en la población afrodescendiente resultado que es consistente con los reportados para las poblaciones afroamericanas donde este genotipo se observó en un 24% (28), sugiriendo el origen étnico de la población estudiada. En mestizos venezolanos la frecuencia GSTT1- fue de 11% igual a la reportada en mestizos mexicanos y venezolanos (30,36, 24), lo que indica que algunas poblaciones mixtas americanas comparten el mismo linaje racial en su acervo genético. Sin embargo, en los amerindios fue del 8%, lo que difiere con lo reportado por las poblaciones de Asia (29,37) y similar a lo encontrado en 5 tribus venezolanas donde osciló entre 0 y 11% (24), mientras que en la población caucásica fue de 21%, frecuencia muy similar a la observada en otras poblaciones del mismo origen (9, 27, 28, 35).

La combinación de genotipos de GSTM1 y GSTT1 doble nulo (GSTM1- / GSTT1-) en la población amerindia fue del 2% (Tabla II), esta frecuencia es menor que la reportada en los asiáticos (27,37), pero muy similar a la observada en las poblaciones del sur de la India (38) Turquía (39, 40) e Irán (41, 42). Se observó la mayor frecuencia de genotipos nulos en población caucásica (8%), lo cual es consistente con la reportada previamente en los europeos y los blancos americanos donde se observó alrededor del 10% (9, 27, 28, 35).

Nuestros hallazgos son consistentes con un estudio reciente llevado a cabo en poblaciones nativas y urbanas de Venezuela, donde se encontró que el genotipo GSTM1- fue el más bajo para los mestizos venezolanos (11%) y amerindios (11,4%) (24).

En general se acepta que las primeras poblaciones de América eran probablemente un pequeño grupo de poblaciones ancestrales del sur-centro de Siberia que cruzaron el estrecho de Bering hace unos 30.000 años para colonizar Beringia y posteriormente migraron al interior de América en períodos variables de tiempo (35). De acuerdo con esto, la frecuencia de GSTM1 observada en la población amerindia tal vez podría reflejar la frecuencia de estos genotipos en las poblaciones ancestrales de Siberia y Beringia que muestran, una vez más, el potencial hombre americano asiático.

La combinación de genotipos nulos de GSTM1- y GSTT1- se ha relacionado con un aumento de la aneuploidía resultante de la exposición al benceno (37), tumores de recto (39), cáncer de pulmón (43) y el cáncer de pulmón entre los no fumadores expuestos al medio ambiente con el humo del tabaco, principalmente en caucásicos y afroamericanos (44). A pesar de la frecuencia relativamente baja de estas combinaciones, los investigadores han sido capaces de establecer un mayor riesgo de cáncer en los individuos que llevan este genotipo doble nulo.

En este estudio se observa una baja frecuencia del genotipo GSTT1 en comparación con las poblaciones de origen asiático. Este hallazgo se debe investigar para determinar las posibles causas y su significado para la población amerindia venezolana. Los factores estocásticos (por ejemplo, de cuello de botella y el efecto fundador, muy comunes en las tribus amerindias) y otros factores tales como la adaptación del medio ambiente, la endogamia, y mezcla con otro grupo étnico o la distribución geográfica pueden explicar las diferencias observadas en este estudio.

Las frecuencias de los polimorfismos de GSTP1 en población general fueron de 33,67% Ile/Ile, 52,92% Ile/Val y 13,40% para Val/Val. En individuos de origen indígena las frecuencias de los diferentes genotipos fueron 34,52% Ile/Ile, 50,44% Ile/Val y 15,04 Val/Val, frecuencias estas muy cercanas a las observadas en coreanos (45) y en concordancia con lo reportado en poblaciones indígenas similares (46,47) En individuos afrodescendientes las frecuencias fueron de 33,96% Ile/Ile, 49,05 Ile/Val y 16,68% Val/Val, las cuales coinciden con las frecuencias reportadas en poblaciones de origen africano en Brasil (48) y con individuos afroamericanos de Norteamérica (49) donde las frecuencias encontradas fueron de 35% Ile/Ile, 46% Ile/Val y 19% Val/Val. En mestizos las frecuencias genotípicas variaron desde un 32% Ile/Ile, 52% Ile/Val hasta un 16% Val/Val. Los caucásicos presentaron la mayor frecuencia de heterocigotos (60%) y la menor frecuencia de homocigotos mutantes (6,67%), datos similares a los reportados para poblaciones caucásicas europeas (27, 49, 50). En los cuatro grupos estudiados la mayor frecuencia fue la de Ile/Val y la mayor frecuencia para Val/Val fue observada en afrodescendientes, sugiriendo que los individuos de este grupo pueden tener una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad asociada con la ausencia o baja actividad de esta enzima. Los resultados de este trabajo proporcionan una completa información con respecto a las variaciones de las secuencias de GSTM1, GSTT1 y GSTP1. Estos hallazgos pueden ser útiles en estudios de casos y controles que asocian estos polimorfismos con efectos de riesgo de enfermedades y respuesta a tratamiento en Venezuela.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por los proyectos FONACIT MC-2007001066, MC- 2008001053, PEII-2012001275, CDCH-UCV PI 0987122013, PEII 2013001768.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses para el presente resultado de la investigación.

Referencias

1. Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J* 1999;18(5):1321-1334.
2. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 82(1-2):21-26
3. Bailey LR, Roodi N, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF. Breast cancer and CYPIA1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. *Cancer Res* 1998;58(1):65-70.
4. Guthenberg C, Warholm M, Rane A, Mannervik B. Two distinct forms of glutathione transferase from human foetal liver. Purification and comparison with isoenzymes isolated from adult liver and placenta. *Biochemical Journal* 1986;235(3):741-745.
5. Mitchell AE, Morin D, Lame MW, Jones AD. Purification, mass spectrometric characterization, and covalent modification of murine glutathione S-transferases. *Chemical Research in Toxicology* 1995;8(8):1054-1062.
6. Seidegård J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(19):7293-7.
7. Roth MJ, Dawsey SM, Wang G, Tangrea JA, Zhou B, Ratnasinghe D, et al. Association between GSTM1*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the high risk region of Linxian, China. *Cancer Lett* 2000;156(1):73-81.
8. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, et al., Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300 (Pt 1):271-276.
9. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* 1999;(148):231-249.
10. Smith CM, Wells SA, Gerhard DS. Mapping eight new polymorphisms in 11q13 in the vicinity of multiple endocrine neoplasia type 1: identification of a new distal recombinant. *Hum Genet* 1995;96:377-87.
11. Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schllens JHM. Genetic polymorphisms of Drug-Metabolising Enzymes and Drug Transporters in the Chemotherapeutic Treatment of Cancer. *Clin Pharmacokinet* 2006;45 (3):253-285.
12. Harries, L.W., Stubbins, M.J., Forman, D., Howard, C. Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase P locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18:641-644.
13. Van EM, Roelofs HM, Dekker S, Mulder CJ, Wobbes T, Jansen JB, et al. Polymorphic expression of the

- glutathione S-transferase P1 gene and its susceptibility to Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:586-589.
14. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30(6):445-600.
 15. Lear JT, Heagerty AH, Smith A, Bowers B, Payne CR, Smith CA, et al. Multiple cutaneous basal cell carcinomas: glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) and cytochrome P450 (CYP2D6, CYP1A1) polymorphisms influence tumors numbers and accrual. *Carcinogenesis* 1996;17(9):1891-1896.
 16. Yuille M, Condie A, Hudson C, Kote-Jarai Z, Stone E, Eeles R, et al. Relationship between glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphism and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:4216-4218.
 17. Engel LS, Taioli E, Pfeiffer R et al. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002;156: 95-109
 18. Geisler AS, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol* 2001;154:95-105
 19. Reszka E, Wasowicz W. Significance of genetic polymorphisms in glutathione S-transferase multigene family and lung cancer risk. *Inter J Occup Med and Environ Health* 2001;14:99-113.
 20. Knudsen LA, Loft SH, Autrup H. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat Res* 2001;483:83-88.
 21. Cotton SC, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:7-32.
 22. Capote LG. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev Venez Oncol* 2006;18(4):269-281.
 23. Chiurillo MA. Genomic biomarkers related to drug response in Venezuelan populations. *Drug Metab Pers Therap* 2015;30(1):33-41
 24. Chiurillo MA, Griman P, Santiago L, Torres K, Moran Y, Borjas L. Distribution of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TP53 disease-associated gene variants in native and urban Venezuelan populations. *Gene* 2013;531(1):106-11.
 25. Arand M, Mühlbauer R, Hengster J, Jäger E, Fuchs J, Winkler L and Oesch F. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem* 1996;236:184-186.
 26. Casson A, Zheng Z, Porter G, Guernsey D. Genetic polymorphisms of microsomal epoxide hydroxylase and glutathione S-transferase M1, T1 and P1, interactions with smoking, and risk for esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Cancer Detect & Prevent* 2006;30:423-431.
 27. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al., E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(12):1239-1248.
 28. Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of Glutathione S-Transferase M1 and T1 polymorphism by polymerase chain reaction in Americans whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996;6:187-191.
 29. Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, et al., Analysis of genetics polymorphism in NQ01, GSTM1, GSTT1 and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemic/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:4091-4095.
 30. Montero R, Araujo A, Carranza P, Mejía-Loza V, Serrano L, Albore A, et al. Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1 and Cytochrome CYP1A1 in Mexican. *Human Biol* 2007;79(3):299-312.
 31. Bailliet G, Santos MR, Alfaro EL, Dipierri JE, Demarchi DA, Carnese FR et al. Allele genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay. *Mutat Res* 2007;627:171-177.
 32. Gaspar PA, Hutz M, Salzano F, Hill K, Hurtado M, Petzl-Erler L, et al. Polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 2002;119 (3):249-256.
 33. Klautau-Guimaraes MN, De Oliveira C, Ferreira R, Oliveira S, Koppe C, Hatagima A, et al. Distribution of Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null in Brazilian Amerindians. *Genet and Mol Biol* 2005;28(1):32-35.
 34. Arruda VR, Grignolli CE, Goncalves MS, Soares MC. Menezes R, Saad STO, et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase umu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet* 1998;54:210-214.
 35. Lell JT, Sukernick RI, Starikovskaya YB, Su B, Jin L, Schurr TG, et al. The dual origin and Siberian affinities of Native American Y Chromosomes. *Am J Hum* 2002;70(1):192-206.
 36. Sandoval-Carrillo A, Aguilar-Duran M, Vázquez-Alaniz F, Castellanos-Juárez FX, Barraza-Salas M, Sierra-Campos E, et al. Polymorphisms in the GSTT1 and GSTM1 genes are associated with increased risk of preeclampsia in the Mexican mestizo population. *Genet Mol Res* 2014;13 (1):2160-2165
 37. Kim SY, Choi JK, Cho YH, Chung EJ, Paek D, Chung HW. Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2004;14(7):453-63.
 38. Naveen AT, Adithan C, Padmaja N, Satyanarayanamoorthy K, Anitha P, Gerard N, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotype distribution in south Indians. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:403-406.
 39. Ates NA, Tamer L, Ates C, Erkan B, Elipek T, Ocal K, et al. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for development to colorectal cancer. *Biochem Genet* 2005;43:149-163.
 40. Berber U, Yilmaz I, Yilmaz O, Haholu A, Kucukodaci Z, Ates F, et al. CYP1A1 (Ile462Val), CYP1B1 (Ala119Ser and Val432Leu), GSTM1 (null), and GSTT1 (null)

- Polymorphisms and Bladder Cancer Risk in a Turkish Population. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2014;14(6):3925-3929.
41. Moasser E, Azarpira N, Shirazi B, Saadat M and Geramizadeh B. Genetic polymorphisms of glutathione-s-transferase M1 and T1 genes with risk of diabetic retinopathy in Iranian population. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17:351-356
 42. Safa F, Shahsavari G and Abyaneh R. Glutathione s-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms in Iranian patients with glaucoma. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17:332-336.
 43. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ and Schwartz AG. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogen* 2005;26(2):395-401.
 44. Cote ML, Kardia SL, Wenzlaff AS, Land SJ and Schwartz AG. Combinations of glutathione S-transferase genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasians and African Americans: a population-based study. *Carcinogen* 2005;26(4):811-819.
 45. Cho HJ, Lee SY, Ki CS, Kim JW. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphism in the Korean population. *J Korean Med Sci* 2005;20:1089-1092.
 46. Ruiz Y, Chiurillo MA, Borjas L, Phillips C, Lareu M, Carracedo Á. Analysis of the SNPforID 52-plex markers in four Native American populations from Venezuela. *Forensic Sci Int Genet* 2012;(6):142-145.
 47. Griman P, Moran Y, Valero G, Loreto M, Borjas L, Chiurillo MA. CYP2D6 gene variants in urban/admixed and Amerindian populations of Venezuela: pharmacogenetics and anthropological implications. *Ann Hum Biol* 2012;(39):137-142.
 48. Rossini A, Ropozo D, Amorin L, Macedo J, Medina R, Neto J, et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphism in a Brazilian population. *Genet and Mol Res* 2002;1(3):233-240.
 49. Watson MA, Stewart RK, Smith GBJ, Masey TE and Bell DA. Human Glutathione S-Transferase P1 polymorphism: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequencies distribution. *Carcinogen* 1998;(19):275-280.
 50. Harries W, Stubbins M, Forman D, Howard G, Wolf C. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogen* 1997;(18):641-644.

CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO EN EL UROANÁLISIS REALIZADO EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS DEL DISTRITO METROPOLITANO DE CARACAS

Celsy Hernández; M^a Fátima Garcés; Hilda Stekman; Jonattan Ramos.

Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Escuela de Bioanálisis,
Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Recibido para publicación el 21 de mayo 2016. Aprobado para publicación el 30 de junio 2016.

RESUMEN:

En la actualidad, a pesar de los grandes avances en el conocimiento de la gestión de calidad en el laboratorio clínico y que las normas y recomendaciones de la ISO, del Instituto de Estandarización Clínica y del Laboratorio (CLSI) y la Confederación de Laboratorios Clínicos Europeos (ECLM), establecen los requisitos para la calidad y la competencia en el análisis simple de orina, el uroanálisis continúa rezagado en materia de calidad, con respecto al resto de las áreas clínicas de los servicios del laboratorio clínico. Por ello, en el presente trabajo se propuso evaluar el cumplimiento de requisitos de control de calidad interno y externo en los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas, de acuerdo con las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM. Objetivo: Evaluar el cumplimiento de requisitos de control de calidad analítico interno y externo en los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas, de acuerdo a las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM. Materiales y métodos: La investigación estuvo limitada a una muestra probabilística y representativa correspondiente al 25% de los laboratorios clínicos registrados en el Distrito Metropolitano de Caracas. La muestra correspondió a 40 laboratorios clínicos del sector público (17%) y privado (83%), quienes llenaron un cuestionario de 42 preguntas correspondientes al cumplimiento de los requisitos 4.9.1, 4.9.2, 4.10.1, 4.10.2, 4.10.3, 4.10.4, 4.11.1, 4.11.2, 4.13.1, 4.13.2, 4.13.3, 5.5.1, 5.5.3, 5.6.1 y 5.6.4 de la "Norma ISO 15189. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia", 3.4.1, 5.4.1, 5.4.2, 7.1, 7.2 y 7.5 de la guía "Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens" del CLSI y 9.1.2.5, 9.1.2.13, 9.2.2, 9.2.13, 10.2, 11.1.6.1, 11.1.6.2 y 12.1.2 de la guía "European Urinalysis Guidelines", de la ECLM, referidos al control de calidad interno y externo del análisis físico, químico y forme de las muestras parciales de orina. Resultados y discusión: 79% de los participantes, no cumplen ninguno de los requisitos mientras que el 21% cumplen en promedio 3 requisitos para el control de calidad interno en el análisis del aspecto y el color de las muestras parciales de orina. 82% de los participantes, no cumplen ninguno de los requisitos mientras el 18% cumplen en promedio 4 requisitos para el control de calidad interno en el análisis del físico-químico de las muestras parciales de orina. 92% de los participantes, no cumplen ninguno de los requisitos mientras el 8% cumplen en promedio 8 requisitos para el control de calidad interno en el análisis de los elementos formes de las muestras parciales de orina. 95% de los participantes, no cumplen ninguno de los requisitos mientras el 5% cumplen en promedio 2 requisitos para el control de calidad externo del uroanálisis. Conclusiones: Este estudio evidenció que entre el 79% y 95% de los laboratorios clínicos, no cumplen ningún requisito para el control de calidad interno y externo del uroanálisis, mientras que la minoría que implementa algún tipo de control de calidad, cumplen con muy pocos requisitos de los previstos en las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM. Se considera que el bajo interés en el uroanálisis, la falta de estructura organizativa y competencia técnica así como los elevados costos y escasa disponibilidad de los materiales controles y programas de evaluación externa de la calidad en uroanálisis, son las principales razones que impiden a los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas asegurar la calidad de los resultados del uroanálisis según los requisitos de la ISO, CLSI y ECLM.

Palabras claves: Control de calidad analítico, uroanálisis, laboratorios clínicos.

ANALYTICAL QUALITY CONTROL IN THE URINALYSIS CARRIED OUT IN THE CLINICAL LABORATORIES OF THE METROPOLITAN DISTRICT OF CARACAS

SUMMARY

At present, despite of the advances in the knowledge of quality management in the clinical laboratory and the standards and guidelines of the ISO, Clinical and Laboratory Standardization Institute (CLSI) and the Confederation of European Clinical Laboratories (ECLM), establishing the requirements for quality and competence in the urine analysis. Urinalysis continues to lag quality compared to the rest of the clinical tests in the clinical laboratory. Therefore, in the present study it was important to evaluate the compliance of internal and external quality control requirements in the clinical laboratories of the Metropolitan District of Caracas, in accordance with the standards and guidelines of ISO, CLSI and ECLM. Aim: To evaluate the compliance of internal and external analytical quality control requirements in the clinical laboratories of the Metropolitan District of Caracas, according to the standards

Solicitar copia a: celsy.hernandez@gmail.com.

and guidelines of ISO, CLSI and ECLM. Materials and Methods: The research was limited to a probabilistic and representative sample corresponding to 25% of the clinical laboratories registered in the Metropolitan District of Caracas. The sample corresponds to 40 public (17%) and private (83%) clinical laboratories in Caracas, who filled out a questionnaire of 42 questions corresponding to the fulfillment of requirements 4.9.1, 4.9.2, 4.10.1, 4.10.2, 4.10.3, 4.10.4, 4.11.1, 4.11.2, 4.13.1, 4.13.2, 4.13.3, 5.5.1, 5.5.3, 5.6.1 and 5.6.4 of the standard "ISO 15189. Medical laboratories -- Particular requirements for quality and competence". Guidelines 3.4.1, 5.4.1, 5.4.2, 7.1, 7.2 and 7.5 of CLSI "Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens" and 9.1.2.5, 9.1.2.1, 9.2.2, 9.2.13, 10.2, 11.1.6.1, 11.1.6.2 and 12.1.2 of the "European Urinalysis Guidelines" of the ECLM, referring to the internal and external quality control of physical, chemical and particles analysis of a random or first morning urine specimen (partial urine). Results and Discussion: 79% of the participants did not accomplish any of the requirements while 21% did accomplish, in average, three requirements for internal quality control in the analysis of the appearance and color of partial urine specimens. 82% of participants did not accomplish any of the requirements while 18% did accomplish, in average, four requirements for internal quality control in the physical and chemical analysis of partial urine specimens. 92% of participants did not accomplish any of the requirements while 8% did accomplish, in average, eight requirements for internal quality control in the particles analysis of the partial urine specimens. 95% of participants did not accomplish any of the requirements while 5% did accomplish, in average, two requirements for external quality control of uroanalysis. Conclusions: This study shows that between 79% and 95% of clinical laboratories do not accomplish any requirements for internal and external quality control of urinalysis, whereas the minority accomplish only few requirements of quality control following the standards and guidelines of ISO, CLSI and ECLM. The lack of interest in urinalysis, standardization and technical competence, as well as high costs and scarce availability of control materials and external quality assessment programs in urinalysis are considered to be the main reasons for the lack of quality of the results of the urinalysis according to the standards and guidelines of ISO, CLSI and ECLM in laboratories Clinicians of the Metropolitan District of Caracas.

Keywords: Analytical quality control, urinalysis, clinical laboratories.

Introducción

El uroanálisis o examen simple de orina, es el análisis de la orina mediante un procedimiento detallado que abarca la evaluación de los aspectos característicos de este líquido biológico (1-5), con la finalidad de proporcionar información clínica útil, de forma rápida, temprana, costo efectiva y con escasa invasividad para el paciente (1,3,4), acerca de alteraciones en el funcionalismo renal y genitourinario, así como de otro orden metabólico (1-5). Al igual que cualquier otra prueba de laboratorio clínico, el uroanálisis debe llevarse a cabo en forma segura y bien controlada (6,7), bajo un sistema de control interno y externo que permita prevenir y minimizar los errores y variaciones aleatorias y sistémicas (8,9), que afectan la confiabilidad de los resultados (10,11) y que pueden ocurrir desde que se ordena la prueba hasta que esta es interpretada por el médico solicitante (8,9).

En la actualidad, a pesar de los grandes avances en el conocimiento de la gestión de calidad en el laboratorio clínico y que las normas internacionales, específicamente, la ISO 15189 y las guías de recomendaciones para el uroanálisis "Urinalysis and Collection, Transportation and Preservation de Urine Specimens" (12) y "Europea Urinalysis Guidelines" (13); del Instituto de Estandarización Clínica y del Laboratorio (CLSI) (del inglés, Clinical and Laboratory Standards Institute) y la Confederación de Laboratorios

Clínicos Europeos (ECLM) (del inglés, European Confederation Laboratory Medicine), respectivamente; establecen los requisitos para la calidad y la competencia en el análisis simple de orina, el uroanálisis continúa tradicionalmente rezagado en materia de calidad, con respecto al resto de las áreas clínicas de los servicios de laboratorio (14). Por ello, en el presente trabajo se propuso evaluar el cumplimiento de requisitos de control de calidad interno y externo en los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas, de acuerdo a las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM, con el objeto de promover la calidad en el uroanálisis así como impulsar la armonización y la acreditación de los laboratorios clínicos, a fin de garantizar la satisfacción de los pacientes y usuarios de los servicios de uroanálisis en el Distrito Metropolitano de Caracas y nuestro país.

Objetivo

Evaluar el cumplimiento de requisitos de control de calidad analítico interno y externo en los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas, de acuerdo a las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM.

Materiales y Métodos

a. Tipo y nivel de la investigación

Este estudio incorporó una investigación de tipo descriptiva con un diseño de campo no experimental,

que permitió evaluar el cumplimiento de requisitos de control de calidad analítico interno y externo, de acuerdo a las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM, mediante el análisis e interpretación de datos recolectados directamente en los servicios de laboratorio clínico del Distrito Metropolitano de Caracas sin manipulación intencional de las variables. El proyecto de investigación se adscribió al Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (U.C.V.) y fue financiado a través del programa de financiamiento para la investigación del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH), de la U.C.V.

b. Muestras

Se envió la documentación para la invitación a la participación voluntaria en el estudio a una muestra probabilística que incorporó el 25% de los laboratorios clínicos registrados en el Distrito Metropolitano de Caracas, considerando una distribución estratificada de afijación proporcional entre los estratos de laboratorios clínicos del sector público (17%) y privado (83%), pertenecientes tanto a servicios de atención de salud pública ambulatoria y hospitalaria, así como laboratorios privados particulares y ubicados en centros de atención clínica; con la intención de asegurar que todos los estratos de interés se encontraran representados aleatoria y proporcionalmente a la cantidad respectiva existente entre los distintos municipios que conforman el Distrito Metropolitano de Caracas. Para crear el marco de muestreo a efecto de la selección de los 60 laboratorios clínicos, correspondiente al 25% de los registrados en el Distrito Metropolitano de Caracas, se tomó en cuenta la lista de laboratorios clínicos registrados en el Colegio de Bioanalistas del Distrito Federal y el Estado Miranda (CBDFEM), así como las listas de laboratorios clínicos ambulatorios, de clínicas populares y hospitalarios del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPPS) y el Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS), ubicados en el Distrito Metropolitano de Caracas.

De los 60 laboratorios clínicos seleccionados, 10 no pudieron ser efectivamente invitados a participar en el estudio, debido a que no existen o se encuentran inoperantes al momento de la entrega de la documentación para la invitación, y otros 10 efectivamente invitados, se negaron a participar voluntariamente en la investigación. Por ello, el estudio contó con 40 laboratorios clínicos que

dieron su consentimiento informado para participar voluntariamente, de los cuales, 17% correspondieron al sector público y 83% al sector privado, siendo 47% privados particulares, 35% privados en clínicas privadas, 10% públicos en hospitales, 5% públicos en clínicas populares y 3% público ambulatorio. Así mismo, 64% se ubicaron en el municipio Libertador, 23% en el municipio Sucre, 10% en el municipio Baruta y 3% en el municipio Chacao.

c. Métodos e instrumentos de recolección, procesamiento y análisis de datos e información

Los 40 laboratorios clínicos participantes llenaron un cuestionario a fin de evaluar el grado de cumplimiento de los requisitos de control de calidad analítico interno y externo en el uroanálisis, según la "Norma ISO 15189. Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia" (15) y las recomendaciones para el uroanálisis "Urinalysis and Collection, Transportation and Preservation de Urine Specimens", del CLSI (12) y "Europea Urinalysis Guidelines", de la ECLM (13).

El cuestionario estuvo compuesto por 42 preguntas distribuidas en dos partes, una referida al control de calidad interno y otra al control de calidad externo de la fase analítica del uroanálisis. La parte referida al control de calidad interno a su vez estuvo constituida por 3 partes que consideraron requisitos para el control de calidad interno en el análisis del aspecto y color, el análisis físico-químico mediante tiras reactivas comerciales para el uroanálisis y el análisis de los elementos formes de las muestras parciales de orina, respectivamente. En el cuestionario, cada una de estas 3 partes del control de calidad analítico interno, constó de 12 preguntas, que correspondieron al cumplimiento de los requisitos 4.9.1, 4.9.2, 4.10.1, 4.10.2, 4.10.3, 4.10.4, 4.11.1, 4.11.2, 4.13.1, 4.13.2, 4.13.3, 5.5.1, 5.5.3 y 5.6.1 de la "Norma ISO 15189. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia" (15), 3.4.1, 5.4.1, 5.4.2, 7.1, 7.2 y 7.5 de la guía "Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens" del CLSI (12) y 9.1.2.5, 9.2.2, 9.2.13, 10.2, 11.1.6.1 y 12.1.2 de la guía "European Urinalysis Guidelines", de la ECLM (13), referidos al control del análisis físico, químico y forme de las muestras de orina, mediante el análisis de soluciones control de orina de nivel normal y patológico, empleando instrucciones

escritas y un cronograma de frecuencia del análisis, en función de la productividad del laboratorio, así como el registro y la revisión programada de los resultados obtenidos empleando criterios normalizados y documentados de aceptación y rechazo, que permitan detectar la presencia no conformidades, las cuales deben ser registradas y revisadas periódicamente a fin de implementar las acciones correctivas y preventivas pertinentes, con la finalidad de mejorar continuamente el control del proceso de medición durante el análisis de las muestras parciales de orina.

La segunda parte del cuestionario, referida al control de calidad externo, estuvo constituida por 6 preguntas, que correspondieron al cumplimiento de los requisitos 5.6.4 de la "Norma ISO 15189. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia" (15), 7.5 de la guía "Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens" del CLSI (12) y 9.1.2.13, 11.1.6.2 de la guía "European Urinalysis Guidelines", de la ECLM (13), referidos a que el laboratorio clínico debe participar en comparaciones interlaboratorio tales como aquellos esquemas o programas de evaluación externa de la calidad, diseñadas, organizados, operados y reportados por fabricantes, asociaciones profesionales, entes académicos o instituciones gubernamentales nacionales o internacionales; y a que la dirección del laboratorio clínico debe hacer seguimiento a los resultados obtenidos de esas evaluaciones, e implementar acciones preventivas y correctivas cuando sea el caso.

Los datos recolectados a través del llenado del cuestionario por los participantes, fueron procesados y analizados empleando el programa Microsoft Excel y métodos de estadística descriptiva de frecuencia porcentual.

Resultados

a. Control de calidad interno de la fase analítica del uroanálisis

1) Análisis físico: Aspecto y color de las muestras de orina parcial

En el análisis de los datos obtenidos a través del cuestionario se obtuvo que el 79% de los participantes, no cumplen ninguno de los requisitos para el control de calidad interno en el análisis del aspecto y el color de las muestras parciales de orina. De igual manera se obtuvo que sólo el 21% de los participantes, conformados en un 87% por laboratorios clínicos

privados y 13% por públicos, cumplen con algún(nos) requisito(s) (en promedio 3 requisitos de los 12 evaluados por participante), para el control de calidad interno en el análisis del aspecto y el color de las muestras parciales de orina. En relación al cumplimiento se evidenció que 10% de los laboratorios clínicos participantes manifiestan tener instrucciones escritas para el control del análisis del aspecto y color de las muestras (requisitos N°2) y registrar los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°7). El 8% de los laboratorios clínicos participantes manifiestan emplear muestras control de nivel normal y patológico para el análisis del aspecto y el color de las muestras (requisito N°1), revisar periódicamente los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°8) y tener un cronograma para la revisión de los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°9). 5% de los laboratorios clínicos participantes manifiestan controlar semanalmente el análisis del aspecto y el color de las muestras (requisito N°3), tener un cronograma para el análisis de muestras control (requisito N°4), tener normalizados y documentados los criterios para la aceptación y rechazo de los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°5) y tener normalizadas y documentadas las acciones correctivas y preventivas a seguir en presencia de una potencial o patente no conformidad en los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°6). Ninguno de los laboratorios clínicos participantes manifiesta registrar las acciones correctivas y preventivas tomadas en caso de la presencia de conformidades potenciales o patentes (requisito N°10), revisar periódicamente las acciones correctivas y preventivas tomadas (requisito N°11) ni tener un cronograma para la revisión de las acciones correctivas y preventivas tomadas (requisito 12).

2) Análisis físico-químico mediante tiras reactivas comerciales

En el análisis de los datos obtenidos a través del cuestionario se obtuvo que el 82% de los participantes, no cumplen ninguno de los requisitos para el control de calidad interno en el análisis físico-químico de las muestras parciales de orina mediante tiras reactivas comerciales para el uroanálisis. De igual manera se obtuvo que el 18% de los participantes, conformados en un 86% por laboratorios clínicos privados y 14% públicos, cumplen algún(nos) requisito(s) (en promedio 4 requisitos de los 12 evaluados por participante), para

el control de calidad interno en el análisis del físico-químico de las muestras parciales de orina, mediante tiras reactivas comerciales para el uroanálisis. En relación al cumplimiento se evidenció que el 10% de los laboratorios clínicos participantes manifiestan tener instrucciones escritas para el control del análisis físico-químico mediante tiras reactivas comerciales (requisito N°2) y registrar los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°7). 8% de los laboratorios clínicos participantes manifiestan emplear muestras control de nivel normal y patológico para el análisis físico-químico de las muestras de orina mediante tiras reactivas comerciales (requisito N°1), tener un cronograma para el análisis de muestras control (requisito N°3), tener normalizados y documentados los criterios para la aceptación y rechazo de los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°5), tener normalizadas y documentadas las acciones correctivas y preventivas a seguir en presencia de una potencial o patente no conformidad en los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°6), revisar periódicamente los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°8) y tener un cronograma para la revisión de los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°9). 5% de los laboratorios clínicos participantes manifiestan controlar semanalmente todos los viales de tiras reactivas comerciales en uso (requisito N°4). 3% de los laboratorios clínicos participantes manifiesta registrar las acciones correctivas y preventivas tomadas en caso de la presencia de no conformidades potenciales o patentes (requisito N°10). Ninguno de los laboratorios clínicos participantes manifiesta revisar periódicamente las acciones correctivas y preventivas tomadas (requisito N°11) ni tener un cronograma para la revisión de las acciones correctivas y preventivas tomadas (requisito 12).

3) Análisis de los elementos formes de las muestras parciales de orina

En el análisis de los datos obtenidos a través del cuestionario se obtuvo que el 92% de los participantes, no cumplen ningún requisito para el control de calidad interno en el análisis de los elementos formes de las muestras parciales de orina. De igual manera, se obtuvo que el 8% de los participantes, conformados en un 100% por laboratorios clínicos privados, cumplen algún(nos) requisito(s) (en promedio 8 requisitos de los 12 evaluados por participante), para el control de calidad interno en

el análisis de los elementos formes de las muestras parciales de orina. En relación al cumplimiento se evidenció que el 8% de los participantes, manifiestan emplear muestras control de nivel normal y patológico para el análisis de los elementos formes (requisito N°1), tener normalizados y documentados los criterios para la aceptación y rechazo de los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°5), tener normalizadas y documentadas las acciones correctivas y preventivas a seguir en presencia de una potencial o patente no conformidad en los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°6) y registrar los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°7). El 5% de los participantes, manifiestan tener instrucciones escritas para el control del análisis de los elementos formes (requisito N°2), tener un cronograma para el análisis de muestras de control (requisito N°3), controlar semanalmente el análisis de los elementos formes del uroanálisis (requisito N°4), revisar periódicamente los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°8) y tener un cronograma para la revisión de los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°9). 2% de los participantes, manifiesta registrar las acciones correctivas y preventivas tomadas en caso de la presencia de no conformidades potenciales o patentes (requisito N°10) y ninguno de los participantes, manifiesta revisar periódicamente las acciones correctivas y preventivas tomadas en caso de no conformidades potenciales o patentes detectadas (requisito N°11), ni tener un cronograma para la revisión de dichas acciones correctivas y preventivas tomadas (requisito N°12).

b. Control de calidad externo de la fase analítica del uroanálisis

En el análisis de los datos obtenidos a través del cuestionario se obtuvo que el 95% de los participantes, no cumplen ninguno de los requisitos para el control de calidad externo en el uroanálisis. De igual manera se obtuvo que sólo el 5% de los participantes, conformados en un 50% por laboratorios clínicos privados y 50% públicos, cumplen algún(nos) requisito(s), para el control de calidad interno externo del uroanálisis. En relación al cumplimiento se evidenció que uno de los participantes (público hospitalario) manifiesta haber participado en algún(nos) programa(s) de evaluación externa de la calidad en uroanálisis, en el que no se evaluaron todos los parámetros del uroanálisis

(requisitos N°1). El otro participante (privado ubicado en clínica) manifiesta haber participado en algún(nos) programa(s) de evaluación externa de la calidad en uroanálisis, en el(los) que se evaluaron todos los parámetros del uroanálisis (requisitos N°1 y 2) y haber implementado acciones correctivas y preventivas generadas a partir del análisis del informe de resultados de algún programa de evaluación externa de la calidad en uroanálisis en el que se haya participado (requisito N°3). Ningún laboratorio clínico manifiesta estar participando actualmente en algún programa de evaluación externa de la calidad en uroanálisis, en el que se evalúen algún(nos) o todos los parámetros del uroanálisis (requisito N°4 y 5).

De lo anterior se desprende, tal y como se muestra en el gráfico N°1, que entre el 79% y 95% de los laboratorios clínicos, no cumplen ningún requisito para el control de calidad interno y externo del uroanálisis, de acuerdo con la “Norma ISO 15189. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia” (15) y las guías “Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens” (12) del CLSI y “European Urinalysis Guidelines” (13), de la ECLM, respectivamente. Adicionalmente, en relación al

cumplimiento observamos que, la mayoría de los laboratorios clínicos que implementan algún tipo de control de calidad interno en el examen simple de orina, cumplen con muy pocos requisitos de los previstos en las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM. En segundo lugar, que la mayoría de los laboratorios clínicos que implementan algún tipo de control de calidad interno en el examen simple de orina, cumplen pocos requisitos para el control del análisis del aspecto y el color y los parámetros físico-químicos y ninguno para el análisis de los elementos formes de las muestras parciales de orina. Y en tercer lugar que, el requisito más cumplido por todos los laboratorios clínicos que cumplen algún(nos) requisito(s) para el control de calidad interno en el análisis físico, químico y forme de las muestras parciales de orina, es el registro de los resultados del análisis de las soluciones control (requisito N°7), mientras que la revisión periódica de las acciones correctivas y preventivas tomadas (requisito N°11) y la existencia de un cronograma para la revisión de las acciones correctivas y preventivas tomadas (requisitos N°12), son los requisitos que no cumplen ninguno de los laboratorios clínicos que implementan algún tipo de control de calidad interno en el uroanálisis.

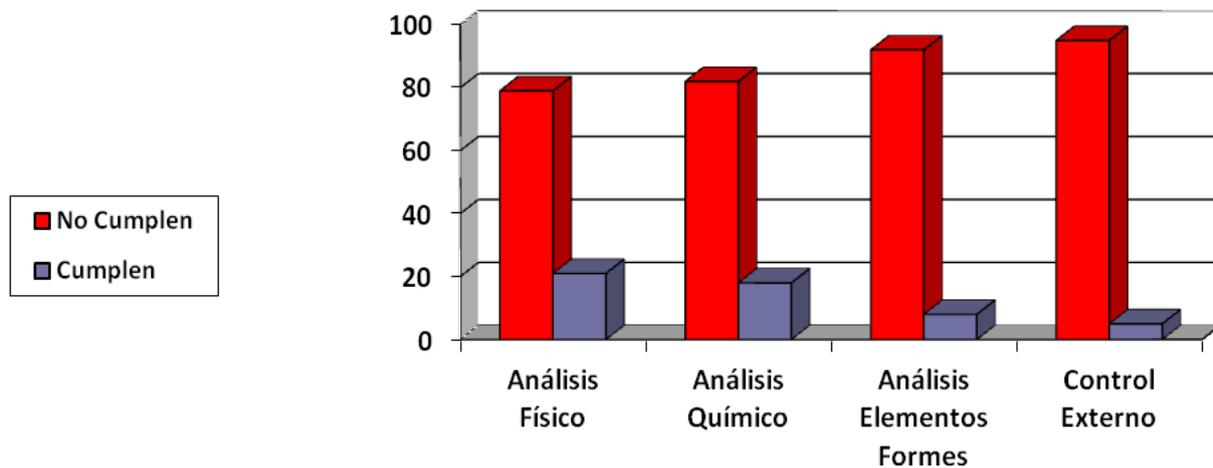


GRÁFICO N° 1. Porcentaje de laboratorios clínicos que cumplen algún requisito o no cumplen ningún requisito para el control de calidad interno y externo en el análisis físico, químico y de elementos formes de las muestras parciales de orina.

Fuente: Los investigadores

En relación a lo evidenciado en nuestro estudio, se desconocen las razones exactas por las que la gran mayoría de los laboratorios clínicos no cumplen con ninguno o cumplen con muy pocos requisitos para asegurar la calidad del uroanálisis de acuerdo con la ISO, CLSI y ECLM. Sin embargo, se considera que entre las principales razones se encuentran, en primer lugar, lo referido por Morales, J; y Col. (2012), en relación a que los servicios de laboratorio tienen bajo interés en el uroanálisis (16), lo que al parecer, les conduce a desestimar la importancia y pertinencia de implementar sistemas de control de calidad interno y externo en el examen simple de orina y por ende, a no gestionar eficientemente los recursos (humanos, medio ambiente, maquinas, materiales y métodos), para alcanzar su apropiado aseguramiento de la calidad. En segundo lugar y como consecuencia de lo primero, se considera al igual que Sierra, R; (2010), que muchos laboratorios clínicos no cuenta con la estructura organizativa ni la competencia técnica (formación, habilidades y experiencia), para implementar sistemas de control de calidad interno y externo que permita asegurar la calidad de sus prestaciones analíticas (17). Se piensa, que la mayoría de los laboratorios clínicos no cumplen con lo indicado en los apartados 5.1.1, 5.1.5, 5.1.6, 5.1.9 y 5.1.11 de la "Norma ISO 15189. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia", referidos a la existencia de una estructura organizativa y recursos humanos con formación continua y competencia técnica para desempeñar tareas asignadas de acuerdo a su formación incluyendo el aseguramiento y gestión de la calidad en los servicios ofrecidos (15). Se considera, que debido a la falta de estructura organizativa y competencia técnica, los laboratorios clínicos están imposibilitados para diseñar e implementar sistemas de aseguramiento de la calidad, y a cambio de ello, continúan realizando el uroanálisis de forma tradicional, sin estandarización y cumpliendo muy pocos o ningún requisito para el control de calidad en el análisis del físico-químico y forme de las muestras parciales de orina, respectivamente. Se cree, que en los laboratorios clínicos el recurso humano por falta de formación continua y competencia técnica en el aseguramiento y gestión de la calidad del uroanálisis; desconoce la gran mayoría de los requisitos que debe cumplir, y además desconoce qué y cómo debe hacer para cumplir aquellos que sí conoce. Una prueba de ello, es que sólo una minoría de los participantes alcanza a cumplir sólo con requisitos comunes y de más fácil implementación como el registro de los resultados del análisis de las soluciones control (requisito N°7),

y casi nunca cumple con requisitos menos corrientes y más complejos relacionados a la estandarización, documentación, registros y la mejora continua para el aseguramiento de la calidad del uroanálisis entre ellos la normalización y documentación de criterios para la aceptación y rechazo de los resultados de las muestras control (requisito N°5), la normalización y documentación de las acciones correctivas y preventivas a seguir en presencia de una potencial o patente no conformidad en los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°6), el registro de las acciones correctivas y preventivas tomadas en caso de no conformidades potenciales o patentes en los resultados del análisis de las muestras control (requisito N°10), revisión periódica de las acciones correctivas y preventivas tomadas (requisito N°11) y contar con un cronograma para la revisión de las acciones correctivas y preventivas tomadas (requisito N°12).

En tercer lugar y último lugar, se considera que el déficit y difícil acceso a los recursos materiales, es otra de las principales razones por la que los laboratorios clínicos, y en especial los privados particulares y públicos ubicados en hospitales, clínicas populares y ambulatorios, cumplen con pocos o ningún requisito para el control de calidad interno y externo del uroanálisis, sobre todo aquellos referidos al empleo de soluciones controles de nivel normal o anormal para el control de la calidad interno del examen simple de orina (requisito N°1) y si ha participado (requisito N°1) o participa actualmente en algún programa de evaluación externa de la calidad en uroanálisis (requisito N°4). En relación a esto, al igual que lo referido por Salha, J; y Col. (2007), De Mária y Campos, V. (2008) y Díaz (2011), se considera que los elevados costos y la escasa disponibilidad de los materiales controles y programas de evaluación externa de calidad, son unas de las principales razones por las cuales los laboratorios clínicos no llevan a cabo un adecuado control de calidad interno en el análisis físico, químico y forme de las muestras parciales de orina así como tampoco participan de forma activa y continuada en programas de evaluación externa de la calidad en uroanálisis, respectivamente. (18,19,20).

De acuerdo con Salha y Col. (2007), el uroanálisis realizado en el laboratorio clínico, requiere del uso rutinario de soluciones controles que permitan monitorear todo el proceso de medición y garantizar resultados precisos y confiables. Los elevados costos de los controles es el principal factor que dificulta la implementación de un control de calidad interno, que a su vez, le impide a los laboratorios clínicos participar

en programas de evaluación externa de la calidad (18). En relación al tema de los costos de las soluciones controles, al igual que De Mária y Campos Otegui, V. (2008), se sabe que en la bibliografía que aborda este tema, se pueden encontrar referencias que tocan dos aspectos fundamentales para la resolución parcial de éste problema. El primero de ellos, es la frecuencia en que se debe practicar la medición del material control. Al respecto, los lineamientos de la NCCLS (ahora CLSI), en "Provider-Performed Microscopy Testing; Approved Guideline HS2-A, 2003" (21), recomiendan se practique según la productividad del laboratorio clínico, en éste sentido, se aconseja que en un laboratorio clínico que se consuma un frasco de tiras reactivas por mes, se mida la orina control una vez por semana, en un laboratorio clínico que se consuma más de un frasco por semana, se mida una vez al día y en un laboratorio clínico que se consuma varios frascos por día, se mida la orina control en sus dos niveles una vez por cada frasco. El segundo aspecto relacionado al tema de los costos de los controles de orina, está referido al manejo del material control. Al respecto, se proponen algunas opciones que incluyen optimizar el volumen de orina control, dividiéndolo en alícuotas y utilizar cada una un máximo de tres (3) días (19). Adicionalmente, al igual que lo referido por Fernández, D (2014); se considera que además de la opción de los controles de orina de origen comercial, es posible que los laboratorios clínicos elaboren soluciones controles que cumplan con los requisitos de la NCCL (Ahora CLSI) "Internal Quality Control Testing: Principles & Definition. C24-A, 1991" (22), y de esa forma puedan controlar el análisis de orina de una manera más económica sin dejar de lado el cumplimiento de los requisitos para el aseguramiento de la calidad en el uroanálisis y la confiabilidad de sus resultados (23).

Conclusiones

Este estudio permitió evidenciar que entre el 79% y 95% de los laboratorios clínicos, no cumplen ningún requisito para el control de calidad interno y externo del uroanálisis, mientras que la minoría que refiere implementar algún tipo de control de calidad en el examen simple de orina, cumplen con muy pocos requisitos de los previstos en las normas y recomendaciones de la ISO, CLSI y ECLM. Se considera que el bajo interés en el uroanálisis, la falta de estructura organizativa y competencia técnica para la gestión de la calidad del examen simple de orina así como los elevados costos y escasa disponibilidad de los materiales controles y programas de evaluación externa

de la calidad en uroanálisis, son las principales razones que impiden a los laboratorios clínicos del Distrito Metropolitano de Caracas asegurar la calidad de los resultados del uroanálisis según los requisitos de la ISO, CLSI y ECLM.

Referencias

- Hernández C. Guía de Uroanálisis. Cátedra de Bioquímica "B", Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela. Caracas 2005, 87p.
- Graff LS. Análisis de Orina. 2da edición. Editorial Panamericana. México 1987, pp19-68.
- Kaplan A, Pesce A. Química Clínica. Técnicas de Laboratorio-Fisiopatología-Métodos de Análisis. 2da Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 1990, pp.1011-1056.
- Strasinger Susan y Schaub Di Marjorie. Urinalysis and Body Fluids. 4ta edición. Davis Company. Florida 2008, pp. 29-138
- Fisbach T. Manual de Pruebas Diagnósticas. 5ª Edición. Editorial MCgrawhill Interamericana. México 1997, pp. 328-415.
- Schumann B, Schweitzer C. Estudio de la orina. Primera edición. Bernard J. En: Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Masson Salvat Médica; España 1993, pp. 399-430.
- Bernard J, Traete G. Diagnóstico y tratamiento por el laboratorio. 9na Edición Salvat. España 1998, pp. 471-477.
- López A. Garantía de Calidad Hematológica. Trabajo de Ascenso. Caracas. Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, 1994. 139p.
- Fernández C. El aseguramiento de la calidad en el laboratorio clínico. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1999;33(1):49- 67.
- Boquet E, Castillo M, Cáceres A, Dybkaer R, Escutia V, Franzini C, et al. Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina. Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica. Editorial Panamericana. México 1996, 314 p.
- Dharán, M. Control de Calidad en los Laboratorios Clínicos. Primera edición. Editorial Reverte S.A. Barcelona 1983, 12 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens. Approved Guideline Third Edition, Wayne, Pennsylvania, USA 2009, 40 p. Disponible en: <http://www.clsi.org/>. [Consultado en: marzo 2016]
- European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM). European Urinalysis Guidelines. Scand J Clin Lab Invest 2000;60:1-96
- Gómez V, Jiménez C, Sánchez M, Vivar N. Evaluación del Control de Calidad Interno en el Sistema Automatizado UF-100, Sistema Kova y Método Manual. Bioquímica 2007;32(A):81
- Laboratorios Clínicos. Requisitos Particulares para la

- Calidad y la Competencia. Norma FONDONORMA-ISO 15189:2007.
16. Morales J, Borrón H. Uroanálisis en pacientes pediátricos de tres hospitales de Lima. *An Fac Med* 2012;73(3):227-231.
 17. Sierra Rosa. La educación: Pilar de la Calidad del Laboratorio. En: 5 ciclo internacional de conferencias de la calidad. "Reunión de expertos". Cancún 2010. QCNet.com [en línea]. [Fecha de acceso 16 de Mayo de 2013]. Disponible en: <http://www.qcnet.com/.../Cancun-Group3-%20La%20educación,%20pilar%20...> [Consultado en: febrero 2016]
 18. Salha J, Salazar M, Medina M. Reproducibilidad y variabilidad de los controles Liquichek Urinalysis Control (BIO RAD) al evaluar volúmenes diferentes. *Bioquímica* 2007;32(2):49-57.
 19. De María y Campos V. Control de Calidad en el Uroanálisis. *Bio Rad Control* 2008;4(12):2-5.
 20. Díaz L. Propuesta de Programa de Evaluación Externa de la Calidad en Hematología para la determinación de Hemoglobina en los Laboratorios Clínicos. Tesis de Maestría en Sistemas de la Calidad. Caracas. Universidad Católica Andrés Bello, 2011.118p.
 21. Clinical Laboratory Standards Instituto. Provider-Performed Microscopy Testing; Approved Guideline HS2-A. Second Edition, Wayne, Pennsylvania, USA 2011. 89 p.
 22. Clinical Laboratory Standards Institute. Internal Quality Control Testing: Principles & Definition; Approved Guideline C24-A. Third Edition, Wayne, Pennsylvania, USA 1991. 31 p.
 23. Fernández D, Chiazza S, Veyretou F, González L, Romero M. Análisis de orina: estandarización y control de calidad. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2014;48 (2):213-221.

ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS EN EMBARAZO NORMAL A TÉRMINO Y ABORTO ESPONTÁNEO RECURRENTE

Sarah Bethencourt¹, Robert Tovar², Francisco Mendoza², Loida Ponce², Julie Verzura², José Corado², Sioly de Orta²

¹ Escuela de Bioanálisis, ² Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas.
Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

Recibido para publicación el 2 de febrero 2016. Aprobado para publicación el 29 de abril 2017.

RESUMEN:

Los anticuerpos antifosfolípidos son una familia heterogénea de inmunoglobulinas que se unen a los fosfolípidos, cargados negativamente, presentes en las membranas celulares. Los anticuerpos anticardiolipinas y los anticoagulantes lúpicos, principales representantes de esta familia de autoanticuerpos, están siendo relacionados con complicaciones obstétricas, principalmente abortos a repetición. Se determinó la significación clínico biológica de estos autoanticuerpos en una muestra conformada por 45 mujeres con embarazo normal y 35 con más de 2 abortos a repetición, para ello se determinaron en sangre periférica IgM e IgG anticardiolipinas (ACA) y antiβ2glicoproteína con el método de ELISA. Los resultados muestran que 11,1% de las mujeres con embarazo normal fueron positivas para IgM ACA, mientras que en las pacientes con aborto a repetición el porcentaje de positividad fue de 23%. En cuanto a la IgG ACA se obtuvo 15% de positividad en las mujeres con embarazo normal vs 57% en las pacientes con aborto a repetición ($p < 0,001$). En el caso de la IgM anti β2 glicoproteína se encontró una positividad de 1% en las mujeres con embarazo normal vs 43% en las pacientes con aborto a repetición ($p < 0,001$), la positividad de la IgG anti anti β2 glicoproteína fue de 20% en las mujeres con embarazo normal y de 9% en pacientes con aborto a repetición. Se concluye que IgG ACA e IgM anti β2 glicoproteína se encontraron asociadas a problemas obstétricos.

Palabras claves: Anticuerpos anticardiolipinas, anticuerpos anti β2 glicoproteína, embarazo, aborto recurrente.

ANTI PHOSPHOLIPID ANTIBODIES IN NORMAL PREGNANCY AND SPONTANEOUS ABORTIONS TO REPETITION

SUMMARY

Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous family of immunoglobulin that interact with negatively charged phospholipids present in cellular membranes. The main representatives of antiphospholipid family of autoantibodies are anticardiolipin and lupus's anticoagulant antibodies, both of them have been implicated in obstetrical complications, mainly in spontaneous abortions to repetition. In this work, the incidence of serum autoantibodies in a shaped sample

45 women with normal pregnancies and 35 women with more than 2 abortions to repetition was determined. IgM and IgG isotypes anticardiolipins antibodies (ACA) and anti beta2glycoprotein I (antiβ2GPI) were measured using the ELISA technique. Our results show that 11.1% of women with normal pregnancies were positive for IgM ACA, whereas 23% of women with spontaneous abortions to repetition were positive for the same isotype. IgG ACA was found positive in 15% of women with normal pregnancies against 57% in women with abortions ($p < 0,01$). IgM antiβ2GPI isotype was positive in 1% of women with normal pregnancies against 43% of women with abortions to repetition ($p < 0,001$), IgG antiβ2GPI was found positive in 20% of women with normal pregnancies and in 9% of women with abortions. These results suggest that IgG ACA and IgM antiβ2GPI may play a role in the induction of spontaneous abortions to repetition.

Keywords: Anticardiolipin antibodies, anti β2 glycoprotein antibodies, pregnancy, recurrent abortion.

Introducción

Los mecanismos fisiológicos, tanto sistémicos como locales en el útero, que se producen durante el embarazo son regulados por interacciones entre hormonas esteroideas, péptidos y componentes del sistema inmunitario (SI); este conjunto de metabolitos actúa de manera sincronizada en la preparación del endometrio

y la placenta para garantizar el desarrollo fetal (1). El embarazo es un alotrasplante de 40 semanas de duración, en un organismo inmunocompetente, cuya evolución fisiológica o patológica está íntimamente ligada al desarrollo de la placenta o interfase materno-fetal (2,3,4).

Una complicación frecuente en el embarazo es el

Solicitar copia a: Sarah Bethencourt, sbethenc@uc.edu.ve

aborto espontáneo recurrente, definido como tres o más pérdidas espontáneas antes de las 20 semanas de gestación, sus causas se atribuyen a infecciones, alteraciones en las estructuras anatómicas, factores genéticos y hormonales, y trastornos del sistema inmunitario. Aproximadamente 80% de los abortos espontáneos, son de causa desconocida; sin embargo, cada día cobran más importancia las alteraciones del sistema inmunitario como posibles desencadenantes, ya que al ser el feto un trasplante semi alogénico es indispensable que este sistema desarrolle mecanismos de adaptación que permitan la tolerancia fetal, si esto no ocurre el riesgo de pérdida del embarazo es elevado (5,6). Entre las causas de origen inmunológico más frecuentemente invocadas se incluye la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aAF) y el desarrollo del síndrome antifosfolípido (SAF) (7,8,9).

Los aAF son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos (IgM, IgG o IGA), cargados negativamente, que reconocen diversas moléculas entre las que se incluyen β 2 glicoproteína I, protrombina, proteína C activada, activador del plasminógeno tisular, plasmina, anexina II y cardiolipina de la membrana mitocondrial. Esta familia de autoanticuerpos está conformada por el anticoagulante lúpico (LAC) que se estudia usando una técnica funcional de coagulación, y los anticuerpos anticardiolipina (ACA) y anti (anti- β 2 GPI), detectados mediante ELISA (10,11). Los anticuerpos antifosfolípidos pueden estar presentes en 1-5 % de la población general, aunque el SAF tiene una prevalencia menor de 0,5 %, con una relación mujer:hombre de 5:1 (12,13).

En general, el Síndrome antifosfolípido puede desarrollarse en la infancia o en la vida adulta, en ambos sexos, y es una entidad clínica caracterizada por la presencia en el suero de títulos elevados de anticuerpos antifosfolípidos, asociada con uno o más eventos de trombosis arterial o venosa, y trombocitopenia. Este tipo de desorden autoinmune, puede ser primario, y aislado, o secundario asociado a otros trastornos del sistema inmunitario tales como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), el Síndrome de Sjögren, la Artritis Reumatoide, las Vasculitis y la Esclerosis Sistémica Progresiva (14,15,16). El SAF obstétrico, en particular, se caracteriza por criterios biológicos, dados por la presencia de los anticuerpos antifosfolípidos, y criterios clínicos del tipo de infertilidad, abortos recurrentes, retardo en el crecimiento intrauterino, preeclampsia y síndrome de HELLP. El diagnóstico de SAF obstétrico requiere que la paciente presente al menos un (1) criterio

biológico y un (1) clínico (17,18).

A pesar de que se han reportado numerosos estudios sobre anticuerpos antifosfolípidos y síndrome antifosfolípido, en relación con los trastornos de la fertilidad y el desarrollo del embarazo, en particular con el aborto espontáneo recurrente (19,20), no hay respuestas concluyentes en cuanto al papel que en forma directa ejercen estos anticuerpos en la infertilidad, implantación o morbilidad durante la gestación; lo que si esta claro es que su acción en estos procesos es controversial, y, por tanto, se recomienda evitar procedimientos de fertilización in vitro, en pacientes con historia de positividad para anticuerpos antifosfolípidos y fallas en la implantación (21,22,23). La escasa literatura al respecto en nuestro medio nos animó a efectuar el presente trabajo.

Materiales y Métodos

Recolección de la muestra y procesamiento

Previo consentimiento informado, se obtuvieron muestras de sangre, mediante venopunción de la región flexora del codo, de 45 mujeres con embarazo normal a término (ENAT), sin historia de abortos, y 35 mujeres que presentaron abortos espontáneos recurrentes (EAR), que asistieron a la consulta de Ginecología y Obstetricia de la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera (CHET). Los criterios de inclusión establecidos para todas las pacientes tanto ENAT y EAR eran: no presentar manifestaciones clínicas previas o actuales de enfermedad autoinmune de base, ser normotensas, no cardiópatas. En cuanto a las pacientes con abortos se estableció como criterio de inclusión el haber sufrido más de 2 abortos espontáneos a repetición de menos de 22 de semanas de gestación. Las muestras fueron colocadas en tubos siliconados, sin anticoagulante, y llevadas baño de María a 37 °C, durante 10 minutos, para favorecer la retracción del coágulo. Posteriormente fueron centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos para obtener el suero; el cual fue alicuotado en criotubos estériles y conservado a -70°C en un Revco hasta su procesamiento.

Determinación de IgM e IgG anticardiolipinas y anti β 2 glicoproteína 1

Las concentraciones de los anticuerpos IgM e IgG anticardiolipina y anti β 2 glicoproteína I, se determinaron mediante la técnica de inmunoensayo enzimático de fase sólida (ELISA), Inmuco Diagnóstico. Las muestras de suero, previamente diluidas 1/100, fueron incubadas

en los micropozos sensibilizados, respectivamente, con los antígenos cardiolipina o $\beta 2$ glicoproteína I, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial se practicaron 3 lavados con solución provista por la casa comercial para este propósito. Para la detección de los anticuerpos unidos a la microplaca se usaron anticuerpos, policlonales, anti IgM e IgG humanos conjugados a la enzima peroxidasa de rábano, los cuales se ponen de manifiesto al agregar el sustrato específico TMB, produciéndose una reacción colorimétrica, cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de los anticuerpos presentes en las muestras. La reacción enzimática se detiene agregando ácido sulfúrico y se determina la densidad óptica de cada pozo por espectrofotometría a 405 nm con un filtro diferencial de 630nm, en un lector de ELISA. Se efectuó curva de calibración y los controles positivo y negativo, todas las muestras se procesaron por duplicado.

Los resultados tanto de las ACA IgG e IgM como de la anti $\beta 2$ GPL I fueron expresados según la clasificación de Harris en unidades GPL (IgG) y MPL (IgM), donde cada unidad GPL o MPL corresponde a una U/mL en la curva de calibración. Las diferencias en la expresión de los resultados estriba en los puntos de corte, considerándose positivos para las IgG ACA resultados > 19 GPL y para las IgM ACA > 10 MPL, mientras que, para la anti $\beta 2$ GPL I (IgG e IgM) valores > 25 GPL y MPL, respectivamente.

Los datos obtenidos en las poblaciones estudiadas, fueron reportados bajo la forma de porcentajes de positividad, se aplicó la t de Student para comparar las medias de los grupos en estudio, y la prueba Z para determinar si había correlación entre las variables, cualquier valor de $p < 0,05$, fue considerado significativo.

Resultados

Niveles séricos de IgM e IgG anticardiolipinas (ACA) y anti $\beta 2$ glicoproteína I (anti $\beta 2$ GPL I)

En el gráfico 1 se muestra las medias aritméticas y desviaciones estándar de los valores séricos de los isotipos IgM e IgG ACA, en mujeres con embarazos normales (ENAT) y en mujeres con abortos espontáneos a repetición (EAR). Observándose que los niveles séricos de IgG ACA son más elevados ($30,17 \pm 27,89$) en el grupo de mujeres con abortos espontáneos a repetición que los niveles de IgM ACA ($8,41 \pm 2,13$), con una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$). En las mujeres con embarazos normales los niveles séricos

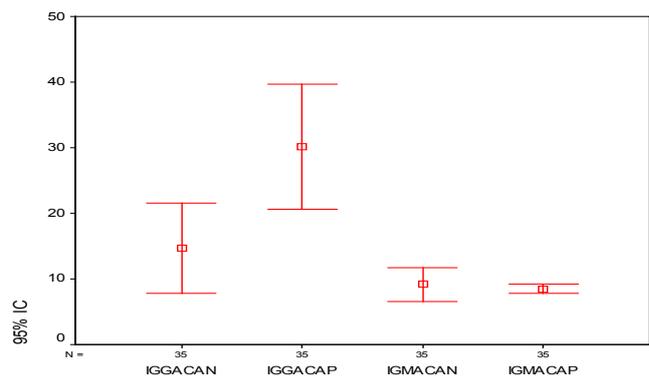


Gráfico 1. Niveles séricos de IgG/IgM de Anticuerpos anticardiolipina (ACA) en pacientes con embarazos normales a término (N) y en pacientes con abortos (P).

de IgG ACA ($14,14 \pm 19,88$) e IgM ACA ($8,80 \pm 6,70$) no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En el gráfico 2 se muestran las medias aritméticas y desviación estándar de los valores de IgM e IgG anti $\beta 2$ GPI, en ambos grupos de estudio. En las mujeres con abortos espontáneos a repetición se observa que los valores ($5,81 \pm 4,13$) de IgG anti $\beta 2$ GPI son menores que los de IgM anti $\beta 2$ GPI ($19,03 \pm 10,54$), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). En las mujeres con embarazos normales los niveles séricos de IgG anti $\beta 2$ GPI ($16,54 \pm 18,71$) e IgM anti $\beta 2$ GPI ($4,83 \pm 1,64$) no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

En el gráfico 3 se observa el % de positividad de los niveles séricos de ACA IgM (11,1%) e IgG (37,8%) en

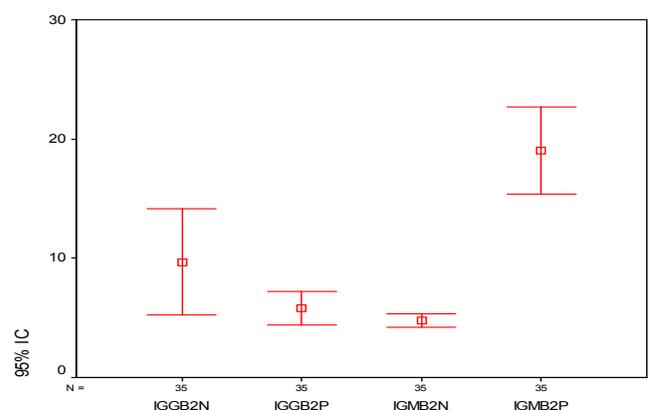
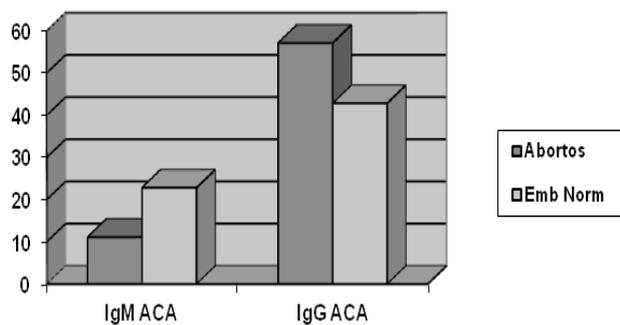


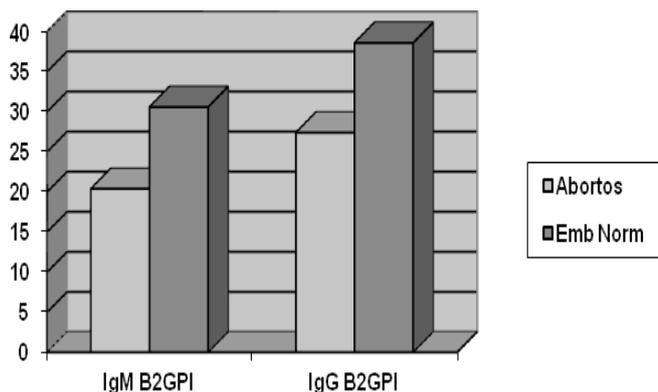
Gráfico 2. Niveles séricos de IgM/IgG de Anticuerpo Anti $\beta 2$ glicoproteína I en pacientes con embarazos normales a término (N) y en pacientes con abortos (P).



IgM ACA Emb Normales Vs IgM ACA Abortos $p > 0,05$
 IgG ACA Emb Normales Vs IgG ACA Abortos $p < 0,01$
 (Pruebas estadísticas utilizadas, prueba Z y Chi cuadrado)

Gráfico 3. Isotipos IgM/IgG de Anticuerpos Anticardiolipina entre mujeres con Embarazos normales y mujeres con abortos.

las pacientes con ENAT, así como, los de ACA IgM (22,8%) e IgG (57,1%) en las mujeres con AER, al comparar dichos porcentajes se encontró una diferencia significativa ($p < 0,01$). Se muestran los porcentajes de positividad (IgG vs IgM) en el grupo de pacientes con AER, evidenciándose una asociación altamente significativa con una $p < 0,001$, del isotipo IgG con AER. En el gráfico 4 se muestra el % de positividad de los niveles séricos de B2 glicoproteína 1 IgM (4,5%) e IgG (24,4%) en las pacientes con ENAT, así como, los de B2



IgM $\beta 2$ GPI Embarazos Normales Vs IgM $\beta 2$ GPI abortos $p < 0,05$
 IgG $\beta 2$ GPI Embarazos Normales Vs IgG $\beta 2$ GPI abortos $p > 0,05$
 (Pruebas estadísticas utilizadas, prueba Z y Chi cuadrado)

Gráfico 4. Isotipos IgM/IgG de Anticuerpos Anti $\beta 2$ Glicoproteína I en mujeres con embarazos normales y en mujeres con abortos.

glicoproteína 1 IgM (42,9%) e IgG (8,6%) en las mujeres con AER, al comparar dichos porcentajes se encontró una diferencia significativa ($p < 0,01$). Al investigar la correlación de los porcentajes de positividad del isotipo IgM, en ambos grupos, se encontró una asociación significativa ($p < 0,05$) entre dicho isotipo y AER, tal como se observa en este gráfico.

Discusión

Se ha estimado que la prevalencia de aAF es de aproximadamente 5% en la población general, mientras que la del SAF es de 0,5%. Cuando se trata de mujeres multíparas la prevalencia de los aAF puede alcanzar hasta 15%. Investigaciones previas (24,25,26,27,28) reportan una gran variabilidad para estos dos isotipos en los grupos objeto de estudio. Por el contrario, resultados discrepantes con los obtenidos en esta investigación encontraron que el isotipo IgM ACA estuvo presente en aproximadamente el 75% de los casos de abortos. (29,30,31)

Se determinó anticuerpos contra la $\beta 2$ glicoproteína I la cual se comporta como un antígeno proteico que se encuentra asociado con frecuencia a la cardiolipina. Se observa que los porcentajes de positividad son mayores en el isotipo IgG anti $\beta 2$ glicoproteína I en las mujeres con embarazos normales que en las mujeres con abortos (24,4% vs. 8,6%) aun cuando no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$) (17,19,24,32). Con respecto al isotipo IgM de la anti $\beta 2$ glicoproteína I se observa un porcentaje mayor de positividad en las pacientes con abortos con respecto a las pacientes con embarazos normales (49,9% vs. 4,5%) encontrándose una asociación significativa entre los niveles de IgM anti $\beta 2$ glicoproteína I y abortos, sin embargo, aun cuando los niveles séricos del isotipo IgM obtenidos fueron mayores que los del isotipo IgG no se encontraron diferencias estadísticamente significativas asociadas a este hallazgo. ($p > 0,05$) (33,34,35).

En otras investigaciones se observan resultados similares aun cuando los porcentajes de positividad encontrados son superiores a los encontrados en este estudio. (18,23,36) Al analizar los resultados de los niveles séricos de anticuerpos IgM/IgG Anti cardiolipina y anti $\beta 2$ glicoproteína I se puede concluir, que el isotipo IgG de ACA presenta niveles mayores que el isotipo M en las mujeres con embarazos normales aun cuando esto no arroje una diferencia significativa, el isotipo IgM de la anti $\beta 2$ glicoproteína I se observó en menor % de positividad en los embarazos normales que el isotipo G aun cuando no tuvo ninguna significación. Se encontró una

asociación significativa entre IgG ACA y la IgM anti β 2 glicoproteína I con los abortos, aunque una parte de la población estudiada que, a pesar de tener niveles positivos para estos anticuerpos, no manifestaron complicaciones obstétricas, lo que se explica por la heterogeneidad antigénica y de efecto que presentan estos anticuerpos. (11,26,32,23)

Los objetivos del presente estudio se basaron en establecer los niveles séricos de los isotipos IgM/IgG de anticuerpos anticardiolipinas aCL y anticuerpos anti β 2 glicoproteína I, en pacientes con embarazos normales a término y en pacientes que presentaban abortos recurrentes a repetición. Los aCL y a β 2-GPI se determinan por inmunoensayos, representando sus niveles en suero, la medida inmunológica de la reactividad frente a un fosfolípido o una proteína de unión al fosfolípido (cardiolipina y β 2-GPI, respectivamente). En general, la especificidad de aCL para APS aumenta con título y es mayor para la IgG que para el IgM e IgA de isotipo. No existe ninguna asociación definitiva entre la clínica específica manifestaciones y subgrupos particulares de la APL. Por lo tanto, múltiples pruebas para AAF se deben utilizar, ya que los pacientes pueden ser seronegativos para un tipo de anticuerpo y de acuerdo con otro isotipo arrojar una prueba positiva.

Referencias

- Li M, Schwerbrock NM, Lenhart PM, Fritz-Six KL, Kadmiel M, Christine KS, et al. Fetal-derived adrenomedullin mediates the innate immune milieu of the placenta. *J Clin Invest* 2013;123(6):2408-2420.
- Piccinni MP. T cell tolerance towards the fetal allograft. *J Reprod Immunol* 2010;85(1):71-75.
- Zenclussen ML, Thuere C, Ahmad N, Wafula PO, Fest S, Teles A, et al. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(3):200-208.
- El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, Parant O, et al. Critical and Differential Roles of NKp46- and NKp30-Activating Receptors Expressed by Uterine NK Cells in Early Pregnancy. *J Immunol* 2008;181:3009-3017.
- Santner-Nanan B, Straubinger K, Hsu P, Parnell G, Tang B, Xu B, et al. Fetal-maternal alignment of regulatory T cells correlates with IL-10 and Bcl-2 upregulation in pregnancy. *J Immunol* 2013;191(1):145-153.
- Ernest JM, Marshburn PB, Kutteh WH. Obstetric antiphospholipid syndrome: an update on pathophysiology and management. *Semin Reprod Med* 2011;29(6):522-539.
- Sanguanserm Sri D, Pongcharoen S. Pregnancy Immunology: Decidual Immune Cells. *Asian Pac J Allergy* 2008;26:171-181.
- Marchetti T, Cohen M, Gris J, Moerloose P. Diagnosis and management of obstetrical antiphospholipid syndrome: where do we stand? *Pol Arch Med Wewn* 2013;123(12):713-720.
- Andreoli L, Fredi M, Nalli C, Piantoni S, Reggia R, Dall'Ara F, et al. Clinical Significance of IgA Anti-Cardiolipin and IgA Anti- β 2Glycoprotein I Antibodies. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15(7):343. doi: 10.1007/s11926-013-0343-1.
- Rawat A, Sikka M, Rusia U, Guleria K. Lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies in Indian women with spontaneous, recurrent fetal loss. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2015;31(2):281-285.
- Kutteh WH1, Hinote CD2. Antiphospholipid Antibody Syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2014;41(1):113-132.
- Otomo K, Atsumi T. The significance of antiphospholipid antibodies tests. *Jpn J Clin Immunol* 2013;36(2):63-70.
- Ruffatti A, Calligaro A, Hoxha A, et al. Laboratory and clinical features of pregnant women with antiphospholipid syndrome and neonatal outcome. *Arthritis Care Res* 2010;62(3):302-307.
- Andreoli L, Chighizola CB, Banzato A, Pons-Estel GJ, de Jesús GR, Erkan D, et al. On behalf of APS ACTION. The estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis. *Arthritis Care Res* 2013;65(11):1869-1873
- Kwak-Kim J, Agcaoili MS, Aleta L, Liao A, Ota K, Dambaeva Set, et al. Management of women with recurrent pregnancy losses and antiphospholipid antibody syndrome. *Am J Reprod Immunol* 2013;69(6):596-607. doi: 10.1111/aji.12114
- Marchetti T, Cohen M, and de Moerloose P. Obstetrical Antiphospholipid Syndrome: From the Pathogenesis to the Clinical and Therapeutic Implications. *Clinical and Developmental Immunology* 2013;159124. doi: 10.1155/2013/159124.
- Derksen RH and de Groot PG. The obstetric antiphospholipid syndrome. *J Reprod Immunol* 2008;77(1):41-50.
- Ravelli A and Martini A. Antiphospholipid Syndrome in Pediatrics. *Rheum Dis Clin N Am* 2007;33:499-523
- Sweiss NJ, Bo R, Kapadia R, Manst D, Mahmood F, Adhikari T, et al. IgA anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies are associated with an increased risk of thromboembolic events in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2010;19;5(8):e12280. doi.org/10.1371/journal.pone.0012280
- Willis R, Pierangeli SS. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1285(1):44-58.
- Luma HN, Doualla MS, Temfack E, Bagnaka SA, Mankaa EW, Fofung D. The antiphospholipid antibody syndrome: a case report. *Int Med Case Rep J* 2012;5;5:63-67.
- Mekinian A, Loire-Berson P, Nicaise-Roland P,

- Lachassinne E, Stirnemann J, Boffa MC, et al. Outcomes and treatment of obstetrical antiphospholipid syndrome in women with low antiphospholipid antibody levels. *J Reprod Immunol* 2012;94(2):222-226. doi.org/10.1016/j.jri.2012.02.004
23. Chauleur C, Galanaud JP, Alonso S, Cochery-Nouvellon E, Balducci JP, Marés P, et al. Observational study of pregnant women with a previous spontaneous abortion before the 10th gestation week with and without antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2010;8(4):699-706.
 24. Alijotas-Reig J, Casellas-Caro M, Ferrer-Oliveras R, Llurba-Olive E, Hermosilla E, Vilardell-Tarrés M. Are anti-beta-glycoprotein-I antibodies markers for recurrent pregnancy loss in lupus anticoagulant/ anticardiolipin seronegative women? *Am J Reprod Immunol* 2008;60(3):229-237.
 25. Devreese KM. Antiphospholipid antibodies: evaluation of the thrombotic risk. *Thromb Res* 2012;130 Suppl 1:S37-40.
 26. Abrahams VM. Mechanisms of antiphospholipid antibody-associated pregnancy complications. *Thromb Res* 2009;124(5):521-525.
 27. Ernest JM, Marshburn PB, Kutteh WH. Obstetric antiphospholipid syndrome: an update on pathophysiology and management. *Semin Reprod Med* 2011;29(6):522-539.
 28. Alessandri C, Conti F, Pendolino M, Mancini R, Valesini G. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2011;10(10):609-616. doi: 10.1016/j.autrev.2011.04.011.
 29. Tincani A, Casu C, Cartella S, Ziglioli T, Cattaneo R. Antiphospholipid antibody: laboratory, pathogenesis and clinical manifestations. *Reumatismo* 2010;62(1):65-75.
 30. Pengo V, Banzato A, Bison E, Denas G, Padayattil Jose S, Ruffatti A. Antiphospholipid syndrome: critical analysis of the diagnostic path. *Lupus* 2010;19(4):428-431. doi: 10.1177/0961203309360543.
 31. Galli M. Clinical utility of laboratory tests used to identify antiphospholipid antibodies and to diagnose the antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2008;34(4):329-334. doi: 10.1055/s-0028-1085474.
 32. Liu XL, Xiao J, Zhu F. Anti- β 2 glycoprotein I antibodies and pregnancy outcome in antiphospholipid syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013;92(2):234-237. doi: 10.1111/aogs.12038. Epub.
 33. Galarza-Maldonado C, Kourilovitch MR, Pérez-Fernández OM, Gaybor M, Cordero C, Cabrera S, et al. Obstetric antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2012;11(4):288-295.
 34. Alijotas-Reig J, Palacio-Garcia C, Llurba E, Vilardell-Tarres M. Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. *Fertil Steril* 2013;99(2):441-449.
 35. De la Torre YM, Pregolato F, D'Amelio F, Grossi C, DiSomone N, Pasqualini F, et al. Anti-phospholipid induced murine fetal loss: novel protective effect of a peptide targeting the β 2 glycoprotein I phospholipid-binding site. Implications for human fetal loss. *J Autoimmun* 2012;38(2-3):J209-215.
 36. Visseaux B, Masliah-Planchon J, Fischer AM, Darnige L. Antiphospholipid syndrome diagnosis: an update. *Ann Biol Clin* 2011;69(4):411-418. doi: 10.1684/abc.2011.0592

BLASTOCYSTIS SPP.: ACTUALIZACIÓN EN MORFOLOGÍA, BIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO QUIMIOTERAPEÚTICO

Emilia E Barrios^{1,2}, Génesis Ochoa¹, Angel Castillo¹, Eva Velasquez³

¹Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP)/ ²Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional de la Escuela de Bioanálisis-Sede Carabobo. ³Departamento Clínico Integral de la Escuela de Bioanálisis-Sede Aragua. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo..

Recibido para publicación el 21 de mayo 2016. Aprobado para publicación el 30 de junio 2016.

RESUMEN:

Blastocystis spp. es un parásito humano perteneciente al Reino Cromista, con un controversial rol patógeno. Los criterios de patogenicidad de *Blastocystis* spp. son: la identificación de abundantes formas parasitarias con predominio de formas con cuerpo central grandes en las heces del paciente, ausencia de otras infecciones o patologías y desaparición de los síntomas después del tratamiento antiparasitario específico. El parásito es vehiculado en líquidos o alimentos por contaminación fecal-oral, además de las vías oral-genital u oral-anal. La sintomatología que ocasiona es variable (gastrointestinal, hepatoesplenomegalia, rash cutáneo y cefalea). En pacientes inmunosuprimidos y en algunos inmunocompetentes, la emisión de formas parasitarias aumenta y la sintomatología se agrava. El diagnóstico de *Blastocystis* spp. se realiza mediante la demostración del parásito en la heces del paciente, no obstante, para determinar el comportamiento patógeno, puede requerirse la cuantificación de la morfología parasitaria, determinación de enzimas claves del metabolismo del parásito, identificar la procedencia epidemiológica del parásito; así como la genotipificación basada en secuencias consenso del ADN del parásito. El tratamiento de pacientes infectados depende en principio de la persistencia de sintomatología junto a los criterios de patogenicidad. El agente quimioterapéutico de primera elección es el metronidazol, no obstante, son frecuentes las reinfecciones y variabilidad en la sensibilidad del parásito al fármaco, en cuyos casos, debe usarse la segunda línea de medicamentos (Nitazoxanida y Trimetropin-Sulfametoxazol). Todos los aspectos controversiales que envuelven a *Blastocystis* spp. solo pueden ser flanqueados a medida que aspectos de la biología, patogenia, patología e interacciones parásito-hospedador, sean esclarecidos.

Palabras claves: *Blastocystis* spp., biología, metronidazol, nitazoxanida, diagnóstico, patología.

BLASTOCYSTIS SPP.: UPDATE ON MORPHOLOGY, BIOLOGY, DIAGNOSIS AND CHEMOTHERAPEUTIC TREATMENT

SUMMARY

Blastocystis spp. is human parasite from the Chromista kingdom and has a controversial role as a pathogen. The pathogenic criteria of *Blastocystis* spp. are: the presence of a large number of vacuolar forms in the patient's stool, absence of other infections or diseases and symptoms disappear after specific antiparasitic treatment. The parasite is transported in liquids or food by fecal-oral contamination, in addition to oral-genital or oral-anal tract. The symptoms are variable (gastrointestinal, hepatosplenomegaly, skin rash and headache), and in immunosuppressed patients or some immunocompetents, issuing parasitic forms is high and it worsens the symptomatology. Diagnosing *Blastocystis* spp. is performed by demonstrating the parasite in the patient's stool, however, to determine the pathogenicity may be required typing and the quantification of parasitic morphologies in feces, determination of the parasite key metabolic enzymes, and identifies the epidemiological origin of the parasite; This can be defined by the genotyping, based on consensus sequences of the parasite's DNA. Treating the infected patients depends in principle on the persistence of symptoms together with the clinical criteria. The first choice of chemotherapeutic agent is the metronidazole, however, the reinfections are frequent and there's variability in the parasite sensitivity to the drug, in which cases, must use the second line drugs (nitazoxanide and Trimethoprim-sulfamethoxazole). All controversial issues that surround *Blastocystis* sp. can only be outflanked as long as aspects of its biology, pathogenesis, pathology and parasite-host interactions are investigated.

Keywords: *Blastocystis* spp., biology, diagnosis, Metronidazole, Nitazoxanide, pathology.

Introducción

Blastocystis spp., es un parásito humano perteneciente al Reino Cromista (1,2), agente causal de una infección cosmopolita de prevalencia creciente, descrita en el

humano y otros vertebrados (3-5). En Venezuela, presenta una alta prevalencia (6-10) y es encontrado frecuentemente en pacientes con sintomatología (11,12).

A pesar de la alta prevalencia de este parásito, existe

Solicitar copia a: barrios.emilia@gmail.com.

controversia en cuanto al papel patógeno de *Blastocystis* spp., algunos criterios clínicos intentan orientar al respecto, en base a: abundancia de formas parasitarias en muestras fecales, presencia de formas ameboides grandes en las heces del paciente y ausencia de otras causas funcionales, otros parásitos, bacterianas, micóticas y virales y desaparición de los síntomas después del tratamiento con un antiparasitario específico (13).

Blastocystis spp. es vehiculizado a través de agua o bebidas, frutas y hortalizas contaminadas, mediante un mecanismo de transmisión fecal-oral principalmente, y en otros casos por vía oral-genital u oral-anal (14). La sintomatología asociada a la infección es variable: diarrea, dolor abdominal, malestar o molestias intestinales, náuseas, inflamación y flatulencia excesiva, cólico, estreñimiento, mareos, pérdida de peso, prurito perianal, tenesmo, vértigo y anorexia, fiebre, esteatorrea y leucocitos en heces, en casos severos hepatoesplenomegalia (con complicaciones de otra índole), rash cutáneo y colitis, entre otros (15-17).

La mayoría de las infecciones son asintomáticas, sin embargo, el comportamiento oportunista de *Blastocystis* spp. es palpable en pacientes con depresión del sistema inmune, en los cuales la emisión de formas parasitarias a través de las heces es mayor y la sintomatología intestinal y extraintestinal es grave (17-19). No obstante, también en pacientes inmunocompetentes se han encontrado infecciones sintomáticas con emisión de gran número de formas parasitarias asociadas a la sintomatología (12, 20).

El diagnóstico de *Blastocystis* spp. se realiza mediante métodos directos de demostración del parásito en la heces del paciente (16). No obstante, para determinar el comportamiento patógeno, se usan criterios que van desde la cuantificación y tipificación de la morfología parasitaria en la heces (12, 21), la determinación de enzimas claves del metabolismo del parásito (22), hasta identificar la procedencia del parásito, en cuanto a hospedador, lo cual solo puede ser definido mediante la genotipificación, para lo que se amplifica el ADN del parásito, empleando secuencias cebadoras consenso (23,24).

Otro aspecto controversial es la alternativa quimioterapéutica a emplear y en qué momento debe ser aplicado. Esto depende en principio de la persistencia de sintomatología, sin que exista otro agente causal, en conjunto con los criterios clínicos antes mencionados. El agente quimioterapéutico que se emplea con mayor frecuencia, es el metronidazol, no obstante, éste no

constituye una terapia efectiva, como lo muestran la frecuente persistencia del parásito luego de ser aplicado el tratamiento con este fármaco (13,25).

Todos los aspectos controversiales que envuelven a *Blastocystis* spp. solo pueden ser flanqueados a medida que aspectos de la biología, patogenia, patología e interacciones parásito-hospedador, sean esclarecidos.

En la presente revisión se evaluó el estatus actual del conocimiento en relación a la biología, patogenia, patología, diagnóstico y tratamiento de *Blastocystis* spp.

El nombre del parásito fue propuesto por Alexieff en 1911, debido a que presentan por encima de la membrana celular, una cubierta mucilaginosa similar a la capsula de los Blastomycetos, además de presentar una división celular similar a un proceso de gemación, lo que que Alexieff, este investigador lo denominó *Blastocystis enterocola*, un año más tarde, Brumpt lo llamó *Blastocystis hominis* (1,2,26,27).

La clasificación inicial de *Blastocystis* varió desde ser considerado hongo, vegetal y un flagelado (26). De hecho fue ubicado entre los protistas, basado en que poseía núcleo, retículo endoplasmático liso y rugoso y organelas similares a mitocondrias, además de que no crecía en medios para hongos, era resistente a anti-fúngicos y era susceptible a drogas antiprotozoarios (metronidazol y emetina (26,27,25)).

El análisis molecular de la secuencias de subunidad pequeña del ARN ribosomal (ssrRNA) y el factor de elongación (EF-1), características de la secuencia de genes de *Blastocystis* spp., puso en evidencia que no formaban parte de un grupo monofilético con levaduras, hongos, sarcodina o esporozoarios por lo que debería ser ubicado dentro del grupo de los *Stramenopiles* (28,29,30). Sin embargo, las características de EF-1, sugieren en ese momento que *Blastocystis* spp. está más relacionado con *Entamoeba* spp debido posiblemente a lo pequeño de la muestra empleada en el estudio y características inherentes a la ssrRNA, por tanto, ubicaron a *Blastocystis* en el *Phyllum Sarcomastigophora* (26).

Posteriormente, en 1996, *Blastocystis* fue ubicado de nuevo en el grupo de los Stramenopiles (29). En este grupo es un organismo atípico, puesto que los Stramenopiles se denominan de esa forma porque presentan estructuras piliformes y flagelos, los cuales no están presentes en *Blastocystis* (29). Sin embargo, el análisis filogenético de la subunidad ribosomal pequeña del ARN (30) y otras secuencias génicas del

parásito (31), confirmaron la relación entre *Blastocystis*, flagelados y ciliados comensales provenientes de anfibios y reptiles, entre ellos, los géneros *Proteromonas*, *Opalina*, *Protoopalina*, *Karotomorpha*, y *Cepedea*. Se considera que la ausencia de características típicas de los Straminophiles en *Blastocystis* spp. es producto de una pérdida secundaria de éstas (32).

La fisión binaria simple es el modo de reproducción más ampliamente aceptado para *Blastocystis*. Sin embargo, otros mecanismos se han propuesto, entre ellos, plasmotomía, esquizogonía, endodiogonía (33).

La supervivencia del parásito se encuentra relacionada a su capacidad de responder a cambios en el ambiente que los rodea. Principalmente a cuatro elementos estresantes, como son: cambios térmicos, depleción de nutrientes, cambios osmóticos y oxidativos (34).

Blastocystis spp, desarrolló un mecanismo de disregulación de la óxido nítrico sintetasa (25), lo que inhibe la producción de este radical libre, el cual, induce necrosis y apoptosis en los organismos vivos. Así mismo, es capaz de contrarrestar el stress por calor, sintetizando proteínas del choque térmico, específicamente la Hsp70, esto explica la capacidad de este protozoario de multiplicarse a pesar de la exposición a altas temperaturas, como se ha observado en pacientes que presentan infección cruzada con parásitos maláricos y el virus del dengue (34).

Se ha descrito un gran número de tipos morfológicos de *Blastocystis* spp. (12, 35), algunos de los cuales, son compatibles con artefactos propios de la exposición de estas células a oxígeno (32). Lo realmente certero en cuanto a morfología, es que el género *Blastocystis* agrupa organismos unicelulares que miden entre 5-10 µm de diámetro, multinucleados con varias organelas parecidas a mitocondrias, aparato de Golgi y otras características típicas de células eucariotas (32).

El tipo morfológico de *Blastocystis* spp. predominante en las heces de humanos infectados, son las de cuerpo central, mal denominadas vacuolares (2, 35). Estas parecen relacionarse con la presencia de sintomatología, observándose en algunos casos, esta morfología en una magnitud seis veces mayor a la forma granular, mientras que, en pacientes asintomáticos la relación es aproximadamente dos veces mayor. Esta misma tendencia fue observada al realizar la cuantificación de formas por gramo de heces, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el número de vacuolares en sintomáticos y asintomáticos (12,20),

diferencias que parecen estar relacionadas con la sintomatología.

Las formas de resistencia, están presentes en alrededor de 30% de las muestras positivas (36), sin embargo, estos son raramente reportados debido al desconocimiento de la morfología característica, no obstante, en cultivo, luego de 24 horas, se pueden desarrollar formas vacuolares a partir de quistes, sin la intervención de los ácidos gástricos o enzimas intestinales (36, 37).

Diagnóstico

El diagnóstico del parásito es crítico para desarrollar estudios clínico epidemiológicos, que definan la asociación de *Blastocystis* spp y enfermedad. Sin embargo, la experiencia de técnicas parasitológicas clásicas, como lo son los métodos de demostración de estadios parasitarios al microscopio, previo uso de técnicas de concentración, presentan escasa sensibilidad, debido a la destrucción de los estadios de *Blastocystis* spp. por los procedimientos, que en su mayoría se han diseñado para quistes de protozoarios y huevos de helmintos, los cuales presentan cubiertas rígidas que los protegen de daño durante el procesamiento (36).

Diagnóstico coproparasitológico

Tradicionalmente, el diagnóstico de *Blastocystis* ssp. se basa en la visualización de la muestra de heces fresca, en solución salina y/o teñida con lugol (16). No obstante, ocasionalmente el diagnóstico puede ser complementado empleando técnicas de tinción como son: tricrómica, hematoxilina y eosina o May-Grunwald-Giemsa (20). La visualización al microscopio requiere experiencia técnica del analista y consume tiempo, puesto que *Blastocystis* puede ser confundido con leucocitos u otros protozoarios como *Dientamoeba fragilis* (36).

Cultivo in vitro

Diversos estudios emplearon métodos de cultivo xénico y axénico (38), a fin de aumentar la sensibilidad de los métodos de demostración del parásito, encontrando alta sensibilidad (36).

El medio de Jones es uno de los medios más utilizados, por su bajo costo y fácil preparación (36). La identificación de las formas de *Blastocystis* spp. cultivados en este medio, con la coloración tricrómica, mostró 100% de sensibilidad y 88% de especificidad (37).

Un estudio comparativo de las formulaciones de nutrientes de cultivo y su capacidad de mantener

la vitalidad del parásito, mostró que los medios RPMI1640 y TB1, solo lograron 3% más de viabilidad en comparación con la solución salina isotónica (SSI), mientras que el mantenimiento de los parásitos vitales, en el medio bifásico de Boeck-Drbohlav (MBD), fue doce veces mayor a la SSI y aproximadamente cinco veces más en comparación con el RPMI1640 y el TB1 (39). Sin embargo, el medio bifásico de Boeck-Drbohlav (MBDM) modificado por Lanuza et al. 1996 (38), resultó ser superior a todos los medios, no sólo fue diez veces mejor que la SSI y ocho veces mejor al RPMI1640 y TB1, sino que casi dos veces superior al MBD clásico, en mantener vitales a los parásitos hasta las 48 horas. No obstante, todos los medios incluidos los medios bifásicos MBD y MBDM disminuyeron con el tiempo, su capacidad de mantener los parásitos viables (39).

Asimismo, se encontró una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica con cultivos xénicos realizados a muestras de heces (38), en frascos con una base de agar, peptona y suero fetal bovino, luego de 24 y 48 h de incubación a 37°C, lo que representa una posibilidad de incorporar este procedimiento al diagnóstico de rutina, para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, no obstante, se debe considerar el inconveniente que representa en estos procedimientos, la posibilidad de seleccionar un subtipo en particular por ser más fácilmente cultivable que otros subtipos (36).

Diagnóstico Molecular

Los métodos moleculares son más costosos, pero son sensibles y específicos en comparación con los métodos de visualización al microscopio (36) y necesarios cuando se tiene que definir la especie del parásito o se desea caracterizarlo genotípicamente. En el estudio molecular se emplean secuencias consenso determinadas a partir del análisis de la subunidad pequeña de ADN ribosomal (SSU-rADN) (24), la cual es altamente conservada en cada especie, por tanto, la determinación de genotipos (Subtipos, STs) puede asociarse al origen epidemiológico del parásito y algunos estudios demuestran que puede ayudar a predecir el papel patogénico (25,40) y orientar el tratamiento, en virtud de que se ha reportado diferencias en la susceptibilidad o resistencia variable al tratamiento en subtipos provenientes de humanos (40).

En Colombia, se han identificado los STs 1, 2, 3, 6 y 8, de los cuales, los ST1, ST2 y ST3 fueron aislados de mamíferos domésticos, humanos y ratas (41). Mientras que, los ST6 y ST8 provenían de reptiles y zarigüeyas, pero los ST5 y ST10 característicos del ganado y el ST4

propio de humanos no fueron identificados, en esa población (41). En Brasil, fueron identificados los ST1, ST3 y ST6, y una vez más el ST4 estuvo ausente (42). Por otra parte, en Turquía (43), y en Líbano (44), los genotipos encontrados fueron ST1-ST3, con predominio de este último, encontrándose una asociación positiva entre el ST1 y sintomatología gastrointestinal, en los aislados de individuos libaneses.

Lo anterior demuestra la existencia de diferencias filogeográficas en *Blastocystis* spp. (44). Por tanto, es necesario definir el(los) genotipo(s) del parásito que circulan en una población determinada, puesto que el predominio de uno u otro subtipo varía con la ubicación geográfica y a su vez la capacidad patogénica varía con los STs presentes.

Diagnóstico serológico

Son pocos los estudios que evalúan la respuesta de anticuerpos frente a *Blastocystis* spp., en un estudio (45) donde fueron evaluados pacientes positivos para *Blastocystis* spp. Sin sintomatología, se observó ausencia de respuesta humoral (IgM e IgG); sin embargo, 86% de los pacientes sintomáticos presentaron anticuerpos IgG. Similarmente, nuestro grupo de investigación demostró 0% de positividad en 30 individuos asintomáticos, en contraste con los individuos sintomáticos (n=35) de los cuales 60% (n=21) fueron positivos para IgM y sólo 17% (n=6) para IgG (46).

En secreciones intestinales de ratones infectados oralmente, se demostró la producción de anticuerpos IgA, IgM e IgG anti-*Blastocystis hominis*. La alta respuesta de IgA contra el parásito, sugiere un rol vital de esta inmunoglobulina, en la respuesta inmune contra *Blastocystis*, y como en otros procesos infecciosos, la IgM sérica marcó la respuesta humoral temprana de la Blastocitosis, en los animales de experimentación. Una proteína antigénica de 70,8 kDa, fue reactiva para todos los tipos de anticuerpos, mientras que proteínas de 55 y 57,2 kDa fueron detectadas tanto en secreciones intestinales como en el suero de los ratones, por tanto, el rol de estas proteínas en la estimulación protectora local es indispensable para futuros estudios de patogenidad, factores de virulencia, desarrollo de estuches de inmunodiagnóstico y opciones de vacunación oral (47).

En contraste, en el estudio previamente citado, se detectó en 100% de los sueros humanos provenientes de sujetos con sintomatología intestinal, una banda de 56 kDa, reconocida solo por 90% de los asintomáticos. Otra banda de interés, encontrada fue de 29 kDa, detectada

por los pacientes con y sin síntomas, no obstante, la banda fue reconocida por 40% de los pacientes sintomáticos y solo 5% de los asintomáticos, por lo que pudiera constituir un buen marcador de patología (47).

Patogenia y patología

La histopatología de pacientes infectados con *Blastocystis* spp. indica que el parásito no puede invadir la mucosa del colon, pero puede alterar la función y permeabilidad de la barrera intestinal (48).

Actualmente, se conoce que el dolor visceral asociado al síndrome de colon irritable (SCI), se debe a alteraciones en la barrera epitelial, ocasionadas por cambios en las uniones estrechas, que traen consigo un incremento en la permeabilidad para-celular (49). En estos pacientes, se observa una alta actividad proteolítica, en comparación con sujetos saludables, lo que sugiere que metalo, cisteína y serina proteasas provenientes de bacterias y de *Blastocystis* spp. juegan un papel importante en el origen del SCI. Puesto que, las proteasas de serina tiene habilidad de marcar el receptor activado por proteasas (PAR-2), induciendo la inflamación y disrupción de las uniones estrechas, características del SCI, esto se debe a que una vez que las uniones estrechas se abren, las proteasas lumbales pueden acceder a los ganglios submucosos, activar los PAR-2, en neuronas entéricas y producir hipersensibilidad (48).

La invasión bacteriana en el lumen intestinal sumado a los antígenos del parásito, promueven la activación de la respuesta innata del hospedador, contribuyendo de esta manera, en el establecimiento de una inflamación leve de curso crónico en la submucosa (48). Si la infección es ocasiona por el genotipo ST7 de *Blastocystis*, este además es capaz de secretar enzimas de tipo glicosiltransferasa, que son capaces de inactivar a las proteínas del citoesqueleto, Rho, responsables del mantenimiento de estas uniones, ocasionando la alteración en las uniones estrechas intercelulares (47). En el proceso contribuyen los patógenos entéricos, debido a su capacidad de modular la actividad de las proteasas del hospedador y alterar la homeostasis intestinal (48). Al evaluar la alteración en la barrera epitelial relacionada a la infección por *Blastocystis* spp. genotipo ST7, en la línea celular de colon humano Caco-2, se encontraron evidencias de que ésta era consecuencia de la apoptosis del enterocito, a través de la vía extrínseca, mediada por las caspasas 3 y 9 (49,50).

Por otra parte, los genotipos ST4 y ST7 de *Blastocystis* spp. modulan la activación de receptores tipo toll

(TLR), empleando ligandos como el zimozan (TLR-2), lipopolisacárido (TLR-4) y flagelina (TLR-5), como fue demostrado en ensayos en una línea celular monocítica humana (THP1-Blue). Esta familia de receptores, son importantes para el reconocimiento de patógenos por células de la respuesta innata (49). El efecto sobre la línea celular puede representar un mecanismo alternativo al descrito previamente, que afecta a la barrera enteroepitelial (47). Lo anterior resulta interesante, en virtud que la pérdida de la integridad de la barrera epitelial intestinal en sujetos infectados por *Blastocystis* spp. puede proveer de receptores TLRs bajo la superficie apical del epitelio intestinal y un acceso de ligandos provenientes de patógenos lumbales. Por ejemplo, TLR-5 es el receptor predominante para la flagelina bacteriana, expresado en el colon basolateral (51), esto implica que la infección con *Blastocystis* spp. puede fungir como un elemento adicional en la inducción de la inflamación intestinal ocasionada por bacterias.

Estudios experimentales mostraron una asociación entre la inoculación de *Blastocystis* spp. provenientes de humanos con sintomatología gastrointestinal y con un predominio de formas vacuolares, en las heces y el desarrollo de signos en ratones inmunosuprimidos con dexametasona (45).

Recientemente, se observó que dentro de un mismo genotipo (el STS 3), el microambiente intestinal y las facilidades que ofrece para que el parásito sobreviva, son las que determinan las diferencias fenotípicas de *Blastocystis* spp (52). Estos investigadores, observaron que los parásitos aislados de pacientes con SCI y sintomatología son de mayor diámetro y presentan alto crecimiento en cultivo y capacidad de aglutinación, en comparación con parásitos provenientes de pacientes asintomáticos, pertenecientes al mismo genotipo. Similarmente, *Blastocystis* spp. fue aislado del tracto gastro-intestinal, hígado y quistes esplénicos en una paciente femenina con dolor agudo en el hipocondrio izquierdo, demostrando posteriormente el análisis molecular que en su mayoría, los parásitos aislados de la lesión correspondían al STS 3 (53).

Tratamiento quimioterapéutico

No existe un protocolo o fármaco de elección para controlar las blastocistosis. Sin embargo, El metronidazol (MTZ), es el medicamento frecuentemente empleado en el tratamiento de la Blastocistosis, presenta una eficacia variable entre 0-100%. Otros antimicrobianos, como laparamomicina,

nitazoxanida, iodoquinol y el trimetropin-sulfametoxazol (TMP-SMX), se han empleado en el tratamiento, dando resultados variables (54,55).

El MTZ se prescribe en dosis de 250 a 750 mg, 3 veces diarias, y 1,5 gr al día por 10 días. Este tratamiento se emplea solo y/o combinado con paramomicina o cotrioxazole (54).

El MTZ puede ser efectivo en ciertos pacientes, pero no erradica el parásito en los pacientes que desarrollan infección severa, debido posiblemente a resistencia desarrollada por algunos subtipos del parásito y a la procedencia geográfica de la persona infectada (54, 56). Paralelamente con el tratamiento con MTZ parece desarrollarse el aumento del potencial reproductivo del parásito, traducido en el hecho de que las formas granulares parecen liberar gránulos reproductivos responsables del aumento del número de parásitos observados en cultivo, luego del tratamiento. Mientras que la resistencia de las formas quísticas a la toxicidad del fármaco, podrían determinar la eficiencia variable del fármaco (57). Así como que cambios en la morfología y aumento en el número de organelas similares a mitocondrias, en *Blastocystis* spp. proveniente de pacientes sintomáticos (58).

Pese a la eficacia variable, se ha demostrado en los parásitos susceptibles al MTZ, que este induce apoptosis en *Blastocystis* spp. (55).

La nitazoxanida, un 5-nitro tiazol, constituye un antiparasitario de amplio espectro, con aparente actividad contra *Blastocystis* spp., empleado a dosis de 500 mg por día, durante tres días. Sin embargo, su efectividad varía con el genotipo del parásito, pudiendo ser más susceptible que el subtipo 7 que el subtipo 4, a este medicamento (57).

El TMP-SMX, se emplea como alternativa terapéutica si la sintomatología persiste luego de administrar el MTZ o en mujeres embarazadas, no obstante, el TMP-SMX puede reducir de forma considerable el número de parásitos, pero no se logra la erradicación definitiva de éstos (57).

En conclusión, desde el punto de vista diagnóstico es importante el reporte de la morfología y el número de *Blastocystis* spp. encontrados en el paciente en un momento determinado como un primer criterio de patogenicidad, debido a la ampliamente demostrada relación entre presencia de gran número de formas vacuolares grandes y sintomatología (2, 12,20,22,36,37,39).

Las proteínas antigénicas de *Blastocystis* spp.

reconocidas por sueros humanos y de animales infectados, podrían emplearse como marcadores de patología pero también como marcadores diagnóstico.

Por otra parte, el diagnóstico molecular es importante, dada la amplia ubicación del parásito en distintos hospedadores (reptiles, mamíferos, aves), la estrecha relación entre algunos genotipos y patología, así como, con la variabilidad en la efectividad del tratamiento con metronidazol y el uso de medicamentos considerados segunda línea de elección como la nitazoxanida o el TMP-SMX con el genotipo de *Blastocystis* spp. Por lo que el diagnóstico molecular puede traducirse en un tratamiento oportuno.

Finalmente, en vista que se reporta a nivel mundial una amplia variabilidad en el predominio y presencia de genotipos y su implicación en patología, es importante identificar los subtipos de *Blastocystis* spp. que se encuentran circulando en Venezuela, con especial énfasis en aquellos que son identificados en pacientes con sintomatología gastrointestinal o extraintestinal, a fin de caracterizar la virulencia, susceptibilidad y resistencia a los fármacos de primera y segunda línea de elección.

Referencias

1. Derelle R, López-García P, Tímpano H, Moreira D. A phylogenomic framework to study the diversity and evolution of stramenopiles (=heterokonts). *Mol Biol Evol* 2016;33(11):2890-2898.
2. Devera R. *Blastocystis* spp.: 20 años después. *Kasmera* 2015;43(2):94-96.
3. Suresh K, Ng GC, Ramachandran NP, Ho LC, Yap EH, Singh M. In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1993;79(6):456-460.
4. Moe K, Singh M, Howe J, Ho L, Tan S N G, Chen X, Yap E. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res* 1996;82(5):439-444.
5. Barahona L, Maguiña C, Náquira C, Terashima I, Tello R. Blastocystosis humana: Estudio prospectivo, sintomatología y factores epidemiológicos asociados. *Rev Gastroenterol Perú* 2003;23(1):29-35.
6. Devera R, Angulo V, Amaro E, Finali M, Franceschi G, Blanco Y, et al. Parásitos intestinales en habitantes de una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. *Rev Biomed* 2006;17(4):259-268.
7. Panunzio A, Fuentes B, Villaroel F, Pirela E, Avi A, Molero-Zambrano T, et al. Prevalencia y epidemiología de *Blastocystis* sp. en dos comunidades del Municipio Maracaibo Estado Zulia. *Kasmera* 2014;42(1):9-21.
8. Calchi M, Rivero Z, Bracho A, Villalobos R, Acurero E, Maldonado A, et al. Prevalencia de *Blastocystis* sp. y otros protozoarios comensales en individuos de Santa Rosa de Agua, Maracaibo, Estado Zulia. *Rev Soc Venezol Microbiol* 2013;33:66-71.

9. Devera R, Blanco Y, Amaya I. Prevalencia de parásitos intestinales en escolares de Ciudad Bolívar, Venezuela: comparación entre dos períodos. *Kasmera* 2015;43(2):122-129.
10. Devera R, Cordero A, Uzcategui Y, Blanco Y, Amaya I, Requena I, et al. Blastocistosis en niños y adolescentes de una comunidad indígena del Estado Bolívar, Venezuela. *Saber* 2016; 28(1). Disponible en: <http://www.ojs.udo.edu.ve/index.php/saber/article/view/2099>. [Consultado en: febrero 2016]
11. Barahona L, Maguiña C, Náquira C, Terashima A, Tello R. Sintomatología y factores epidemiológicos asociados al parasitismo por *Blastocystis hominis*. *Parasitol Latinoam* 2002;57:96-102.
12. Hernández A, Barrios E, Sánchez L, Araque W, Delgado V. Tipos morfológicos, número de parásitos por campo y carga parasitaria de *Blastocystis* sp proveniente de pacientes sintomáticos y asintomáticos. *Salus* 2012;16(3):15-20.
13. Devera R, Velásquez V, Vásquez M, Azacón B, Jiménez M. *Blastocystis hominis*: criterios de patogenidad. *Saber* 2000;12(2):23-28.
14. Muñoz V, Frade C. *Blastocystis hominis*: parásito enigmático. *Cuad Hosp Clin Caracas* 2005; 50(1). Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Documents/Emilia/conferencias%202015/charla%20blastocystis/carpeta%20de%20envio%20del%20articulo/nuevos%20papers/sintomatologia.pdf>. [Consultado en: enero 2016]
15. Méndez M, Do Muiño M, Sánchez G, López B, Toboada L. *Blastocystis hominis* un gran desconocido. *Rev Pediatr Aten Primaria* 2015;17:e39-344.
16. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(4):639-665.
17. Mohandas SR, Sud A, Malla N. Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in Northern India. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55(3):83-84.
18. Alger J. *Blastocystis hominis*: Pathogen or Commensal. *Lancet* 2007;337(8740):521-522.
19. Socarras SL. Presencia de *Blastocystis hominis* como agente causal de enfermedades gatrointestinales en la comuna 7 (Gaira) del Distrito de Santa Marta. *Duazary* 2005;2(1):36-40.
20. Sánchez L, Barrios EE, Sardiña A, Araque W, Delgado V. Infección experimental de aislados humanos de *Blastocystis* sp. en ratones inmunosuprimidos con dexametasona. *Kasmera* 2012;40(1):67-77.
21. Amaya A, Trejos J, Morales E. *Blastocystis* spp.: revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. *Rev Salud UIS* 2015;47(2). Disponible en: <http://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/rt/printerFriendly/4831/5285>. [Consultado en: enero 2016]
22. Barrios E, Hernández A, Peña N, Villanueva J, Pinto V, Delgado V, et al. *Blastocystis hominis*: patrones de isoenzimas en aislados humanos. *Salus* 2009;13(1):39-42.
23. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb V, Delgado-Viscogliosi P, Ho L-C, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol* 2005;43(1):348-355.
24. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RA, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends Parasitol* 2007;23(3):93-96.
25. Mirza H, Wu Z, Kidwai F, Tan KS. A metronidazole-resistant isolate of *Blastocystis* spp. is susceptible to nitric oxide and downregulates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase by a novel parasite survival mechanism. *Infect Immun* 2011;79(12):5019-5026.
26. Zierdt C, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristic of *Blastocystis hominis*. *Am J Clin Path* 1967;48:495-501.
27. Zierdt C. *Blastocystis hominis*--past and future. *Clin Microbiol Rev* 1991;4(1):61-79.
28. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology* 2003;126(1):1-9.
29. Silbeman J, Sogin M, Leipe D, Clark C. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 1996;380:398. Disponible en: [Doi:10.1038/380398a0](https://doi.org/10.1038/380398a0). [Consultado en: enero 2016]
30. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J Eukaryot Microbiol* 2002;49(1):42-53.
31. Klimer V, Gentekaki E, Roger A, Elia M. A Large Number of Nuclear Genes in the Human Parasite *Blastocystis* Require mRNA Polyadenylation to Create Functional Termination Codons. *Genome Biol Evol* 2014;6(8):1956-1961.
32. Mehlhorn H, Tan KSW, Yoshikawa H. *Blastocystis*: Pathogen or Passenger?: An Evaluation of 101 Years of Research. *Parasitol Res Monographs* 2012: Springer Berlin Heidelberg. Disponible en: <http://www.springer.com/us/book/9783642327377>. [Consultado en: enero 2016]
33. Zapata I, Rojas-Cruz C. Una actualización sobre *Blastocystis* sp. *Rev Gastrohnp* 2012;14(3):94-100.
34. Gaythri T, Suresh K, Subha B, Kalyani R. Identification and Characterisation of Heat Shock Protein 70 in Thermal Stressed *Blastocystis* sp. *PLoS ONE* 2014;9. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095608> [Consultado en: enero 2016]
35. Zierdt C, Donnelly C, Muller J, Constantopoulos G. Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. *J Clinical Microbiol* 1988;26(5):965-970.
36. Stensvold CR. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. *Trop Parasitol* 2015;5(1):3-5 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326991/>. [Consultado en: enero 2016]
37. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Amer J Trop Med Hyg* 2009;80(4):588-592.
38. Lanuza MD, Carbajal JA, Borrás R. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitol Res* 1997;83:60-63.
39. Barrios E, Castillo S, Goitia E, Ojeda O, Araque W, Delgado

- V. Mantenimiento y transporte del *Blastocystis* sp. en condiciones de vitalidad. *Salus* 2013;17(Suppl):29-38.
40. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog* 2014;6:17. Disponible en: <http://www.gutpathogens.com/content/6/1/17>. [Consultado en: enero 2016]
 41. Ramírez JD, Sánchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Flórez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Gen Evol* 2014;22:223-228.
 42. David EB, Guimarães S, De Oliveira AP, Goulart TC, Nogueira GN, Moraes AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors* 2015;8(1):103. Disponible en: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0714-8> [Consultado en: febrero 2016]
 43. Ertug S, Malatyali E, Ertabaklar H, Çaliskan SÖ, Bozdoğan B, Aydın İ. İnde Elde Edilen *Blastocystis* İzolatlarının Alt Tip Dağılımı ve Klinik Semptomların Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*; 2015;49(1):98-104.
 44. El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am J Trop Med Hyg* 2013;88(6):1203-1206.
 45. Mahmoud M, Saleh W. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. *J Egypt Soc Parasitol* 2003;33(1):13-30.
 46. Barrios EE, Guevara D, Ojeda O, Pinto V, Araque W, Delgado V, Barrios M G. Morfología y respuesta de anticuerpos IgM e IgG anti-*Blastocystis* sp. en pacientes con síntomas gastrointestinales. *Salus* 2013;17(3):19-26.
 47. Abou M, Elwakil H, El Deeb H, Khalifa K, Abd H. The potential use of 29 kDa protein as a marker of pathogenicity and diagnosis of symptomatic infections with *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2011;108(5):1139-1146.
 48. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog* 2012;8(3): Disponible en: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002545> [Consultado en: enero 2016].
 49. Teo J, MacAry PA, Tan K. Pleiotropic effects of *Blastocystis* spp. subtypes 4 and 7 on ligand-specific toll-like receptor signaling and NF- κ B activation in a human monocyte cell line. *PLoS one* 2014;9(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089036> [Consultado en: enero 2016]
 50. Wu Z, Mirza H, Teo JD, Tan KS. Strain-Dependent Induction of Human Enterocyte Apoptosis by *Blastocystis* Disrupts Epithelial Barrier and ZO-1 Organization in a Caspase 3-and 9-Dependent Manner. *Biomed Res Internat* 2014. Disponible en: Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/209163>. [Consultado en: enero 2016]
 51. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Eugene CY, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410(6832):1099-1103.
 52. Ragavan ND, Govind SK, Chye TT, Mahadeva S. Phenotypic variation in *Blastocystis* sp. ST3. *Parasit Vectors* 2014;7:404. Disponible en: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-404> [Consultado en: febrero 2016]
 53. Santos H, Sodré F, De Macedo H. *Blastocystis* sp. in splenic cysts: causative agent or accidental association? A unique case report. *Parasit Vectors* 2014;7(1):207. Disponible en: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-207> [Consultado en: enero 2016]
 54. Nigro L, Larocca L, Massarelli L, Patamia I, Minniti S, Palermo F, et al. A placebo-Controlled Treatment Trial of *Blastocystis hominis* Infection with Metronidazole. *J Travel Med* 2003;10(2):128-130.
 55. Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitol Res* 2005;96(4):273-275.
 56. Dunn L, Tan K, Vanelle P, Juspin T, Crozet M, Terme T, et al. Development of metronidazole-resistant lines of *Blastocystis* sp. *Parasitol Res* 2012;111(1):441-450.
 57. Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Trop Parasitol* 2013;3(1):35-39.
 58. Raman K, Kumar K, Chye TT. Increase number of mitochondrion-like organelle in symptomatic *Blastocystis* subtype 3 due to metronidazole treatment. *Parasitol Res* 2016;115(1):391-396.

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. 19 - No 1

2016

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 31

ORIGINAL ARTICLES:

Glutathione S- transferase GSTM1, GSTT1 AND GSTP1 distribution in Venezuelan population

Marycarmen Chacin, Sabrina Ferraz, Martha Bravo, Andrea Rivas, Greisly Suarez,
Carmen Clavijo, Gloria Garcia y Anabel Arends..... 2

Analytical quality control in the urinalysis carried out in the clinical laboratories of the Metropolitan District of Caracas

Celsy Hernández, M^a Fátima Garcés, Hilda Stekman, Jonattan Ramos..... 11

Antiphospholipid antibodies in normal pregnancy and spontaneous abortions to repetition

Sarah Bethencourt, Robert Tovar, Francisco Mendoza, Loida Ponce,
Julie Verzura, José Corado, Sioly de Orta..... 20

REVIEW ARTICLE:

Blastocystis spp.: Update on morphology, biology, diagnosis and chemotherapeutic treatment

Emilia E Barrios, Génesis Ochoa, Angel Castillo, Eva Velasquez..... 26

INFORMATION FOR AUTHORS..... 34

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

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

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