

Optimización y validación analítica de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa seguida de análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción para factor V de Leiden y protrombina G20210A

AOptimization and analytical validation of a polymerase chain reaction technique followed by restriction fragment length polymorphism analysis for Factor V Leiden and Prothrombin G20210A

De Biasio, María Bárbara^{1*}; Sánchez Garbía, Ana Celeste¹; Zimmermann, María Carla²; Martínez, María de los Ángeles²; Farizano, Diego Horacio¹

¹Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología, Departamento de Laboratorio y Bioquímica Clínica, Hospital de Campaña "Escuela Hogar". Ministerio de Salud Provincia de Corrientes. Corrientes, Argentina.

²Laboratorio de Medicina Genómica, Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste.

*Contacto: De Biasio, María Bárbara; Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología, Departamento de Laboratorio y Bioquímica Clínica, Hospital de Campaña "Escuela Hogar". Avenida Pedro Ferré 2755 (3400), Corrientes, Argentina; mariabarbaradebiasio@gmail.com

Resumen

La trombofilia hereditaria es un factor predisponente para la enfermedad tromboembólica venosa, frecuentemente asociada a los polimorfismos factor V de Leiden (G1691A) y protrombina G20210A. La identificación molecular de estas variantes resulta clave para la estratificación del riesgo y la implementación de estrategias profilácticas. El objetivo de este trabajo fue optimizar y validar un método *in house*, basado en la reacción en cadena de la polimerasa seguida de análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para la identificación de ambos polimorfismos. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa *in silico* para evaluar la especificidad de los cebadores, seguida de la optimización de las condiciones de amplificación mediante gradiente térmico. Los productos amplificados se sometieron a digestión enzimática con Mnl I y Hind III y a posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa. La validación incluyó sensibilidad y especificidad analítica, exactitud (mediante secuenciación de Sanger), veracidad, interferencias, robustez y precisión. Se obtuvieron amplicones específicos de 267 pb para factor V y 506 pb para protrombina con temperaturas óptimas de hibridación de 58 °C y 59 °C. El método presentó sensibilidad y especificidad del 100%, con concordancia total respecto de un laboratorio externo y la secuenciación. No se detectaron interferencias, y los ensayos mostraron alta repetibilidad y reproducibilidad. En conclusión, la técnica optimizada constituye una herramienta rápida, precisa, robusta y de bajo costo para la detección de estos polimorfismos que favorece la identificación de individuos con predisposición genética a eventos trombóticos.

Palabras clave: trombofilia; factor V de Leiden; protrombina; PCR-RFLP; diagnóstico molecular.

Abstract

Background: Hereditary thrombophilia is a predisposing factor for venous thromboembolic disease, frequently associated with Factor V Leiden (G1691A) and Prothrombin G20210A polymorphisms. Molecular identification of these variants is essential for risk stratification and the implementation of prophylactic strategies. Aim: The aim of this study was to optimize and validate an in-house method based on polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) for the detection of both polymorphisms. Methods: An *in silico* polymerase chain reaction was performed to assess primer specificity, followed by optimization of amplification conditions by using a thermal gradient. Amplified products were subjected to enzymatic digestion with MnlI and HindIII and subsequently analyzed by agarose gel electrophoresis. Validation included analytical sensitivity and specificity, accuracy (by Sanger sequencing), trueness, interference testing, robustness, and precision. Results: Specific amplicons of 267 bp for Factor V and 506 bp for Prothrombin were obtained, with optimal annealing temperatures of 58 °C and 59 °C, respectively. The method demonstrated 100% sensitivity and specificity, with complete concordance compared to an external laboratory and sequencing results. No interferences were detected, and the assays showed high repeatability and reproducibility. Conclusion: The optimized technique represents a rapid, accurate, robust, and cost-effective tool for the detection of these polymorphisms, facilitating the identification of individuals with genetic predisposition to thrombotic events.

Keywords: Thrombophilia, Factor V Leiden, Prothrombin, PCR-RFLP, Molecular Diagnosis.

Introducción

La trombofilia se define como un trastorno de la hemostasia que predispone al desarrollo de eventos trombóticos incrementando la morbimortalidad¹⁻³. La enfermedad tromboembólica venosa (ETV), que incluye la trombosis venosa profunda (TVP) y la embolia pulmonar (EP), constituye una de las principales causas de mortalidad intrahospitalaria prevenible y la tercera causa de muerte cardiovascular luego del infarto agudo de miocardio y el accidente cerebrovascular⁴. Se trata de una entidad multifactorial en la que interactúan factores genéticos, ambientales y adquiridos^{2,3,5}. En Argentina, se estima que hay más de 60.000 casos anuales de ETV, con una elevada mortalidad asociada a EP³.

Entre los factores hereditarios más relevantes, se encuentran los polimorfismos del factor V de Leiden (G1691A) y protrombina G20210A⁵. El primero genera resistencia a la proteína C activada, mientras que el segundo incrementa la estabilidad del ARNm y los niveles de protrombina^{1,6,7}. Estas variantes aumentan significativamente el riesgo trombótico especialmente en presencia de factores adquiridos^{2,5,8}.

La detección de estos polimorfismos está recomendada en pacientes con eventos trombóticos tempranos o recurrentes^{2,7,8}. En este contexto, resulta fundamental disponer de metodologías diagnósticas confiables. Si bien en la actualidad existen metodologías para la detección de variantes genéticas, como la PCR en tiempo real o la secuenciación, la técnica de PCR-RFLP constituye una herramienta útil para la identificación de los polimorfismos puntuales previamente caracterizados. Esta elección se fundamenta en su elevada especificidad analítica, robustez, reproducibilidad y bajo costo operativo, además de requerir equipamiento ampliamente disponible en laboratorios de diagnóstico molecular⁹.

El presente trabajo tiene como objetivo optimizar y validar una técnica *in house* de PCR-RFLP para la detección del factor V de Leiden y la protrombina G20210A. La validación de métodos desarrollados en laboratorio requiere la evaluación de parámetros, como sensibilidad, especificidad, exactitud, veracidad, interferencias, robustez y precisión, a fin de garantizar resultados confiables para su aplicación clínica¹⁰⁻¹³.

Materiales y métodos

Muestras

El ácido desoxirribonucleico (ADN) utilizado se obtuvo a partir de sangre periférica anticoagulada con EDTA dipotásico, proveniente de individuos homocigotas normal/normal

y heterocigotas para los polimorfismos analizados. No se incluyeron muestras homocigotas variantes debido a la baja frecuencia poblacional de estos genotipos por lo que la validación se realizó con los genotipos clínicamente más prevalentes y disponibles. Las muestras fueron previamente tipificadas en otra institución de salud.

Extracción de ADN

Se centrifugaron 1000 µL de sangre a 12000 rpm durante 4 minutos (en microcentrífuga Numak), y se descartó el sobrenadante. Los eritrocitos se eliminaron por lisis osmótica con agua libre de nucleasas (cuatro lavados). El *pellet* leucocitario se resuspendió en 500 µL de solución de homogenización con CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio, Sigma Aldrich) e incubó a 60 °C durante 1 hora. La purificación se realizó mediante extracción con cloroformo, alcohol isoamílico (24:1; Cicarelli) y posterior precipitación con isopropanol (Cicarelli). El ADN se lavó con etanol al 70 % (Cicarelli), se secó y se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas; se conservaron las muestras a -20 °C.

Selección de oligonucleótidos cebadores y PCR *in silico*

Tras una revisión bibliográfica, se seleccionaron dos pares de oligonucleótidos cebadores para factor V⁶ y protrombina¹⁴ (Tabla I). La validación *in silico* se realizó mediante el programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) alineando las secuencias con el genoma de referencia de *Homo sapiens* disponible en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, GenBank). El análisis se efectuó utilizando el ensamblado de referencia GRCh38.p14 (por su sigla en inglés, *Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 14, Primary Assembly*), con el fin de predecir la especificidad de los cebadores y los posibles productos de amplificación.

Optimización de condiciones de amplificación por PCR

Las reacciones se realizaron en un termociclador BIORAD T100 (California, Estados Unidos), en un volumen final de 30 µL. Para la amplificación del gen del factor V, la mezcla de reacción contuvo 1 x de *buffer* de PCR, 2,0 mM de MgCl₂ (Biodynamics), 0,05 mM de dNTPs (Biodynamics), 0,4 µM de cada cebador (IDT, Biodynamics, Tabla I) y 1 U de ADN polimerasa (Promega) y, para protrombina, 1 x *buffer* de PCR, 1,5 mM MgCl₂ (Biodynamics) 0,2 mM de dNTPs (Biodynamics), 0,8

Tabla I. Secuencias de oligonucleótidos cebadores.				
Gen	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño del amplicón	Referencia bibliográfica
Factor V Fw	5´ - TGCCAGTGCTTAACAAGACCA – 3´	66	267 pb	[6]
Factor V Rew	5´ - TGTTATCACACTGGTGCTAA – 3´	56		
Protrombina Fw	5´ - GCACAGACGGCTGTTCTCTT-3´	62	506 pb	[14]
Protrombina Rew	5´ -ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC -3´	66		

Tabla II. Perfil térmico para la amplificación por PCR de fragmentos del gen del factor V y de la protrombina.

	Factor V	Protrombina
Desnaturalización inicial	94°C/ 1 minuto	95°C/ 2 minutos
Desnaturalización	94°C/ 30 segundos	94°C/ 30 segundos
Pegado de cebadores	54-56-58°C/ 30 segundos	55-57-59°C/15 seg
Extensión	72°C / 30 segundos	72°C / 60 segundos
Extensión final	72°C / 5 minutos	72°C / 5 minutos
N° de Ciclos	37	40
Incubación	4°C / ∞	4°C / ∞

μM de cada cebador (IDT, Biodynamics, Tabla I) y 1 U de ADN polimerasa (Promega). Las condiciones térmicas de ciclado se describen en la Tabla II. En todos los ensayos, se incluyó un control negativo consistente en 2 μL de agua destilada.

La temperatura de fusión (Tm) se estimó mediante la fórmula de Wallace¹⁵ y se fijó una temperatura de alineamiento 5 °C inferior. Luego, se evaluó por duplicado un gradiente térmico que incluyó el valor teórico calculado y el reportado en la bibliografía. Para el factor V, se ensayaron 54, 56 y 58 °C y, para la protrombina, 55, 57 y 59 °C.

Detección de amplicones por electroforesis

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Cuba electroforética, Labnet International, Inc. y Enduro™ Power Supplies Labnet International, Inc., Nueva Jersey, Estados Unidos) y visualizados por transiluminación ultravioleta (MaestroGen Inc., Hsinchu City, Taiwán). Se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb (Cienmarker, Biodynamics), y las corridas se realizaron a 100 V durante 30 minutos.

Digestión con enzimas de restricción

Los ensayos de restricción enzimática se realizaron en un volumen final de 20 μL empleando productos de PCR de individuos homocigotas normal/normal y heterocigotas. La digestión se efectuó con la enzima de restricción Mnl I (10 U, New England BioLabs) para el factor V de Leiden y Hind III (8 U, New England BioLabs) para la protrombina G20210A, con incubación a 37 °C durante 40 minutos. Los productos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% con bromuro de etidio, a 100 V durante 40 minutos y se visualizaron por transiluminación UV. Los patrones de restricción esperados según el genotipo se muestran en la Tabla III.

Parámetros de validación

Para todos los ensayos se utilizó un lote maestro de reactivos preparado para minimizar variables, en alícuotas y conservado a -20 °C.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se evaluó utilizando una muestra homocigota normal y una heterocigota para cada polimorfismo. Se realizaron ensayos por duplicado de PCR y digestión enzimática variando las proporciones de ADN molde y de producto amplificado a fin de establecer la relación óptima para la correcta identificación de los polimorfismos. Las condiciones determinadas se detallan en la Tabla IV.

Especificidad analítica

La identificación de los polimorfismos se evaluó por quintuplicado durante cinco días consecutivos utilizando tres muestras homocigotas normales y tres heterocigotas para cada variante analizada, previamente tipificadas por un laboratorio externo mediante PCR-RFLP.

Exactitud. Genotipificación por secuenciación

A partir de un panel de ADN previamente tipificado, se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras para su análisis por PCR-RFLP y posterior secuenciación de Sanger: cinco correspondientes al gen del factor V y cinco al de protrombina. Los productos de PCR se purificaron con perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). Para cada muestra, se realizaron dos reacciones de secuenciación de Sanger, una por cada cebador, utilizando el BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) en un volumen final de 10 μL: 4 μL de mezcla reactiva, 2 μL de cebador forward o re-

Tabla III. Patrón de bandas esperado en función del genotipo para el factor V de Leiden y la protrombina G20210A.

Genotipos	Factor V Leiden	Protrombina G20210A
Normal/normal	163 + 67 + 37pb	406 + 100 pb
Normal/variante	200 + 163 + 67 + 37pb	406 + 100 + 383 + 23 pb
Variante/variante	200 + 67 pb	383 + 100 + 23 pb

► pb, pares de bases.

Tabla IV. Condiciones de PCR-RFLP para polimorfismos de nucleótido único en genes del factor V y la protrombina.

	Volumen de ADN/ Volumen total de PCR	Volumen de productos de PCR/ Volumen total de reacción de restricción
Factor V de Leiden	1,5 µl/30 µL	10 µl/20 µL
	3 µl/30 µL	10 µl/20 µL
	5 µl/30 µL	10 µl/20 µL
Protrombina G20210A	3 µl/30 µL	10 µl/20 µL
	1,5 µl/30 µL	10 µl/20 µL
	1,5 µl/30 µL	6,0 µl/20 µL

verse, 2 µL de ADN purificado y 2 µL de agua estéril libre de nucleasas. El ciclado incluyó desnaturalización inicial a 96 °C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos y 60 °C por 4 minutos, con una incubación final a 4 °C por 10 minutos. Los productos se purificaron mediante precipitación con EDTA 125 mM y etanol al 100 %, con lavados en etanol al 70 % y se eluyeron en Hi-D™ i Formamide (Thermo Fisher Scientific Inc.). La electroforesis capilar se realizó en un ABI 3500 Genetic Analyzer en condiciones estándar (125 minutos), utilizando arreglo capilar de 50 cm y polímero POP-7 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Las secuencias se analizaron con SeqScape™ Software v4.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.) identificando variantes respecto de las secuencias de referencia NG_011806.1 (pos. 41.721; factor V Leiden, G1691A) y NG_008953.1 (pos. 25.313; protrombina G20210A).

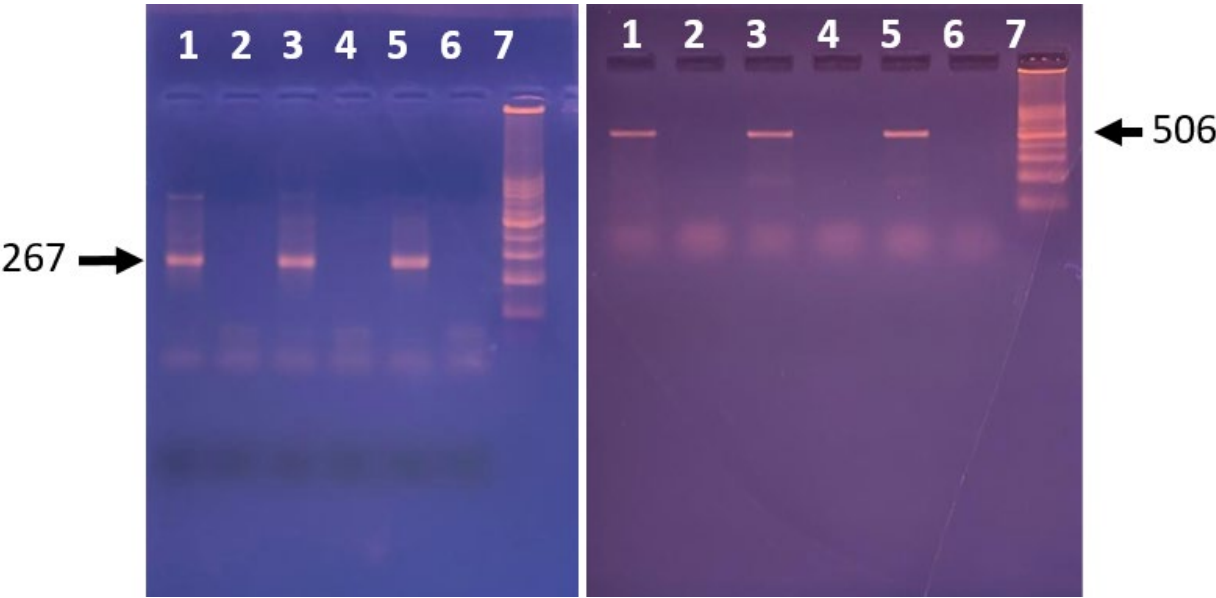
Veracidad

Se evaluó mediante un estudio de recuperación comparando los resultados con los de un laboratorio externo que emplea la misma técnica (tres muestras homocigotas normales y tres heterocigotas por variante, por quintuplicado, 30 determinaciones para factor V de Leiden y 30 determinaciones para protrombina G20210A) y mediante comparación de métodos contrastando cinco muestras de cada gen con los resultados obtenidos por secuenciación de Sanger.

Interferencias

Para evaluar posibles interferencias, la prueba se aplicó a muestras con condiciones potencialmente interferentes: recuentos de leucocitos elevados (15900 células/mm³) y disminuidos (4280 células/mm³); hiperglucemia (207 mg/

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% .



► Izquierda: PCR del factor V: calles 1-2: Ta 54°C; calles 3-4: Ta 56°C; calles 5-6: Ta 58°C; calle 7: marcador de peso molecular [Cienmarker, Biodynamics].; calles 1, 3 y 5: control positivo; calles 2, 4 y 6: control negativo. Derecha: PCR de la protrombina: calles 1-2: Ta 55°C; calles 3-4: Ta 57°C; calles 5-6: Ta 59°C; calle 7: marcador de peso molecular [Cienmarker, Biodynamics]; calles 1, 3 y 5: control positivo; calles 2, 4 y 6: control negativo.

Tabla V. Concordancia entre el método PCR-RFLP en estudio y la tipificación molecular externa para la detección de variantes del factor V de Leiden y la protrombina G20210A.

		Tipificación molecular externa	
		Normal/normal	Normal/variante
PCR-RFLP en estudio	Normal/normal	15	0
	Normal/variante	0	15

dL); lipemia (triglicéridos: 334 mg/dL); así como hemólisis e ictericia (bilirrubina total: 3 mg/dL). Asimismo, se incluyeron muestras de pacientes en tratamiento con anticoagulantes.

Robustez y precisión

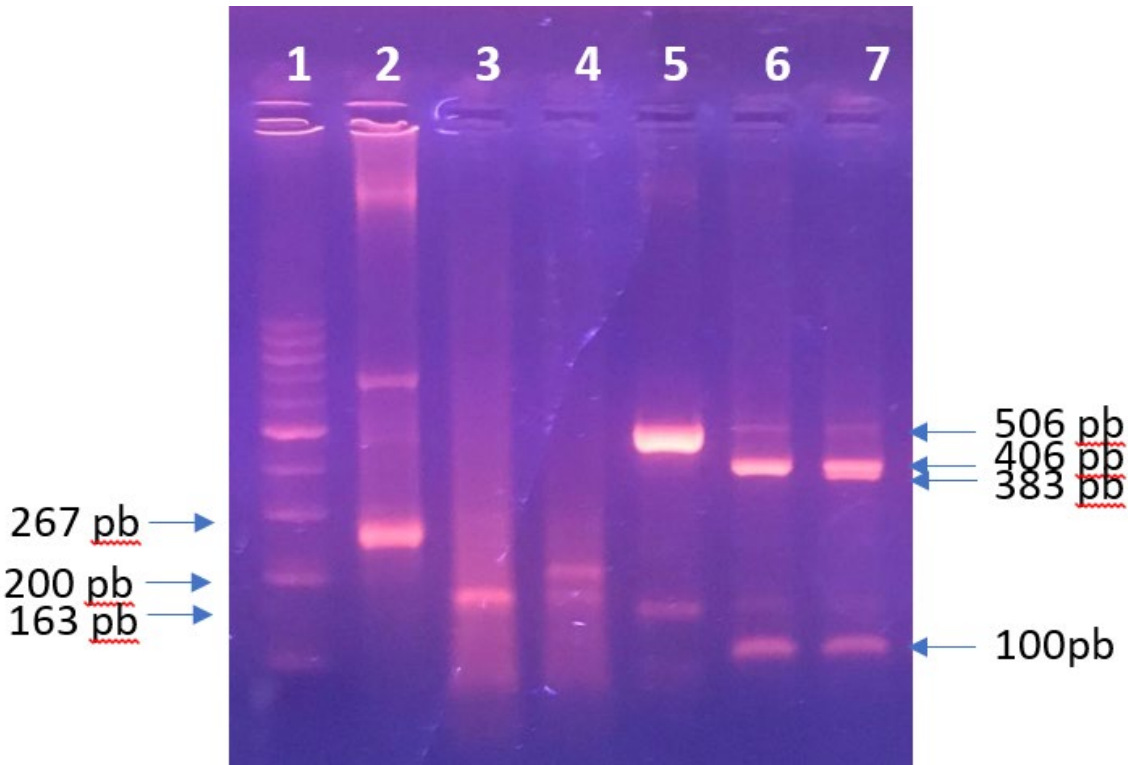
La precisión se evaluó mediante ensayos de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio. Para la repetibilidad, un operador analizó durante cinco días consecutivos una muestra homocigota normal y otra heterocigota para cada polimorfismo utilizando el mismo equipamiento. La reproducibilidad intralaboratorio se determinó mediante el análisis independiente de las mismas muestras realizado por un segundo

operador durante cinco días.

Análisis estadístico

La concordancia entre los resultados obtenidos mediante la técnica PCR-RFLP y los métodos de referencia se evaluó mediante el porcentaje de acuerdo y el coeficiente kappa de Cohen¹⁶. Los intervalos de confianza del 95% [IC95%] para las proporciones de concordancia se estimaron mediante el método exacto binomial de Clopper-Pearson. Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* Jamovi versión 2.6 [The Jamovi Project, Sydney, Australia] considerando un nivel de confianza del 95%.

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 3%, PCR-RFLP del factor V de Leiden y la protrombina G20210A .



► Calle1: marcador de peso molecular 100 pb (Cienmarker, Biodynamics); calles 2-4: factor V de Leiden: calle 2, productos de PCR sin digerir; calle 3, muestra homocigota normal; calle 4, muestra heterocigota. Calles 5-7: protrombina G20210A: calle 5, producto de PCR sin digerir; calle 6, muestra homocigota normal; calle 7, muestra heterocigota.

Tabla VI. Concordancia entre los genotipos determinados por PCR-RFLP y secuenciación de Sanger para los polimorfismos factor V de Leiden y protrombina G20210A.

Factor V de Leiden			
Secuenciación de Sanger			
PCR-RFLP		Normal/ normal	Normal/ variante
	Normal/ normal	4	0
	Normal/ variante	0	1
Protrombina G20210A			
Secuenciación de Sanger			
PCR-RFLP		Normal/ normal	Normal/ variante
	Normal/ normal	2	0
	Normal/ variante	0	3

Resultados

PCR in silico

El alineamiento de los cebadores con la secuencia genómica de referencia de *Homo sapiens* permitió predecir los productos de amplificación. Para el factor V, se obtuvo un amplicón específico de 267 pb y uno inespecífico de 557 pb, mientras que, para la protrombina, se observó únicamente un amplicón específico de 506 pb.

Optimización de la PCR: gradiente de temperatura

La amplificación del fragmento del gen del factor V mostró en todas las condiciones una banda específica de 267 pb de buena intensidad en el control positivo. No obstante, se observaron productos inespecíficos en las temperaturas más bajas, que disminuyeron a 58° C (Figura 1, izquierda).

Para la protrombina, el control positivo mostró una banda específica de 506 pb en las tres temperaturas evaluadas (Figura 1, derecha). En todos los ensayos, se incluyó un control negativo (agua), sin observarse amplificación.

Sensibilidad analítica

Se establecieron las cantidades óptimas de ADN molde para la amplificación y la digestión enzimática, adecuadas para la detección de ambos polimorfismos. Para el factor V se emplearon 5 µL de ADN en la PCR y 10 µL del producto amplificado en la digestión (volumen final: 20 µL), mientras que, para la protrombina, se utilizaron 1,5 µL y 6,0 µL, respectivamente (Figura 2).

Especificidad analítica

La evaluación mostró resultados concordantes con los genotipos esperados, observándose los patrones de bandas correspondientes en todos los casos (Tabla V). La técnica optimizada identificó correctamente el 100% de las muestras previamente tipificadas como normal/normal y normal/variante tanto para el factor V de Leiden como para la protrombina G20210A.

Exactitud. Secuenciación

La secuenciación de un fragmento del gen del factor V en las muestras seleccionadas identificó cuatro genotipos homocigotas para el alelo normal (G) y uno heterocigota (G/A) en la posición 41.721, correspondiente al sitio de reconocimiento de la enzima Mnl I. En el caso de la protrombina, se observaron dos genotipos homocigotas normales (A) y tres heterocigotas (A/G) en la posición 25.313, que incluye el sitio de reconocimiento para la enzima Hind III (Tabla VI).

Veracidad

La concordancia entre la técnica PCR-RFLP y la secuenciación de Sanger fue del 100% (10/10 muestras; IC95%: 69,2–100%), sin observarse discrepancias en la asignación de genotipos (Tabla VI). El coeficiente kappa de Cohen fue de 1,00, lo que indica concordancia perfecta entre ambos métodos. Asimismo, el estudio de recuperación (Tabla V) evidenció una concordancia del 100% con los resultados previamente informados por un laboratorio externo mediante PCR-RFLP (30/30

determinaciones; IC95%: 88,4–100%). El valor de kappa obtenido ($\kappa = 1,00$) confirmó una concordancia interlaboratorio perfecta.

Interferencia

En las condiciones optimizadas, ninguno de los factores evaluados mostró interferencias en la detección por PCR-RFLP de las variantes del factor V de Leiden y de la protrombina G20210A.

Robustez y precisión

Las muestras con genotipos homocigotas normales y heterocigotas mostraron 100% de concordancia en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio tanto con el mismo operador como entre operadores.

Discusión

En el presente estudio, se logró optimizar y validar analíticamente una técnica de PCR-RFLP para la detección de dos polimorfismos asociados a trombofilia hereditaria, cumpliendo con el objetivo propuesto de desarrollar un método confiable, accesible y reproducible. La evaluación inicial del análisis *in silico* de la PCR, para el gen del factor V, predijo, además del amplicón esperado, la generación de un producto inespecífico de 557 pb. Sin embargo, dicho producto no fue observado experimentalmente en ninguna de las condiciones evaluadas. No obstante, considerando esta posibilidad teórica, se realizó un gradiente de temperaturas de hibridación que permitió definir temperaturas de alineamiento más específicas que las previamente reportadas para optimizar la especificidad de la reacción y minimizar la eventual formación de productos inespecíficos. Este hallazgo concuerda con lo descrito por Burd¹², quien destaca la importancia de la optimización empírica de las condiciones de PCR en ausencia de protocolos estandarizados universales.

En cuanto al desempeño analítico, la técnica mostró adecuada especificidad, evidenciada por la correcta discriminación de genotipos sin interferencias detectables, en concordancia con los criterios de Jennings¹¹, que destacan la evaluación de reactividad cruzada y de inhibidores en ensayos moleculares. Estos últimos, ya sean compuestos endógenos o exógenos, pueden afectar la actividad de la ADN polimerasa e interferir en la amplificación. Dado que el método de extracción empleado incluye etapas de lisis y purificación orientadas a eliminar estos compuestos, no se observaron efectos adversos, lo que refleja la eficacia del procedimiento.

La sensibilidad analítica se definió en función de la capacidad del método para generar señales interpretables, dependientes de la cantidad de ADN y de la adecuada resolución electroforética. Esta sensibilidad analítica no es equivalente a la sensibilidad clínica o diagnóstica, que resulta pertinente cuando la prueba se utiliza para detectar una enfermedad en una población específica. En este estudio, no se evaluó la sensibilidad diagnóstica, dado que el método está destinado a la detección de polimorfismos asociados a riesgo trombótico

co y no al diagnóstico directo. Por lo tanto, el ensayo aporta información acerca de predisposición genética, cuya interpretación clínica debe realizarse en conjunto con factores clínicos y ambientales¹¹.

Si bien se observó concordancia completa entre la técnica PCR-RFLP, la secuenciación de Sanger y los resultados previamente informados por un laboratorio externo, el reducido número de muestras evaluadas mediante secuenciación limita la precisión de las estimaciones estadísticas y se refleja en la amplitud de los intervalos de confianza obtenidos¹⁷. La cantidad de muestras confirmadas por secuenciación estuvo condicionada por la complejidad operativa y los costos asociados a esta metodología de referencia. No obstante, la ausencia de discrepancias entre los métodos comparados respalda la exactitud analítica de la técnica evaluada¹⁶.

Una limitación del presente estudio fue la ausencia de muestras correspondientes a individuos homocigotas variantes para los polimorfismos evaluados debido a la baja frecuencia de estos genotipos en la población y a la limitada disponibilidad de muestras previamente caracterizadas. En consecuencia, el desempeño analítico del método para esta condición genética no pudo ser verificado experimentalmente. Sin embargo, la validación se realizó utilizando los genotipos normal/normal y heterocigota, que constituyen los genotipos más frecuentemente encontrados en la práctica diagnóstica. Estudios futuros con un mayor número de muestras, que incluyan particularmente genotipos homocigotas variantes, permitirán consolidar la evidencia analítica del método.

Por otra parte, los ensayos de precisión y robustez mostraron una reproducibilidad intralaboratorio óptima, sin variabilidad entre operadores ni entre corridas, lo que respalda la estabilidad operativa del método, incluso considerando las etapas manuales inherentes a los métodos moleculares no automatizados¹². La utilización de un lote maestro de reactivos fabricados conforme a las buenas prácticas de manufactura (ANMAT, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y FDA, Food and Drugs Administration) en alícuotas y conservado en condiciones controladas contribuyó a minimizar fuentes de variación asociadas a la preparación de reactivos fortaleciendo la consistencia de los resultados obtenidos. La concordancia observada entre operadores respalda además, la robustez del método frente a variaciones intralaboratorio, lo que resulta particularmente relevante para su implementación en entornos diagnósticos.

Conclusión

En conjunto, los resultados demuestran que la técnica de PCR-RFLP optimizada constituye una alternativa válida frente a métodos más complejos, como la secuenciación, especialmente en entornos con recursos limitados. No obstante, su aplicación debe circunscribirse a la detección de polimorfismos genéticos evitando extrapolaciones hacia el diagnóstico clínico directo de trombofilia, en línea con el alcance real de la metodología evaluada. La técnica presenta un desempeño analítico adecuado en términos de especificidad, exactitud

y precisión por lo que cumple con los requisitos necesarios para su implementación en el laboratorio. Su utilidad radica en la identificación confiable de variantes genéticas relevantes contribuyendo como herramienta complementaria en la evaluación del riesgo trombótico, sin sustituir la valoración clínica integral del paciente.

Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Referencias Bibliográficas

- Noroña Calvachi CD. Trombofilias hereditarias. Rev Cien Cienc Med. 2015;18(1):43-9. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426041256009>
- Gallo MC, Maneyro A, Altuna D, Ceresetto J, Fassi D, Ferro H, et al. Trombofilias. En: Sociedad Argentina de Hematología, editor. Guías de diagnóstico y tratamiento: hemostasia y trombosis [Internet]. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Hematología; 2023 [citado 2026 Jun 9]. p. 275-83. Disponible en: https://www.sah.org.ar/docs/guias/2023/Hemostasia_y_Trombosis-Guia_2023-Libro.pdf
- Rios M, Fernández-Zenoff V, Hayward C, Suárez A, Rossi E. Study of hereditary thrombophilia (factor V Leiden and prothrombin 20210) in women of fertile age with thromboembolic events studied in the Tucumán public health laboratory. J Cardiol Curr Res. 2020;13(2):35-9, <https://doi.org/10.15406/jccr.2020.13.00471>
- Grande Ratti MF, Posadas-Martínez ML, Vicens J, González Bernaldo de Quirós F, Vázquez FJ, Giunta DH. Incidence of hospital-acquired venous thromboembolic disease. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 2018;75(2):82-7, <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v75.n2.17243>
- Palomo GI, Pereira GJ, Alarcón LM, Pinochet PC, Vélez SM, Hidalgo PP, et al. Factor V Leiden y mutación de protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. Rev Med Chil. 2005;133(12):1425-33, <https://doi.org/10.4067/S0034-98872005001200003>
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature. 1994;369(6475):64-7, <https://doi.org/10.1038/369064a0>
- Vargas Ruíz AG. Trombofilias hereditarias: el perfil de pruebas necesarias. Hematol Mex. 2019;20(2):79-85, <https://doi.org/10.24245/rhematol.v20i2.3096>
- Spector EB, Grody WW, Matteson CJ, Palomaki GE, Bellissimo DB, Wolff DJ, et al. Technical standards and guidelines: venous thromboembolism (factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing). Genet Med. 2005;7(6):444-53, <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000172641.57755.3A>
- Kindermann EHS, Rodrigues Campos K, Caterino-de-Araujo A. Performance of the tetra-primer PCR technique compared to PCR-RFLP in the search for rs12979860 (C/T) and rs8099917 (T/G) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IFNL4 gene. Rev Inst Adolfo Lutz. 2023;82:e39195. Disponible en: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/39195>
- Leotta GA, Chinen I, Epsztejn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, et al. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de Escherichia coli productora de toxina Shiga. Rev Argent Microbiol. 2005;37(1):1-10.
- Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML, College of American Pathologists Molecular Pathology Resource Committee. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(5):743-55, <https://doi.org/10.5858/133.5.743>
- Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):550-76, <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09>

- Yepes-Pérez M, Carrero K, Vásquez N, Correa E. Validación de PCR convencional para detectar Escherichia coli O157. Inf Tecnol. 2022;33(2):3-12, <https://doi.org/10.4067/S0718-07642022000200003>
- Danneberg J, Abbes AP, Bruggeman BJ, Engel H, Gerrits J, Martens A. Reliable genotyping of the G-20210-A mutation of coagulation factor II (prothrombin). Clin Chem. 1998;44(2):349-51, <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.2.349>
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to X174 DNA: the effect of single base pair mismatch. Nucleic Acids Res. 1979;6(11):3543-57, <https://doi.org/10.1093/nar/6.11.3543>
- Cardona-Ramírez C, Enríquez-Valencia CE, Méndez-Callejas G, Meza Barreto G, Tafur-Gómez GA, Sanjuanelo-Corredor DW. An integrated methodological framework for the validation and verification of clinical testing by qRT-PCR. Heliyon. 2025;11(1):e41088, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e41088>
- Yusuf E, Schijffelen MJ, Leeftang MMG. How to verify and validate a clinical microbiology test before it can be used in routine diagnostics: a practical guide. Clin Microbiol Infect. 2024;30(10):1261-9, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2024.06.028>



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución -No Comercial. Compartir Igual 4.0 Internacional. Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (mezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.