

VOL 82 - Nº1
Enero - Abril de 2018
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Bioquímica y Patología Clínica



Emil Adolph von Behring
primer Premio Nobel de Medicina y Fisiología.

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina.
Publicación cuatrimestral.



MicroScan



Microbiología Automatizada

Identificación y Sensibilidad

Microscan responde a las necesidades de atención eficaz de los pacientes mediante resultados automatizados rápidos de ID/AST sin reducir la exactitud.



WalkAway 40 Plus



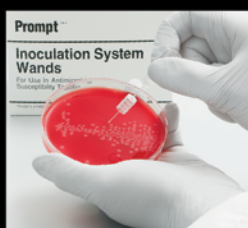
WalkAway 96 Plus



autoSCAN4

Sistemas MicroScan

La línea se completa con múltiples opciones de paneles que han sido adaptados a la epidemiología local, de tipo Combo (ID/AST), solo CIM y solo identificación. También Paneles para identificación de levaduras, anaerobios y fastidiosos y Paneles especiales para sensibilidad de Microorganismos exigentes.



Selección de colonias con PROMPT

Estandarización de inóculos sin pérdida de tiempo por turbidez gracias al sistema de inoculación PROMPT™.



Preparación de inóculos con PROMPT

La estabilidad del inóculo de hasta cuatro horas flexibiliza el flujo de trabajo.



Inoculación de panel con RENOK

La inoculación simultánea de los 96 pocillos del panel simplifica el flujo de trabajo.

LabPro Software Suite

La mejora de la gestión de datos con el conjunto de aplicaciones de LabPro promueve la eficacia en el laboratorio al agilizar al flujo de trabajo y facilitar el acceso a la información del paciente. LabPro Manager, LabPro Alert y LabPro Connect en forma conjunta, le ayudan a estandarizar y consolidar las pruebas, adaptar la creación versátil de informes de resultados y aumentar su capacidad para identificar la emergencia de nuevas resistencias.



BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

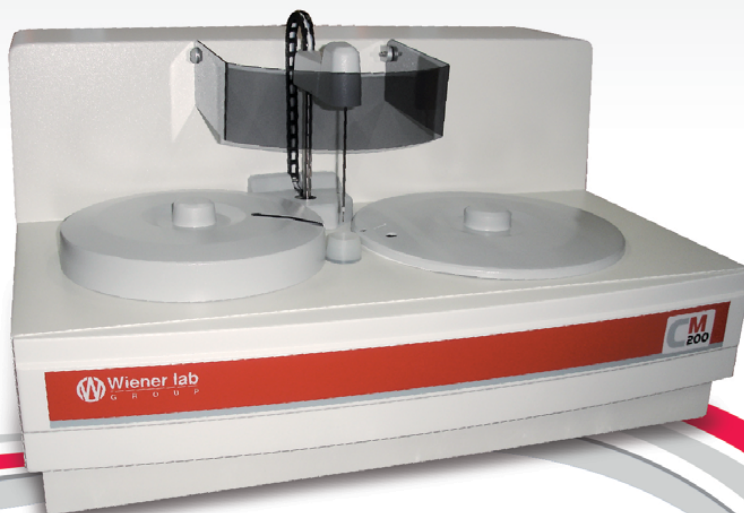
info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

CM 200

¿Qué haría Ud. con 2 horas más 5 veces a la semana?

**Analizador automático
para bioquímica clínica**

- › Velocidad: 200 test/h
- › Consumo de agua: <0,5 litros/h
- › Posiciones para muestra: 48
- › Posiciones para reactivos: 48
- › Capacidad para resolver urgencias
- › Dilución automática de muestras
- › Control de calidad



El **CM200** es el primer instrumento diseñado específicamente para ser la "primera elección" en el momento que Ud. decida automatizar su rutina de Química Clínica.

De manejo sencillo y amigable, con capacidad para procesar hasta 200 test/hora, le asegura años de servicio de rendimiento excelente. Y lo más importante: **sin complicaciones**.

No obstante, es bueno saber que **Wiener lab.** cuenta con la **mayor red de distribución, asistencia técnica y asesoramiento bioquímico del país**. Que todos nuestros reactivos han sido **completamente adaptados al instrumento** siguiendo todas las normativas internacionales y que finalmente, el **CM200 está integralmente producido en la Argentina** por la empresa que lo acompañó desde siempre.

Consulte por nuestra oferta especial y planes de financiación en pesos.

Y vaya pensando qué hacer en su nuevo tiempo libre



Asistencia Técnica WL



www.wiener-lab.com
marketing@wiener-lab.com



Wiener Laboratorios SAIC
Riobamba 2944,
S2003GSD Rosario, Argentina
Tel.: +54 341 4329191/6

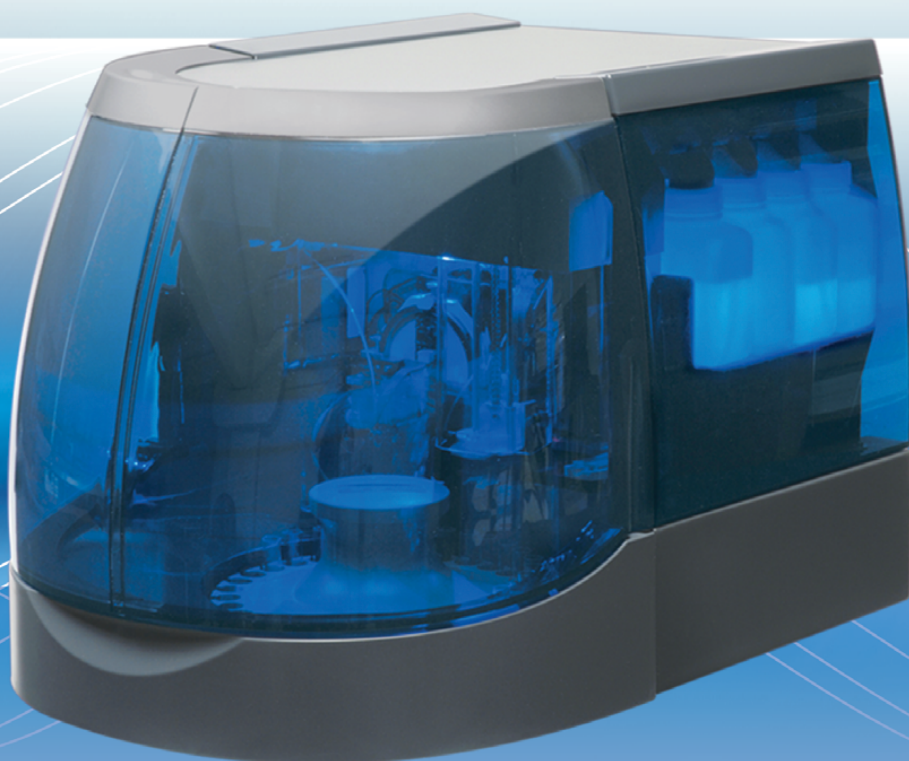
Moreno 1850, 2° piso,
C1094ABB Buenos Aires, Argentina
Tel.: +54 11 43754151/4

 **Wiener lab**
G R O U P
www.wiener-lab.com

MINICAP

**UNA NUEVA DIMENSION EN
ELECTROFORESIS CAPILAR**

ÚLTIMA GENERACIÓN



MINICAP

30 tests / hora.

Dos muestras simultáneas.

Tubo primario.

Lector de códigos de barra.

Completa trazabilidad de muestras

**Transferencia de resultados vía
módem.**

Proteínas

Inmunotyping

Proteínas Alta Resolución

Hemoglobina

CDT

Orinas.

sebia

Sucursal Buenos Aires
Aráoz 86 | C1414DPB | C. A.B.A. | Argentina
Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876 | Fax: 54-11 4856-5652
bga@bganalizadores.com.ar - www.bganalizadores.com.ar


Sucursal Neuquén
Santa Cruz 1629 | CP 8300
Neuquén | Argentina | Tel.: 0299-4471385
bganqn@bganalizadores.com.ar




BG Analizadores
Soluciones Personalizadas

Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina

SUMARIO

- Pág. 11 **Evaluación de la intervención bioquímica para la mejora en el diagnóstico de Chagas congénito en un hospital general**
Evaluation of the biochemical intervention for the improvement of the diagnosis of congenital Chagas in a general hospital
Tkach, Agustina; Delgado, Victoria
- Pág. 14 **Novedoso inmunoensayo multiplex por Citometría de Flujo para la detección simultánea y discriminativa de GADA e IA-2A en pacientes con Diabetes Mellitus**
Novel Flow Cytometric Multiplex Immunoassay for the simultaneous and discriminative detection of GADA and IA-2A in patients with Diabetes Mellitus
Guerra, Luciano Lucas; Faccinetti, Natalia Inés; Bombicino, Silvina Sonia; Rovitto, Bruno David; Sabljic, Adriana Victoria; Trabucchi, Aldana; Penas Steinhart, Alberto; Poskus, Edgardo; Iacono, Ruben Francisco; Valdez, Silvina Noemí
- Pág. 27 **Detección molecular de *Trypanosoma cruzi*. Experiencia en un hospital público**
Molecular detection of *Trypanosoma cruzi*. Experience in a public hospital
Irurtia, María Cecilia; Magdaleno, María Alejandra; Peluffo, Graciela; Di Bartolomeo, Susana; Montenegro, Graciela
- Pág. 34 **Experiencia argentina de Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) con biopsia de trofoblasto**
Argentine experience of preimplantation genetic diagnosis (PGD) with trophoblast biopsy
Coco, Roberto; Coco, Fabian; Mincman, Judith; Mondadori, Andressa; Montel Mendonza, Gabriela; Santomé, Matías; Altamirano, Belen; Gismondi, Fernando; Neuspiller, Nicolás
- Pág. 45 **Utilidad de la glucosa 1-hora post-carga para la evaluación del riesgo de diabetes y sus complicaciones asociadas**
One hour postload glucose and its clinical use to evaluate diabetes risk and its associated complications
Meroño, Tomás; Alonso Elizabeth; Kabakian, Laura; Santucci, María Pía; Muzzio, María Luz
- Pág. 57 **Evaluación mediante los estados vaginales básicos de la disfunción vaginal según diferentes factores de riesgo y caracterización de la microbiota lactobacilar**
Evaluation through the basic vaginal states of the vaginal dysfunction according to different risk factors and characterization of the lactobacilar microbiota
Perazzi, Beatriz Elizabeth; Maldonado, Verónica; Losada, Mirta; Susuki, Verónica; Diaz Altuzarra, María del Carmen; Cocucci, Silvina; Rodriguez, Ana Paula; Montalvo, Eduardo; Ocampo, Pamela; Cora Eliseht, Martha; Provenzano, Sergio; Vay, Carlos; Tatti, Silvio; Famiglietti, Angela
- Pág. 71 **Cursos**



TAPA

El primer premio nobel de medicina y fisiología, Emil Adolph von Behring

Nacido en Hansdore, Prusia Oriental, el 15 de marzo de 1854.

El Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1901 fue otorgado a Emil von Behring por su trabajo en la terapia sérica, especialmente su aplicación contra la difteria, por la cual ha abierto un nuevo camino en el campo de la ciencia médica y por lo tanto puesto en manos del médico un arma victoriosa contra las enfermedades

Fuente: Nobel Foundation (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1901/index.html)

Bioquímica y Patología Clínica

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP {1096}
Buenos Aires - Argentina
Tel/ fax: 4384-7415 / Tel: 4381-2907
e-mail: info@aba-online.org.ar
www.aba-online.org.ar
Registro Nacional de Derechos de Autor N° 034772
Publicación cuatrimestral

COMISIÓN DE REVISTA

Director:

Dr. Fernando D. Brites

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

Secretario Científico:

Dr. Jaime Kovensky

Hospital Arturo U. Illia, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Carrera de Medicina, Universidad Nacional de la Matanza. Argentina.

Comité Editorial:

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Hospital Carlos G. Durand. Hospital Italiano de Buenos Aires. Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

Dra. María Laura D'Ámbrosio

Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Argentina.

Dra. Isabel Desimone

Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Universidad Kennedy. Argentina.

Dra. Cecilia Gasco

Hospital Carlos G. Durand. Argentina.

Dr. Julián Verona

Hospital de Balcarce Dr. Felipe A. Fossati. Argentina.

Correctoras:

Lic. Inés Carozza (Castellano)

Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés)

Secretarios Administrativos:

Sr. Gastón Goldberg

Sr. Jorge Signorelli

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA - Fundada el 3 de septiembre de 1934

COMISION DIRECTIVA

Presidente: Dra. Silvia B. González

Vicepresidente: Dra. Patricia Otero

Secretaria: Dra. Viviana Osta

Tesorera: Dra. Isabel Desimone

1° Vocal Titular: Dr. Orlando G. Carballo

2° Vocal Titular: Dr. Alberto Villagra

3° Vocal Titular: Dra. María José Rial

1° Vocal Suplente: Dra. María Rugiero

2° Vocal Suplente: Dr. Eduardo Mormandi

3° Vocal Suplente: Dr. Santiago Fares Taie

COMISION REVISORA DE CUENTAS

Titular 1°: Dra. Silvia Morilla

Titular 2°: Dra. Estella Meyer

Titular 3°: Dra. Silvia Cajiao

1° Vocal Suplente: Dra. Graciela Astarita

2° Vocal Suplente: Dra. Claudia Ayuso

COMISIONES INTERNAS

PRENSA Y DIFUSIÓN

Presidente: Dra. Laura Colitto

Secretario: Dr. Santiago Fares Taie

Vocales:

Dr. Eduardo Mormandi

CERTIFICACION

Presidente: Dr. Alberto Villagra

Secretario: Dra. Viviana Osta

Vocales:

Dra. María José Rial

CURSOS

Presidente: Dra. Silvia González

Secretaria: Dra. María Soledad Caldirola

Vocales:

Dra. María de la Paz Domínguez

Dra. Liliana Maggi

Dra. María José Rial

Dra. Alejandra Svartz

Dra. Marysia Szefer

COMITÉ CIENTÍFICO ASESOR

Dra. Mónica Aixalá

Dr. Gloria Alvarez

Dra. Liliana Arias

Dra. Alicia Blanco

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Silvia González

Dr. Gabriel Migliarino

Dr. Eduardo Mormandi

Dra. Raquel Osatinsky

Dr. Jorge Rey

Dra. María José Rial

Dra. Sandra Rozental

Dra. Gabriela Santizo

Dra. Nora Slobodianik

PREMIOS Y DISTINCIONES

Dra. Alicia Blanco

Dr. Fernando Brites

Dra. Nilda Fink

Dr. Nestor Litwin

Dra. Raquel Osatinsky

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES DE BIOQUÍMICA Y PATOLOGÍA CLÍNICA, REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Bioquímica y Patología Clínica (ByPC), Revista de la Asociación Bioquímica Argentina, tiene el objetivo de difundir artículos inéditos y originales relacionados con aplicaciones de la bioquímica clínica en todas sus especialidades en el campo asistencial y de investigación clínica humana, así como en bioquímica animal y vegetal. ByPC está destinada a todos los profesionales de la salud interesados en estas áreas. ByPC se publica cuatrimestralmente en ambos formatos, impreso (ISSN 1515-6761) y electrónico (ISSN 2250- 5903), sin costo para los autores y no posee propósitos comerciales.

La Comisión de Revista de ByPC está integrada de la siguiente manera:

Director:

Dr. Fernando D. Brites. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

Secretario Científico:

Dr. Jaime Kovensky. Hospital Arturo U. Illia, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Carrera de Medicina, Universidad Nacional de la Matanza. Argentina.

Comité Editorial:

Dr. Orlando Gabriel Carballo. Hospital Carlos G. Durand. Hospital Italiano de Buenos Aires. Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

Dra. María Laura D' Ambrosio. Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Argentina.

Dra. Isabel Desimone. Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Universidad Kennedy. Argentina.

Dra. Cecilia Gasco. Hospital Carlos G. Durand. Argentina.

Dr. Julián Verona. Hospital de Balcarce Dr. Felipe A. Fossati. Argentina.

Correctoras:

Lic. Inés Carozza (Castellano).

Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés).

Secretarios Administrativos:

Sr. Gastón Goldberg.

Sr. Jorge Signorelli.

Los trabajos enviados a la Revista ByPC no deben haber sido publicados en otra revista u órgano de difusión científica nacional o extranjero, tanto en forma impresa como electrónica. Para la preparación de manuscritos, se siguen los requerimientos del International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) disponible en <http://www.icmje.org>. Se pueden consultar guías para publicaciones en <http://www.equatornetwork.org>, en castellano en <http://www.espanol.equator-network.org>. Una vez aprobada la publicación del trabajo, ByPC retiene los derechos de su reproducción total o parcial. Quienes deseen reproducir material publicado en la revista deben solicitar permiso a ByPC. Igualmente, para incluir material de otras fuentes con derechos de autor en artículos a publicar en la revista, se debe obtener el correspondiente permiso, y adjuntar copia del mismo al artículo propuesto para publicación. Para mayor información respecto a los derechos de los autores, se recomienda consultar el documento disponible en <http://www.accesoabierto.net/es/node/62>.

1. Descripción del proceso de revisión y edición

La modalidad de revisión es por pares académicos a doble ciego. Específicamente, la Comisión de Revista realiza una primera evaluación del trabajo recibido y lo envía a 2 revisores, quienes deben ser especialistas reconocidos en el área de incumbencia del trabajo y no deben pertenecer a la misma institución de los autores ni guardar alguna relación conocida con los mismos. Los artículos son enviados a los revisores sin el nombre de los autores, lugar de trabajo, dirección de correspondencia, ni los agradecimientos. Los revisores reciben el trabajo completo acompañado de un formulario guía para la realización de la revisión con tópicos que la Comisión de Revista considera imprescindibles para elaborar el dictamen final. La evaluación efectuada por los revisores debe ser remitida a la Comisión de Revista dentro de los 30 días. El dictamen de los revisores es reservado, así como su identidad, y debe fundamentarse de modo explícito. En caso de discrepancia en el dictamen de los revisores, la Comisión de Revista acudirá a un tercer revisor que cumpla los mismos requisitos que los anteriores. El dictamen es decidido por la Comisión de Revista y es comunicado a los autores. Los resultados del dictamen pueden ser: a) Aceptación sin necesidad de modificaciones adicionales; b) Sugerencia de cambios mayores; c) Sugerencia de cambios menores; y d) Rechazo. Las críticas efectuadas al trabajo, así como un eventual rechazo deben estar debidamente justificados. Los resultados de la evaluación son inapelables.

Una vez que el trabajo ha sido aceptado y se ha efectuado la comunicación a los autores, se procede a la corrección de estilo y ortográfica del mismo, tanto en castellano como en inglés. A continuación, se elabora la prueba de galera, la cual es enviada a los autores, junto con instrucciones para efectuar la corrección de la misma. Los autores cuentan con 5 días hábiles para devolver la prueba de galera corregida.

2. Requisitos para la remisión de manuscritos

- Doble espacio en todas las partes del manuscrito.
- Empezar cada sección o componente en una nueva página.
- Revisar la secuencia: título; autores; lugares de trabajo; datos del autor de correspondencia; resumen y palabras clave en castellano; título, resumen y palabras clave en inglés americano; introducción; materiales y métodos; resultados; discusión; agradecimientos, referencias bibliográficas, leyendas de las figuras; tablas; y figuras (cada uno en páginas separadas).
- Las ilustraciones no deben ser más grandes que 203 x 254 mm.
- Incluir los permisos para reproducir material publicado previamente o usar ilustraciones que pueden identificar a las personas.
- Incluir las transferencias de derechos de autor y otras solicitudes.

3. Carta

Carta dirigida al Director de la Revista en la cual se solicita la publicación del artículo. Debe contener el título del trabajo, categoría a la cual pertenece (ver ítem 4), nombre y apellido de todos los autores, dirección, teléfonos y dirección de e-mail del autor de contacto, una dirección de e-mail alternativa, una frase con valor de declaración jurada en la que se manifieste que el artículo cumple con todos los requisitos de publicación en ByPC, y que la última versión del manuscrito ha sido leída y aprobada por todos los autores.

Los trabajos deberán ser enviados por e-mail a la dirección: revista@aba-online.org.ar.

4. Categorías a las cuales deberán ser presentados los trabajos

- a) Artículos originales.
- b) Casos clínicos.
- c) Revisiones.
- d) Cartas al Editor.
- e) Informes.
- f) Guías o Consensos.

5. Preparación de los manuscritos

5.1. Generalidades:

El archivo deberá ser nombrado solamente con el apellido del primer autor y la leyenda “y col.” si correspondiese [Ej.: Pérez y col.]. El texto debe estar dividido en secciones con los títulos de Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Los artículos extensos pueden requerir subtítulos dentro de algunas secciones (especialmente en las secciones de Resultados y Discusión) para aclarar sus contenidos. Debe estar escrito en procesador de texto Word, en tamaño de página A4, con márgenes de al menos 25 mm, empleando letra Arial tamaño 12. Usar doble espacio, incluyendo la página del título, resumen, texto, agradecimientos, referencias bibliográficas, tablas individuales y leyendas. Numerar las páginas consecutivamente empezando con la página del título. Poner el número de la página en la esquina inferior derecha de cada página.

5.2. La primera página debe contener:

- a) El título que debe ser conciso pero informativo.
- b) El apellido y luego, separado por coma, los nombres completos de los autores, lo cual debe ir seguido de punto y coma, y los datos del siguiente autor. A continuación del nombre de cada autor, se debe colocar, a modo de superíndice, el número que haga referencia al lugar de trabajo al que pertenece dicho autor. El autor al cual debe ir dirigida la correspondencia debe ser destacado con un asterisco también a modo de superíndice [Ej.: Ramírez, Juan Carlos^{1*}; Benítez, Laura²; Romero, Mario¹.].
- c) Cada lugar de trabajo con el número asignado al autor correspondiente. No se deben emplear abreviaturas. Debe constar primero el nombre del servicio o laboratorio, luego el correspondiente al departamento y por último el de la institución, todo separado por comas y seguido de punto. A continuación, se debe incluir el nombre de la ciudad, la provincia y el país, también separados por comas y con punto final [Ej.: Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.].
- d) Descargos, si hubiere.
- e) Nombre completo del autor responsable de recibir la correspondencia, su lugar de trabajo, la dirección postal, y la dirección de e-mail.
- f) Fuente (s) de financiamiento en la forma de betas, equipos, medicamentos o todos estos.

5.3. La segunda página debe contener:

- a) El resumen en castellano de no más de 250 palabras. Debe estar estructurado de la siguiente manera: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones. Se deben incluir dichos subtítulos de manera explícita. El resumen debe establecer los propósitos del estudio o investigación, procedimientos básicos (selección de los sujetos de estudio o animales de laboratorio; métodos de observación y analíticos), los hallazgos principales y las conclusiones más relevantes. Debería enfatizarse en los aspectos nuevos e importantes del estudio u observaciones. Se recomienda incluir los valores correspondientes a los hallazgos más relevantes acompañados de la forma de expresión de los mismos [Ej.: Media $\pm$ D.E.] y el tratamiento estadístico, si correspondiese. En el resumen no se deben utilizar abreviaturas.
- b) Palabras clave. Los autores deben colocar, e identificar como tales,

tres a diez palabras clave o frases cortas que servirán para la indicación cruzada del artículo y deben ser publicadas con el artículo.

5.4. La tercera página debe contener:

- a) Título en inglés americano. Debe cumplir los mismos requisitos que el título en castellano.
- b) Resumen en inglés americano (Abstract). Debe cumplir los mismos requisitos que el resumen en castellano e incluir los siguientes subtítulos: *introduction, objectives, materials and methods, results y conclusions*.
- c) Palabras clave en inglés americano (Key words). Deben cumplir los mismos requisitos que las palabras clave en castellano.

5.5. Las páginas subsiguientes, comenzando cada sección en página aparte, deben contener:

- a) Introducción. En la introducción, se debe expresar el contexto o los antecedentes del estudio (por ejemplo, la naturaleza del problema y su importancia) y enunciar el propósito específico u objetivo de la investigación o la hipótesis que se pone a prueba en el estudio u observación. A menudo, la investigación se centra con más claridad cuando se plantea como pregunta. Tanto los objetivos principales como los secundarios deberán estar claros, y deberá describirse cualquier análisis de subgrupos predefinido. Se deben incluir sólo las referencias que sean estrictamente pertinentes y no añadir datos o conclusiones del trabajo que se presenta.
- b) Materiales y Métodos. Debe describir detalladamente los sujetos experimentales, el equipamiento, los reactivos y los procedimientos utilizados, con la inclusión de las marcas registradas cuando corresponda y referencias al utilizar métodos establecidos. Indicar las consideraciones éticas que correspondan si han participado en el estudio seres humanos (Aprobación por comités de ética y obtención de consentimiento informado). Se recomienda dividir la sección Materiales y Métodos mediante el empleo de subtítulos en el caso de ser demasiado extenso. Incluir una sección de “Análisis de datos” en la cual se describan las formas de expresión de los resultados y los métodos estadísticos empleados, si correspondiese. Estos deben ser descriptos con suficiente detalle para permitir que un lector experto con acceso a los datos originales pueda comprobar los resultados que se presentan. Cuando sea posible, cuantificar los hallazgos y presentarlos con los indicadores de medida de error o de incertidumbre adecuados (como los intervalos de confianza). Evitar basarse únicamente en la comprobación de hipótesis estadísticas, como el uso de valores P, que no dan información sobre la magnitud del efecto. Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos deberán corresponder a manuales o artículos clásicos (con los números de página incluidos). Definir también los términos estadísticos, abreviaturas y la mayoría de símbolos. Especificar el *software* utilizado.
- c) Resultados. Presentar los resultados siguiendo una secuencia lógica en el texto, tablas e ilustraciones, y destacando en primer lugar los hallazgos más importantes. No repetir en el texto los datos de las tablas o ilustraciones; resaltar o resumir sólo las observaciones más importantes. Los materiales extra o suplementarios y los detalles técnicos pueden situarse en un anexo donde se puedan consultar para no interrumpir la secuencia del texto. Cuando los datos se resumen en este apartado, los resultados numéricos no sólo deben presentarse los derivados (por ejemplo, porcentajes), sino también los valores absolutos a partir de los cuales se calcularon, y especificar los métodos estadísticos utilizados para analizarlos. Limitar el número de tablas y figuras a las estrictamente necesarias para ilustrar el tema del artículo y para evaluar su grado de apoyo. Usar gráficos como alternativa a las tablas con muchas entradas; no duplicar datos en los gráficos y tablas. Evitar usos no técnicos de términos estadísticos, como “azar” (que implica un dispositivo de aleatorización), “normal,” “significativo,” “correlaciones” y “muestra”. Cuando

sea científicamente adecuado, incluir análisis en función de variables como la edad y el sexo.

d) **Discusión.** Destacar los aspectos más novedosos e importantes del estudio y las conclusiones que de ellos se deducen, contextualizándolos en el conjunto de las evidencias más accesibles. No repetir en detalle datos u otro material que aparezca en la Introducción o en el apartado de Resultados. En el caso de estudios experimentales, es útil empezar la discusión resumiendo brevemente los principales resultados; a continuación, explorar los posibles mecanismos o explicaciones de dichos hallazgos, comparar y contrastar los resultados con los de otros estudios relevantes, exponer las limitaciones del estudio, y explorar las implicaciones de los resultados para futuras investigaciones y para la práctica clínica. Relacionar las conclusiones con los objetivos del estudio, evitando hacer afirmaciones rotundas y sacar conclusiones que no estén debidamente respaldadas por los datos. En particular, evitar afirmaciones sobre los costes y beneficios económicos a menos que el manuscrito incluya datos económicos con sus correspondientes análisis. Evitar afirmaciones o alusiones a aspectos de la investigación que no se hayan llevado a término. Cabe la posibilidad de establecer nuevas hipótesis cuando tengan base, pero calificándolas claramente como tales.

e) **Agradecimientos.** Una o más declaraciones deben especificar [a] Las contribuciones que necesitan agradecerse pero que no justifican una autoría, tales como apoyo general por una jefatura de departamento; [b] Agradecimientos al apoyo técnico; [c] Agradecimiento al apoyo financiero y material, que debe especificar la naturaleza del apoyo; [d] Las relaciones que pueden tener un conflicto de intereses. Las personas que han contribuido intelectualmente al artículo, pero cuyas contribuciones no justifican una autoría, pueden ser mencionadas y sus funciones o contribuciones pueden ser descritas -por ejemplo, “asesor científico”, “revisión crítica de los propósitos del estudio”, “recolección de información” o “participación en el ensayo clínico”; tales personas deben haber dado sus permisos para ser mencionadas. Los autores son responsables de obtener los permisos escritos de las personas a quienes se agradece, porque los lectores pueden inferir su endosamiento de la información y conclusiones. La ayuda técnica debe ser agradecida en un párrafo aparte de los agradecimientos de otras contribuciones.

6. Aspectos que deben tenerse en cuenta en la redacción del manuscrito (Normas Vancouver actualizadas al 2016)

6. 1. Citas bibliográficas:

Es la presentación textual o resumida, de ideas expresadas por otros autores que sirven de apoyo al investigador, se contraponen a lo que él dice o aportan mayor información sobre un tema determinado. Las citas son un tipo de texto incrustado en otro texto.

Las citas en estilo Vancouver por lo general utilizan un sistema de secuencia numérica. Son numeradas consecutivamente en el orden de aparición en el texto. Se identifican con números arábigos entre corchetes, ejemplo [1].

a) Tipo de citas

- Cita directa: La que se transcribe textualmente. Ejemplo: “La cita textual breve, de menos de cinco renglones, se inserta dentro del texto entre comillas, y el número correspondiente se coloca al final, después de las comillas y antes del signo de Puntuación” [3].

- Cita corta: Menos de cinco renglones.

- Cita larga: Más de cinco renglones. Se escribe fuera del texto, dejando doble espacio y sangría, entre comillas y en bastardilla.

- Cita indirecta: Mención de las ideas de un autor con palabras de quien escribe. Se escribe dentro del texto sin comillas, el número de la referencia se escribe inmediatamente después de citar su idea. Ejemplo: La mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín [5].

b) Tipo de cita según redacción

- Cita integral: Es aquella donde el nombre del autor forma parte de la oración. El nombre se integra dentro del texto. El número de la referencia se escribe después del apellido del autor y antes de citar su idea. Ejemplos:

Como dice Londoño [5] la mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín. Cita Indirecta

Según Sanz Pinyol [1] “Desde el punto de vista de la caracterización de los discursos, en el aula suelen producirse diferentes géneros” Cita directa

- Cita no integral: No se menciona el nombre del autor dentro del texto. Ejemplos:

La mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín [5]. Cita Indirecta

“Desde el punto de vista de la caracterización de los discursos, en el aula suelen producirse diferentes géneros” [1]. Cita directa

6. 2. Referencias bibliográficas:

- Conjunto de datos suficientemente detallados que permite identificar un documento. Deben ser numeradas consecutivamente en el orden en que son mencionadas en el texto. Identificar las referencias en el texto, cuadros y leyendas con números arábigos entre corchetes. Las referencias citadas sólo en los cuadros o en las leyendas de las figuras deben ser numeradas de acuerdo con la secuencia establecida por la primera identificación en el texto del cuadro o figura particular.

- Usar el estilo basado en los formatos utilizados por el US National Library of Medicine (NLM) en el Index Medicus. Los títulos de las revistas deben ser abreviados de acuerdo al estilo que utiliza el Index Medicus. Consultar la lista de revistas indizadas en el Index Medicus, publicado anualmente como una separata por la NLM y como una relación en el volumen del mes de enero del Index Medicus.

- Evitar el uso de los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos aceptados pero no publicados deben ser designadas como “en prensa” o “en avance”; los autores deben obtener permiso por escrito para citar tales artículos así como la verificación de que ellos han sido aceptados para publicación. La información de los manuscritos remitidos pero no aceptados debe ser citada en el texto como “observaciones no publicadas” con el consentimiento escrito de los autores.

- No citar una “comunicación personal” a menos que proporcione información esencial no disponible de una fuente pública, en cuyo caso el nombre de la persona y la fecha de la comunicación deben ser citados entre paréntesis en el texto. Para los artículos científicos, los autores deben obtener permiso por escrito y confirmación de exactitud de la fuente de la comunicación personal.

- Las referencias deben ser verificadas por el autor o autores en los documentos originales.

- El estilo de Requisitos Uniformes (de Vancouver) se basa principalmente en el estilo estándar ANSI adaptado por la NLM para su base de datos.

a) Artículos de revistas

- Mencionar los seis primeros autores seguidos por et al (Nota: la NLM ahora menciona hasta 25 autores; si hay más de 25 autores, la NLM menciona los 24 primeros, luego el último autor seguido de et al): Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreaticobiliary disease. Ann Intern Med 1996;jun 1; 124 [11]: 980-3.

Como una opción, si una revista lleva paginación continua a través de un volumen (como muchas revistas médicas lo hacen), el mes y el número del volumen pueden ser omitidos: Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreaticobiliary disease. Ann Intern Med 1996; 124: 980-3.

- Más de seis autores:

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

•La organización como autor:

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guide-lines. Med J Aust 1996; 164:2824.

•Sin autor mencionado:

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J 1994; 84: 14.

•Artículo no escrito en inglés:

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral inftapatellar seneruptur hos tidligere frisk kv-inne. Tdsskr Nor Laegeforen 1996; 116: 412.

•Volumen con suplemento:

Shen M Zhang QF. Risk assesement of nikel carcinogenicity and occupational lung cancer Environ Health Perspect 1994; 102 Suppl 1: 275-82.

•Número con suplemento:

Paybe DK, Sullivan ME, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol 1996; 23 [1 Suppl 2: 89-97].

•Volumen con parte:

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

•Número con parte

People GH, Mills SM. One Hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. N Z Med J 1994; 107 [986 PH]: 377-8.

•Número sin volumen

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

•Sin número, ni volumen:

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. Curr Opin Gen Surg 1993; 325-33.

•Compaginación en números romanos:

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

•Tipo de artículo indizado tal como es requerido:

Enzensberger W, Fischer PA. Metronome in Parkinson's disease [carta]. Lancet 1996; 347 1337.

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

•Artículo conteniendo una retractación:

Garcy CE, Schwarzman AL, Rise ML. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retraction of Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML. In: Nat Genet 1994; 6: 426-31]. Nat Genet 1995; 11: 104.

•Artículo retractado:

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expresion during mouse development [retractado en Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35: 31271. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35: 1083-8.

•Artículo con errata publicada:

Hamlim JA, Kahn AM. Herniorraphy in symptomatic patients following inguinal hernia repair [publicado con errata en West J Med 1995; 162: 2781]. West J Med 1995; 162 28-31.

b) Libros y otras monografías

•Autor (o autores) personal:

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

•El editor(es), compilador(es) como autor:

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

•Una organización como autor y editor:

Institute of Medicine [US]. Looking at the future of the Medical program. Washington (DC): The Institute; 1992].

•Un capítulo en un libro:

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

•Libro de congreso:

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 199 Oct 1519; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

•Ponencia de un congreso:

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degouler P, Piemme TE, Rienhoff O, editors MEDINFO 92 m Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10, Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

c) Informe científico o técnico

•Emitido por la agencia financiante o auspiciadora:

Smith P, Golladay K Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Oficce of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report N° HHSIGOEI69200860.

•Emitido por la agencia ejecutante:

Field MJ, Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract N°AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

d) Disertación

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

e) Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignance. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5.529,067, 1995 Jun Material publicado.

f) Artículo de periódico

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 5000 admissions annually. The Washington Post 1996; jun 21; Sect. A:3 [col5].

g) Material audiovisual

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

c) Material legal

h) Ley Pública

Preventive Health Amendments of 1993, PubL. N° 103-183, 107 Stat, 2226 [Dec. 14, 1993].

i) Dispositivo no decretado

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

j) Código de regulaciones federales

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441. 257 [1995].

k) Material inédito

•En prensa o "en avance":

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Eng J Med. En prensa 1997

l) Material electrónico

•Artículo de una revista en formato electrónico:

Morse SS. Factors in the emergence of infections diseases. Emerg Infect Dis [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5], 1(1): [24 screens]. Available from: VRL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

•Monografía en formato electrónico:

CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM]. Reeves JRT, Malbach H, CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 20. San Diego: CMEA; 1995.

•Archivo computarizado:

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

7. Tablas

Todas las tablas deben agruparse a continuación de las leyendas de las figuras, cada una en página separada. Deberán estar numeradas secuencialmente con números romanos, contener un título y aclaraciones al pie de la tabla, si fuese necesario. Al pie de cada tabla debe figurar la aclaración de las abreviaturas empleadas, así como toda la información relacionada con la forma de expresión de los resultados y el tratamiento estadístico que los autores consideren necesaria. Las tablas deben ser comprensibles por sí mismas. Para la elaboración de las tablas, se recomienda utilizar el procesador de texto Word y seleccionar el Estilo de Tabla "Tabla básica 1".

8. Figuras

Todas las figuras deben agruparse a continuación de las tablas, cada una en página separada. Deberán estar numeradas secuencialmente con números arábigos. Las fotografías y las figuras podrán tener colores, aunque en el caso de las figuras el fondo debe ser blanco. El título de las figuras no debe incluirse junto a las mismas sino en la sección "Leyendas de Figuras". En dicha leyenda debe incluirse el título de la figura, la aclaración de las abreviaturas empleadas y toda la información relacionada con la forma de expresión de los resultados y el tratamiento estadístico que los autores consideren necesaria. En caso de figuras, fotografías o tablas tomadas de otra publicación, se debe citar la fuente y además enviar el permiso escrito otorgado por el propietario intelectual de dicho material para que el mismo sea publicado en ByPC.

9. Revisiones, cartas al editor, informes guías y consensos

Las revisiones, cartas al editor, informes guías y consensos serán usualmente solicitados por el Comité Editorial de la Revista a autores considerados expertos en el campo, la disciplina o la especialidad en cuestión. Sin embargo, serán consideradas para su publicación las que fueran enviadas espontáneamente. Deberán seguir los lineamientos expuestos para la publicación de artículos originales, con la diferencia de que su texto no necesitará contar con resultados y discusión. En el caso particular de las revisiones, deben contener un mínimo de 20 referencias bibliográficas completas y actualizadas a los fines del tema tratado.

10. Ortografía y formas de expresión

- Se debe evitar la utilización de palabras en otros idiomas y, cuando ello sea indispensable, deberán ser colocadas en *italica* (Ej.: *in vitro*).
- El estadístico "p" debe ser escrito en minúscula.
- En la expresión de los resultados, se debe dejar espacio entre la cifras y los símbolos o las unidades (Ej.: $p < 0,05$; 32 ± 2 g/l).
- Unidades: se deben emplear las unidades utilizadas más frecuentemente en nuestro medio para cada analito (Ej.: glucosa, urea, ácido úrico, lípidos, lipoproteínas, apoproteínas en mg/dl).
- Las abreviaturas deben ser aclaradas la primera vez que aparecen en el texto ubicándolas entre paréntesis, a pesar de que se trate de abreviaturas ampliamente conocidas (Ej. hemoglobina [Hb.]). A su vez, siempre deben ir seguidas de un punto.
- En la expresión de los resultados, tanto la media como la mediana deben contener la misma cantidad de decimales que sus respectivos desvíos estándar, errores, percentilos o rangos (Ej. $9,25 \pm 0,78$).
- En la expresión de los resultados, la separación entre el entero y los decimales se debe hacer mediante comas y no con puntos lo cual es propio del idioma inglés (3,25), excepto para el resumen en inglés (*Abstract*), en el cual se deben emplear puntos (3.25).
- En el texto, cuando un número aparece al principio de la oración, deberá ser escrito en letras (Ej. Veinte pacientes...).

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de la intervención bioquímica para la mejora en el diagnóstico de Chagas congénito en un hospital general

Tkach, Agustina^{1*}; Delgado, Victoria¹

¹Servicio de Laboratorio, Hospital Zonal General de Agudos "Doctor Lucio Meléndez", Adrogué, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: Tkach, Agustina; Ituzaingo 1356, Burzaco, Buenos Aires; agustinadt@gmail.com

Resumen

Introducción: la infección transplacentaria por *Trypanosoma cruzi* no puede ser prevenida, pero el diagnóstico y el tratamiento oportuno de la infección congénita alcanza curas cercanas al 100%. **Objetivos:** gestionar la intervención bioquímica para optimizar el diagnóstico de Chagas congénito. Establecer la prevalencia de serologías positivas para Chagas en embarazadas. **Materiales y métodos:** en una primera etapa se recabaron los resultados de las serologías de las pacientes internadas en maternidad, y de los *Microstrouts* de los neonatos de madres positivas. Se estableció la prevalencia de Chagas en el período de enero de 2015 a junio de 2015. Se realizó una intervención bioquímica para protocolizar la extracción de sangre de los recién nacidos de madres con serología positiva. Posteriormente, se relevaron los mismos datos desde julio 2015 a diciembre de 2015. Se evaluó la eficiencia de la intervención, mediante la comparación de la proporción entre el número de solicitudes de *Microstrout* y la cantidad de madres con serología positiva (MS/MSP), en la primera y segunda parte del estudio. Los datos se procesaron en planillas de Excel. **Resultados:** la razón MS/MSP en el primer período fue 0,46; aumentando a 0,72 en el segundo período de análisis. La prevalencia de Chagas de serologías positivas para Chagas en embarazadas resultó en 1,7 % en el primer período y 3,2 % en el segundo. **Conclusiones:** se logró aumentar la proporción MS/MSP. Hemos mejorado notoriamente la cantidad de neonatos con al menos un *Microstrout*. La participación e integración del profesional bioquímico al equipo de salud resultó fundamental en este estudio.

Palabras clave: Chagas congénito, *Microstrout*, *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

Introduction: *Trypanosoma cruzi* transplacental infection cannot be prevented, but appropriate diagnosis and treatment can allow reaching a cure of 100 %. **Objectives:** To manage the biochemical intervention to optimize the diagnosis of congenital Chagas, and to establish the prevalence of pregnant women with a positive Chagas test. **Materials and methods:** In a first stage, we collected the serological results of hospitalized maternity patients, as well as those of the *Microstrouts* from the neonates whose mothers produced positive results. We also established the prevalence of Chagas between January 2015 and June 2015. A biochemical intervention was carried out to formalize the blood extraction of babies born to mothers with positive serology. Subsequently, the same data were gathered from July 2015 to December 2015. The efficiency of the intervention was evaluated through the comparison of the proportion between the number of *Microstrout* requests and the number of mothers with a positive serology (MS/MSP) in both the first and the second part of the study. The data were processed in Excel files. **Results:** The MS/MSP proportion in the first period of analysis was 0.46, whereas that in the second period increased to 0.72. The prevalence of Chagas positive serologies in pregnant women was 1.7 % in the first period and 3.2 % in the second. **Conclusions:** The MS/MSP proportion increased. We notoriously improved the number of neonates with at least one *Microstrout*. The participation, integration and involvement of biochemists with the health team were fundamental in this study.

Key words: congenital Chagas, *Microstrout*, *Trypanosoma cruzi*.

Introducción

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, su transmisión vertical ha ido aumentando en importancia a medida que la transmisión vectorial y transfusional han sido y son crecientemente controladas. En los casos de pacientes embarazadas con enfermedad de Chagas, la infección transplacentaria del *Trypanosoma cruzi* no puede ser prevenida, pero el diagnóstico y el tratamiento oportuno de la infección congénita alcanza curas cercanas al 100 %¹.

En el Chagas congénito la transmisión placentaria depende directamente de dos indicadores epidemiológicos básicos: la tasa de prevalencia de la infección chagásica en mujeres embarazadas y la incidencia de la transmisión vertical².

De acuerdo con la ley nacional 26.281 es de carácter obligatorio testear esta zoonosis en toda embarazada, mediante estudios serológicos, y en recién nacidos de madres infectadas, mediante la búsqueda directa del protozoo; una alternativa puede ser la técnica llamada *Microstrout*. Este último método debería realizarse preferentemente antes del alta del centro asistencial o lo más cercano al nacimiento, pudiéndose emplear hasta el noveno mes de vida. Sin embargo, la sensibilidad del *Microstrout* disminuye después del tercer mes de vida. En caso de ser negativo, el niño deberá ser evaluado nuevamente con métodos de detección de anticuerpos específicos. Cabe aclarar que la sensibilidad del método directo aumenta cuando se repite en los primeros días de vida, luego de un resultado negativo. Una vez descartada la infección congénita por métodos serológicos, a partir de los 10 meses de edad, el niño podrá ser dado de alta del seguimiento. En el caso que los estudios confirmen la ocurrencia de la infección congénita, el niño deberá ser tratado^{3,4}.

Motivaron los siguientes objetivos la escasa cantidad de solicitudes médicas para *Microstrout*, en comparación con la cantidad de serologías positivas para Chagas informadas en pacientes embarazadas.

Es por eso que se propuso en una primera instancia, establecer la prevalencia de mujeres embarazadas con testeo positivo para Chagas y la incidencia de Chagas congénito, en el período enero a junio de 2015; y, consecuentemente, revisar el flujo de interconsultas dentro del nosocomio al momento del nacimiento de hijos de madres con serología positiva para Chagas. En una segunda instancia, luego del primer análisis de los datos, el objetivo se centró en gestionar una intervención bioquímica para optimizar el diagnóstico de Chagas congénito y en consecuencia evaluar el resultado de la misma con el fin de reducir la cantidad de neonatos dados de alta sin *Microstrout*.

Materiales y métodos

El estudio se dividió en dos etapas, tomando como punto de inflexión el momento de la intervención bioquímica.

Durante la primera etapa, se realizó un estudio retrospectivo observacional para determinar la prevalencia de mujeres embarazadas con testeo positivo para Chagas, y la incidencia de neonatos con Chagas congénito, en el período Enero a Junio de 2015. Para ello, se recabaron los datos de hemaglutinación indirecta (HAI) y enzimoimmunoensayo (ELISA) para Chagas de las

pacientes internadas en la sala de maternidad del nosocomio y, a su vez, de los *Microstrouts* solicitados en los recién nacidos. Se consideraron pacientes positivas para Chagas aquellas con uno o dos testeos positivos, dado que en nuestro medio no es posible realizar una tercera prueba diagnóstica.

Luego del primer análisis de datos se produjo la intervención bioquímica. La cual constó en protocolizar la extracción de sangre de los recién nacidos de madres con serología positiva, mediante la generación de un alerta al médico neonatólogo para que indique la correspondiente solicitud del análisis.

La segunda etapa del estudio consistió en calcular nuevamente la prevalencia e incidencia antes mencionadas, durante el período posterior a la intervención, comprendido entre julio 2015 a diciembre de 2015.

Finalmente, se evaluó la eficiencia de la intervención, mediante la comparación de la proporción entre el número de solicitudes de *Microstrout* sobre la cantidad de madres con serología positiva, en la primera y segunda parte del estudio.

No hubo casos de embarazos múltiples. Todos los datos fueron analizados mediante Excel de Office.

Resultados

De los datos recabados en el primer período de análisis, 8/775 pacientes presentaron ambos tests positivos, 4/775 sólo ELISA positivo y 1/775 solamente HAI positivo. De un total de 13 (1,7 %) informes de serología positiva para Chagas, se recibieron en el laboratorio sólo 5 (38 %) solicitudes médicas indicando la realización del *Microstrout* en los neonatos, los correspondientes resultados fueron negativos. Por lo tanto, durante este período analizado, a 8 (61 %) neonatos se les otorgó el alta sin que se les realice el *screening* de la búsqueda directa de los protozoos en sangre periférica.

Posteriormente a la intervención bioquímica, durante el período de julio a diciembre de 2015, 13/566 pacientes presentaron ambos tests positivos, 3/566 sólo ELISA positivo y 2/566 solamente HAI positivo. De un total de 18 (3,2 %) informes de serología positiva para Chagas, se recibieron en el laboratorio 13 (72 %) solicitudes médicas indicando la realización del *Microstrout* en los neonatos, los correspondientes resultados fueron negativos.

Se calculó la proporción de la cantidad de solicitudes médicas para *Microstrout* con respecto a la cantidad de informes de serología positiva para Chagas, y se observó que en el primer período de estudio previo a la intervención, la proporción resultó en 0,46 (6 *Microstrouts* por cada 13 madres con serologías de Chagas positivas), en cambio para el segundo período la proporción aumentó su valor a 0,72 (13 *Microstrouts* por cada 18 serologías de Chagas positivas).

La prevalencia de serologías positivas para Chagas desde enero de 2015 a diciembre de 2015 resultó 2,3 %.

Discusión

Se pudo establecer que la prevalencia de serologías positivas para Chagas en este nosocomio es de 2,3 %. Se pretende en un futuro contar con la incorporación de una tercera prueba diagnós-

tica, con el fin de cumplir con las recomendaciones nacionales.

No se atreve a reportar incidencia nula de Chagas congénito debido al estudio incompleto de los neonatos, aunque considerando los *Microstrouts* realizados no se reportaron resultados positivos.

Si bien las guías nacionales recomiendan la realización de al menos un *Microstrout* en neonatos de madres con serología positiva para Chagas, se observó que se solicitaba tal estudio solamente en el 38 % de los recién nacidos, resultando en una proporción de 0,46 *Microstrout* por cada informe de serología positiva para Chagas. Es sabido que la probabilidad de hallazgo de los protozoos aumenta con la cantidad de extracciones, y considerando que la parasitemia inicial puede ser baja, es necesario continuar el algoritmo con serologías luego de los 10 meses de vida.

El flujo de trabajo interdisciplinario entre los profesionales de Maternidad, Neonatología e Infectología de esta institución es deficiente. El presente estudio permitió ahondar en la investigación de dicho flujo para comenzar a corregir las falencias del mismo, dando como resultado una mejora en el estudio de los neonatos de madres con serología positiva.

La intervención bioquímica permitió establecer una relación directa entre los bioquímicos y neonatólogos, para que éstos últimos indiquen la realización del *Microstrout*.

Luego de la intervención bioquímica, y su establecimiento en el tiempo, durante el segundo período de análisis se logró aumentar la proporción a 0,72 *Microstrout* por cada informe de serología positiva para Chagas, siendo en este período el 72 % los recién nacidos estudiados para Chagas congénito al nacer.

Se ha mejorado notoriamente la cantidad de neonatos estudiados para Chagas congénito en la institución. Por lo que el desafío bioquímico en la búsqueda de los posibles casos de transmisión vertical de Chagas fue llevado a cabo. Su éxito se demostró con el aumento en la proporción de la cantidad de neonatos estudiados por cada madre con serología positiva en la segunda etapa del estudio. La participación e integración del profesional bioquímico al equipo de salud resultó fundamental en este estudio.

Agradecimientos

Deseamos agradecer el compromiso y la colaboración de la Técnica de Laboratorio Yésica Rojas, quien participó activamente para llevar a cabo los objetivos del presente.

Referencias bibliográficas

1. Piat GL, Almirón JF, Romano JR, Romano MF. Chagas congénito revisión de una enfermedad curable y subestimada. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina 2009;193:16-21.
2. Mansilla M, Rocha MC, Sarubbi MA. Chagas congénito. Presentación de un caso clínico y revisión bibliográfica. Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá 1999;18(1):29-35.
3. Ley Nacional Argentina 26.281 de Prevención y control del Chagas. Boletín Oficial 31232, 3.
4. Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma*

cruzi [Enfermedad de Chagas]. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2012.

ARTÍCULO ORIGINAL

Novedoso inmunoensayo multiplex por Citometría de Flujo para la detección simultánea y discriminativa de GADA e IA-2A en pacientes con Diabetes Mellitus

Guerra, Luciano Lucas¹; Faccinetti, Natalia Inés¹; Bombicino, Silvina Sonia¹; Rovitto, Bruno David¹; Sabljic, Adriana Victoria¹; Trabucchi, Aldana¹; Penas Steinhardt, Alberto¹; Poskus, Edgardo¹; Iacono, Ruben Francisco¹; Valdez, Silvina Noemí^{1*}.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Microbiología, Inmunología, Biotecnología y Genética, Cátedra de Inmunología. CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Prof. Ricardo A. Margni" (IDEHU) Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA), e Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Prof. Ricardo A. Margni" (IDEHU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET-UBA).

Contacto: Valdez, Silvina Noemí. Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 4to piso [C1113AAD] CABA; silval@ffyb.uba.ar, valdezsilvina@gmail.com

Resumen

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) es un trastorno autoinmune con pérdida de tolerancia hacia antígenos de las células beta-pancreáticas y presenta autoanticuerpos en circulación dirigidos contra ellos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un inmunoensayo basado en Citometría de Flujo (CF) para la determinación combinada y discriminativa de los principales autoanticuerpos de DMT1: anti-glutamato decarboxilasa (GADA) y anti-proteína tirosina fosfatasa IA-2 (IA-2A). Se emplearon 48 sueros de pacientes con DMT1. Para la CF, se inmovilizaron microesferas de 4 y 5 µm con cada uno de los autoantígenos recombinantes (TrxGAD y TrxIA-2_{ic}, respectivamente). Se incubó el suero con una mezcla de ambas microesferas, y se detectaron los inmunocomplejos con una mezcla de TrxGAD-biotina/TrxIA-2_{ic}-biotina, y luego 50,00 ng de estreptavidina-ficoeritrina. Los resultados obtenidos por la CF fueron contrastados con el ensayo de unión de radioligando (RBA). Se detectó GADA en un 52,1 % de sueros empleando RBA ($SDs_{mediana}$ 3,08 y rango [-0,85] - 42,26 SDs) y un 60,9 % con IA-2A ($SDs_{mediana}$ 6,39 y rango [-2,95] - 39,92 SDs), evidenciando un 77,1 % de muestras con componente autoinmune y 100 % de especificidad en ambos ensayos. Por CF, se detectó un 68,8 % de pacientes con GADA ($SDs_{mediana}$ 5,66 y rango [-1,89] - 124,10 SDs , sensibilidad analítica del 100 % y especificidad de 98 %) y un 41,7 % de IA-2A ($SDs_{mediana}$ 0,19 y rango [-2,08] - 62,07 SDs , 64,5 % de sensibilidad analítica y 93,9 % de especificidad). Se descubrió autoinmunidad en el 77,1 % de las muestras. Se logró desarrollar un inmunoensayo por CF que permitió la detección de autoinmunidad con el mismo desempeño que dos determinaciones independientes por RBA.

Palabras clave: diabetes mellitus, citometría de flujo, autoinmunidad, autoanticuerpos, inmunoensayo.

Abstract

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) is an autoimmune disorder with loss of tolerance to antigens of pancreatic beta-cells and presents circulating autoantibodies directed against them. The objective of this work was to develop an immunoassay based on Flow Cytometry (FC) for the combined and discriminative determination of the main T1DM markers: GADA and IA-2A. For FC, 4- and 5-µm-microspheres were immobilized with each of the recombinant autoantigens (TrxGAD and TrxIA-2_{ic}, respectively). The serum was incubated with a mixture of both microspheres, and the immunocomplexes were detected with a mixture of TrxGAD-biotin and TrxIA-2_{ic}-biotin, and then 50,00 ng of streptavidin-phycoerythrin was added. The final mixture was acquired on a flow cytometer. The results obtained were compared with the reference method (RBA). GADA was detected in 52.1 % of sera using RBA (SDs_{median} 3.08 and range [-0.85] - 42.26 SDs) and 60.9 % with IA-2A (SDs_{median} 6.39 and range [-2.95] - 39.92 SDs), evidencing 77.1 % of samples with autoimmunity and 100 % of specificity in both assays. By FC, 68.8 % of patients were detected with GADA (SDs_{median} 5.66 and range [-1.89] - 124.10 SDs , analytical sensitivity of 100 % and specificity of 98 %) and 41.7 % with IA-2A (SDs_{median} 0.19 and range [-2.08] - 62.07 SDs , 64.5 % of analytical sensitivity and 93.9 % of specificity). Autoimmunity was detected in 77.1 % of the samples. It was possible to develop a FC-based immunoassay that allowed the detection of autoimmunity with the same performance as two independent RBA determinations.

Keywords: diabetes mellitus, flow cytometry, autoimmunity, autoantibodies, immunoassay.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) y sus complicaciones constituyen la tercera causa de muerte en los países industrializados, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Alrededor del 8,8 % de la población mundial padece alguna de las formas de esta enfermedad, la cual muestra una tendencia de crecimiento continuo [1]. Las estadísticas en Argentina muestran que en el país hay cerca del 7 % de la población con DM, aunque la prevalencia se eleva a un 20 % en aquellas personas mayores de 60 años. El 50 % de los afectados ignora que padece la enfermedad, lo que representa un serio problema en la salud pública nacional.

La DM constituye un grupo heterogéneo de patologías, las cuales conducen a una elevación de la glucosa en sangre. Se distinguen dos tipos principales de la enfermedad, las que requieren estudios y tratamientos diferentes: la DM Tipo 1 (DMT1) y la DM Tipo 2 (DMT2). En algunos casos es difícil diferenciar entre las dos variantes principales de la enfermedad [2]. Así, se han propuesto nuevas categorías, entre ellas, la diabetes autoinmune latente del adulto (conocida como LADA por su sigla en inglés), para identificar un subgrupo de pacientes adultos que poseen autoinmunidad e inicialmente no requieren insulina, pero pueden requerirla poco tiempo después del diagnóstico [3]. Aunque los síntomas agudos y a veces letales de la DM pueden ser controlados, las complicaciones tardías de la enfermedad exhiben alta morbilidad y reducen significativamente las expectativas de vida [4]. La aparición y progresión de las complicaciones tardías generan una pesada carga socioeconómica y de enfermedad (en términos de discapacidad y mortalidad) para la comunidad en general y para los distintos agentes del sistema de salud.

La principal causa de la DMT2 o “DM del adulto” es una resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, asociada a un grado variable de disfunción secretoria [5-8]. Ambas causas, a su vez, se correlacionan con la presencia de determinantes genéticos y factores ambientales, de ahí que la DMT2 haya sido definida como una enfermedad poligénica y multifactorial.

La DMT1 o “DM infante juvenil” es un trastorno de origen autoinmune que presenta un importante componente de autoagresión celular, acompañado de una serie de marcadores humorales que sirven principalmente para la detección prodrómica y para el apoyo diagnóstico [9-13]. Los principales marcadores de autoinmunidad asociados a DMT1 son los autoanticuerpos que reconocen a la GAD65 (denominados GADA), al dominio intracelular de IA-2 (denominados IA-2A), al transportador de zinc 8 (denominados ZnT8A) y a los productos de secreción de la célula pancreática: insulina (denominados IAA) y proinsulina (denominados PAA) [14]. Aparte de éstos, fueron identificados otros autoantígenos, pero ninguno de los anticuerpos inducidos por ellos resultó tener suficiente relevancia para el apoyo diagnóstico y la predicción de la enfermedad [15]. Analizados en conjunto, más del 90 % de los pacientes infante-juveniles debutantes con DMT1 presentan uno o más de los marcadores principales [16], siendo GADA el de mayor prevalencia (70-90 %) [17-

19], seguido por IA-2A (40-75 %) [19-24].

Los estudios prospectivos y predictivos demostraron que los cuatro marcadores de autoinmunidad se asocian a la respuesta celular autoagresiva de las células beta y se anticipan meses o incluso años a la aparición de los primeros síntomas de la DM [25-26], siendo el marcador IA-2A el que presentó el mayor valor predictivo positivo (VPP) para evaluar el riesgo de evolución a DMT1 [27]. Así, se encontró una vinculación entre el número de marcadores positivos en individuos asintomáticos dentro de grupos de riesgo (familiares directos de pacientes diabéticos), y la probabilidad de contraer la enfermedad en el transcurso de un período determinado [28]. Además, la determinación de estos marcadores de autoinmunidad en la población heterogénea, de pacientes debutantes en edad adulta, es de gran utilidad para la asignación diagnóstica precisa de aquellos individuos que padecen formas intermedias de DM autoinmune, no siempre bien caracterizadas, como por ejemplo los LADA. En este sentido, el diagnóstico preciso de las diferentes formas de DM autoinmune a través de la detección de los marcadores serológicos garantiza el inicio de un tratamiento precoz y adecuado, disminuyendo las complicaciones crónicas de la enfermedad.

El método de referencia para la detección sensible de los marcadores de autoinmunidad, dada su baja concentración sérica, es el ensayo de unión de radioligando (RBA), que emplea antígenos recombinantes marcados radiactivamente [21-29,30]. Si bien esta metodología es de gran sensibilidad y especificidad, tiene la desventaja del uso de material radiactivo, el que provoca residuos contaminantes del medioambiente que requieren de un tratamiento especial para su descarte. Además, implica la necesidad de contar con personal e infraestructura edilicia habilitados por la Autoridad Regulatoria Nuclear. Esto hace que existan limitaciones operativas importantes que dificultan la implementación del método en forma rutinaria en laboratorios de mediana/baja complejidad, incluyendo, además, el alto costo de las determinaciones debido a la importación de los isótopos radiactivos empleados en la generación de las moléculas anti-génicas marcadas.

No existen en Argentina desarrollos locales de kits para el diagnóstico y seguimiento de la DM autoinmune, por lo cual el sistema de salud depende de su importación, lo que provoca sustancialmente el costo de las determinaciones.

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un novedoso inmunoensayo basado en Citometría de Flujo, para la detección simultánea y discriminativa de los principales marcadores de autoinmunidad asociados a DM autoinmune. Los marcadores seleccionados fueron GADA e IA-2A, ya que la combinación en la detección de ambos autoanticuerpos permite detectar la presencia del componente autoinmune en el 85-90 % de los pacientes debutantes con DMT1, y la presencia de estos dos marcadores positivos en el grupo de riesgo determina un VPP del 100 % en un período de evolución de 5 años.

Materiales y métodos

Colección de sueros

Pacientes argentinos con Diabetes Mellitus Tipo 1

Se colectaron muestras de suero ($n = 48$, edad media de 9,2 años con edad mediana de 9 años, rango etario 2 a 21 y sexo masculino/femenino: 23/37), de niños y adolescentes argentinos ingresados al Servicio de Nutrición del Hospital Nacional de Pediatría "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina, de mayo de 2013 a marzo de 2015. Se tomaron muestras de pacientes con ayuno de 8 h, antes o dentro de las 72 h del inicio del tratamiento con insulina. La DMT1 fue diagnosticada de acuerdo con los criterios de la OMS [31]. La colección de muestras y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Pediatría "Ricardo Gutiérrez". Se obtuvo el consentimiento de los padres. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta que se ensayaron. Se sometieron al análisis del perfil de autoanticuerpos GADA e IA-2A por el método de referencia RBA. Es así que se determinó por separado la presencia de GADA e IA-2A con el objetivo de obtener 4 grupos experimentales discriminados según la presencia (+) o ausencia (-) del marcador (GADA/IA-2A): +/+; +/-; -/+ y -/-.

Individuos controles normales

Se obtuvieron sueros ($n = 115$, edad media de 29,7 años con mediana de 25 años, rango etario 16 a 80 y sexo masculino/femenino: 58/57) de individuos sanos argentinos sin antecedentes personales o familiares de DM o enfermedades autoinmunes, para ser utilizados como controles normales. La colección de muestras fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas "José de San Martín" de la Universidad de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina. Todos los sujetos fueron informados sobre el propósito del estudio y se obtuvo el consentimiento firmado para la participación en el mismo. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta que se ensayaron. Se realizó la evaluación de autoanticuerpos (GADA, IA-2A, IAA y ZnT8A) por RBA y todos los individuos resultaron negativos.

Detección de GADA o IA-2A por el ensayo de unión de radioligando o Radioligand Binding Assay (RBA)

Producción de los trazadores [^{35}S]GAD y [^{35}S]IA-2

Los trazadores se obtuvieron con alto grado de pureza por transcripción/traducción *in vitro* del ADN codificante, ya sea para la GAD humana clonado en el vector pEX9 o el fragmento intracelular de IA-2 (IA-2_{ic}) humano (residuos 604-979) clonado en el vector pSP64 (Promega, Madison, WI, EE.UU.), usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo (Promega, Madison, WI, EE.UU.) en presencia de [^{35}S]-metionina (New England, Nuclear, Boston, MA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de traducción se diluyeron en *buffer* RBA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % V/V, pH 7,4) y se sembraron en una columna PD10 (Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) para eliminar la [^{35}S]-Metionina libre. Típicamente, el porcentaje de incorporación de [^{35}S]-metionina a las proteínas por este método fue de 15 % para [^{35}S]GAD, produciendo aproximadamente $5\text{--}10 \times 10^6$ dpm de proteína marca-

da o 5-7 % de [^{35}S]IA-2, produciendo aproximadamente $5\text{--}7 \times 10^6$ dpm de esta. Los trazadores se almacenaron en alícuotas a -40°C , y tuvieron una vida útil de 5 semanas.

Protocolo de RBA para la detección de GADA o IA-2A

Los protocolos de RBA se realizaron como se describió anteriormente [21-30], con modificaciones menores [32-34]. Brevemente, se incubaron 2,5 μL de suero humano durante la noche a 4°C con 10.000 dpm de [^{35}S]GAD o [^{35}S]IA-2 en un volumen final de 60 μL en *buffer* RBA. A continuación, se añadieron 50 μL de proteína A-Sepharose 4B FF (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweeden) 40 % V/V en *buffer* RBA para aislar los inmunocomplejos y se incubaron 2 h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, las muestras se dejaron sedimentar y los sobrenadantes se descartaron. Los *pellets* se lavaron tres veces con 200 μL de *buffer* RBA y una vez con 200 μL de NaCl 200 mM en *buffer* RBA. Finalmente, los *pellets* se resuspendieron en 100 μL de SDS 1 % P/V, se dejó decantar la proteína A-Sepharose y los sobrenadantes se transfirieron cuidadosamente a viales para su lectura en un contador de centelleo líquido (Liquid Scintillation Analyzer Modelo 1600TR, Packard, Canberra, Australia) por 1 min/vial. Los resultados para cada muestra se calcularon como porcentaje de unión (B%):

$$B\% = 100 \times \left(\frac{dpm}{dpm_{\text{totales}}} \right)$$

Y se expresaron como *scores* de desvío estándar [*SDs*, por sus siglas en inglés, *standard deviation scores*]:

$$SDs = \left(\frac{B\% - B_c\%}{DE_c} \right)$$

Donde $B_c\%$ es el B% medio de sueros de individuos controles y DE_c su desvío estándar. Se procesaron simultáneamente sueros de individuos controles normales para calcular el *cut-off*. Las muestras se consideraron positivas cuando *SDs* > 3,0. El ensayo para GADA mostró un 79,6 % de sensibilidad y 98 % de especificidad en el *Diabetes Autoantibody Standardization Program* (DASP) 2007 y, el RBA para IA-2A obtuvo un 66,0 % de sensibilidad, 97,8 % de especificidad y 86,43 % de precisión en el *Islet Autoantibody Standardization Program* (IASP) 2015, laboratorio 0519.

Flow Cytometric Microsphere-based Immunoassay (FloCMIA) para la detección simultánea de GADA e IA-2A o FloCMIA multiplex

Expresión, purificación y biotilación de las proteínas recombinantes TrxGAD y TrxIA-2_{ic}

Las proteínas recombinantes GAD e IA-2_{ic} fueron expresadas en *E. coli* como proteínas de fusión con tiorredoxina (TrxGAD y TrxIA-2_{ic}, respectivamente) como se describió previamente [35, 36]. Brevemente, las cepas GI698 y GI724 de *E. coli* se transformaron con los plásmidos recombinantes pTrxGAD65, que posee el ADN codificante para la isoforma de 65 kDa de la GAD humana, y pTrxIA-2_{ic}, que codifica para el fragmento intracelular de IA-2

humana [residuos 604 a 979], respectivamente. Las bacterias se cultivaron a 30°C con casaminoácidos 0,2 % P/V, glucosa 0,5 % P/V, MgCl₂ 1 mM y ampicilina 100 µg/mL. Se indujo la expresión proteica con 100 µg/mL de triptófano a 20°C para la cepa GI698 o 37°C para la cepa GI724. Se realizó una centrifugación de 200 mL del cultivo bacteriano, se resuspendió el pellet resultante en 2 mL de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) y la suspensión resultante se sonicó en presencia de 2-mercaptoetanol (2ME) 1 mM e inhibidores de proteasa [aprotinina 0,1 % P/V y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM] sobre hielo triturado (5 ciclos de 30 s). Después de la sonicación, se añadió a la suspensión resultante Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % V/V y se incubó durante 10 min a 0°C. Luego, se separó la fracción soluble intracelular (FSI) por centrifugación a 15.000 rpm durante 10 min.

Las proteínas de fusión se purificaron por cromatografía de afinidad siguiendo el protocolo previamente descrito [36, 37]. La resina se basó en un soporte de agarosa modificado covalentemente con óxido de fenilarsina, que permitió la unión de proteínas que contenían residuos de ditiol vecinales, tal como la Trx [38]. Se añadió la FSI (4 mL), proveniente de la cepa de *E. coli* que corresponda, a dicha resina (≈4 mL), previamente equilibrada en *buffer* de lisis y activada con 4 volúmenes de columna (V_C) de 2ME 20 mM en *buffer* de lisis, y se incubó la suspensión resultante durante 1,5 horas a 4°C. La resina se vertió en una columna y se lavó secuencialmente con 6 V_C de *buffer* de lisis, 6 V_C de 2ME 1 mM en *buffer* de lisis y con 3 V_C de 2ME 5 mM en *buffer* de lisis. Las proteínas unidas se eluyeron de la resina con varias alícuotas de 2 mL de 2ME 100 mM en *buffer* de lisis. Las preparaciones típicas de TrxGAD y TrxIA-2_{ic} proporcionaron ≈10 mg de proteína recombinante por Litro de cultivo.

Dos mililitros de cada proteína de fusión purificada por afinidad se sometieron a intercambio de *buffer* a *buffer* fosfato salino (PBS, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) utilizando una columna de desalinización ZEBA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína en PBS se incubó luego durante 2 h a 0°C con 0,32 mg de sulfo-NHS-biotina (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.) y se retiró la biotina libre con una nueva columna de desalinización ZEBA.

Protocolo de adsorción pasiva

Este protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones menores. Se mezcló 28 µg de una preparación purificada de TrxGAD por cada 100 cm² de microesferas [36,4 µL de suspensión de microesferas de 4 µm 5% P/V, Spherotech, Inc., Lake Forest, IL, EE.UU.] con 60 µg de una preparación purificada de TrxIA-2_{ic} por cada 100 cm² de microesferas [64,0 µL de suspensión de microesferas de 5 µm 5% P/V]. Se empleó una alícuota almacenada con 2ME 50 mM, glicerol 50 % y aprotinina 0,1 % P/V, en un volumen final de 220 µL en *buffer* isotónico salino (IBS, *isotonic buffered saline*) [NaH₂PO₄ 2,3 mM, Na₂HPO₄ 14,2 mM, NaCl 140 mM, KCl 3,8 mM, azida de sodio 3,1 mM]. Luego de una incubación durante la noche a 4°C en agitación, las preparaciones se centrifugaron

a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes se descartaron. Para bloquear los sitios libres sobre la microesfera, los *pellets* se re suspendieron con 200 µL de una solución de se-roalbúminabovina (BSA) 0,5% P/V en IBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Las preparaciones se centrifugaron de nuevo a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y el *pellet* se lavó con 400 µL de PBS. Finalmente, se añadieron otros 400 µL de PBS (resultando en 1x10⁵ microesferas - TrxGAD o TrxIA-2_{ic} /µL) y la suspensión se almacenó a 4°C.

Protocolo de FloCMIA *multiplex* para la detección simultánea y discriminativa de GADA e IA-2A

Excepto cuando se indica de otro modo, todas las etapas de lavado se realizaron con 200 µL de PBS-Tween 20 0,05 % V/V en el *Multiscreen_{HTS} vacuum manifold*, y las diluciones de los reactivos se prepararon utilizando BSA 0,5 % P/V, Tween 20 0,05 % V/V en PBS y se agregaron 50 µL de volumen de reactivos por pocillo en cada incubación. Veinte microlitros de suero humano puro se mezclaron con 20 µL de una suspensión conteniendo una mezcla de microesferas-TrxGAD (1,7x10³ microesferas /µL) y microesferas-TrxIA-2_{ic} (2,5x10³ microesferas/µL), en una placa de filtración *Multiscreen_{HTS}-HV* de 96 pocillos. La incubación se realizó durante la noche a 4°C en agitación. Después de ésta, la placa de filtración se lavó 5 veces. La detección de los anticuerpos GADA e IA-2A unidos requirió una incubación en dos etapas (1 h a temperatura ambiente cada una, con 5 lavados entre ellas): i), se añadió una mezcla de 1,15 ng de TrxGAD-biotina y 2,75 ng de TrxIA-2_{ic}-biotina y ii) 50,00 ng de estreptavidina-PE (Affimetrix eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.) para la detección simultánea de las moléculas de TrxGAD-biotina y TrxIA-2_{ic}-biotina unidas. Después de este paso, la placa se lavó 4 veces, más 1 etapa final de lavado con 200 µL de PBS y las microesferas se resuspendieron con otros 200 µL de PBS. Se realizó la transferencia de la suspensión a tubos de Röhrer y se adquirió en un citómetro de flujo PAS III PARTEC. Las muestras se analizaron utilizando el *software Cyflogic*, se identificó la población de singletes de microesferas por *gating* en un *dot plot* de *Forward Scatter* (FSC) vs. *Side Scatter* (SSC) discriminando ambas poblaciones de microesferas por su tamaño, las señales de fluorescencia se midieron en el canal FL2 y se informaron como Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia (GeoM) (Figura 1). Los resultados se expresaron como *SDs*:

$$SDs = \left(\frac{GeoM_m - GeoM_c}{DE_c} \right)$$

Donde GeoM_m es la GeoM media de las muestras por duplicado, GeoM_c es la GeoM media de los sueros de individuos controles normales y DE_c su desvío estándar. Se consideraron como muestras GADA positivas cuando *SDs* > 2,5, e IA-2A positivas cuando *SD* > 3,0. Se calcularon los valores de CV en determinaciones por duplicado para *SDs* bajas, medias y altas. Para la determinación de GADA, el CV intraensayo fue de 9,8 % a *SDs* = 43,89. Los CV intraensayo resultaron en 6,3 % a *SDs* = 8,80, 4,0 % a *SDs* = 57,30 y

Tabla I. Parámetros analíticos para los métodos de RBA y FloCMIA *multiplex* aplicados a la determinación del marcador humoral GADA. Los resultados se obtuvieron del análisis de una población de individuos controles normales y de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1.

Inmunoensayo	RBA	FloCMIA <i>multiplex</i>
Mediana (SDs)	3,08	5,66
Rango (SDs)	(-0,85)-42,26	(-1,89)-124,10
Sensibilidad (%)^a	52,1	68,8
Sensibilidad Analítica (%)^b	-	100,0
Especificidad (%)^c	100,0	98,0

► a: Porcentaje de pacientes positivos para GADA del total de pacientes estudiados

b: Porcentaje de pacientes positivos para GADA por RBA que fueron positivos por FloCMIA

c: 100% menos el porcentaje de falsos positivos

1,6 % a SDs = 122,67. Por otro lado, para la determinación de IA-2A, los CV intraensayo fueron de 2,0 % a SDs = 7,36 y 9,8 % a SDs = 13,16. Los CV interensayo resultaron en 2,1 % a SDs = 6,75, 11,3 % a SDs = 10,85 y 10,7 % a SDs = 57,69.

Análisis estadístico

La distribución normal de los datos se analizó mediante el test de normalidad Omnibus de D'Agostino & Pearson. Se realizó el test de Rout con el fin de eliminar los valores *outliers* dentro de la población de individuos control normalmente distribuidos. La selección de valores óptimos de *cut-off* se basó en curvas construidas trazando la especificidad calculada y la sensibilidad de cada protocolo frente a los valores de corte correspondientes. La significación estadística se evaluó mediante tests paramétricos: test t de Student para muestras no pareadas con corrección de Welch; o tests no paramétricos: test U de Mann-Whitney para datos no pareados, cuando fuese aplicable. La correlación entre ensayos se evaluó mediante regresión lineal estándar y con el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman (r_s). Los cálculos se realizaron utilizando *GraphPad Prism* versión 6.01 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego California, EE.UU., www.graphpad.com). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Detección de GADA e IA-2A por RBA

Mediante la determinación de GADA por el método de referencia, de los 48 sueros de pacientes con DMT1, 25 muestras resultaron positivas para la presencia de dicho marcador [52,1 %], empleando un *cut-off* de SDs > 3,0 (Figura 2 (A)). Los niveles de autoanticuerpos se caracterizaron por presentar una SDs_{mediana} = 3,08 y un rango de señales de -0,85 a 42,26 (Tabla I). Por otro lado, al analizar la presencia de IA-2A en esta misma población, 28 muestras resultaron positivas para dicho marcador [60,9 %] empleando un *cut-off* de SDs > 3,0 (Figura 2 (B)). Los parámetros observados para este ensayo incluyeron una SDs_{mediana} = 6,39 y un rango de señales de -2,95 a 39,92 (Tabla II). El análisis en paralelo de 24 sueros de individuos controles normales confirmó una especificidad del 100 % en ambos ensayos. Frente al análisis en conjunto de estos resultados puede decirse que se detectó el componente autoinmune (definido como presencia de GADA y/o IA-2A en suero) en una cantidad de 37 muestras de pacientes con reciente diagnóstico de DMT1 [77,1 %]. Además, se establecieron así 4 cuatros grupos experimentales (GADA/IA-2A): +/+ (n = 16), +/- (n = 9), -/+ (n = 12) y -/- (n = 11) (Figura 2 (C)); los cuales se sometieron al análisis por el método FloCMIA *multiplex*.

Detección de GADA e IA-2A por FloCMIA *multiplex*

Mediante la determinación de GADA por FloCMIA *multiplex* (Figura 3 (A)), de los 48 sueros de pacientes con DMT1, 33 muestras resultaron positivas para la presencia de dicho marcador [68,8 %] empleando un *cut-off* de SDs > 2,5. Los niveles de

Tabla II. Parámetros analíticos para los métodos de RBA y FloCMIA *multiplex* aplicados a la determinación del marcador humoral IA-2A. Los resultados se obtuvieron del análisis de una población de individuos controles normales y de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1.

Inmunoensayo	RBA	FloCMIA <i>multiplex</i>
Mediana (SDs)	6,39	0,19
Rango (SDs)	(-2,95)-39,92	(-2,08)-62,07
Sensibilidad (%)^a	60,9	41,7
Sensibilidad Analítica (%)^b	-	64,5
Especificidad (%)^c	100,0	93,9

► a: Porcentaje de pacientes positivos para IA-2A del total de pacientes estudiados

b: Porcentaje de pacientes positivos para IA-2A por RBA que fueron positivos por FloCMIA

c: 100% menos el porcentaje de falsos positivos

Figura 1. Evaluación de sueros por FloCMA *mutiplex*. A: Poblaciones de microesferas de 4 μ m-TrxGAD (izquierda) y 5 μ m-TrxIA-2_{ic} (derecha) observadas en el *dot plot* FSC vs. SSC para propósitos de *gating*, B-E: *dot plots* para el análisis de la intensidad de fluorescencia adquirida en el canal FL2 vs. FSC. Se muestran señales representativas para los sueros de pacientes diabéticos tipo 1 con diferente perfil de detección de autoanticuerpos. B: suero GADA-/IA-2A-, C: suero GADA-/IA-2A+, D: suero GADA+/IA-2A+ y E: suero GADA+/IA-2A-.

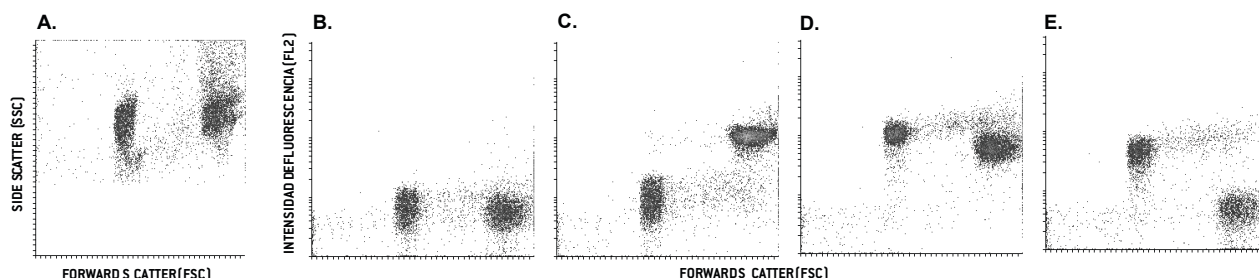
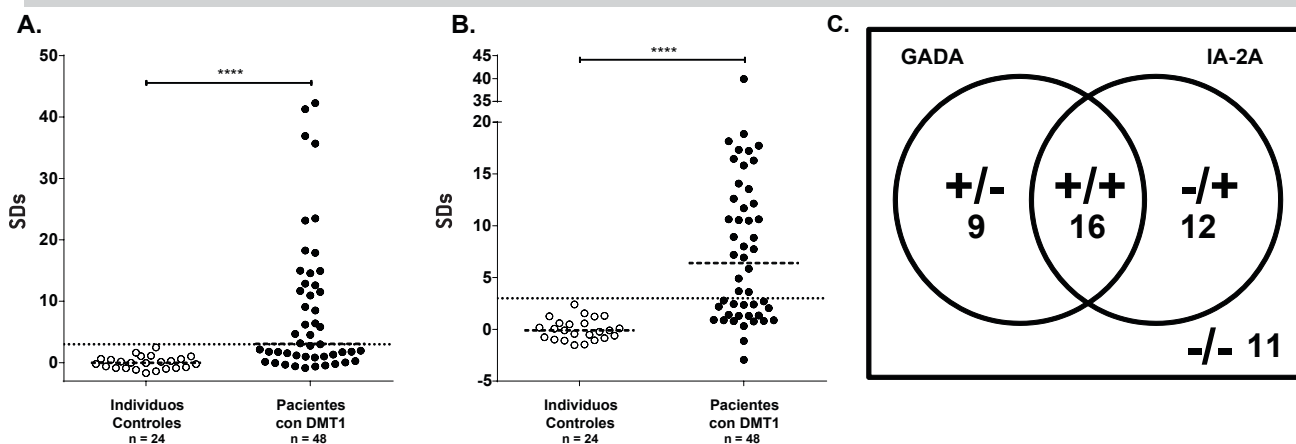


Figura 2. Resultados obtenidos por RBA para la determinación de GADA (A) e IA-2A (B) en el suero de individuos controles normales y pacientes con DMT1. El valor de *cut-off* para cada ensayo es indicado por una línea punteada y las medianas para cada población están indicadas por una línea discontinua. **** $p < 0,0001$ estadísticamente significativo. C: Diagrama de Venn para resultados obtenidos en la determinación de GADA e IA-2A por RBA, sobre una población de 48 pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1. En este diagrama se establecen 4 grupos experimentales según la presencia (+) o ausencia (-) del marcador correspondiente.



autoanticuerpos se caracterizaron con una $SDs_{mediana} = 5,66$ y un rango de señales de -1,89 a 124,10 [Tabla I]. La sensibilidad analítica fue del 100,0 %, mientras que el análisis en paralelo de 49 sueros de individuos controles normales determinó una especificidad de 98,0 % con la eliminación de una muestra con señal *outlier* para el cálculo del *cut-off*. Por otro lado, al analizar la presencia de IA-2A en esta misma población (Figura 3 [B]), 20 muestras resultaron positivas para dicho marcador [41,7 %] empleando un *cut-off* de $SDs > 3,0$. Los parámetros observados para este ensayo incluyeron una $SDs_{mediana} = 0,19$, un rango de señales de -2,08 a 62,07 y una sensibilidad analítica de 64,5 % [Tabla II]. El análisis en paralelo de 49 sueros de individuos controles normales confirmó una especificidad de 93,9 % con la eliminación de 3 muestras con señales *outlier* para el cálculo del *cut-off*. Frente al análisis en conjunto de estos resultados puede decirse que se detectó el componente autoinmune en una cantidad de 37 muestras de pacientes con reciente diagnóstico de DMT1 [77,1 %], discriminado en 4 grupos experimentales [Figura 3 (C)]

Resultados integrados y análisis de correlación

El diagrama de Venn (Figura 4 [A]) ilustra los resultados integrados de la determinación de GADA por RBA y FloCMA *mutiplex*. Del análisis de las 48 muestras de pacientes con DMT1, 25 sueros fueron positivos por ambos métodos [52,1 %], mientras que 15 resultaron negativos por ambos ensayos [31,3 %]. Se destaca que el método FloCMA fue capaz de determinar la presencia del marcador en 8 sueros que el RBA no pudo. Frente al análisis de regresión lineal y correlación entre las determinaciones de GADA por RBA y aquellas realizadas en paralelo por FloCMA, los parámetros estadísticos obtenidos fueron: $R^2 = 0,6481$, $r_s = 0,8137$ para RBA y FloCMA *mutiplex* (Figura 5 [A]). Es así, que la regresión lineal es buena y la correlación entre métodos para determinar GADA es real y no por muestreo azaroso.

Luego del análisis de los resultados integrados de la determinación de IA-2A por RBA y FloCMA *mutiplex* en las 48 muestras de pacientes con DMT1 se pudo observar que 20 sueros fueron positivos por los dos métodos [41,7 %], mientras que otros 20 resultaron negativos por ambos [41,7 %] [Figura 4 (B)]. El RBA

fue capaz de detectar como positivas a 8 muestras que el diseño *multiplex* de FloCMIA no pudo establecer como positivas. Cuando se analizaron la regresión lineal y la correlación entre las determinaciones de IA-2A por RBA frente a las determinaciones realizadas en paralelo por FloCMIA, los parámetros estadísticos obtenidos fueron: $R^2 = 0,3110$, $r_s = 0,7776$ para RBA y FloCMIA *multiplex* (Figura 5 (B)). Es así, que si bien la regresión lineal no es buena, la correlación entre métodos para determinar IA-2A es real (las señales obtenidas por ambos métodos tienden a aumentar paralelamente). El menor valor de R^2 obtenido en la regresión lineal del FloCMIA para IA-2A puede observarse en la pérdida de linealidad a medida que aumenta el valor de las señales.

Discusión

La problemática actual en el apoyo diagnóstico diabetológico se puede resumir en ciertos aspectos críticos que han podido ser subsanados en este trabajo:

- I. *Necesidad de gran cantidad de masa de antígeno*: se cuenta con dos autoantígenos expresados de manera recombinante en *E. coli* en gran cantidad, correctamente plegados, de fácil purificación y alto rendimiento; con ellos se han podido desarrollar un gran número de inmunoensayos y permite su aplicación en determinaciones rutinarias.
- II. *Metodologías radiométricas costosas*: se pudieron implementar exitosamente protocolos de FloCMIA con insumos

Figura 3. Resultados obtenidos por FloCMIA *multiplex* para la determinación de GADA (A) e IA-2A (B) en el suero de individuos controles normales y pacientes con DMT1. El valor de *cut-off* para cada ensayo es indicado por una línea punteada y las medianas para cada población están indicadas por una línea discontinua. **** $p < 0,0001$ estadísticamente significativo. C: Diagrama de Venn para resultados obtenidos en la determinación de GADA e IA-2A por FloCMIA *multiplex*, sobre una población de 48 pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1. En este diagrama se establecen 4 grupos experimentales según la presencia (+) o ausencia (-) del marcador correspondiente.

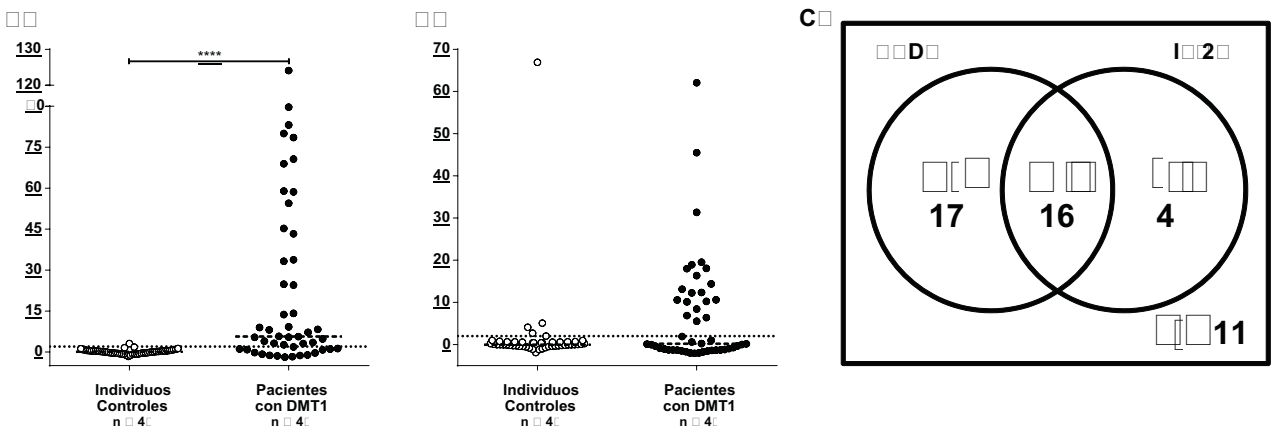


Figura 4. Diagramas de Venn de los resultados integrados en la determinación de GADA (A) e IA-2A (B) en 48 sueros de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1, realizado por RBA y FloCMIA *multiplex*.

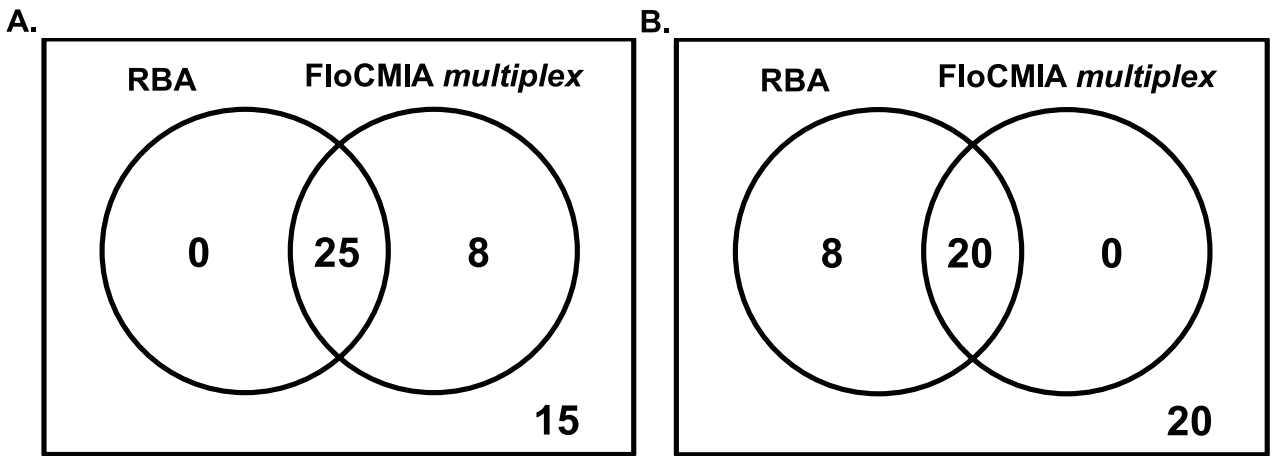
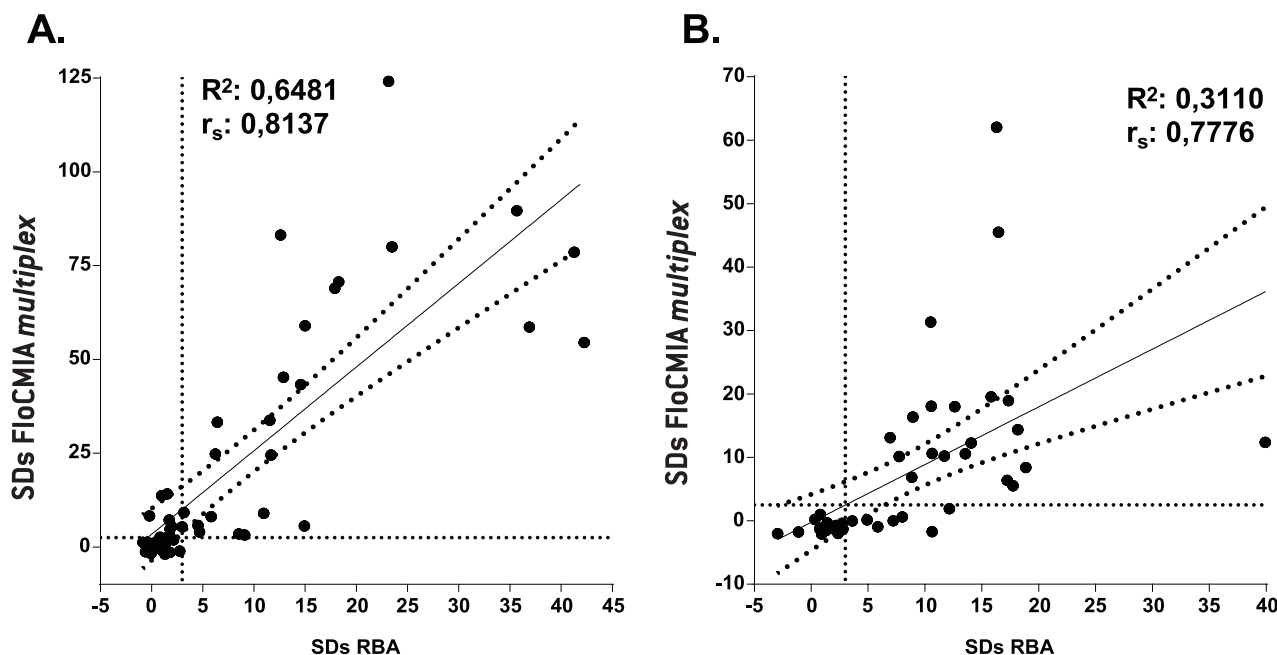


Figura 5. Correlación de señales obtenidas por el método FloCMA *multiplex* desarrollado para GADA [A] o IA-2A [B], y el método de referencia para el mismo marcador humoral en 48 sueros de pacientes diabéticos infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1 seleccionados. La línea punteada representa el valor de *cut-off* para cada uno de los ensayos. Cada gráfico incluye los parámetros correspondientes a la regresión lineal (R^2) y correlación determinada por el coeficiente de Spearman (r_s).



mucho más estables y productivos para la evaluación y seguimiento de un gran número de muestras, con potencial beneficio económico del paciente y el sistema de salud.

III. *Aplicabilidad en laboratorios de baja-media complejidad:* el equipamiento más costoso es el citómetro de flujo, el cual ya ha sido adquirido en la gran mayoría de los hospitales públicos y privados de los centros urbanos más importantes del país, y no requiere mucha más infraestructura específica ni habilitaciones rigurosas.

IV. *Desafío analítico por la baja concentración de autoanticuerpos:* se desarrollaron métodos con detección de alta sensibilidad, como es la fluorescencia, que permitieron distinguir adecuadamente la diferencia en señales de pacientes e individuos normales.

Todos estos aspectos permiten considerar al FloCMA *multiplex* para la determinación de GADA e IA-2A como método de *screening* de primera línea en distintas poblaciones. Si bien no poseen una *performance* superadora con respecto al método de referencia, al ser un método combinado y discriminativo aumenta su importancia diagnóstica. Por lo tanto, teniendo en cuenta que:

- I. FloCMA GADA se desarrolló utilizando microesferas de 4 μ m como fase sólida, mientras que FloCMA IA-2A se optimizó con microesferas de 5 μ m, ambas pueden combinarse en un mismo pocillo de reacción y ser distinguidas en un citómetro de flujo gracias a la señales diferenciables que se obtienen por FSC.
- II. La detección simultánea permite realizar el *screening* y seguimiento de un gran número de pacientes [34-39-41], con

gran utilidad para predicción y prevención de la DMT1.

III. La combinación de la determinación de GADA e IA-2A ha demostrado detectar el componente autoinmune en la mayor parte de los pacientes infanto-juveniles con DMT1A (donde presentan alta prevalencia) y además posee un valor predictivo positivo > 90 % al estudiar a la población de riesgo [27].

Se seleccionaron 48 muestras de pacientes con DMT1 de reciente diagnóstico para ser evaluadas por RBA y el diseño *multiplex* de FloCMA. A partir de los resultados obtenidos por el método de referencia se crearon 4 grupos experimentales según la presencia (+) o ausencia (-) de los marcadores GADA e IA-2A (+/+, +/-, -/+ y -/-), los cuales se sometieron posteriormente a la evaluación por FloCMA *multiplex*, para el análisis de la *performance* analítica con el objetivo de demostrar que los métodos radiométricos pueden ser reemplazados en la práctica clínica de apoyo diagnóstico diabético. Como era de esperar, empleando el RBA no todos los individuos mostraron evidencia de autoinmunidad [37 pacientes presentaron como mínimo uno de los marcadores humorales mencionados], aún siendo este el método de referencia. El análisis conjunto de los resultados supera al alcance diagnóstico de la determinación individual de cada autoanticuerpo [25 muestras positivas para GADA y 28 para IA-2A]. Esto coincide con la recomendación de determinar más un marcador para disminuir la posibilidad de informar al paciente un resultado negativo para la presencia de autoinmunidad, con la consiguiente falla terapéutica. Esto es de suma importancia en pacientes adultos, donde si no se demuestra el componente autoinmune no se comienza el tratamiento sustitutivo con insulina, perjudicando así a los islotes

de Langerhans residuales al sobreexigir la liberación de dicha hormona para mantener los niveles normales de glucosa en sangre perpetuando y acelerando el daño autoinmune. Incluso, si se establece una terapia con secretagogos de insulina (como las sulfonilureas) el cuadro se agrava aún más, precipitando el debut de la DM autoinmune con cetoacidosis. Actualmente, está contraindicado el empleo de sulfonilureas en pacientes con presencia de autoanticuerpos en circulación y diagnóstico de DM no insulino-requiriente; de hecho se propone el uso de inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) o insulina para mejorar el control glucémico en ellos [42].

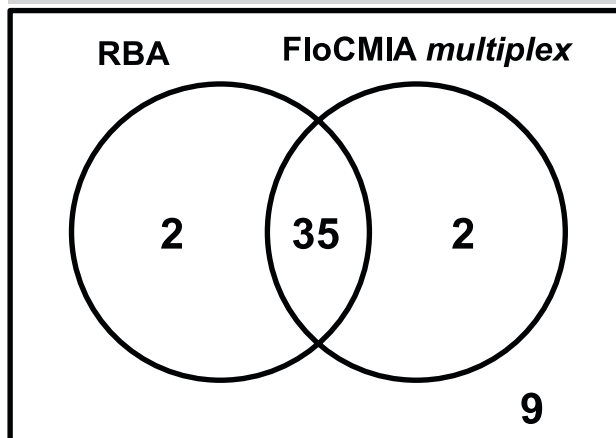
El análisis de regresión lineal y correlación entre las determinaciones de GADA por RBA y FloCMIA *multiplex* muestra que se relacionan linealmente y correlacionan de manera adecuada, rechazando la idea de que la correlación es debida a casualidad. Esto reafirma la idea de poder reemplazar el método radiométrico individual para la determinación de GADA por FloCMIA. Aunque posean principios fisicoquímicos diferentes, es evidente que el método FloCMIA posee características más cercanas a la fase fluida que los métodos en fase sólida clásicos, probablemente debido a que el pequeño tamaño de las microesferas, sumado a la incubación durante toda la noche del suero con las mismas (tiempo suficiente para alcanzar un estado cercano al equilibrio químico), podría constituir una “fase fluida virtual”.

Por otro lado, al analizar la regresión lineal entre las determinaciones de IA-2A por RBA y FloCMIA *multiplex* se observa que no existe buena relación lineal evidenciada por los valores bajos de R^2 obtenidos. *A priori*, esto podría deberse a que el método FloCMIA para IA-2A posee valores más altos de CV que aquellos para GADA al determinar altos títulos del marcador, lo cual produce un desvío de la linealidad. Como ambos métodos poseen principios fisicoquímicos diferentes no se esperaba una relación lineal ideal, y además el objetivo final es determinar presencia y ausencia del marcador, no tanto así su semicuantificación, por lo que no es tan crítica la falta de relación lineal entre señales sino que se detecte la presencia de IA-2A. Los métodos correlacionan de manera adecuada, indicando que cuando aumentan las señales por RBA también se observa el aumento por FloCMIA (análisis de r_s). Si bien las determinaciones individuales por FloCMIA no superan en *performance* al RBA, cuando se analiza la cantidad de pacientes con componente autoinmune demostrado por FloCMIA GADA e IA-2A a través del diseño *multiplex* se obtiene prácticamente el mismo número que aquellos detectados por RBA (Figura 6).

Es recomendable aplicar el diseño *multiplex* de FloCMIA, ya que en un único acto analítico se puede detectar el componente autoinmune en los sueros de pacientes de manera análoga a realizar dos determinaciones independientes por el método de referencia (mediante el empleo del diseño *multiplex* se evidenció mayor número de pacientes con componente autoinmune que realizando cada RBA por separado). Esto trae como ventaja:

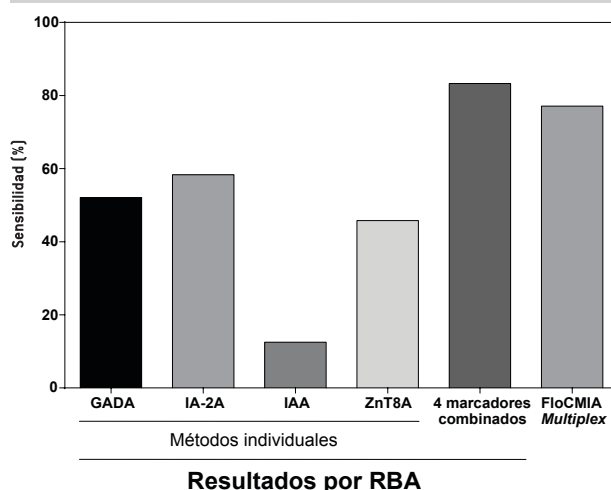
- I. Potencialmente disminuir los costos para el desarrollo e implementación de estos métodos en la clínica rutinaria,
- II. Utilizar equipamiento y procedimientos de menor complejidad,

Figura 6. Diagrama de Venn para los resultados integrados en la determinación de componente autoinmune (presencia de GADA y/o IA-2A) en 48 sueros de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1, realizado por RBA y FloCMIA *multiplex*.



- III. Aumentar la aplicabilidad de estos métodos en laboratorios de mediana complejidad que posean un citómetro de flujo con pocos requerimientos,
- IV. Descentralizar las determinaciones de marcadores humorales, como consecuencia del punto anterior,
- V. Lograr una mejora en el diagnóstico del componente autoinmune, análogo al método de referencia,
- VI. Mejorar la terapia una vez conocido el proceso autoinmune subyacente, ayudando incluso al médico clínico no especializado en diabetología (si no está seguro que análisis pedir al laboratorio, puede pedir la realización del FloCMIA *multiplex* y así aumentar las posibilidades de acceder a un diagnóstico correcto),
- VII. Disminuir el uso de material radiactivo eliminando la necesidad de tratar los desechos generados, pedir autorización a la autoridad regulatoria competente, formar personal con entrenamiento específico y autorizado, y disminuir los costos

Figura 7. Histograma de sensibilidad para los marcadores GADA, IA-2A, IAA y ZnT8A en comparación con el FloCMIA *multiplex* en 48 pacientes con DMT1.



de importación del insumo. Además, si bien el RBA es un método muy robusto, el trazador radiactivo decae rápidamente en el tiempo, afectando de manera negativa la performance analítica. Mientras tanto, los métodos FloCMA dependen de una producción sencilla, rápida y económica de las proteínas de fusión necesarias para adsorber a las microesferas.

En la Figura 7 se re-elaboraron los resultados obtenidos con los 48 sueros de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1. En dicha figura se muestra en forma comparativa la sensibilidad obtenida para el FloCMA *multiplex* respecto de los otros marcadores serológicos de autoinmunidad. Como puede observarse, la metodología desarrollada presentó el mayor porcentaje de positividad dentro del grupo de pacientes diabéticos evaluados en comparación a cada uno de los métodos individuales por radiometría: hasta un 77,1 % de los pacientes con diagnóstico reciente de DMT1 presentaron GADA y/o IA-2A por el FloCMA *multiplex*, un aumento significativo en la sensibilidad respecto de los métodos de referencia individuales para GADA, IA-2A, IAA y ZnT8A con los cuales se alcanzó una sensibilidad del 52,1 %, 58,3 %, 12,5 % y 45,8 % respectivamente. Al analizar la sensibilidad combinada, la incorporación de los marcadores IAA y ZnT8A dosados por RBA sólo aportó un 6,2% extra al porcentaje de pacientes con componente autoinmune (83,3% de sensibilidad combinada entre los 4 marcadores vs. 77,1 % detectado originalmente con RBA GADA e IA-2A analizados en conjunto). De hecho, no es una gran ventaja sobre el componente autoinmune detectado con FloCMA *multiplex* ya que en valor absoluto se detecta por RBA el proceso autoinmune subyacente en 3 pacientes más, 2 de ellos GADA (-)/IA-2A (-)/IAA (+)/ZnT8A (-) (uno de los cuales resultó GADA (+) por FloCMA) y 1 de ellos GADA (-)/IA-2A (-)/IAA (-)/ZnT8A (+). Por lo tanto, aún teniendo en cuenta la determinación conjunta de los 4 marcadores humorales principales, el FloCMA *multiplex* aún puede reemplazarlos con una buena *performance*. Si bien anteriormente nuestro grupo de trabajo desarrolló un método combinado para GADA e IA-2A que podía detectar el mismo número de pacientes diabéticos con etiología autoinmune que las determinaciones combinadas por RBA [34], este poseía un fundamento radiométrico por lo que no era posible su aplicación a un gran número de muestras e incluso sus costos no justificaban su aplicación rutinaria. Por otro lado, a diferencia del FloCMA *multiplex*, no podía discriminar entre marcadores, sólo detectar componente autoinmune. Por último, puede observarse en la figura 6 (diagrama de Venn para el componente autoinmune) que hay 2 pacientes originalmente RBA negativos que “positivizaron” al analizarse por FloCMA *multiplex*. Se considera que estos hallazgos analíticos no implican la aparición de falsos positivos debido a que:

- I. Al debutar con la patología, la clínica de estos pacientes es inequívoca para DMT1,
- II. Se acepta actualmente que el RBA por sí solo no es suficiente para descartar la presencia de autoinmunidad en pacientes diabéticos juveniles [43].
- III. El protocolo de FloCMA combinó interacciones de fase sólida [GADA/IA-2A con TrxGAD/TrxIA-2_{ic} inmovilizado] y fase fluida [complejo inmune microesfera- TrxGAD/TrxIA-2_{ic}-GADA/IA-2A

con TrxGAD/TrxIA-2_{ic} biotinilada] sumado a una incubación entre el suero y el antígeno adsorbido de ≈16 h (cercanía al equilibrio), lo que probablemente permitió una unión antígeno-GADA/IA-2A más estable.

- IV. La presencia de GADA o IA-2A de baja constante de afinidad (K_a) dificulta su detección por RBA ya que es un ensayo que detecta muy bajas concentraciones pero es altamente dependiente de la K_a . Mientras que aquellos ensayos de fase sólida pueden detectar dichos autoanticuerpos de baja afinidad, pero presentan grandes limitaciones respecto a su sensibilidad [44-46].
- V. Hay un reconocimiento de epitopes no expuestos originalmente en la fase fluida, porque en esta se utiliza el antígeno nativo expresado en un organismo eucariota. Esto no siempre significa que sea la forma en que se presenta al sistema inmune y se genera la respuesta inmune dirigida a estos autoantígenos, por lo que la forma en que se adsorbe sobre una superficie de poliestireno puede exponer epitopes necesarios para la unión del autoanticuerpo. Por otro lado, se usan dos moléculas estructuralmente diferentes y de distinta fuente celular, potencialmente presentando epitopes diferencialmente.
- VI. Finalmente, en particular en estos casos, los 2 pacientes evidenciaron componente autoinmune ya sea por presencia de IAA o ZnT8A, dándoles un fuerte respaldo experimental a la detección del proceso autoinmune.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el FloCMA *multiplex* es útil para el *screening* de la DMT1 en la población infanto-juvenil.

En el futuro se pretende extender el diseño *multiplex* al resto de los marcadores humorales de mayor prevalencia, como IAA/PAA y ZnT8A, y así contar con la detección simultánea y discriminativa de los 4 autoanticuerpos claves en DM autoinmune. De hecho, se puede seleccionar un panel diferencial de analitos a analizar dependiendo de la población en estudio y la prevalencia diferencial de los marcadores en las mismas:

- I. En pacientes niños y adolescentes sería conveniente estudiar GADA e IA-2A en principio para el apoyo diagnóstico en casos de debut sospechoso.
- II. En jóvenes y adultos no obesos, con comienzo clínico de DM (clasificación como LADA o DMT2 genuino), cobraría mayor importancia sumar el uso de ZnT8A o IAA a GADA, no tanto así IA-2A ya que se demostró la relación inversa entre sus títulos y la edad, y no aportaría aumento en la prevalencia del componente autoinmune. Sin embargo, su presencia indicaría alto riesgo para la rápida progresión a la insulino-dependencia.
- III. El estudio de los títulos de anticuerpos anti-insulina (IA) producidos por la terapia insulínica sustitutiva para detectar falla en el control metabólico de pacientes diabéticos, etc.

También es útil no sólo para el apoyo diagnóstico (mejor clasificación, aplicación terapéutica adecuada en el momento oportuno y máxima preservación funcional de los islotes pancreáticos) sino también para su aplicación en:

- I. Estudios de prevalencia en la población general,
- II. Estudios de predicción en grupos de riesgo (parientes en

primer grado, sanos, de pacientes con DMT1] aguardando la disponibilidad de terapias preventivas. Aquí sería útil la combinación GADA/IA-2A,

III. Prospección de la patología, entre otras.

Todas estas aplicaciones son posibles gracias a la posibilidad de evaluar un gran número de muestras en poco tiempo y con la posibilidad de obtener el resultado para varios marcadores en una determinación [efectuando un ahorro sustancial de muestra del paciente al evitar 4 determinaciones individuales, crítico en algunos grupos de pacientes]. También es destacable el rango dinámico amplio que posee FloCMIA, y si bien actualmente la semicuantificación de los marcadores no tiene una aplicación clínica inmediata ya que se busca presencia del mismo (priorizando la sensibilidad y especificidad), eventualmente podría correlacionarse con diferentes fenómenos consecuencia de la patología, como por ejemplo con la cercanía al debut, progreso del daño pancreático, el requerimiento de insulina [34], entre otras. En este contexto, Achenbach y col. examinaron prospectivamente el título de autoanticuerpos, la reactividad hacia ciertos epitopes y las subclases de IgG en familiares en primer grado de pacientes diabéticos con presencia de algún autoanticuerpo y determinaron cómo estos análisis pueden ser utilizados para estratificar la probabilidad de progresión hacia el debut clínico de la DMT1 [47]. De esta manera, demostraron que el riesgo de DMT1 aumenta en familiares con títulos de IA-2A e IAA por encima del umbral del percentilo 99 de individuos controles, pero que el riesgo no se relaciona con los títulos de GADA.

Como consecuencia de esto, el RBA quedaría como un método complementario o confirmatorio para ciertos casos dudosos, reemplazado por un método más adecuado para *screening* rápido, masivo y económico debido a que es más simple de ejecutar, menos costoso, aplicable a la práctica clínica y factible de ser automatizado.

Como conclusión se logró desarrollar un inmunoensayo no radiométrico basado en citometría de flujo el cual logró tanto la mayor sensibilidad analítica en la búsqueda de autoinmunidad en DMT1 como el mayor VPP en la evaluación del riesgo a desarrollar DMT1.

Agradecimientos

Agradecemos a Liliana Trífone y Adriana Roussos del Servicio de Nutrición del Hospital Pediátrico Nacional Gutiérrez y a la División de Hemoterapia del Hospital de Clínicas José de San Martín (Buenos Aires, Argentina) por recolectar y suministrar el suero de pacientes diabéticos y de individuos controles normales, respectivamente.

Este trabajo fue financiado en parte por los subsidios del Programa FONCYT de la Agencia Nacional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología (PICT-2008-0998), el Consejo Nacional de Investigación (CONICET) PIP 11220120100256CO y la Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (UBA 20020110100146).

Referencias bibliográficas

1. Group IDFDA. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. Diabetes research and clinical practice. 2015; 109(3):461-5. Epub 2015/06/30.
2. Palmer JP, Hirsch IB. What's in a name: latent autoimmune diabetes of adults, type 1.5, adult-onset, and type 1 diabetes. Diabetes care. 2003;26(2):536-8.
3. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. Diabetic Medicine : a Journal of the British Diabetic Association. 1994;11(3):299-303.
4. Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. Cell Mol Life Sci. 2007;64(7-8):865-72.
5. Reaven GM, Bernstein R, Davis B, Olefsky JM. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? The American Journal of Medicine. 1976;60(1):80-8.
6. DeFronzo R, Deibert D, Hendler R, Felig P, Soman V. Insulin sensitivity and insulin binding to monocytes in maturity-onset diabetes. The Journal of Clinical Investigation. 1979;63(5):939-46.
7. Turner RC, Holman RR, Matthews D, Hockaday TD, Peto J. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. Metabolism: Clinical and Experimental. 1979; 28(11):1086-96.
8. Olefsky JM, Kolterman OG, Scarlett JA. Insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. The American Journal of Physiology. 1982;243(1):E15-30.
9. SEARCH for Diabetes in Youth: a multicenter study of the prevalence, incidence and classification of diabetes mellitus in youth. Controlled clinical trials. 2004;25(5):458-71.
10. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. Diabetes. 1965; 14(10):619-33.
11. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. N Engl J Med. 1986;314(21):1360-8.
12. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. Lancet. 2014;383(9911):69-82.
13. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2006;29 Suppl 1:S43-8.
14. Eisenbarth GS, Jeffrey J. The natural history of type 1A diabetes. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia 2008; 52(2):146-55.
15. Rabin DU, Pleasic SM, Palmer-Crocker R, Shapiro JA. Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens. Diabetes. 1992;41(2):183-6.
16. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. Diabetes. 1994; 43(11):1304-10.

17. Roll U, Christie MR, Standl E, Ziegler AG. Associations of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetes*. 1994; 43(1):154-60.
18. Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, et al. Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. *Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie. Diabetologia*. 1996;39(11):1351-6.
19. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Chase HP, et al. Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type I diabetes. *Journal of autoimmunity*. 1996;9(3):379-83.
20. Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, et al. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia*. 1995; 38(7):816-22.
21. Gianani R, Rabin DU, Verge CF, Yu L, Babu SR, Pietropaolo M, et al. ICA512 autoantibody radioassay. *Diabetes*. 1995; 44(11):1340-4.
22. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes*. 1997; 46(11):1701-10.
23. Gorus FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. *The Belgian Diabetes Registry. Diabetologia*. 1997; 40(1):95-9.
24. Hawa M, Rowe R, Lan MS, Notkins AL, Pozzilli P, Christie MR, et al. Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes*. 1997; 46(8):1270-5.
25. Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Annals of Internal Medicine*. 2004;140(11):882-6.
26. Knip M. Can we predict type 1 diabetes in the general population? *Diabetes care*. 2002;25(3):623-5.
27. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 1996; 45(7):926-33.
28. Achenbach P, Schlosser M, Williams AJ, Yu L, Mueller PW, Bingley PJ, et al. Combined testing of antibody titer and affinity improves insulin autoantibody measurement: Diabetes Antibody Standardization Program. *Clinical Immunology*. 2007;122(1):85-90. Epub 2006/10/25.
29. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 1983;222(4630):1337-9.
30. Grubin CE, Daniels T, Toivola B, Landin Olsson M, Hagopian WA, Li L, et al. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia*.
31. Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. World Health Organization Technical Report Service. 1985; 727:1-113.
32. Papouchado ML, Valdez SN, Ermacora MR, Ganán S, Poskus E. Highly-sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assays for GAD65 autoantibodies using a thioredoxin-GAD65 fusion antigen. *Journal of immunological methods*. 1997; 207(2):169-78.
33. Sica MP, Primo ME, Ermacora MR, Poskus E. High-yield expression of properly folded insulinoma-associated protein intracellular domain (IA-2ic) in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2003; 37(Pt 3):301-9.
34. Valdez SN, Sica MP, Labovsky V, Iacono RF, Cardoso AL, Krochik AG, et al. Combined measurement of diabetes mellitus immunological markers: an assessment of its benefits in adult-onset patients. *Autoimmunity*. 2001; 33(4):227-36.
35. Papouchado ML, Valdez SN, Ghiringhelli D, Poskus E, Ermacora MR. Expression of properly folded human glutamate decarboxylase 65 as a fusion protein in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 1997; 246(2):350-9.
36. Guerra LL, Faccinetti NI, Trabucchi A, Rovitto BD, Sabljic AV, Poskus E, et al. Novel prokaryotic expression of thioredoxin-fused insulinoma associated protein tyrosine phosphatase 2 (IA-2), its characterization and immunodiagnostic application. *BMC Biotechnol*. 2016; 16(1):84.
37. Trabucchi A, Guerra LL, Faccinetti NI, Iacono RF, Poskus E, Valdez SN. Expression and characterization of human proinsulin fused to thioredoxin in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012; 94(6):1565-76.
38. Hoffman RD, Lane MD. Iodophenylarsine oxide and arsenical affinity chromatography: new probes for dithiol proteins. Application to tubulins and to components of the insulin receptor-glucose transporter signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(20):14005-11.
39. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995; 155(11):5419-26.
40. Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Böhm BO, Richter W. Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes*. 1997; 46(4):565-71.
41. Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG. GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes*. 1998; 47(4):592-7.
42. Leslie RD, Palmer J, Schloot NC, Lernmark A. Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. *Diabetologia*. 2016;59(1):13-20.
43. Villalba A, Iacono RF, Valdez SN, Poskus E. Detection and immunochemical characterization of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in patients with autoimmune diabe-

- tes mellitus. *Autoimmunity*. 2008;41(2):143-53.
44. Stumpo RR, Llera AS, Cardoso AI, Poskus E. Solid versus liquid phase assays in detection of insulin antibodies. Influence of iodination site on labelled insulin binding. *Journal of immunological methods*. 1994; 169(2):241-9.
 45. Sodoyez-Goffaux F, Koch M, Dozio N, Brandenburg D, Sodoyez JC. Advantages and pitfalls of radioimmune and enzyme linked immunosorbent assays of insulin antibodies. *Diabetologia*. 1988; 31(9):694-702.
 46. Sodoyez JC, Koch M, Lemaire I, Sodoyez-Goffaux F, Rapaille A, Francois-Gerard C, et al. Influence of affinity of antibodies upon their detection by liquid phase radiobinding assay and solid phase enzyme linked immunosorbent assay. Demonstration using monoclonal antibodies raised against rDNA human proinsulin. *Diabetologia*. 1991;34(7):463-8.
 47. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJ, Bingley PJ, et al. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes*. 2004;53(2):384-92.

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección molecular de *Trypanosoma cruzi*. Experiencia en un hospital público

Irurtia, María Cecilia; Magdaleno, María Alejandra; Peluffo, Graciela; Di Bartolomeo, Susana; Montenegro, Graciela

¹Laboratorio de Microbiología, Servicio de Bioquímica, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Hospital Nacional "Profesor Alejandro Posadas", Morón, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: Irurtia, María Cecilia. Laboratorio de Microbiología, Servicio de Bioquímica, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Hospital Nacional "Profesor Alejandro Posadas". Presidente Illia y Marconi s/Nro., El Palomar, Morón, Provincia de Buenos Aires, Argentina; bioqceciliairurtia@gmail.com

Resumen

Introducción: el diagnóstico de Chagas agudo, congénito y de reactivación chagásica se basa en la observación microscópica del parásito. Debido a la baja sensibilidad de estas técnicas se han desarrollado métodos de biología molecular para su diagnóstico. **Objetivo:** evaluar la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del *Trypanosoma cruzi*. **Materiales y métodos:** se determinó el límite de detección (LoD) a partir de una curva de parásitos y la sensibilidad analítica con diluciones seriadas de ADN de *T. cruzi* usando 2 PCR *in-house*. Se estudiaron 53 muestras de recién nacidos de madres seropositivas para Chagas y 25 de pacientes crónicos con sospecha de reactivación chagásica. Las técnicas utilizadas fueron: micrométodo para sangre, observación microscópica directa para LCR y dos PCR (PCR-ADN kinetoplastídico y PCR-ADN nuclear). **Resultados:** el LoD para ADN nuclear fue 1,45 parásitos/ml (IC 95 %: 1,06 - 3,54) y para ADN del kinetoplasto fue 1,00 parásitos/ml (IC 95 %: 0,76 - 1,77). La sensibilidad analítica en ambas PCR fue de 0,1 fg/μl. En el total de muestras (n = 78), la cantidad de positivos detectados por PCR fueron significativamente mayores que con los métodos directos (33 % vs. 9 %, p < 0,01). El índice de concordancia Kappa entre ambos métodos fue "aceptable" (Kappa = 0,698; p < 0,0001) para recién nacidos y "malo" (Kappa = 0,083; p = 0,299) para pacientes crónicos con sospecha de reactivación chagásica. **Conclusiones:** la sensibilidad de la PCR superó ampliamente a la de los métodos parasitológicos directos. La implementación de las técnicas de biología molecular para detección de *T. cruzi* aumentaría el número de pacientes beneficiados por un tratamiento precoz.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, diagnóstico molecular, PCR, ADN satélite, kinetoplasto.

Abstract

Introduction: the diagnosis of acute and congenital Chagas disease, as well as of Chagas disease reactivation, is based on the microscopic observation of the parasite. Due to the low sensitivity of this technique, molecular methods have been developed for this diagnosis. **Objective:** To evaluate the usefulness of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Trypanosoma cruzi*. **Materials and methods:** The limit of detection (LoD) was determined with a curve of parasites and the analytical sensitivity with serial dilutions of *Trypanosoma cruzi* DNA, by using two in-house PCRs. We studied 53 samples from newborns born to mothers who were seropositive for Chagas and 25 from chronic patients with suspected Chagas disease reactivation. The techniques used were: micro-method for blood, direct microscopic observation for CSF and two PCR (kinetoplastic DNA-PCR and nuclear DNA-PCR). **Results:** The LoD for nuclear DNA was 1.45 parasites/ml (CI 95 %: 1.06 - 3.54), whereas that for kinetoplast DNA was 1.00 parasites/ml (CI 95 %: 0.76 - 1.77). The analytical sensitivity in both PCRs was 0.1 fg/μl. In the samples studied (n = 78), the number of positive samples detected by PCR was significantly higher than detected with the direct methods (33 % vs. 9 %, p < 0.01). The Kappa concordance index between both methods was "acceptable" (Kappa = 0.698; p < 0.0001) for newborns and "bad" (Kappa = 0.083; p = 0.299) for chronic patients with suspected Chagas disease reactivation. **Conclusions:** The sensitivity of PCR exceeded that of direct parasitological methods. The implementation of molecular biology techniques for the detection of *T. cruzi* would increase the number of patients diagnosed, who will in turn be benefited by an early treatment.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, molecular diagnosis, PCR, satellite DNA, kinetoplast.

Introducción

La Enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al hospedador vertebrado a través de un vector (triatomino) infectado. Existen otras vías de transmisión no vectoriales como la transplacentaria, transfusión de sangre, trasplante de órganos, ingesta de alimentos contaminados con parásitos y accidentes de laboratorio.

La infección por *T. cruzi* constituye un problema de salud de relevancia social y económica en muchos países de América Latina. Ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 13 enfermedades tropicales desatendidas del mundo [1,2]. La OMS ha estimado, para Latinoamérica, que cerca de 8 millones de personas permanecen hoy infectadas por *T. cruzi*. En nuestro país, habría entre 1.500.000 y 2.000.000 de niños y adultos infectados [3], por lo que se considera la principal endemia. Según datos del Ministerio de Salud de la Nación (Programa Nacional de Chagas) la seroprevalencia de infección por *T. cruzi* en embarazadas en Argentina fue de 6,8 % en 2000 y 4,84 % en 2010. En base a estos datos, se estima que cada año nacen 1300 niños infectados por transmisión congénita.

En nuestro país, la situación actual de control de Chagas es heterogénea y en las regiones no endémicas existe riesgo de transmisión congénita derivado de las migraciones, lo que también ocurre en otras partes del mundo [4].

Durante el curso de la Enfermedad de Chagas se puede distinguir una fase aguda, caracterizada por una abundante parasitemia, seguida de una fase indeterminada de recuperación, hasta finalmente instaurarse la fase crónica de la enfermedad. Ésta última se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgG específicos y de una parasitemia escasa e intermitente con un curso clínico impredecible, que va desde la ausencia de síntomas hasta una enfermedad severa con compromiso cardiovascular y/o gastrointestinal que pueden ocasionar la muerte [5,6]. Los pacientes con Chagas crónico que sufren algún grado de inmunosupresión (trasplante de órganos, infección por VIH, tratamiento oncológico) pueden presentar una reactivación del *T. cruzi*.

La demostración de la presencia del parásito constituye el diagnóstico de certeza para definir la reactivación de la enfermedad o para el diagnóstico de la infección en los recién nacidos [7]. En etapas posteriores, el diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de anticuerpos específicos [8].

El Ministerio de Salud de la Nación a través del Programa Nacional de Chagas recomienda que el niño recién nacido, hijo de madre infectada sea estudiado en las primeras semanas de vida por métodos parasitológicos directos y a partir de los 10 meses de edad por métodos serológicos [7]. Cabe consignar que 9 de cada 10 niños tratados en fase aguda y 8 de cada 10 niños tratados en la fase crónica negativizan los anticuerpos, lo cual forma parte de los criterios de "curación" [7]. Por tal motivo, la detección temprana del parásito resulta fundamental a la hora de prevenir complicaciones posteriores.

Los métodos parasitológicos directos se basan en la observación por microscopía del parásito y son los comúnmente utilizados ya que pueden ser realizados en laboratorios de baja

complejidad. Debido a la baja sensibilidad de estas técnicas y con el advenimiento de la Biología Molecular se han desarrollado, en los últimos años, una gran cantidad de técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas [9]. Entre estos, se encuentran la PCR para la detección de la región variable del ADN de minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi* y la PCR para la detección de una secuencia de 195 pares de bases del ADN satélite de *T. cruzi*. Estas PCR tienen gran sensibilidad ya que se basan en la amplificación de secuencias repetitivas. A su vez, revisten de una elevada especificidad debido a que sólo amplifican el ADN de *T. cruzi* y no de otros parásitos relacionados [10,11]. Como ambas secuencias se encuentran representadas en un número de copias muy similar, las diferencias en el límite de detección de cada técnica dependen de la optimización de cada reacción.

En muchos trabajos se han realizado comparaciones entre la PCR y los métodos parasitológicos directos para la detección de *T. cruzi* reportándose en todos ellos un incremento de casos positivos por PCR [12-16].

Considerando que el tratamiento temprano presenta grandes beneficios, existe la necesidad de contar con un ensayo sensible, específico y rápido para el diagnóstico de los casos de Chagas agudo, congénito y de reactivación chagásica. Los métodos parasitológicos, aunque precoces y altamente específicos son poco sensibles mientras que los métodos serológicos dan un diagnóstico tardío. Por tal motivo, cobran relevancia las características de las técnicas de biología molecular al combinar alta sensibilidad y especificidad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilidad de la detección molecular de *Trypanosoma cruzi* realizando dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), con diferentes cebadores y comparar su capacidad de detección respecto a los métodos parasitológicos directos en pacientes crónicos y en recién nacidos de madre chagásica atendidos en este hospital.

Materiales y métodos

1. Aislado parasitario/curva de parásitos. Se utilizaron epimastigotes de cultivo de *T. cruzi* linaje CLBr, provistos por el Laboratorio de Biología Molecular de La Enfermedad de Chagas-INGEBI, a partir de los cuales se realizaron diluciones seriadas en sangre seronegativa. Para estas se partió de una concentración de 1000 parásitos/ml hecha por recuento en cámara de Neubauer y se realizaron las diluciones de 100, 20, 10, 5, 1 y 0,5 par/ml. De cada dilución se realizaron 9 extracciones del ADN (ver ítem 5) que fueron procesadas acorde a lo descrito más adelante.
2. Curvas de sensibilidad de ADN: partiendo de una alícuota de ADN puro de parásitos, se midió la concentración del mismo a 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop (EEUU) y luego se realizaron diluciones seriadas en sangre entera anticoagulada con EDTA con serología negativa para Chagas, hasta obtener las siguientes concentraciones: 1000 fg/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl, 1 fg/μl y 0,1 fg/μl. Cada dilución se extrajo según ítem 5 y se realizaron corridas por duplicado.
3. Muestras de Pacientes. Se analizaron 78 muestras con soli-

ciudad médica de parasitemia para Chagas atendidos en este hospital: 53 muestras de sangre de 44 recién nacidos de madres seropositivas para Chagas (RN) y 25 muestras de 11 pacientes chagásicos crónicos. Entre los pacientes crónicos se incluyeron 2 muestras de sangre de pacientes pediátricos inmunosuprimidos (uno con Linfoma + HIV y el otro con leucemia linfocítica aguda) y 17 muestras de sangre y 6 muestras de LCR de 9 pacientes HIV (+) con lesión ocupante de espacio (LOE), compatible con "Chagoma" cerebral. Las muestras pertenecientes a un mismo paciente corresponden a distintos momentos durante el curso del seguimiento médico.

4. Métodos parasitológicos. Se realizó la observación directa al microscopio óptico para los LCR y el micrométodo para sangre [17]. El micrométodo fue adaptado acorde a las siguientes modificaciones: se colocó 1 ml de sangre entera en un tubo estéril y se dejó decantar 24 horas a temperatura ambiente, luego se tomaron 12 gotas de la interfase (zona de glóbulos blancos) y se colocaron entre porta y cubreobjetos. La observación microscópica se realizó en 10X y 40X por microscopía con contraste de fase, recorriendo la totalidad de los campos en los 12 preparados.

5. Extracción de ADN. Se realizó la extracción de ADN de todas las muestras y de las diluciones de parásitos utilizando columnas comerciales (Roche, Mannheim, Alemania), según indicaciones del fabricante y reservando a -20 °C hasta su procesamiento. Se incluyó en cada tanda de extracción un control usando sangre seronegativa.

6. Técnica de PCR para la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi* (k-DNA). Se realizó una adaptación del protocolo descrito por Burgos y col. [18], mediante la cual se amplifica una banda de 330 pares de bases (pb) empleando los cebadores 121 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3', y 122 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA-3'. Brevemente, las condiciones de reacción fueron: Buffer 1X, desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP) 0,25 mM, cebadores 2,5 µM, cloruro de magnesio 3 mM y Polimerasa 0,75 U (taqPlatinum de Invitrogen con sistema *Hot start*. CA, EEUU) para un volumen final de mezcla de reacción de 25 µl y volumen de muestra de 5 µl. La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: un ciclo inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 68 °C y 45 segundos a 72 °C, luego 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 64 °C y 45 segundos a 72 °C, finalmente a 72 °C durante 10 minutos.

7. Técnica de PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* (sat-DNA). Se emplearon los cebadores específicos diseñados por Piron y col. [19]: TC1 5'-ASTCGGCTGATCGTTTCGA-3' y TC2 5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'. Estos cebadores permiten la amplificación de una región repetida de 166 pares de bases del ADN satélite de *T. cruzi*. Durante la puesta a punto de la técnica se optimizaron las condiciones de reacción, las cuales fueron: Buffer 1X, dNTP 0,25 mM, cebadores 0,5 µM, cloruro de magnesio 3 mM y Polimerasa 0.6 U (taqPlatinum de Invitrogen con sistema *Hot start*. CA, EEUU) para un volumen final de mezcla de reacción de 25 µl y volumen de muestra de 5 µl.

La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: un ciclo inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 60 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C y 60 segundos a 72 °C. Todas las técnicas de amplificación se realizaron con el termociclador DNAEngine de BioRad (CA, EEUU).

8. Procedimiento y controles internos. Cada muestra se procesó por duplicado con controles negativos entre cada una, un control de reactivos y tres controles positivos de distinta concentración en cada ensayo. Simultáneamente, se realizó un control de idoneidad de la muestra mediante una amplificación del gen β -actina humana.

9. Electroforesis de ADN en geles de agarosa. La electroforesis se realizó en geles de agarosa (Invitrogen, CA, EEUU) al 2 % utilizando Buffer TAE (Tampón Tris Acetato 40 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0) y un sistema de electroforesis horizontal (Bio Rad, Sub Cell GT, CA, EEUU). Se empleó un voltaje de 90V durante 45 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Bio Basic Inc, Ontario, Canadá). Las bandas de ADN se visualizaron con transiluminador de luz ultravioleta (UV Transilluminator UVP). El tamaño de las bandas de ADN se estimó comparándolas con un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, CA, EEUU).

10. Análisis estadístico. El LoD se calculó como la carga parasitaria más baja que proporciona ≥ 95 % de los resultados detectables por PCR para ambos blancos moleculares, de acuerdo con las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio [20] adaptadas a los propósitos de este trabajo. El LoD se calculó por análisis de regresión Probit con Minitab 15 Statistical Software (Minitab Inc., 2014, State College, PA, EEUU).

Para la comparación de proporciones se aplicó el test de Fisher y para evaluar la concordancia se calculó el índice Kappa, confeccionando las tablas de contingencia. Se aplicó la escala propuesta por Landis y Koch [21] para la interpretación del índice Kappa. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 19.0 (IBM, III, EEUU).

Resultados

Cálculo de sensibilidad analítica:

El LoD mediante análisis Probit fue 1,45 parásitos/ml (IC 95 % 1,06 - 3,54) para PCR sat-DNA y 1,00 parásitos/ml (IC 95 % 0,76 - 1,77) para k-DNA (Tabla I).

Las figuras 1 y 2 corresponden a las corridas electroforéticas mostrando los resultados de las amplificaciones. Se observa una banda predominante a la altura de 330 pb para las corridas realizadas con los cebadores de k-DNA y una banda predominante a la altura de 188 pb correspondientes a una unidad de repetición del ADN satélite. Las bandas de peso molecular superior son múltiplos de la unidad de ADN satélite.

La sensibilidad analítica expresada en masa de ADN para los 2 sistemas de amplificación estudiados fue 0,1 fg/µl. Si se considera que un parásito contiene aproximadamente 200 fg de ADN, la sensibilidad analítica determinada en masa de ADN sería equivalente a aproximadamente 0,5 par/ml, lo cual es levemente inferior a los resultados obtenidos en la curva de parásitos.

Figura 1. Productos de amplificación de la PCR para la curva de parásitos de *T. cruzi* [parásitos/ml].

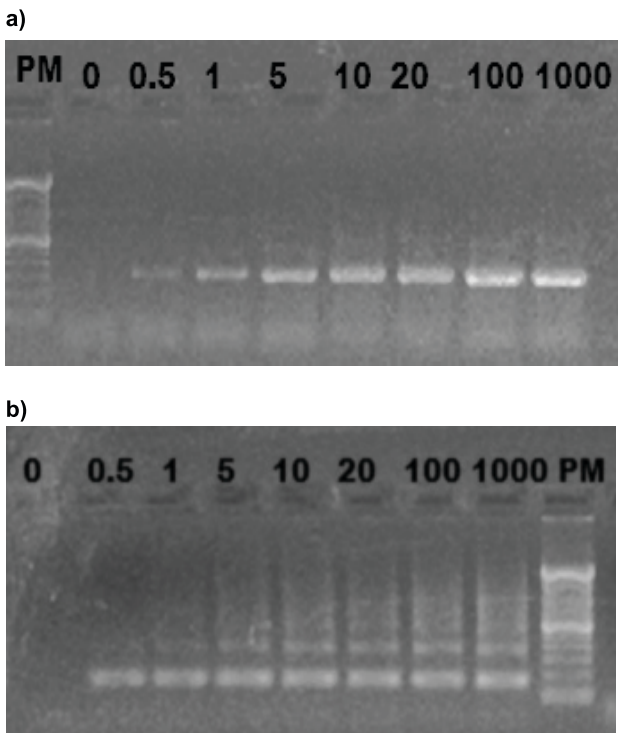
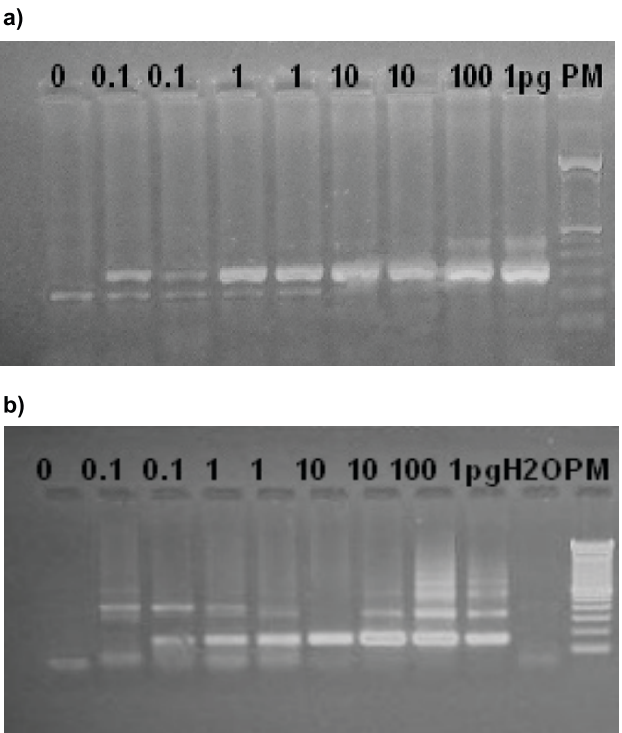


Figura 2. Productos de amplificación de la PCR para la curva de masa de ADN de *T. cruzi* [fg/μl].



► a) con cebadores 121-122 para k-DNA se observa banda a la altura de 330 pb
b) con cebadores TC1 y TC2 para sat-DNA se observa banda a la altura de 188 pb
PM: Marcador de peso molecular de 100 pb

Comparación de los métodos en muestras de pacientes:

Entre las 78 muestras analizadas, 26 presentaron PCR positiva y 7 fueron micrométodo positivo. Es destacable que ninguna de las muestras con micrométodo positivo fue negativa por PCR (Tabla II). El índice Kappa calculado en el total de las muestras fue de 0,329 ($p < 0,0001$), constatando la “regular” concordancia, en general, entre los métodos.

En el grupo de los RN entre las 53 muestras de sangre ana-

lizadas, 7 presentaron PCR positiva y 4 micrométodo positivo (Tabla III). En 9 de los 44 RN se documentaron resultados de 2 muestras en diferentes períodos. Entre ellos se destacó un caso en el que el resultado de la PCR fue positivo al nacer y a los 18 días de vida, mientras que el micrométodo fue positivo solamente en la segunda muestra. La concordancia entre los métodos en este subgrupo de muestras puede considerarse “aceptable” ya que el índice Kappa fue de 0,698 ($p < 0,0001$).

Entre las 25 muestras de pacientes crónicos analizadas, 19 presentaron PCR positiva y sólo 3 fueron positivas por micrométodo. Nuevamente, ninguna de las muestras con micrométodo

Tabla I. Curva de parásitos/ml para las dianas sat-DNA y k-DNA.

Concentración (parásitos/ml)	Réplicas	PCR			
		Sat-DNA		k-DNA	
		Pos	Neg	Pos	Neg
0	9	0	9	0	9
0.5	9	4	5	6	3
1	9	6	3	8	1
5	9	9	0	9	0
10	9	9	0	9	0
20	9	9	0	9	0
100	9	9	0	9	0
1000	9	9	0	9	0

► Pos: Número de ensayos que detectaron ADN de *T. cruzi*; Neg: Número de ensayos que no detectaron ADN de *T. cruzi*.
El análisis Probit arrojó un LoD de 1,45 parásitos/ml [IC 95 % 1,06 - 3,54] para PCR sat-DNA y de 1,00 par/ml [IC 95 % 0,76 - 1,77] para PCR k-DNA.

Tabla II. Resultados de PCR y MM en el total de muestras analizadas [n = 78].

	PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
MM (+)	7	0	7
MM (-)	19	52	71
TOTAL	26	52	78

► PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo. Se consideró PCR (+) a aquellas muestras que fueron positivas en las dos reacciones evaluadas.
Kappa= 0,329 [IC 95 % 0,135 - 0,524]; $p < 0,0001$.
Grado de acuerdo “regular”.

Tabla III. Resultados de PCR y MM en muestras de recién nacidos (n = 53).

	PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
MM(+)	4	0	0
MM (-)	3	46	49
TOTAL	7	46	53

► PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo. Se consideró PCR (+) a aquellas muestras que fueron positivas en las dos reacciones evaluadas.

Kappa= 0,698 [CI95 % 0,382 - 1,000]; p < 0,0001.

Grado de acuerdo "aceptable".

Tabla IV. Resultados de PCR y MM en muestras de pacientes crónicos (n = 25).

	PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
MM (+)	3	0	3
MM (-)	16	6	22
TOTAL	19	6	25

► PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo. Se consideró PCR (+) a aquellas muestras que fueron positivas en las dos reacciones evaluadas.

Kappa= 0,083 [CI95 % 0,025 - 0,190]; p= 0,299.

Grado de acuerdo "malo".

positivo presentó PCR negativo (Tabla IV). La concordancia entre los métodos en las muestras de este subgrupo de pacientes fue "mala" (Kappa = 0,083; p = 0,299).

La Tabla V describe en detalle los resultados de los pacientes con sospecha de reactivación chagásica. Al analizar los resultados de los 9 pacientes HIV (+) con LOE, 6 resultaron positivos para *T. cruzi* (3 sólo por PCR y los otros 3 por ambas técnicas). Asimismo, en coherencia con una mayor sensibilidad de las técnicas de biología molecular, durante los controles postratamiento el micrométodo negativizó antes que la PCR. De los 6 LCR estudiados 4 fueron positivos por PCR, de los cuales sólo 1 de ellos presentó microscopía positiva. Los pacientes pediátricos

con compromiso del sistema inmune y serología positiva para Chagas, presentaron ambos PCR positiva y micrométodo negativo (Tabla V).

La figura 3 compara el porcentaje de positividad por la PCR y el micrométodo diferenciando entre pacientes recién nacidos y crónicos. Como se puede observar el número de positivos es significativamente mayor al utilizar la PCR que al utilizar el micrométodo.

Discusión

El resultado más relevante del trabajo fue poder documentar la mayor capacidad de detección de la PCR con respecto a los métodos tradicionales usando muestras de sangre y LCR. Esta mayor sensibilidad se observó tanto en muestras de pacientes crónicos, así como en muestras de recién nacidos de madre chagásica.

El diagnóstico serológico de la infección neonatal por *T. cruzi* se ve impedido debido a la transferencia pasiva de los anticuerpos IgG de la madre. Por otro lado, si bien en la infección congénita suele haber parasitemia, ésta no es siempre detectada por los métodos parasitológicos tradicionales (tal como fue observado en el presente estudio). La PCR, que detecta y amplifica pequeñas cantidades de ADN parasitario, provee una alternativa complementaria para el diagnóstico de esta infección en el neonato y establecer el tratamiento lo más precozmente posible.

En el Hospital Posadas se aconseja tomar dos muestras de sangre en los bebés: una al nacimiento y la otra a las 2 - 4 semanas de vida. De esta manera, se amplía el rango de detección del parásito. En el caso que las dos muestras sean negativas, los bebés deberán estudiarse a los 10 meses de vida por métodos serológicos. En este medio, resulta de suma utilidad el hecho de contar con esta herramienta diagnóstica de alta sensibilidad debido a que la mayoría de los bebés de madre chagásica no vuelven al Hospital para una segunda toma de muestra ni para el control serológico de los 10 meses. Al poder brindar un resultado positivo aún con la primera muestra, más niños podrían ser beneficiados con el tratamiento antiparasitario.

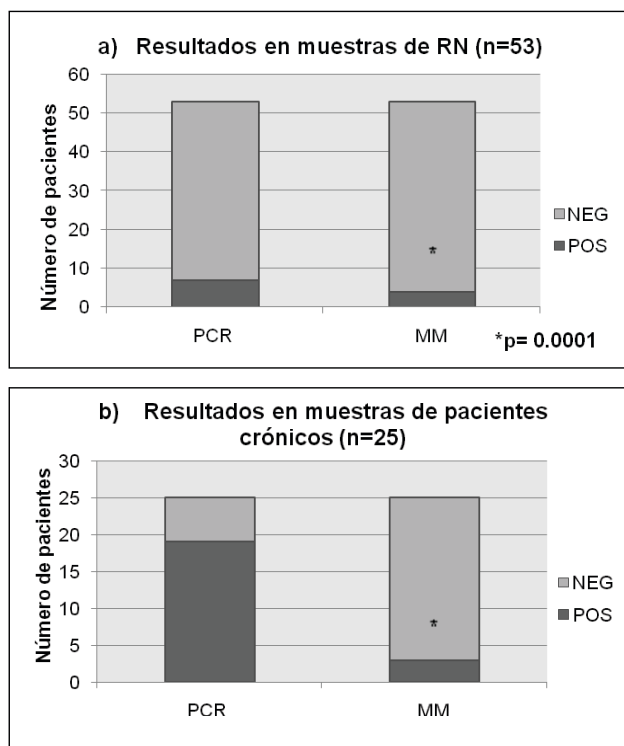
Si bien el tratamiento temprano de la enfermedad de Chagas congénito presenta una buena repuesta terapéutica, con índices de curación cercanos al 100 %, en la actualidad se descono-

Tabla V. Detalle de resultados de PCR y MM de pacientes crónicos con sospecha de reactivación chagásica (n=11).

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	MUESTRA	MM*	PCR
CF	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	NEG
HS	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	POS
Tto		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
RR	HIV (+) / LOE	Sangre	POS	POS
Tto		Sangre	NEG	POS
SN	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	POS
		LCR	POS	POS
MN	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	POS
		LCR	NEG	POS
GR	HIV (+) / LOE	LCR	NEG	POS
LR	HIV (+) / LOE	LCR	NEG	NEG
SS	HIV (+) / LOE	LCR	NEG	NEG
BM	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	POS
Tto		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	POS	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	NEG
		Sangre	NEG	NEG
		LCR	NEG	NEG
SA	LLA-T	Sangre	NEG	POS
GA	HIV + Linfoma no Hodking	Sangre	NEG	POS

► NEG, negativo; POS, positivo; tto, inicio del tratamiento; LOE, lesión ocupante de espacio, PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo. *Para LCR se realiza microscopía directa. Se consideró PCR (+) a aquellas muestras que fueron positivas en las dos reacciones evaluadas.

Figura 3. Resultados de las muestras por biología molecular y métodos directos acorde al tipo de paciente.



► NEG, negativo; POS, positivo; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo

*p= 0.0002

ce la eficacia del tratamiento durante la fase crónica de la infección. Hasta el momento, el consenso sobre el criterio de “cura” comprende la negativización de las pruebas serológicas [22]. Sin embargo, la negativización de los títulos de anticuerpos en los pacientes crónicos no ocurre antes de 8 o 10 años después del tratamiento y en una proporción de pacientes no superior al 15 %. Por lo tanto, es necesario el uso de nuevos marcadores que permitan determinar la disminución de la carga parasitaria o la eliminación completa del parásito después del tratamiento. En los últimos años, la detección de ADN mediante la PCR y la PCR en tiempo real se ha convertido en las mejores alternativas [23].

Los límites de detección determinados en ambas PCR están dentro de los parámetros considerados adecuados para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*, según los criterios propuestos en un estudio internacional de PCR para Chagas, aplicado a casos de infección reciente por Chagas congénito y de reactivación chagásica por inmunosupresión [9]. El LoD obtenido se encuentra dentro del rango publicado, el cual abarca el intervalo 0,005 – 5,000 parásitos/ml, al igual que el valor obtenido para sensibilidad analítica expresada en masa de ADN, el cual, también, se halla dentro de los valores publicados (0,01 - 1,00 fg/μl) [9]. En este aspecto, se destaca la optimización de las condiciones de reacción para adaptar las técnicas de biología molecular a las condiciones de trabajo en este laboratorio.

La concordancia obtenida en el grupo de los recién nacidos fue “aceptable”, mientras que en el grupo de los pacientes crónicos fue “mala”. Esto se debe a que en general las parasitemias suelen ser más bajas en la etapa crónica de la enfermedad, y por lo tanto más difícilmente detectables por observación microscópica.

Una de las limitaciones de este trabajo es que no se contó con la serología a los 10 meses de los bebés, consecuentemente la tasa de falsos positivos de PCR no pudo ser determinada. No obstante, para realizar este trabajo se minimizaron los riesgos de contaminación (principal fuente de falsos positivos en este tipo de técnicas) utilizando las áreas separadas del laboratorio de biología molecular, los controles de reactivos y el control negativo de extracción en cada ensayo. Asimismo, se consideraron como positivas sólo aquellas muestras que fueron positivas por ambas técnicas de PCR. De este modo, es asumido que la tasa de falsos positivos fue nula o al menos mínima.

En conclusión, estos resultados muestran una mayor sensibilidad de la PCR respecto a los métodos tradicionales y son similares a los de publicaciones previas [16-24-27]. Por tal motivo, el presente trabajo permite aconsejar el uso de la PCR en el diagnóstico de la infección congénita y reactivación chagásica.

Agradecimientos: Al Dr. Darío Siciliani, médico del Servicio de Epidemiología del Hospital Prof. A. Posadas, por sus aportes y a la Dra. Silvia Balconi, jefa del servicio de Bioquímica, por su apoyo. Un agradecimiento especial al Dr. Tomás Meroño por su asesoramiento para la publicación de este trabajo.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. Brooker S, ed. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2007;1(2): e114.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of neglected tropical diseases. New Engl J Med. 2007;357:1018–1027.
- Jannin J, Salvatella R. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Panamericana de la Salud 2006; OPS/HDM/CD/425-06, 28 pp.
- Fumadó V, Juncosa T, Posada E, Fisa R, Gállego M, Gascón J. Chagas pediátrico en zona no endémica. Enferm Infecc Microbiol Clin 2014;32(5):293–296.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis 2001;1(2):92-100.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto J A. Chagas disease. Lancet 2010;375:1388-402.
- Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2012.
- Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA y Segovia M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. Enf Inf Microbiol Clin 2013;31 Suppl 1:26-34.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR

- methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *Plos negl trop dis* 2011;5: e931.
10. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51(6):771-777.
11. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27(7):1477-1482.
12. Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(5):1171-1175.
13. Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(3):487-491.
14. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(3):441-449.
15. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68(5):574-582.
16. Lucero RH, Brusés BL, Merino DE, Fernandez G. Enfermedad de Chagas congénito en Hospitales de la ciudad de Corrientes-Argentina. *Enf Emerg*. 2007;9(3):121-124.
17. De Rissio A, Riarte A, García M, Esteva M, Quaglini M. Ruiz A. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non endemic area of Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82: 838-845.
18. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2007;37:1319-1327.
19. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007; 103:195-200.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification: Approved Guideline. Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 2004.
21. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74
22. Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(1):331-335.
23. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):122-135.
24. Mora MC, Sanchez Negrette O, Marco D, Barrio A, Ciaccio M, Segura MA, et al. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J Parasitol*. 2005;91:1468-1473.
25. Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, et al. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serology and parasitological diagnosis. *Parasitology*. 1997;114:367-373.
26. Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, et al. Usefulness of PCR Strategies For Early Diagnosis of Chagas' Disease Reactivation and Treatment Follow-Up in Heart Transplantation. *Am J Transplant*. 2007; 7(6):1633-1640.
27. Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*. 1995;110:241-247.

ARTÍCULO ORIGINAL

Experiencia Argentina de Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) con Biopsia de Trofoblasto

Coco, Roberto*; Coco, Fabián; Mincman, Judith; Mondadori, Andressa; Montel Mendonza, Gabriela; Santomé, Matías; Altamirano, Belén; Gismondi, Fernando; Neuspiller, Nicolás

Fecunditas Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la UBA

Contacto: Roberto Coco, Roberto; Fecunditas Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la UBA; robercoco@gmail.com

Resumen

Introducción: existen varios tipos de biopsia embrionaria. La mayor experiencia se tiene con la biopsia en pre-embriones clivados de día 3, la cual está siendo reemplazada por la biopsia de blastocisto por sus ventajas. **Objetivo:** documentar la experiencia lograda con diagnóstico preimplantatorio en biopsia de blastocisto y transferencia diferida al ciclo estimulado para parejas con riesgo genético aumentado y otros motivos médicos. **Materiales y Métodos:** se realizaron 269 ciclos de diagnóstico preimplantatorio en 161 parejas, quienes fueron divididas en: trastornos monogénicos, reordenamientos balanceados, screening de aneuploidías embrionarias, tipificado para histocompatibilidad y selección de pre-embriones con factor Rh negativos en mujeres altamente sensibilizadas. Los estudios genéticos fueron abordados por mini secuenciación, rearrreglos de hibridación genómica comparada y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente. Un blastocisto sin mutaciones fue transferido al útero a los 30/60 días del ciclo estimulado. **Resultados:** de 850 blastocistos estudiados 334 (39 %) fueron normales y de 130 parejas transferidas, 53 lograron el embarazo (40,8 %), siendo 28,5 % embarazos evolutivos y 12,3 % abortados espontáneamente. **Conclusión:** la tasa de embarazo clínico por transferencia fue 40,8 %, la tasa de aborto 12,3 % y el error diagnóstico 1,8 %. El diagnóstico preimplantatorio permite establecer embarazos no afectados con una certeza del 98 % similar al prenatal efectuado en vellosidades coriónicas, con la ventaja de minimizar al 2 % el riesgo del establecimiento de un embarazo genéticamente anormal para el riesgo en cuestión.

Palabras clave: diagnóstico genético preimplantatorio, PGD, screening de aneuploidías embrionarias, PGS, diagnóstico de enfermedades génicas y cromosómicas.

Abstract

Introduction: there are several types of embryo biopsy. The main one is the biopsy of cleaved embryos of day 3, but this is being replaced by the blastocyst biopsy due to its advantages. **Objective:** to document the experience achieved with preimplantation genetic diagnosis in blastocyst biopsy and deferred transfer of the stimulated cycle for couples with increased genetic risk and other medical reasons. **Materials and Methods:** 269 cycles of preimplantation genetic diagnosis were performed in 161 couples, who were divided into: monogenic disorders, balanced rearrangements, aneuploidy embryo screening, histocompatibility typing and selection of the embryo with negative Rh factor in highly sensitized women. Genetic studies were approached by mini-sequencing, comparative genomic hybridization array and fluorescent quantitative polymerase chain reaction. A blastocyst without mutations was transferred to the uterus at 30/60 days of the stimulated cycle. **Results:** 334 (39 %) out of the 850 blastocysts studied were normal and 130 couples were transferred, 40.8 % of them achieved pregnancy, 28.5 % are ongoing pregnancies and 12.3 % aborted spontaneously. **Conclusion:** The clinical pregnancy rate per transfer was 40.8 %, the abortion rate 12.3 % and the misdiagnosis 1.8 %. The preimplantation diagnosis allowed establishing unaffected pregnancies with a diagnostic certainty of 98 % similar to prenatal diagnosis in chorionic villi, with the advantage of reducing to 2 % the risk of establishing a genetically abnormal pregnancy for the risk in question.

Key words: preimplantation genetic diagnosis, PGD, screening of embryonic aneuploidies, PGS, diagnosis of gene and chromosomal diseases.

Introducción

El diagnóstico genético pre-implantacional, conocido internacionalmente con la sigla PGD, es una alternativa de diagnóstico prenatal que se realiza en los pre-embiones originados *in vitro*, con la finalidad de seleccionar aquellos no afectados para una determinada condición genética y facilitar, así, el establecimiento de un embarazo libre de la afección que aqueja a la pareja. Por lo tanto, es una alternativa diagnóstico-terapéutica válida respecto de los diagnósticos prenatales convencionales que se realizan una vez establecido el embarazo.

Existen tres fuentes para la obtención del ADN pre-embionario en el que se realiza el estudio genético: a) biopsia del cuerpo polar I y II antes de la fecundación y en el momento de la fecundación, respectivamente, b) biopsia de una blastómera en ovocitos fecundados clivados con 6 a 8 células en día 3 del desarrollo *in vitro* y c) biopsia de trofoectodermo del blastocisto en día 5/6.

Para poder obtener las células se debe realizar una perforación en la zona pelúcida, ya sea por métodos mecánicos, químicos o físicos. De las tres opciones de biopsia, hoy la preferida es la biopsia del trofoectodermo que permite obtener varias células, entre 5 y 10, lo que asegura disponer de más cantidad de ADN para los estudios, además de no perturbar las células del macizo celular interno que originarán al futuro embrión-feto-nacido. Esto, por un lado, tranquiliza porque las células extraídas no están destinadas a formar parte del embrión, pero, por otro lado le quita valor diagnóstico, o sea que sólo permite inferir la constitución del embrión si se asume que todas las células conservarán la constitución fijada en el momento de la fecundación [1].

En sus comienzos el PGD se realizaba casi exclusivamente en las parejas con mayor riesgo para enfermedades monogénicas. En cambio, en la actualidad es usado mucho más en los laboratorios de fecundación *in vitro* para seleccionar a los blastocistos euploides que tienen mayor posibilidad de implantación. Cuando la finalidad es el screening de las aneuploidías pre-embionarias, para diferenciarlo del PGD se lo llama screening preimplantatorio de aneuploidías con su sigla en inglés PGS. En la actualidad, aproximadamente el 20 % de los diagnósticos son verdaderos PGDs y la mayoría son PGS con la finalidad de lograr la máxima eficacia en las diferentes técnicas de reproducción asistida. Cuando la caracterización molecular del trastorno en cuestión es conocida, el estudio genético es de tipo directo, pero cuando se desconoce y existen familiares afectados puede ser de tipo indirecto por ligamiento.

Más de 300 diferentes trastornos monogénicos han sido evaluados preimplantatoriamente alrededor del mundo [2]. Los más frecuentes son: hemoglobinopatías, fibrosis quística, atrofia muscular espinal, distrofia muscular de Duchenne, fragilidad del X y distrofia miotónica. Si bien, las indicaciones de PGD/PGS son similares a las del diagnóstico prenatal convencional (PND) en vellosidades o amniocitos, el PGD tiene menos objeciones éticas que el PND. Como la

finalidad del PGD/PGS es transferir pre-embiones no afectados, se evita la posibilidad de la interrupción del embarazo debido a un trastorno genético, que en Argentina está penado, mientras que la selección pre-embionaria, se podría decir que es lícita por la existencia de la ley de cobertura de las técnicas de fecundación *in vitro* desde el año 2012.

Otra gran ventaja es que las personas con riesgo de haber heredado una mutación con manifestación en vida adulta pueden acceder al PGD sin que se revele su condición de portador. Tal es el caso de la enfermedad de Huntington, que es una enfermedad progresiva sin cura que se manifiesta tardíamente en la vida, generalmente cuando los hijos de los afectados están planeando tener hijos. Muchos de ellos quieren asegurarse que sus descendientes no tengan la mutación sin revelarse el status de portador en ellos. A este respecto, el PGD permite la no transmisión sin revelar si desarrollará o no la enfermedad.

Los pacientes portadores de mutaciones con riesgo de tener descendencia con predisposición a desarrollar tumores a lo largo de su vida son otro ejemplo de la ventaja del PGD, ya que no se admitiría realizarlo por PND una vez logrado el embarazo.

Otra aplicación, aunque muy discutida, es la búsqueda de un hijo histoiéntico a uno existente que requiere de trasplante de médula ósea para sobrevivir y curarse con el tratamiento con las células del cordón umbilical. Las mujeres Rh negativas, altamente sensibilizadas con anticuerpos RHD también pueden evitar una probable eritroblastosis fetal con la selección de los pre-embiones Rh negativos.

Desde hace tiempo se viene sosteniendo que la transferencia de pre-embiones euploides podría restaurar la fertilidad perdida en las mujeres de edad avanzada que acceden a la fecundación *in vitro* (FIV). Si se tiene en cuenta que la tasa de embarazo disminuye a medida que aumenta la edad de la mujer y que la tasa de aborto espontáneo aumenta debido fundamentalmente a la mayor tasa de ovocitos aneuploides, es perfectamente entendible que la transferencia de pre-embiones euploides debería aumentar la tasa de embarazos evolutivos. Sin embargo, ese objetivo se ha logrado en mujeres de buen pronóstico que son las que responden bien a la estimulación ovárica y que pueden producir suficientes blastocistos para seleccionar. Al inicio, el screening de aneuploidías se efectuaba enumerando un determinado número de cromosomas con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente en biopsias de blastómeras, la cual en la actualidad fue reemplazada por las diferentes plataformas de cariotipos moleculares que permiten diagnosticar desbalances mayores a 2MB, tales como aCGH, aSNPs o NGS [3-6]. Las expectativas actuales son mucho más promisorias que con el empleo de la técnica FISH, pero todavía no hay ensayos clínicos bien diseñados que avalen su real beneficio en las parejas con mayor riesgo cromosómico en la fecundación [7].

El propósito de este trabajo es documentar la experiencia adquirida con el programa de PGD con biopsia de trofoblas-

to y transferencia diferida al ciclo de estimulación ovárica desde fines del año 2009. Dos tercios de las motivaciones fueron riesgo genético aumentado o por razones médicas entendibles, tales como la búsqueda de un hijo histoiéntico a otro que requiere trasplante de médula ósea o los casos de mujeres Rh negativas altamente sensibilizadas, mientras; un tercio tras el logro de mejores resultados en reproducción asistida.

Materiales y Métodos:

Pacientes:

Accedieron al programa PGD 161 parejas por motivaciones diferentes: 64 por trastornos monogénicos, 39 por rearrreglos cromosómicos equilibrados, 6 para tipificado de HLA, 2 por isoimmunización RHD y 50 para screening de aneuploidías.

Los trastornos monogénicos [64] se separaron en 4 grupos:

Autosómicas Recesivas: atrofia muscular espinal AME [7], Fibrosis quística [8], β Talasemia [5], Inmunodeficiencia combinada severa [1], acidemia metilmalónica [1], Síndrome de Leigh [1], leucodistrofia metacromática [1], epidermolisis bullosa [1] y Síndrome de Zellweger [1]

Autosómicas Dominantes: Neurofibromatosis tipo 1 [3], Von Hippel Lindau [2], Síndrome de Marfan [1], Síndrome de Stickler [1], Poliquistosis renal PKD1 [2], Síndrome de Di George [1], Síndrome de Ehlers-Danlos [1], Paraganglioma [1], Acondroplasia [2], Esclerosis Tuberosa [1] y Angioedema Hereditario [1].

Ligados al X: Distrofia muscular de Duchenne-Becker [4], Síndrome de Hunter [1], Hemofilia B [3], Agammaglobulinemia [2], Deficiencia de OTC [1], Síndrome de Alport [1], Granulomatosa Crónica [1] y Síndrome de Leri-Weil [1].

Expansión de tripletes: Fragilidad X [3], Distrofia Miotónica [4], Enfermedad de Huntington [1].

Los rearrreglos cromosómicos fueron 26 translocaciones recíprocas, 8 translocaciones Robertsonianas y 5 inversiones pericéntricas. Los rearrreglos cromosómicos en todos los casos fueron portados por un sólo miembro de la pareja, excepto uno en que un miembro portaba una translocación recíproca y el otro una Robertsoniana.

Las translocaciones recíprocas fueron las siguientes:

t(15;18)(q26;q21)mat; t(2;9)(q37;p12)pat;
t(1;8)(q41-q42;q12)mat; t(3;10)(p25;q24)mat;
t(6;14)(q13;q31)pat; t(9;13)(q34.3;q14.3)mat;
t(6;7)(q25;p15)pat; t(13;17)(q22;p11)pat;
t(10;13)(q21.3;q21.2)pat;
t(4;9)(q21;p22)mat+rob(13;14)(q10;q10)pat;
t(9;13)(q21;q21.2)mat; t(8;16)(q24.3;q12)pat;
t(3;10)(p21;q24),9ph pat; t(1;3)(q42.1;p21.3)mat;
t(7;11)(q11.2;q12)mat; t(1;11)(q12;q13)mat;
t(10;19)(q10;q10)pat; t(3;6)(q26;q24)pat;
t(6;7)(q23;q34)mat; t(9;11)(q32;q21)pat;
t(6;10)(q25;q26)mat; t(4;12)(p15.2;p12.1)pat;
t(2;22)(q35;q13)mat; t(4;18)(q32;q31)pat;
t(3;8)(p21;p11.2)pat; t(9;13)(q21;q21.2)mat

Las translocaciones Robertsonianas fueron:
4 rob(13;14)pat, 1 rob(13;14)mat, 1 rob(13;21)pat,
1 rob(14;21)pat y 1 rob(14;22)mat

Las inversiones pericéntricas fueron:
inv(8)(p23;q11.2)pat; inv(5)(p12;q22)pat;
inv(9)(p21;q22)pat; inv(5)(p14;q21)mat; inv(5)(p12;q22)pat.

Los PGDs para tipificado de HLA fueron 6, tres de ellos asociados a Granulomatosa Crónica, β Talasemia y S. Hurler, respectivamente.

Dos casos de PGD fueron por isoimmunización RHD

Los casos de PGS fueron 50.

El promedio de edad de las mujeres que realizaron PGD fue 34,8 años (r 22 - 42), mientras que la de los PGS 38,8 años (r 38 - 49).

En todas ellas se efectuó previo al procedimiento la evaluación hormonal de la reserva ovárica y el recuento de folículos antrales por ecografía transvaginal para predecir la respuesta ovárica a la estimulación ovárica. Además, se les realizó histerosalpingografía para evaluar la anatomía de la cavidad y las trompas uterinas. En todas también se realizó previamente una transferencia de embriones simulada comúnmente llamada prueba de cánula para evitar inconvenientes durante la verdadera transferencia.

En los varones se evaluó el espermograma, se efectuó espermocultivo y el swim up diagnóstico.

La estimulación ovárica se realizó con gonadotrofinas con agonistas o antagonistas del GnRH de acuerdo con el perfil hormonal de las mujeres, mientras que para las mujeres con reserva ovárica muy disminuida se utilizó mini-estimulación con clomifeno y gonadotrofinas en dosis baja. La aspiración de los folículos se realizó por vía transvaginal con anestesia local y neuroleptoanalgesia, previa toilette vaginal. Los ovocitos fueron recuperados de los fluidos foliculares bajo lupa y cultivados en microgotas con medio de cultivo embrionario en incubadora trigas con 5 % de tensión de oxígeno y a las dos horas desnudados de su corona radiata, para la evaluación de la maduración y la calidad de los mismos. Solamente a los ovocitos en telofase I se les realizó el ICSI, previo procesamiento del eyaculado con la técnica del swim up. Entre las 18 y 20 hs de realizado el ICSI se verificó la fecundación de los ovocitos y sólo los fecundados normales se cultivaron hasta alcanzar el estado de blastocisto en medio de cultivo embrionario no secuencial. Para favorecer la biopsia del trofoblasto en día 4 se perforó la zona pelúcida, con unos disparos de rayos láser, para poder eclosionar algunas células del trofoblasto al quinto día, las cuales fueron aspiradas con ayuda del micromanipulador microscópico. Las células aspiradas se lavaron tres veces en medio de biopsia, sin calcio ni magnesio y se depositaron en tubos para PCR de 0,2 ml con no más de 2 μ l de medio de biopsia. Los blastocitos luego de ser biopsiados se vitrificaron individualmente en cryotops sistema abierto y las células removidas conservadas a -20 °C hasta ser analizadas.

Los trastornos génicos se abordaron de las siguientes maneras:

Tabla I. Primers utilizados en los PGDs por amplificación directa de la mutación.

Gen	Mutación	Técnica	Primers 5' - 3'
Cadena gama receptor IL2	ins280pb en Intron 5	Amplificación directa de la ins280pb	F: FAM-CACAACAAATATAAGGTCCACT R: CAATGCAACAGGAAAGGATTCT
HBD	Mutación Siciliana [deleción]	Gap-PCR	D1 F (flank): FAM-AAGTCGTTGTAGGAGACAG D2 R int2-3 (flank): GGTAAGCAGATACATGCATA D3 R (delec.): TGCTTGGTAGATCTCTCCCA
SMN1	del exon 7 y 8	Tetraprimer: amplificación exones 7 y 8 SMN1 y SMN2	OUTER1/2F: FAM-TGCAGCCTAATAATTGTTTCTTTGGG OUTER1/2R: TTAAATGTTCAAAAACATTGTTTCCAC SMN1 IN F: FAM-ACCTCTCTTATTTCTTACAGGGTGTC SMN2 IN R: AGCACCTTCTCTTTTGATTGTGATA
SMN1	del exon 7 y 8	Amplificación exones 7 y 8 del gene SMN1. STR ligado al gene SMN1 como control de amplificación.	SMN1 F: FAM-AGACTATCAACTAATTTCTGATCA SMN1 R: TCCTTCTTTTGATTGTGCTG D5S610 F: HEX-TCCAGTGAATTTTCATTTTCAGATAC D5S610 R: CCAGCCTAACTGAACCTTCAAAG
TSC2	dup 23bp	Amplificación directa de la dup.23pb	EX34dupF: FAM-TGATGCCTGGCATTCTCTGCA EX34dupR: GAGGGTCCCTTGCCCTCCAGCTC
DMPK	Repeticiones CTG	Amplificación alelo normal y STR ligado al crom. 19 como control de amplificación.	DM102F: FAM-CTTCCAGCCTGCAGTTGGCCATC DM102R: GAACGGGCTCGAAGGGCTCTGTAGC D19S559F: HEX-CACCACTGCCTCAGCTGTGTG D19S559R: CGATTGGGACATAATAGGTTGAGG
DMPK	Repeticiones CTG	TP-PCR	P2: GAACGGGGCTCGAAGGGTCTTGTAGCCG P3: 6FAM-TACGCATCCAGTTTGAGACG P4CAG: TACGCATCCAGTTTGAGACGCAGCAGCAGCA
HD	Repeticiones CAG	Amplificación directa de los alelos normales y amplificados. STR ligado al gene crom. 4 como control de amplificación.	H3: VIC-CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC H5: CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT D4S43F: NED-CTTCTTTTCTCTCTGGATGC D4S43R: HEX-AGAAAGCATTAGAGTCCATC
FMR1	Repeticones CGG	Amplificación directa del alelo normal	FUC: GCTCAGTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT FUF:VIC-AGCCCCGCACTCCACCACGCTCTCCA
FMR1	Repeticones CGG	TP-PCR	FF1: FAM-TTCGGTTTCACTTCCGGTGGAGGGCCGCCT F30K: ATGGCTATGCGTAGGGTCAAACAGT F2: ATGGCTATGCGTAGGGTCAAACAGTCCGCCGCCGCCG

► F=Forward; R=Reverse

a) para deficiencias y/o duplicaciones por qf-PCR utilizando primers específicos de las zonas implicadas (Tabla I)

b) los trastornos monogénicos puntuales fueron analizados por minisecuencia directa de las mutaciones caracterizadas. Esencialmente, la técnica consistió en amplificar el segmento donde se encuentra la mutación y sobre ese amplicón con primers específicos diseñados se minisecueciaron las mutaciones utilizando el SNaPshot® multiplex Kit de Applied Biosystems y los fragmentos analizados en un ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Tabla II). Previo al procedimiento, las mutaciones fueron corroboradas en los progenitores y/o familiares portadores/afectados.

En los casos sin la caracterización molecular de la mutación se realizó análisis por ligamiento con STRs ligados al gen mutado (Tabla III).

Además de abordar las mutaciones, siempre se realizó el screening del par 21 usando los STRs informativos de cada una de las parejas (Tabla IV).

En el tipificado de HLA se determinó el haplotipo informativo a partir de STRs ligados al locus, que mapea en 6p (Tabla V).

Los dos casos de isoinmunización RHD fueron realizados

con tres primers que amplifican simultáneamente los Rh C, E y D (Tabla VI).

Previo a acceder al procedimiento se acondicionó la técnica para la determinación en pocas células, que en general fue entre 4 y 10 células, similar al número de células obtenidas en la biopsia embrionaria. El lisado de las células se realizó con la mezcla constituida por 2,5 µl de agua libre de nucleasas, 0,5 µl buffer thermophilic DNA poly 10X de Promega®, 0,5 µl proteinasa K de concentración 10 µg/µl y 0,5 µl de Tween20® de Promega al 1 %, en un volumen final de 5 µl. Los tubos fueron incubados a 45 °C / 20 min. y luego 96 °C / 20 min. Se colocan los tubos en hielo y se le agrega 45 µl de la siguiente mezcla: 10 µl del buffer 5XGoTaq de Promega®, 1µl de DNTPs 10mM, 1 - 1,5µl de la mezcla de primers 25 µM, 0,3 ul de GoTaq polimerasa de Promega®, todo en un volumen final de 50 ul. En el termociclador, las condiciones de ciclado de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C / 5 min, seguida de 35 ciclos de: 95 °C / 30seg, el annealing varió entre 50- 63 °C / 30 - 45 seg, extensión a 72 °C / 30 - 45 seg, con una extensión final a 72 °C / 5 - 7 min.

Los resultados de las QF-PCRs fueron directamente ana-

lizados en un secuenciador ABIprism310 con el software GeneMapper.

Para la técnica de minisecueñaci3n, a 1 ul del amplic3n obtenido en la primera reacci3n se le realiz3 una segunda PCR adaptando las concentraciones de los reactivos de la mezcla descrita previamente a un volumen final de 15 ul. Los primers utilizados en esta segunda reacci3n corresponden 3nicamente al segmento gen3mico que posee la mutaci3n. Las condiciones del termociclado son iguales a las 3ltimas descritas, excepto que fueron 25 ciclos. La banda amplificada fue observada por electroforesis en un gel de agarosa 3 % con bromuro de etidio bajo luz UV. La misma fue cortada y purificada con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega®. La soluci3n de ADN fue minisecueñada con el kit SNaPshot Multiplex de Promega® utilizando el primer forward o el reverse correspondiente a la mutaci3n. Las condiciones de la PCR fueron 25 ciclos a 96 °C / 10 seg, 50 - 55 °C / 5 seg y 60 °C / 30 seg. Finalmente se adicion3 a la reacci3n 1ul de la enzima T-SAP de Promega® y se incub3 a 37 °C / 1min y 75 °C / 15 min. Los resultados se analizaron por electroforesis capilar en un ABI prism 310.

Para la QF-PCR que amplifica las repeticiones CGG del gen FMR1, el dGTP de los dNTPs de la mezcla de reacci3n se reemplaz3 por 7'deaza-dGTP y se adicion3 a la misma 5 ul de PCR MAX de Promega®.

Los cariotipos moleculares fueron realizados con el kit 24 Sure V3 y 24 Sure plus de BlueGnome-Illumina® para los PGSs y reordenamientos equilibrados, respectivamente. La t3cnica consisti3 en una amplificaci3n inicial de todo el material gen3tico de las c3lulas biopsiadas utilizando el kit Sureplex de Illumina®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificaci3n fue corroborada por electroforesis en gel de agarosa 3 % con bromuro de etidio, se sembr3 5 µl de cada amplic3n mezclado con 1 µl de soluci3n de azul de bromofenol. Se verific3 a los cinco minutos de corrida electrofor3tica, bajo UV, la presencia de una banda mayor a 500 pb y luego se continu3 con la hibridaci3n con los kits 24 Sure V3 y 24 Sure Plus de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los arrays fueron analizados con el programa BlueFuse® Multi v.4.1.

La transferencia de un s3lo blastocisto no afectado desvitrificado fue realizada en el ciclo siguiente al estimulado, con el endometrio preparado fisiol3gicamente con estr3genos y se abri3 la ventana de recepci3n con el agregado de 5 d3as de progesterona, independiente del d3a en que alcanz3 el estadio de blastocisto. La fase l3tea fue suplementada con la misma medicaci3n hasta la determinaci3n de la subunidad beta de HCG y en caso de dar positiva hasta las 16 semanas del embarazo. A las 4 semanas de la realizaci3n del test del embarazo se realiz3 ecograf3a obst3trica para corroborar la ubicaci3n del saco y el latido card3aco.

Todas las parejas fueron informadas sobre la posibilidad de realizar la amniocentesis para corroborar los resultados del PGD.

Resultados

De un total de 161 parejas que realizaron 218 ciclos se obtuvieron 850 blastocistos, de los cuales 334 [39,3 %] fueron normales. De 130 parejas que lograron ser transferidas con un blastocisto normal, 53 consiguieron el embarazo [40,8 %] perdi3ndose espont3neamente un 12,3 %.

Los principales detalles de cada una de las motivaciones figuran en la tabla VII. Como puede observarse en dicha tabla, las 26 parejas con riesgo para tener hijos con enfermedades recesivas produjeron 175 blastocistos, de los cuales 98 resultaron normales para transferir, pero 2 de las 26 parejas no lograron ninguno normal para transferir.

Las 21 parejas con riesgo para descendencia con enfermedades dominantes produjeron 141 blastocistos, de los cuales 48 resultaron no afectados, pero 3 de las 21 parejas no lograron ninguno para transferir.

Las 17 parejas con riesgo para tener 50 % de los hijos varones afectados produjeron 75 blastocistos, de los cuales 36 resultaron transferibles y todas las parejas lograron ser transferidas.

Las 6 parejas en busca de otro hijo histoid3ntico a un hermano produjeron 80 blastocistos, de los cuales 11 resultaron transferibles en cuatro de las parejas, o sea que dos no pudieron transferirse.

Las 2 parejas en busca de un hijo Rh negativo lograron 4 blastocistos pero ninguno de ellos result3 transferible.

Las 39 parejas con riesgo para tener hijos con deficiencias-duplicaciones parciales de cromosomas por ser portadoras de rearreglos cromos3micos balanceados produjeron 189 blastocistos de los cuales 69 tuvieron un cariotipo normal, pero 7 de las 39 parejas no lograron ninguno normal para transferir.

Las 50 parejas con mayor riesgo para embarazos aneuploides, pero portadores cariotipos normales, lograron 186 blastocistos de los cuales 72 tuvieron cariotipos normales, pero 15 de las 50 no lograron cariotipos normales.

Resumiendo 161 parejas realizaron un promedio de 1,6 ciclos [269 / 161]. De los 850 blastocistos logrados en 835 [97,6 %] se logr3 obtener un resultado y en 334 [40 %] fue normal.

Discusi3n

La mayor experiencia del PGD se tiene con la realizaci3n de la biopsia de una o a lo sumo dos blast3meras en preembriones clivados de d3a 3 del desarrollo. En ese d3a los pre-embri3nes de buena calidad tienen m3s de 6 c3lulas, siendo los mejores los que tienen 8 c3lulas y menos de 15 % de fragmentos. La remoci3n de una o dos c3lulas en ese estadio, si bien todas las c3lulas son totipotenciales, significa una reducci3n de la masa celular entre el 12,5 y 25 %, la cual puede disminuir la posibilidad de implantaci3n. En cambio, la mayor3a de los blastocistos que est3n eclosionando poseen m3s de cien c3lulas, la remoci3n de 5 a 10 c3lulas del trofoectodermo significa una disminuci3n menor de c3lulas del trofoectodermo, aparentemente sin modificaci3n del n3-

Tabla II. Primers utilizados en los PGDs abordados por Minisecuenciación.

Trastorno	Gen	Mutación	Primers 5' - 3'
Hemofilia B	F9	Arg180Leu	F: GCCAATGAGAAATATCAGG R: CCAGTTTGGACACCATC SF: CACCAATCATTTAATGACTTCACTC SR: GTTGGCATCTCTCCACCAACAACC
Hemofilia B	F8	c.6301 C/G	F: TTTCAGGAGGTAGCACATACATT R: CAGGCATTCCCTTTAAATGAC SF: GATCTGTTGGCACAATGATTATT SR: GCACCTGGGTCTTGATGCCGT
Hemofilia B	F8	c.1754T/C	F: TGCCATCGCTTTCATCATAG R: CATTATTATCTGGACATCAC SF: CTTTCAATATATGAATTAACAGA
Agammaglobulinemia Tirosina Kinasa lig. al X	BTK	W588R	F: CTGATTCTAATCTTTGAGGTTGAT R: CAGCTATCAGTCTTTGGTGGCTG SF: TTCACCTTCTAGGGGTTTGTATG SR: CTCCCCAGGGAGTAAATTTCCC
Agammaglobulinemia Tirosina Kinasa lig. al X	BTK	R255X	F: ATCTTGAAAAAGCCACTACCG R: GTCTCTGATGAGGATGCTGATCAGG SF: AGCAACTACCATGGTGAGAGCA SR: GACTCACCATTTTATCTC
DMD	DYS	c.2317 A/T	F: GATGGCAAAAGTGTGAGAAAAAGTC R: TTCTACCACATCCATTTTCTCCA SF: CATAGAGCGAGAAAAAGCTGAG SR: CTGGCATCTTGAGTTTCTGAAC
DMD	DYS	c.6936delA	F: GCTGCTAAAAATAACAATCAG R: CAAATGAGAAATTCAGTGATTATGC SF: GTTCCAGAGCTTTACCTGAGAA
Hunter	IDS	c.1403 G>A	F: TGTAACCCATTCTGCTCTGT R: CTGGAAGGGAGCACATCACA SF: GATTGCCTATAGCCAGTATCCCC SR: CACTGAGGGATGCTGAAGGC
OTC	OTC	c.482 A>G	F: ATCTTTTCTTGGTTTGCCACAG R: TGTTTCACCTAAAGCAAGTCAGG SF: AGAAGCATCCATCCCAATTATCA SR: GATGGTACAAATCTGACAGCCCA
β-Talasemia	HBB	IVS110/ COD39	F/SF110: AGGCACTGACTCTCTGCCTATT R: AAAAAAACCCAAAGGACTCAAGAACCTCT SR39: AAAAAAACCCAAAGGACTCAAGAACCTCT
β-Talasemia	HBB	IVS1-2/IVS110	F: CATCTATTGCTTACATTGCTCTG R: TGTAACCTGTTACTTATCCCTTCC SF 1-2: GGTGGTGAGGCCCTGGGCAGG SR 1-2: CTGCTTGTAACTTGATACCA SF110: AGGCACTGACTCTCTGCCTATT
β-Talasemia	HBB	COD39	F: ACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGA R: TGTAACCTGTTACTTATCCCTTCC SF: CTGGTGGTCTACCTTGAGCC SR: AAAAAAACCCAAAGGACTCAAGAACCTCT
FQ	CFTR	dF508	F: GACTTCACCTCTAATGGTGATTATG R/SR: ATCTATATTCATCATAGGAAACAC
FQ	CFTR	G542X	F: GATTACATTAGAAGGAAGATGCGCTTT R: ACATGAATGACATTTACAGCAAATGCTT SF: GCAGAGAAAGACAATATAGTTCTT SR: ACTCAGTGTGATTCCACCTTCTC
FQ	CFTR	c.2183AA-G	F: TTACACCGTTTCTCATTAGAAGGA R: TCTCCCTGCTCAGAATCTGGTACT SF: CTGCTCCTGGACAGAAACAAAA
FQ	CFTR	c.3873+1	F/SF: GAAAGCCTTTGGAGTGATACCAG R: AAGCTATGAACATTTCAATAACCAG SR: TTTTCTGGCTAAGTCTTTTGCTCA
Zellweger Spectrum	PEX3	c.898C/T	F: GTAACCACGTTATTACTGAATTTG R: GTCACTTACCTATTATAGAGT SF: GACAATATGGCTGAGTTCTTT SR: GTTGACGGTCTGTTCAAGTAGGTC
Zellweger Spectrum	PEX3	c.991G/A	F: GTCATGATGCAATTAGAGTTG R/SR: CACTGCAAACTGAATGGATCTGTC SF: CTAAGATAATTCCAATAGTAAAC
Leucodistrofia Metacromatica	ARSA	c.465+1 G/A	F: CATCGATTCTAGGCATCCCGTAC R: TCACAGCCACCGTCGCAAGGAGT SF: CCGTACTCCACGACCAC SR: CTGAGGGCCCGGTGTTCTCTA

Acidemia Metilmalonica	MMACH	c.271dupA	F: AAAAGTGTGAGGCTGAAGGTT R: AACCTGGGTGTGTGAGAAGG SF: GGCTTACCCTGCGCGGTGTTA SR: CTGAGCCTTCTCACCTCTCT
Epidermolisis Bullosa	ITGB4	p.C61Y	F: TCGGGAATAGCTGGTGGAAA R: CCCATAAATAGCCAGGCTGA SF: ATGTTTCAGGGACCGCGCT SR: AGCAGCTCCGCTGGGTGTTG
Neurofibromatosis Tipo I	NF1	c.205-1 G>C	F: TTTCACCTTTTCAGATGTGTGTG R: CTCAGATCAAAATTCACAAAG SF: GTTCTGAATATCTTTCTGTGA SR: CAGCAGCTTCTCCAAATATTCT
Neurofibromatosis Tipo I	NF1	c.7464_7467del	F: AGCCACTTGGAGGAGCAACGAT R: AAGCACTTCTTAGTGTGGCCTGAG SF: TGAAGGATACCTTGACGACCTATCC SR: TGGCTCGGGACTGGTCTGGCCGA
Von Hippel–Lindau	VHL	c.219_232del	F: TACGGCCCTGAAGAAGACG R: TACCTCGGTAGCTGTGGATG SF: GTGAACCTCGCGGACCTCCCA
Von Hippel–Lindau	VHL	V84L	F: TACGGCCCTGAAGAAGACG R: TACCTCGGTAGCTGTGGATG SF: TTCTGCAATCGCAGTCCGCGGTC SR: AAGTTGAGCCATACGGGCAGCA
Stickler	COL2A1	c.2301+1 G>A	F: TCTTCAGGGAATGCCTGG R: TTGCTGTGGTCTCAGGGTG SF: TGGGCCCAAGGCGACAGG SR: AGGCTGTAACTCAGTACTTA
Ehlers-Danlos	COL3A1	c.2284-2 A/G	F: AGAAGCCATGCTACTGTCTTGATC R: GTATCTATGTCTATATCTTTCTG SF: TTAATAATATTTTATTTCTCT SR: ACCAATAGGACGATAGGACCC
Poliquistosis Renal	PKD1	c.9698delA	F: GTGTCCTCACTTCTTAATG R: CTTGAAGTTTCATGATTCCTG SF: CAGCCAACCTGACATCAACAG SR: CTTGATTGGAGGGAGCTCTA
Acondroplasia	FGFR3	G1138A	F: CCTCAACGCCATGTCTTT R: AGGCAGCTCAGAACCTGGTA SF: GTATGCAGGCATCTCAGCTAC SR: ATGAACAGGAAGAAGCCACCC
Paraganglioma	SDHB	Pro56FrX61	F: CCAGCAAAATGGAATTATCTGT R: CTCTCTTCAATAGCTGGCTT SF: ACCCAGACAAGGCTGGAGACAAA SR: GTCAACTTCATAAGCTGCATA
Angioedema Hereditario	SERPING 1	c.597 C/G	F: TCATCCTGCAAGTATCTTTCATC R: CTGATACTGTAGCTCCAACATTC SF: CTGGAGAGCATCTCTCTTA SR: GACACAGGTGAAGTCCTTGGG

mero de las células primordiales embrionarias.

La mayor experiencia recogida en los 20 años de aplicación del diagnóstico preimplantatorio fue con biopsia en día 3, la que evidenció una tasa promedio de embarazo por ciclo del 22,7 %, con una certeza diagnóstica mayor del 90%, según los registros del Consorcio de PGD de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología ESHRE [8]. Un inconveniente no menor cuando se trabaja con una o dos células es que no se pueda obtener el resultado del estudio genético, a pesar de haber acondicionado la técnica, que de hecho ocurre en un 10 al 20 % de las células estudiadas. En cambio, con la biopsia de trofoectodermo como la cantidad de células removidas es mayor, entre 5 y 10 células, uno se asegura prácticamente siempre el resultado de las células extraídas [9].

Los adelantos en los medios de cultivo embrionario, en las incubadoras trigas, que permiten reducir la concentración de oxígeno durante el desarrollo in vitro, el cambio de la criopreservación lenta por la vitrificación y la mayor tasa de embarazo logrado con blastocistos desvitrificados son los responsables de que los estudios preimplantatorios hoy se realicen en el estadio de blastocisto. En la presente serie constituida por 269 ciclos

correspondientes a 161 parejas la tasa de embarazo clínico por transferencia fue 40,7 %, por pareja 32,9 % y por ciclo iniciado 20 %, siendo la tasa de aborto espontáneo 8,4 % y el error diagnóstico de 1,8 %. Las fallas en la amplificación del ADN ocurrieron en 15 de 850 blastocistos analizados, o sea que no superó el 2 %, mientras que lo reportado con la biopsia de blastómeras es de 15 a 20 %.

El porcentaje de blastocistos transferibles obtenido de 39 %, si bien es algo menor, no se aleja tanto de lo esperado si se tiene en cuenta la heterogeneidad de las motivaciones y que en 72 de las 161 parejas no sólo se evaluó la mutación génica en cuestión, sino que además se determinó el número de copias del cromosoma 21 y no se consideraron transferibles aquellos que evidenciaron trisomía 21.

De las 161 parejas que accedieron al programa, 130 fueron transferidas [81 %], o sea que 31 no lograron ser transferidas ni siquiera una vez por no haber originado blastocistos normales. Los porcentajes de parejas sin transferencia dependieron fundamentalmente de la motivación del PGD: 7,7 % para las enfermedades autosómicas recesivas, 14,3 % para las autosómicas dominantes, 0% para las ligadas al

Tabla III. STRs utilizados en los PGDs para trastornos abordados por ligamiento.

Trastorno	Gen	STRs /Primers 5'-3'
Alport	COL4A5	DXS8377 F: 6FAM-CACCTTCATGGCTTACCACAG R: GACCTTTGGAAAGCTAGTGT DXS1068 F: VIC-ATTATGACTAAGGTTCTAGGGAC R: CTGAGAACACGCTGTTTTTAC DXS15 F: 6FAM-AGCACATGGTATAATGAACCTCCACG R: CAGTGTGAGTAGCATGCTAGCATTG DYS393 F: HEX-TGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC R: GAACTCAAGTCCAAAAATGAGG
Granulomatosa	CYBB	DXS8069 F: PET-AACAGTCATTGTAGGCATCG R: GAATTGCCAGTCATCCC DXS8091 F: VIC-CACATTCAGGTTCCACAGG R: CAAGATCCAGGCCAAAAGTC DXS1684 F: HEX-AGCACCAGTAAGAGACTGAAC R: CCTCAGTGGCAACCCTCAAG
Leri-Weill	SHOX	DXS1055 F: CTCTATGGGATACACTGTTCTGGG R: NED-GGAATGCATCCCCATCATTAA DXYS10093 F: GCCCGTGATCCAGTACTG R: HEX-CAACTTCTTGGAAATCTTC DXYS10137 F: CCCAGGCCCTGTTTACGCTTCG R: HEX-TATCCTCACAACTGCGCTTCC
DMD	DYS del exones 45-55	Exon 44 F: 6FAM-TCCACATTGGAAATCACATTTCAA R: TCATCACAAATAGATGTTTCACAG Exon 49 F: CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC R: HEX-ATATGATACGATTCTGTGTTTGC
DMD	DYS del exones 48-55	Exon 45 F: HEX-AGGCTATAATCTTTAACTTTGGC R: CTCTTCCCTCTTTATTCATGTATC Exon 50 F: HEX-AAGGTTCTCCAGTAACAGATTGG R: TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC
FQ	CFTR	IVS 17bCA F: FAM-TGTCACTCTTCATACTCAT R: AAACCTACCGACAAGAGGA
FQ	CFTR	IVS 17bTA F: GCTGCATTCTATAGGTATC R: ROX-ACAATCTGTGTGCATCG
Neurofibromatosis Tipo I	NF1	NF1 F: VIC-CTTCCATGGCTGCTAACATC R: CCCGTGGGTGATGTTCAACA NF3 F: FAM-CAGAGCAAGACCTGTCT R: CTCCTAACATTTATTAACCTTA Alu F: NED-CAAGAAAAGCTAATATCGGC R: GGAACCTTAAGTTCACCTAG
S. DiGeorge	Del22q.11	D2S264 F: HEX-ATTAACATAAAGGAGCCC R: CACCCACAGAGGTATTCC D2S944 F: FAM-CATGTGAAAGATGCTAATTCC R: ATCCATGCTCCTCCCAT D2S941 F: TAMN-AGGTTACAAAGTACATTAACCTT R: CAAGAAATGGTTGGAGCTGGT
Poliquistosis Renal	PKD1	D16S3252 F: VIC-CTCCCAGGGTGAGGAAGGTG R: GCAGGCACAGCCAGCTCCGAG D16S291 F: 6FAM-AGTGCTGGGATTACAGGCATGAACC R: GCAGCCTCAGTTGTGTTTCTTAATC SM6 F: HEX-AGCTGGGGTCTCAGGGGAGCT R: GCGCACACGCACTAACACG

X-Frágil	FMR1	DXS8091 F: HEX-CACATTGAGTCCACAGG R: CAAGATCCAGGCAAAAGTC DXS8377 F: FAM-CACTTCATGGCTTACCACAG R: GACCTTTGGAAAGCTAGTGT DYS393 F: HEX-TGGTCTTCTACTTGTGTCATAC R: GAACTCAAGTCCAAAAATGAGG
----------	------	---

► FQ= Fibrosis Quística; DMD= Distrofia Muscular de Duchenne; S.= Síndrome; del= deleción; F= Forward; R= Reverse.

X, 33,3 % para el tipificado del HLA, 100 % por la isoimmunización RHD, 18 % en los reordenamientos cromosómicos balanceados y 30 % para los PGSs. Si se tiene en cuenta que la posibilidad de obtener blastocistos transferibles es dependiente de la motivación del PGD, es entendible que los porcentajes más altos correspondan a las motivaciones por tipificado de HLA, Reordenamientos Cromosómicos Balanceados y PGS, en los cuales la posibilidad teórica de obtener blastocistos transferibles es 1 de cada 4, 1 de cada 5 y de 1 de cada 8; respectivamente. En humanos, el porcentaje de ovocitos fecundados normales que alcanza el estadio de blastocisto, rara vez supera el 50 % debido a la mala programación de los ovocitos para ser embriogénicos y a la compatibilidad de los genomas de ambos progenitores. Un ovocito bien programado es el que logra hacer suficiente acopio de nutrientes que permite que el ovocito fecundado se divida hasta alcanzar más de 6 células en día 3 del desarrollo, pero en el humano la eficiencia nunca es 100 % sino alrededor del 60 %. Una vez alcanzado el estadio de 6 - 8 células, el 80 % de los mismos continúa el desarrollo. Por lo tanto, para predecir la posibilidad de lograr embriones para transferir, no sólo hay que tener en cuenta el riesgo genético sino también la embriogenicidad de los ovocitos fecundados. Se debe recordar que el procedimiento es diagnóstico-terapéutico y se convertirá en terapéutico siempre que se puedan transferir blastocistos no afectados. Las parejas jóvenes y fértiles son las que tienen más posibilidades de conseguir el

beneficio del PGD, mientras que las de edad avanzada que son subfértiles tienen menos posibilidades. Esto se puede ver claramente en las parejas que hicieron PGS, fundamentalmente por edad materna avanzada, si bien la tasa de embarazo por transferencia fue de 40 %, hubo 15 de las 50 parejas que no pudieron ser transferidas por resultar todos los blastocistos aneuploides.

Discusión:

La biopsia de trofoectodermo es considerada menos invasiva que la de blastómeras, ya que la proporción de células removidas es mucho menor e involucra a la porción no embrionaria del blastocisto, con prácticamente poco riesgo de degeneración después de la biopsia y sin impacto indeseable sobre el potencial implantatorio.

Cuando se la quiere usar como PGS tiene el inconveniente de descartar blastocistos aneuploides que podrían desde lo teórico auto corregirse o bien confinarse la anomalía en la placenta. Todavía no existen ensayos clínicos bien diseñados que permitan evaluar la tasa real de falsos positivos y negativos. La transferencia de blastocistos aneuploides, de acuerdo con las comunicaciones de varios autores, puede dar lugar a nacidos

Tabla IV. STRs ligados al cromosoma 21 utilizados en los PGDs.	
STR	Primer 5´-3´
D21S268	F: GCAACAGAGTGAGACAGGCTC
	R: NED-AGTTTGTTACATCTTGCC
D21S1442	F: 6FAM-CTCCTCCCCACTGCAGAC
	R: TCTCCGAATCACATGAGCC
D21S1446	F: HEX-ATGTACGATAGTAATACTTGACAA
	R: GTCCCAAAGGACCTGCTC
D21S11	F: 6FAM-TATGTGAGTCAATCCCCAAGTGA
	R: GTTGATTAGTCAATGTTCTCCAG
D21S1411	F: TAMN-TGGATAGATAGATAAATGGATGG
	R: CCCACTCCCAGCCTTCTAA
D21S1270	F: HEX-CTATCCCACTGTATTATTAGGGCTGA
	R: GTCTCCAGGTTGCAGGTGACA

► F=Forward; R=Reverse

Tabla V. Primers ligados al locus HLA utilizados en los PGDs.	
STRs	Primers 5´-3´
D6S510	F: FAM AATGGGCTACTACTTCACACC
	R: CAACACACTGATTCCATAGC
MICA	F: FAM AAAGTGCTGGTGCTTCAGAGTC
	R: CTTACCATCTCCAGAACTGCC
DQCAR	F: GCACATCATTAATAATTGCTTCCACAGTAC
	R: HEX TGATTCAATAGGCAAGAATCCAGCATATTGG
D6S1568	F: HEX AGATATCCCCACCAAGGCAG
	R: AGCTAGGCCAGGCCGTGT
D6S2414	F: PET AACTGGGCTGAGATGTACCACT
	R: GACTCAAGGAGAGGAATGTGTG
D6S497	F: PET CCTGGGCAACAAGAGTGAAGT
	R: TTGGCTGTTGAATTGTGAGAGT
RF	F: HEX CTGTCCTATTTCATATGCTCAGGTA
	R: TTGCTCTGAGAATGAAGGTCTAGA
MOG-TAAA	F: FAM TGGGCACCTATAATACCAGCTAC
	R: AAGGGGTTAGAAGTGTGCTTATGAA

► F = Forward; R = Reverse

Tabla VI. Primers de isoinmunización RhD.

Marcador	Primer 5'-3'
Rh38446d6c	F: 6FAM-TCTGGGTGTTGGTTATGTGGG R: GCAGTCAGCAGGTTTGGGTT
Rh41712d4c	F: VIC-CCCTATGATGAGACTGGTGGC R: CATGCTGCTGGCATCTGTTG
Rh48925d3c	F: VIC-CAGGCGCCAGAGATCATTACT R: TCGTATTTCCTTTCGTGGTG

► F=Forward; R=Reverse

normales, estimado en un 5 % [10,11,12]. A raíz de estos datos la Sociedad Internacional de Diagnóstico Preimplantatorio, PGDIS, advirtió que no siempre un resultado anormal es sinónimo de no transferencia, la cual depende fundamentalmente del cromosoma involucrado y del número de copias. En principio todas las monosomías, excepto la del X, pueden transferirse, ya que todas de ser verdaderas son letales en el período preimplantatorio y no darían lugar ni a abortos clínicos. En cambio, con las trisomías se podrían transferir aquellas que nunca llegan a término y/o la aneuploidía de cromosomas con impronta debido a que un rescate incorrecto de la trisomía, en el afán de corregirla, podría originar una disomía uniparental grave (cr14 y cr15), como también las trisomías de los cromosomas 2, 7 y 16, que, a pesar de confinarse a la placenta, producen severo retardo de crecimiento intraútero [13]. Obviamente las trisomías 21, 13 y 18 son las menos aconsejables de transferir, porque son las que más llegan a término y nacen [14]. La mencionada postura de la PGDIS toma relevancia en los casos en que sólo se ha

logrado un único blastocisto de buen aspecto pero aneuploide, como suele suceder en las mujeres de 40 ó más años y que la no transferencia podría quitarle la posibilidad de tener a su hijo genético.

La gran ventaja de la biopsia de trofoblasto es la obtención de una mayor cantidad de células para efectuar el estudio genético, lo cual permite tener siempre un resultado, favorable o no, además de permitir la realización de cualquiera de los métodos diagnósticos genéticos disponibles.

Otra gran ventaja, es que los estudios se realizan solamente en los pre-embiones que han alcanzado el grado máximo de desarrollo en el laboratorio, o sea potencialmente transferibles. Este hecho, sobre todo en Argentina, toma relevancia porque sólo se estudian a los blastocistos potencialmente implantables, reduciéndose así substancialmente los costos de los estudios moleculares. Si bien la biopsia de trofoblasto obliga vitrificar a los blastocistos una vez realizada la biopsia, en la actualidad no existen dudas de que la transferencia de un blastocisto desvitrificado en un ciclo sin estimular tiene más posibilidades de implantar que en el ciclo estimulado [15,16]. Además, una reciente revisión sistemática y meta-análisis de 11 estudios mostraron mejores resultados obstétricos y perinatales con los embriones criopreservados *versus* no-criopreservados [17,18]. Los mejores resultados probablemente se deban a una mejor sincronización embrión-endometrio [19]. Un endometrio más fisiológico tiene mayor posibilidad de implantar debido a que no está expuesto a las altas dosis farmacológicas de hormonas producidas en el ciclo estimulado. La menor invasividad de la biopsia, el mayor número de células aspiradas, la programación de los estudios en días laborables y los resultados logrados en cuanto a tasa de embarazo y evolución de los mismos son los

Tabla VII. Detalles de los resultados según la motivación del PGD.

Motivo	Parejas (n)	Nº Ciclos totales	Nº ciclos/parejas		Total blastocistos analizados	Resultados (%)			PBN/p [rango]	E/transf. (%)	AE/transf. (%)
			1	≥2		N	A	F			
AR	26	45	17	9	175	98	76	1	3,8 [0 – 7]	8/24 [33,3]	5/24 [20,8]
AD	21	39	12	9	141	48	91	2	2,3 [0 – 5]	7/18 [38,9]	1/18 [5,5]
Lig X	17	23	16	1	75	36	38	1	2,1 [0 – 4]	6/17 [35,3]	1/17 [5,8]
HLA	6	20	2	4	80	11	67	2	1,8 [0 – 2]	4/4 [100]	3/4 [75]
RHD	2	2	2	-	4	0	4	0	0	-	-
RCB	39	64	23	16	189	69	116	4	1,8 [0 – 5]	14/32 [43,8]	4/32 [12,5]
PGS	50	76	30	20	186	72	109	5	1,4 [0 – 4]	14/35 [40]	2/35 [5,7]
total	161	269	102	59	850	334 [39]	501 [59]	15 [2]	1,8	53/130 [40,8]	16/130 [12,3]

► N = Normal, A= Anormal, F = falla en la amplificación, PBN/p = promedio de blastocistos normales por pareja, E/transf. = tasa de embarazo por pareja transferida, AE/transf. = tasa de aborto espontáneo por pareja transferida.

responsables de su elección cuando se requiere hacer un PGD. Con un programa de biopsia de blastocisto y transferencia en un ciclo posterior al estimulado ya no es necesaria la premura en obtener los resultados. Esta posibilidad también permite que las mujeres mayores puedan hacer acopio de blastocistos en varios ciclos de estimulación. La transferencia de un blastocisto cromosómicamente normal le otorgará una buena chance de embarazo con mínima posibilidad de aborto espontáneo [20,21]. Sin embargo, hay que tener presente que todas las biopsias que se pueden realizar en la etapa preimplantacional *in vitro* son invasivas y tienen el valor de *screening*. Por más que se tomen todos los recaudos en el control del laboratorio, siempre las condiciones de los ovocitos fecundados son subóptimas respecto de las del hábitat natural, sobre todo en los momentos en que hay que practicar la perforación de la zona y la toma de la biopsia, las cuales pueden favorecer anomalías en las divisiones celulares. De hecho, la tasa de mosaicismo en los pre-embriones está muy incrementada respecto de la hallada en vellosidades coriales, amniocitos y recién nacidos. La única metodología con valor diagnóstico es la amniocentesis que permite el estudio de las células exfoliadas del feto. Por lo tanto, es mandatorio informar a las parejas que la certeza diagnóstica del PGD es muy buena, pero no 100 % y al respecto aconsejarles acerca de la vigilancia durante el embarazo y que, si desean corroborar el resultado del PGD una vez establecido el mismo, el método ideal es la amniocentesis, ya que la punción de vellosidades daría el mismo resultado que la biopsia de trofoblasto.

Referencias bibliográficas

1. Coco R. Reprogenetics: Preimplantational genetics diagnosis. *Genet Mol Biol*. 2014; 37(1 Suppl):271-84.
2. De Rycke M, Belda F, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Traeger-Synodinos J, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. *Hum Reprod*. 2015; 30(8):1763-89.
3. Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril* 2013; 100:595-602.
4. Treff NR, Tao X, Schillings WJ, Bergh PA, Scott RT Jr, Levy B. Use of single nucleotide polymorphism microarrays to distinguish between balanced and normal chromosomes in embryos from a translocation carrier. *Fertil Steril* 2011; 96: e58-e65.
5. Fedorova EM, Shlykova SA, Shunkina KV, Zaitceva OG, Lapina EN, Yanchuk TV et al. Outcomes of IVF cycles coupled with PGS by aCGH of embryos from donor and autologous oocytes, transferred after vitrification to women of advanced maternal age. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(9):737-740.
6. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod*. 2014; 29(12):2802-13.
7. Orvieto R. Preimplantation genetic screening- the required RCT that has not yet been carried out. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016; 14:35.
8. Harper JC, Wilton LJ, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*. 2012;18(3):234-247.
9. Coco R, Mondadori A, Ducatelli ME, Mincman J, Gallo A, Coco F et al. Preimplantation diagnosis in blastocyst biopsy and deferred cycle transfer. *JBRA Assist Reprod*. 2012;16(5):268-270.
10. Gleisher N, Vidali A, Braverman J, Kushnir VA, Albertini DF, Barad DH. Further evidence against use of PGS in poor prognosis patients: report of normal births after transfer of embryos reported as aneuploidy. *Fert Steril* 2015; 104(3), Supplement, page e59.
11. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *N Engl J Med*. 2015; 19; 373(21):2089-90.
12. Scott KL1, Hong KH, Scott RT Jr. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertil Steril*. 2013; 100(3):608-14.
13. Lestou VS, Kalousek DK. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. *Arch Dis Child fetal Neonatal Ed* 1998; 79: F223-F226.
14. PGDIS. Position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage. *PGDIS Newsletter*. 2016; July 19.
15. Shapiro B, Daneshmand S, De Leon L, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2012; 98(6):1490-1494.
16. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013; 99(1):156-152.
17. Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H et al. Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects. *N Engl J Med*. 2012; 366: 1803-1813.
18. Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012; 98(2): 368-377.
19. Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, et al. Controlled ovarian hyperstimulation for In Vitro Fertilization alters endometrial receptivity in Humans: Protocol effects. *Biol Reprod*. 2010; 82(4): 679-686.
20. Munné S, Fischer J, Warner A, Chen S, Zouves C, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril*. 2006; 85(2): 326-332.
21. Mondadori AG, Ducatelli ME, Mincman J, Gallo A, Coco F, Coco R. PGD by aCGH and qPCR in a couple with recurrent aneuploidies. *JBRA Assist Reprod*. 2012; 16(5): 290-300.

REVISIÓN

Utilidad de la glucosa 1-hora post-carga para la evaluación del riesgo de diabetes y sus complicaciones asociadas

Meroño, Tomás^{1,2*}; Alonso, Elizabeth³; Kabakian, Laura³; Santucci, María Pía³; Muzzio, María Luz^{2,4}

¹Laboratorio Central, Servicio de Bioquímica, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas". El Palomar, Buenos Aires, Argentina.

²Bioquímica Clínica 3, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina.

³Servicio de Diabetes y Nutrición Infanto-Juvenil, Complejo Médico Churruca-Visca. CABA, Argentina.

⁴Laboratorio Central, Complejo Médico Churruca-Visca. CABA, Argentina.

Contacto: Dr. Tomás Meroño. Laboratorio Central; Servicio de Bioquímica, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas", Av. Pte. Illia y Marconi S/N (1684), El Palomar, Buenos Aires, Argentina; tomasmero@yahoo.com.ar

Resumen

Diversos estudios observacionales han descrito a la glucosa una hora post-carga durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) como un marcador del futuro riesgo de desarrollar diabetes. El mayor riesgo conferido por esta alteración se encontraría vinculado a su capacidad de estimar la funcionalidad de las células β , tanto en población pediátrica como en adulta. Diversos estudios validados contra las técnicas de referencia [técnicas de *clamp*] demostraron las asociaciones entre la glucosa una hora post-carga y la secreción y sensibilidad a la insulina, parámetros necesarios para calcular la funcionalidad de la célula β . A diferencia de otros índices empleados para estimar la funcionalidad de la célula β , la glucosa a la hora presenta las ventajas de no insumir recursos adicionales, presentar una interpretación directa al contar con puntos de corte validados y evitar el uso de complejas fórmulas matemáticas. Adicionalmente, se ha observado que pacientes con tolerancia normal a la glucosa pueden presentar glucosa una hora post-carga alterada. Este hecho estaría ligado al declive gradual y progresivo de la funcionalidad de la célula β durante la evolución natural de la diabetes desde estadios tempranos de intolerancia a la glucosa hasta la diabetes manifiesta. El objetivo de la presente revisión es describir las evidencias que asocian a la glucosa una hora post-carga con el riesgo de desarrollar diabetes y sus complicaciones. Adicionalmente, se exponen casos de aplicación para ejemplificar su implementación en la práctica clínica.

Palabras clave: glucosa, diabetes, célula beta, prueba de tolerancia a la glucosa.

Abstract

Numerous observational studies have described the association between one-hour postload plasma glucose during the oral glucose tolerance test (OGTT) and an increased risk of diabetes. The increased risk conferred by this alteration could be related to a decreased β -cell function. Indeed, one-hour postload glucose levels performed well as a surrogate measure of β -cell function in pediatric and adult populations. Validation studies using the reference techniques [clamp] have well documented the associations between insulin sensitivity and secretion with one-hour postload glucose levels. Unlike some other indices used to estimate β -cell function, the one-hour postload glucose does not imply an additional cost, does not require the use of complex mathematical formulas, and its values can be easily read in the clinical context. In addition, some patients present altered one-hour glucose levels even in the presence of normal glucose tolerance. This fact might be a consequence of the gradual and linear decline of the β -cell function observed from the early stages of glucose intolerance to the development of overt diabetes. The aim of the present review is to describe the state-of-art evidences of the association between one-hour glucose levels and the risk of diabetes and its associated conditions. In addition, some examples of its intended use are shown.

Key words: glucose, diabetes, beta-cell, glucose tolerance test.

Introducción

En la actualidad se evidencia un marcado aumento en la prevalencia de diabetes y sus comorbilidades asociadas. Dado que las alteraciones genéticas serían responsables de una baja proporción de los casos, los principales factores de riesgo serían el sedentarismo y la alimentación no saludable característicos del estilo de vida occidental. En la Argentina, la diabetes afecta alrededor del 10 % de la población adulta [Organización Mundial de la Salud, 2016], de los cuales un 50 % lo ignora, el 20-30 % de aquellos que conocen su enfermedad no reciben ningún tratamiento, y el 68 % son diagnosticados recién una vez que se manifiesta alguna complicación crónica (micro o macrovascular) [1].

Considerando el tamaño de la problemática actual emerge la necesidad de diseñar eficientes medidas de prevención. De hecho, el “análisis de intención de tratar”, aplicado a uno de los ensayos más importantes en prevención de diabetes llevados a cabo en Estados Unidos (*Diabetes Prevention Program* en conjunto con su continuación el *Diabetes Prevention Program Outcomes Study*) demostraron que un programa de prevención de diabetes a lo largo de 10 años presenta un beneficio superior a sus costos [2].

A la hora de seleccionar individuos para diseñar estrategias de prevención es necesario contar con herramientas para identificar a los pacientes que mayor beneficio podrían obtener de dichos programas. A tales fines, se encuentran identificados varios de los factores de riesgo para el desarrollo de diabetes entre los que se hallan los factores de riesgo genéticos, así como los adquiridos. Adicionalmente, se han definido dos categorías de riesgo llamadas estados “prediabéticos”. Estos son la glucemia alterada en ayunas [GAA; glucemia en ayunas > 100, acorde a definición de la *American Diabetes Association* (ADA) o > 110 mg/dl acorde a definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), y < 126 mg/dl] y la tolerancia alterada a la glucosa [TAG; glucemia dos horas post-carga > 140 y < 200 mg/dl] [3,4].

Por su lado, el diagnóstico de diabetes se concreta en presencia de [3,4]:

- glucemia en ayunas > 126 mg/dl, o
- valor de glucosa 2-horas post-carga durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa > 200 mg/dl, o
- glucemia al azar > 200 mg/dl en presencia de síntomas cardinales como polidipsia, poliuria o polifagia.

Si bien los estados prediabéticos representan situaciones clínicas anteriores al diagnóstico de diabetes, el estudio de la evolución natural de la patología identificó fenómenos anteriores y subyacentes al desarrollo incluso de “prediabéticos” [5-7]. Tales fenómenos son la resistencia a la insulina y la disfunción de la célula β . La resistencia a la insulina es una condición que se caracteriza por la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana, primariamente músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. Tal proceso se caracteriza por un estado de hiperinsulinemia y comúnmente se evidencia a través de una serie de alteraciones que en conjunto com-

ponen el síndrome metabólico. Este síndrome es inherente a las alteraciones fisiopatológicas de la resistencia a la insulina y se define ante la presencia de tres de estas 5 alteraciones: 1) obesidad abdominal (evaluada a través de la circunferencia de cintura); 2) aumento de la tensión arterial; 3) GAA; 4) bajo colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y 5) triglicéridos elevados. Este enfoque fue necesario debido a las limitaciones que rodean al uso clínico de la determinación de insulinemia en ayunas (elevada variabilidad biológica y analítica).

Por otro lado, la disfunción de la célula β es un evento reconocido como uno de los mayores determinantes del progreso desde los estados prediabéticos hacia la diabetes manifiesta [8]. De hecho, se estima que para el momento del diagnóstico de TAG un paciente ya presenta una reducción considerable en la funcionalidad de sus células β [8]. Por tales motivos, la evaluación tanto de la resistencia a la insulina como de la funcionalidad de la célula β permitiría una evaluación temprana del riesgo de desarrollo de diabetes de un individuo. De aquí en adelante, la presente revisión se centrará en la disfuncionalidad de la célula β .

Uno de los inconvenientes respecto a la evaluación de la funcionalidad de las células β son las dificultades metodológicas para su medición, la que requiere de procedimientos costosos, complejos y poco prácticos [9]. Recientemente, se ha sugerido una determinación sencilla que podría brindar una medida práctica y “aceptable” de la funcionalidad de la célula β , la glucosa una hora post-carga durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) [10].

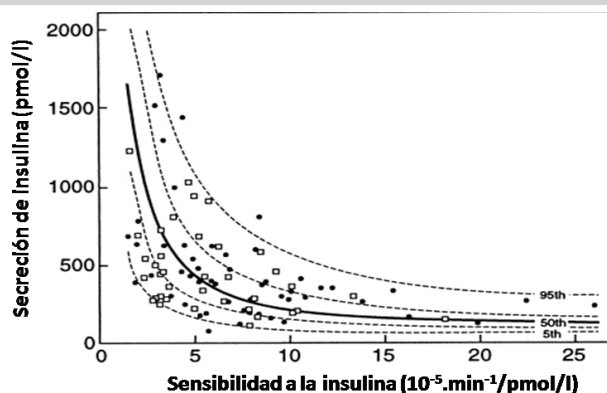
El presente trabajo de revisión tiene como objetivo describir las evidencias que asocian a la glucosa una hora post-carga con la funcionalidad de la célula β y el riesgo de desarrollar diabetes y sus complicaciones.

Eventos fisiopatológicos desde la resistencia a la insulina y los estados prediabéticos hasta la diabetes manifiesta.

Fisiológicamente, la capacidad de metabolizar la glucosa mediada por la insulina, varía ampliamente entre sujetos aparentemente sanos y la homeostasis de la glucemia se logra por un equilibrio entre la secreción pancreática y la sensibilidad de los tejidos a la insulina [Figura 1] [11,12]. La relación hiperbólica de equilibrio entre estos factores implica que siempre y cuando un aumento de la secreción pancreática compense a las disminuciones de sensibilidad a la insulina, o viceversa, no va a ser detectable ningún tipo de alteración en la glucemia. De este modo, si bien el aumento compensatorio de la secreción de insulina logra mantener los niveles de glucosa en sangre, a largo plazo afecta aspectos del metabolismo, en general, y compromete la función pancreática, renal y cardiovascular [13]. Esta situación conduciría al síndrome de resistencia a la insulina o síndrome metabólico.

Como ya fue mencionado la resistencia a la insulina se caracteriza por la disminución de la capacidad de esta para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana [14]. A pe-

Figura 1. Relación entre la secreción y sensibilidad a la insulina en pacientes sin alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono.



► Secreción de insulina en función de la sensibilidad a la insulina. Determinaciones realizadas en una muestra de 93 adultos con tolerancia normal a la glucosa empleando el test endovenoso de tolerancia a la glucosa. Adaptado de [12].

sar de que la resistencia a la insulina no es considerada una enfermedad, la misma es un síndrome multifacético que, además de asociarse con algún grado de intolerancia a la glucosa, se relaciona con diversas alteraciones como dislipemia, disfunción endotelial, hipertensión arterial y un estado procoagulante y proinflamatorio [15]. La importancia de reconocer a los individuos con resistencia a la insulina radica en que esta es detectable varios años antes del desarrollo de prediabetes, diabetes y/o algún tipo de complicación cardiovascular [5,6,13,16]. De hecho, la resistencia a la insulina, a lo largo de sus variables definiciones, fue consistentemente asociada a mayor riesgo cardiovascular en un gran número de estudios en diversas poblaciones [17-20].

En la historia evolutiva de la diabetes tipo 2, en cuanto se quiebra el equilibrio entre la sensibilidad y la secreción de insulina, una de las primeras manifestaciones es el aumento de los valores de la glucemia en ayunas y/o postprandiales. Estos cambios en la glucemia conforman los estados prediabéticos: GAA y TAG. Entre los eventos que conducen desde la normoglucemia [o tolerancia normal a la glucosa] a la GAA o TAG se diferencian los aportes individuales de la resistencia a la insulina hepática y muscular, y la disfunción de las células β [21]. De hecho, si bien los estados prediabéticos son considerados como equivalentes, diversos estudios mostraron que corresponden a diferentes entidades fisiopatológicas [5,21,22]. El desarrollo aislado de GAA implica fundamentalmente un aumento de los valores de insulinemia en ayunas y una mayor producción hepática de glucosa compatibles con una menor sensibilidad a la inhibición de la gluconeogénesis hepática (dependiente de insulina) y a un mínimo deterioro de la función pancreática a lo largo del tiempo. Por otro lado, el desarrollo aislado de TAG se considera consecuencia de un deterioro constante y sostenido de la funcionalidad de la célula β , luego de un pri-

mer evento de disminución de la sensibilidad a la insulina, predominantemente a nivel del tejido muscular. Estas diferencias fisiopatológicas explican el mayor grado de progresión a diabetes y de desarrollo de eventos cardiovasculares que presentan los pacientes con TAG respecto a aquellos con GAA [23,24]. En este contexto, la disfuncionalidad de la célula β se reconoce actualmente como uno de los mayores responsables de la progresión a diabetes. Por último, la disminución de la funcionalidad pancreática más allá de un determinado umbral conduce a la instauración de diabetes manifiesta.

Del análisis de la evolución natural de la patología, desde la resistencia a la insulina hasta la diabetes manifiesta, se pueden evidenciar las ventajas de poder evaluar la funcionalidad de la célula β para dirigir estrategias de prevención y/o tratamiento. Tal poder predictivo se evidencia en la Figura 2 en la que se observa cómo la disminución de la funcionalidad de la célula β disminuye a medida que se desarrolla la intolerancia a la glucosa y finalmente la diabetes [25,26].

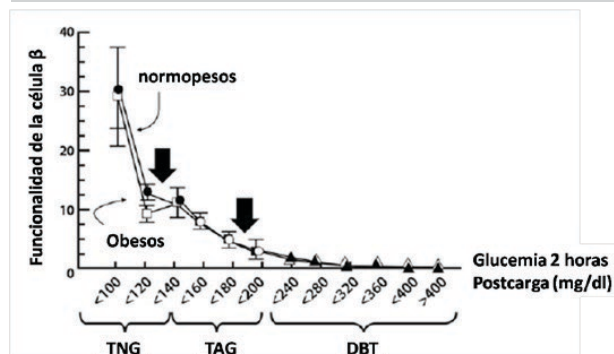
La gran limitante para la implementación de la medición de la funcionalidad de la célula β en la clínica es que hasta el momento los métodos desarrollados para obtener una medida directa resultan costosos y complejos, y requieren de personal entrenado. Por lo tanto, su uso en la práctica clínica es poco probable. No obstante, mediante modelos matemáticos se han desarrollado diversos índices utilizando la glucemia e insulinemia en ayunas y/o en distintos tiempos durante la POTG para ser utilizados como marcadores de la funcionalidad de la célula β . Por último, recientemente, se ha propuesto a la glucemia una hora post-carga como un surrogante de la funcionalidad de la célula β .

Evaluación de la funcionalidad de la célula β : pruebas de secreción y sensibilidad a la insulina.

Los marcadores tradicionalmente empleados para el estudio del metabolismo de los hidratos de carbono son la glucemia en ayunas, la glucemia dos horas post-carga en la POTG y la hemoglobina (Hb) A1c. Adicionalmente, se suelen determinar la insulinemia en ayunas y a las 2 horas post-carga durante la POTG, aunque estas no forman parte de las recomendaciones de diagnóstico y seguimiento del paciente con riesgo de diabetes o diabetes manifiesta. Las condiciones estándar para realizar la POTG es 75 g de glucosa anhidra en agua para adultos y 1,75 g de glucosa / kg de peso en niños.

Los estudios complementarios utilizados en el ámbito de investigación son la técnica de *clamp* en sus dos variantes euglicémico hiperinsulinémico o hiperglicémico y la prueba endovenosa de tolerancia a la glucosa (IVGTT del inglés *intravenous glucose tolerance test*). En la presente revisión se discutirán las pruebas que son utilizadas para evaluar directa o indirectamente la secreción y sensibilidad a la insulina que son los parámetros necesarios para el estudio de la funcionalidad de la célula β .

Figura 2. Relación entre la funcionalidad de la célula β y la glucemia dos horas postcarga desde la tolerancia normal hasta la diabetes manifiesta.



► Resultados obtenidos en pacientes pertenecientes al estudio San Antonio Metabolism (SAM) y Veteran Administration Genetics Epidemiology (VAGES). Se evaluaron 778 adultos que realizaron una prueba de tolerancia oral a la glucosa para evaluar secreción de insulina (con mediciones de glucemia-insulinemia cada 15 minutos) y un clamp euglucémico hiperinsulinémico para determinar sensibilidad a la insulina. El eje Y es el disposition index estimador de la funcionalidad de la célula β . TNG, tolerancia normal a la glucosa; TAG, tolerancia alterada a la glucosa; DBT, diabetes. Adaptado de [26].

Técnicas de *Clamp* y prueba endovenosa de tolerancia a la glucosa.

Estas técnicas se caracterizan por realizar una medida directa de la sensibilidad y secreción de insulina, parámetros necesarios para evaluar la funcionalidad de la célula β . Se han desarrollado dos variantes de la técnica de *clamp* [27]. La primera variante es el *clamp* euglucémico hiperinsulinémico, diseñado específicamente para la medida de la sensibilidad a la insulina, y la segunda es el *clamp* hiperglucémico cuyo diseño permite la determinación de la máxima capacidad secretora de la célula β bajo distintas condiciones de estimulación.

El *clamp* euglucémico hiperinsulinémico se considera la técnica de referencia o *gold standard* para la evaluación de la sensibilidad a la insulina. Brevemente, el estudio consiste en administrar una infusión endovenosa de insulina a una tasa constante hasta conseguir un nuevo estado de equilibrio a un valor de insulinemia por encima del estado basal (condición de hiperinsulinemia). Al mismo tiempo que se administra la insulina, los valores de glucemia son monitoreados cada 10-15 minutos para regular la tasa de infusión de dextrosa endovenosa necesaria para mantener la glucemia en el rango euglucémico. Adicionalmente, el paciente también recibe por vía fosfato de potasio para prevenir algún posible episodio de hipokalemia. En estas condiciones, una vez alcanzados niveles estables de glucemia a una tasa de infusión de dextrosa fija y asumiendo que la producción hepática de glucosa se encuentra completamente suprimida por el estado hiperinsulinémico, se cumple que la tasa de infusión de glucosa es proporcional a la sensibilidad a la insulina del individuo. Tal como se desprende de la descrip-

ción de la técnica, la incorporación de la misma a la práctica clínica resulta inviable por la complejidad y los riesgos asociados.

Por otro lado, el *clamp* hiperglucémico es una variante diseñada con la finalidad principal de estimar la máxima capacidad de secreción de insulina de un individuo. La técnica consiste en la administración de dextrosa en bolo para incrementar rápidamente la glucemia y luego mantener una tasa de infusión de dextrosa tal que se alcance un estado estable hiperglucémico. Como la glucemia se mantiene constante, la tasa de infusión de glucosa resulta proporcional a la capacidad secretora y a la sensibilidad a la insulina del individuo [reflejo de la funcionalidad de la célula β]. Durante el desarrollo de esta prueba se observan dos fases de secreción de insulina: una primera dentro de los 10 minutos iniciales y luego una segunda caracterizada por un aumento gradual y sostenido de la insulinemia. El área bajo la curva de insulinemia o péptido C a lo largo de la prueba puede ser utilizada como medida de la secreción de insulina. En particular, este tipo de prueba se utiliza para evaluar secretagogos tales como arginina o análogos del *glucagón like peptide-1* (GLP-1) [28]. Tal como con la otra variante del *clamp*, la aplicación a la clínica de esta técnica es poco probable.

La IVGTT es una prueba que tiene tres horas de duración e implica la administración de un bolo endovenoso de dextrosa. Posteriormente, se monitorea la respuesta de glucemia e insulinemia o péptido C cada 10 minutos. Una vez concluidas las tres horas del estudio, el análisis de los datos implica el empleo de complejos modelos matemáticos para poder calcular la sensibilidad y secreción de insulina, y en consecuencia estimar la funcionalidad de la célula β . Si bien este método representa menores riesgos que los tests de *clamp*, su empleo en la clínica es también improbable. Otra limitante de esta prueba, así como de las técnicas de *clamp*, es que se está realizando una evaluación en una situación no-fisiológica dada la vía de administración de la glucosa. Por lo tanto, factores gastrointestinales tal como el efecto de las incretinas no son tenidos en cuenta.

Glucemia e insulinemia en ayunas.

A partir de la concentración de glucemia e insulinemia en ayunas es posible calcular los siguientes índices: a) de resistencia a la insulina, HOMA-IR (*homeostasis model assessment*), b) de sensibilidad a la insulina, $1/\text{HOMA-IR}$ o QUICKI y c) de funcionalidad de la célula β , HOMA- β [29, 30]. Estos índices presentan una aceptable correlación respecto a las mediciones hechas con el *clamp* pero su utilidad en la práctica clínica se encuentra limitada debido a la variabilidad [biológica y analítica] de la determinación de la insulina en ayunas. De hecho, existe una amplia discusión sobre qué punto de corte aplicar al HOMA-IR y qué valores utilizar para realizar algún diagnóstico o predicción de riesgo de diabetes tanto en niños como en adultos [31,32]. Asimismo, al utilizar valores en ayunas estos índices evalúan sólo la resistencia a la insulina hepática, dejando de lado el

componente periférico. La Figura 3 muestra las diferencias fisiopatológicas que se pueden ocultar tras valores similares de glucemia e insulinemia en ayunas. Por tal motivo, pese a que su uso se encuentra ampliamente difundido y los resultados de ensayos clínicos soportan cierta utilidad de su evaluación, el impacto de la determinación de insulinemia en ayunas sobre el manejo clínico de los pacientes es limitado.

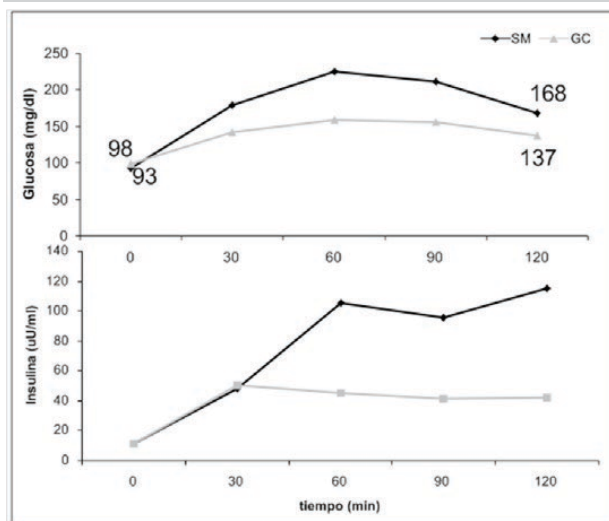
Índices a partir de la prueba oral de tolerancia a la glucosa.

La POTG permite un estudio más completo del metabolismo de los hidratos de carbono que la evaluación en ayunas. Es importante destacar, que la POTG es una prueba diseñada para evaluar la tolerancia a la glucosa, la cual no es sinónimo de sensibilidad a la insulina. En la tolerancia a la glucosa se ponen en juego factores que exceden a las acciones metabólicas de la insulina tales como el efecto de las incretinas y otros factores gastrointestinales. Sin embargo, es posible calcular índices de secreción y de sensibilidad a la insulina con los datos de la POTG, los cuales permiten estimar la funcionalidad de la célula β [9]. La mayoría de estos índices requieren al menos de una extracción adicional a las dos comúnmente realizadas durante de la POTG estándar (basal y dos horas post-carga) en algún tiempo intermedio durante la prueba. Asimismo, para el cálculo de estos índices se requiere de la determinación simultánea de glucemia e insulinemia en cada extracción realizada.

Por definición todo marcador surrogante de la funcionalidad de la célula β es el resultado del producto entre una medida de la sensibilidad a la insulina y de la secreción de insulina [26]. Por lo tanto, en primer lugar, se describirán los índices que permiten estimar la sensibilidad a la insulina y luego aquellos utilizados para estimar la secreción de insulina a partir de la POTG.

Los índices para evaluar la sensibilidad a la insulina calculados a partir de la POTG más difundidos en la literatura son: el índice de Matsuda, el índice de Stumvoll, el índice OGIS (del inglés *oral glucose insulin sensitivity*) y el índice de Gutt [33-36]. La fórmula original del índice de Matsuda requiere de la determinación simultánea de glucemia e insulinemia cada 30 minutos durante las dos horas de la POTG. Posteriormente, adaptaciones de la fórmula acorde a distintos puntos de la curva se desarrollaron y se encuentran disponibles *online* (<http://mmatsuda.diabetes-smc.jp/MIndex.html>). En particular, el índice de Matsuda se encuentra ampliamente estudiado y fue asociado consistentemente a mayor riesgo de diabetes y de sus complicaciones clínicas [10,37-39]. Asimismo, los índices de Stumvoll y Gutt que utilizan datos antropométricos, además de algunos valores de glucemia e insulinemia durante la POTG, también se encontraron asociados a mayor riesgo de diabetes y sus complicaciones [17]. La limitante para el empleo de estos índices, similar a lo que ocurre con el HOMA-IR, es que aún no se han establecido valores de referencia [40]. El que más apoyo encuentra es un valor de $> 5,0$ para el índice

Figura 3. Cinéticas de glucemia e insulinemia durante una prueba de tolerancia a la glucosa en dos pacientes adultos que no presentaban diferencias en sus valores en ayunas.



► Resultados obtenidos en pacientes con sobrecarga de hierro primaria que realizaron una POTG estándar (75g). Se observan las mínimas diferencias en los valores de glucemia e insulinemia en ayunas, hecho que implica que los índices HOMA-IR, QUICKI y HOMA- β no sean diferentes entre los pacientes a pesar de lo observado durante la curva. Resultados propios del autor TM como parte del trabajo de su tesis doctoral.

de Matsuda [41]. No obstante, la necesidad de uno o más puntos de la curva sumado a la complejidad de las fórmulas matemáticas desarrolladas conducen a que estos índices sean poco utilizados en la práctica clínica a pesar de ser mejores marcadores pronósticos independientes del desarrollo de diabetes y aterosclerosis que el índice HOMA-IR y los otros índices calculados a partir de valores en ayunas [10,42,43].

Los índices de secreción de insulina calculados a partir de la POTG son: el índice insulinogénico (Δ insulinemia_{0-30min} / Δ glucemia_{0-30min}), el cociente entre el área bajo la curva (AUC) de insulina / AUC de glucemia durante toda la POTG y el cociente Δ insulinemia_{0-120min} / Δ glucemia_{0-120min} [9]. Adicionalmente, se puede estimar la secreción prehepática de insulina mediante complejos cálculos matemáticos que requieren de la medición del péptido C cada 30 minutos durante la POTG [44]. Los índices de secreción de insulina se utilizan multiplicados al de algún marcador de sensibilidad para estimar la funcionalidad de la célula β . Este producto se halla comúnmente denominado como *disposition index* en la literatura. El *disposition index* se asoció a muchas otros eventos tales como diabetes y enfermedad cardiovascular [10,38,45] y su disminución fue correlativa a la progresión de la enfermedad desde la tolerancia normal a la glucosa, pasando por los estados prediabéticos hasta llegar a la diabetes (Figura 2) [26].

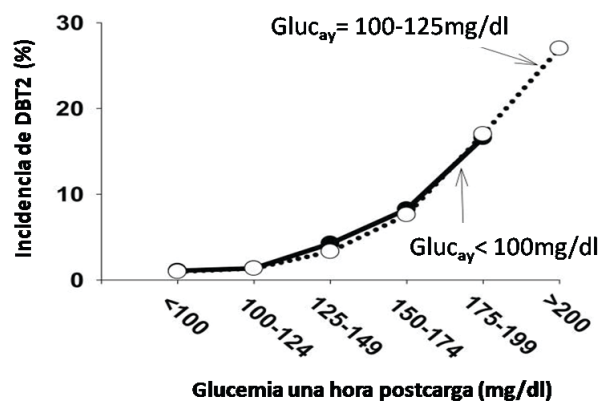
Glucosa una hora post-carga.

La glucosa una hora post-carga es un indicador muy sencillo que combina la mayor información brindada por las pruebas dinámicas (POTG), con la practicidad derivada del hecho de que su interpretación no requiere ningún cálculo. De hecho, se ha definido un punto de corte tentativo de 155 mg/dl para la glucosa una hora post-carga. Este valor fue el que maximizó la sensibilidad y especificidad para detectar pacientes que progresaron hacia la diabetes tipo 2 durante los 7-8 años de seguimiento que abarcaron los estudios en los que se validó este parámetro [10,46]. En estos estudios también se observó que la información pronóstica brindada por la GAA fue insignificante frente al aporte de la glucemia una hora post-carga (Figura 4) [46]. Tal como se observa en la Figura 4, las curvas de incidencia de diabetes tipo 2 a 7 - 8 años de seguimiento en función de la glucemia una hora post-carga no fueron diferentes entre los pacientes con y sin GAA. De modo similar en la Figura 3, se observa que la separación entre las curvas de los dos pacientes es máxima en el punto de glucemia una hora post-carga.

Diversos estudios observacionales validaron el punto de corte de glucosa a la hora en diversas poblaciones e incluso demostraron que un valor > 155 mg/dl se asoció a deterioro de la funcionalidad de la célula β (evaluada a través de técnicas de *clamp*) aún en pacientes con tolerancia normal a la glucosa, es decir sin prediabetes [47,48]. Más aún, un valor alterado de glucemia una hora post-carga se asoció a menor funcionalidad de la célula β también en población pediátrica [49,50].

En la siguiente sección se describen algunos de los estudios que evaluaron la asociación entre la glucemia una hora post-carga y distintos eventos clínicos relacionados a la diabetes y a sus consecuencias clínicas.

Figura 4. Incidencia de diabetes en 7-8 años de seguimiento en función de los valores de glucemia una hora postcarga.



► Análisis combinado de los estudios San Antonio Heart Study y Botnia (n=3450). En ambos estudios se evaluaron pacientes adultos durante 7-8 años de seguimiento con el objetivo de evaluar predictores del desarrollo de diabetes tipo 2. Como se indica en la figura se distinguen los pacientes con glucemia alterada en ayunas de los que presenta glucemia en ayunas normal. Gluc_{ay}, glucemia en ayunas; DBT2, diabetes tipo 2. Adaptado de [46].

Glucosa una hora post-carga y riesgo de diabetes y sus complicaciones.

Los primeros reportes en describir el poder predictivo de la glucosa una hora post-carga para la incidencia de diabetes fueron resultados de los estudios *San Antonio Heart Study* (SAHS) y *Botnia Study*. El primer reporte del SAHS fue un estudio que incluyó el análisis de 1551 pacientes adultos [42 % de sexo masculino] que realizaron una POTG al reclutamiento y fueron seguidos durante 7 - 8 años para evaluar predictores de la incidencia de diabetes tipo 2 [10]. Si bien en este estudio se identificó al *disposition index* (calculado mediante índices a partir de la POTG) como el mayor predictor independiente de la incidencia de diabetes, se observó una correlación estrecha entre la glucosa una hora post-carga y el *disposition index*. Al evaluar posibles puntos de corte para la glucosa una hora post-carga se determinó que un valor de 155 mg/dl presentaba un 75 % de sensibilidad y 79 % de especificidad para identificar a los pacientes que desarrollaron diabetes mientras que el criterio para definir TAG presentó un valor de 51 % de sensibilidad y 92 % de especificidad [10]. De modo similar, en el estudio Botnia que evaluó a 2442 adultos seguidos durante 7 - 8 años [42] identificó a la glucosa una hora post-carga como un predictor independiente y significativo del riesgo de diabetes tipo 2. Estos resultados se reprodujeron en otras cohortes [43,51] e inclusive un análisis de 4989 adultos asoció mayor valor predictivo a la glucosa una hora post-carga que a un modelo compuesto por variables clínicas tales como sexo, edad, índice de masa corporal e historia familiar de diabetes [52]. El AUC de la curva ROC, para predecir incidencia de diabetes tipo 2 para la glucosa una hora post-carga fue 0,80 [0,77 - 0,84], mientras que para el criterio clínico fue 0,75 [0,72 - 0,79].

En niños, la glucosa una hora post-carga (aplicando 155 mg/dl como punto de corte) también se ha demostrado como un predictor del deterioro de la funcionalidad de la célula β y, consecuentemente, de mayor riesgo de prediabetes [50]. Kim y col. [50] estudiaron 233 niños obesos (edad: $11,1 \pm 1,7$ años) que realizaron una POTG anualmente durante 8 años y observaron un riesgo de prediabetes 2,5 veces mayor en los niños con valores elevados de glucosa una hora post-carga en la evaluación inicial. Más aún, los niños y adolescentes con valores elevados de glucosa una hora post-carga presentaron disfuncionalidad de la célula β evaluado acorde a los métodos de *clamp* [49]. De este modo, considerando las evidencias que demuestran que la glucosa una hora post-carga es un surrogante aceptable de la funcionalidad de la célula β tanto en niños como en adultos, los resultados citados son consecuencia directa de la relación entre la disfunción pancreática y el desarrollo de diabetes.

A su vez, el valor de glucosa una hora post-carga también se encontró asociado a complicaciones de la diabetes tales como esteatosis hepática no alcohólica y aterosclerosis. Respecto al riesgo de esteatosis hepática no alcohólica, Fio-

rentino y col. observaron que los individuos con glucosa una hora post-carga > 155 mg/dl presentaban un mayor riesgo de esteatosis hepática no alcohólica en un estudio que evaluó a 1100 adultos [53]. Lo importante de este estudio es que la glucosa una hora post-carga se encontró alterada tanto en pacientes con tolerancia normal a la glucosa, así como con valores de HbA1c $< 6,5$ %, demostrando así su habilidad como predictor temprano.

Por último, haciendo referencia al riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, un estudio de fines de los 90 reveló la asociación entre la glucemia una hora post-carga y enfermedad cardiovascular en una muestra de aproximadamente 26700 adultos seguidos durante 22 años [54]. Estos resultados fueron luego confirmados por el estudio CATAMERIS [55], el cual describió una asociación independiente entre la glucemia una hora post-carga y el espesor de íntima media carotídeo (IMTc), un marcador de aterosclerosis subclínica. En este estudio que abarcó a 400 pacientes no-diabéticos se observó que la glucosa una hora post-carga fue un predictor independiente del IMTc en pacientes con tolerancia normal a la glucosa en un modelo ajustado por los factores de riesgo cardiovascular tradicionales [55]. De modo similar, diversos estudios observaron que los pacientes con glucosa una hora post-carga > 155 mg/dl, a pesar de presentar tolerancia normal a la glucosa, presentaron signos de daño vascular (hipertrofia ventricular, rigidez arterial y riesgo de disfunción renal) [56-58].

En conclusión, la glucosa una hora post-carga es un marcador de riesgo de diabetes y sus complicaciones asociadas, aún en pacientes con tolerancia normal a la glucosa. Esto estaría vinculado a la capacidad de reflejar el deterioro de la funcionalidad de la célula β , evento temprano que ocurre inclusive antes de detectarse algún estado pre-diabético (Figura 2).

Glucosa una hora post-carga en pacientes pediátricos con autoinmunidad pancreática y/o sobrepeso/obesidad.

La presente sección es de especial importancia para la población pediátrica en la que la POTG no es frecuente y su indicación se encuentra reservada para determinados subgrupos de pacientes como los niños / adolescentes con GAA o con obesidad. Es importante destacar que, aunque no existe una recomendación específica para niños con autoinmunidad pancreática, también se ha sugerido una utilidad para la glucosa una hora post-carga en estos casos, en especial por su valor pronóstico. De hecho, se ha identificado que aquellos pacientes con autoanticuerpos positivos que presentan valores > 200 mg/dl en los puntos intermedios de la POTG (a los 30, 60 o 90 minutos) presentan un mayor riesgo de incidencia de diabetes tipo 1 [59,60]. Es destacable que estos valores se observan incluso en pacientes que presentan tolerancia normal a la glucosa por lo que no serían detectables si sólo se evalúa la glucemia basal y dos horas post-carga durante la POTG. En su análisis, Sosenko y col. [59] observaron que un 16 % de los pacientes con riesgo de diabetes tipo 1 presentó glucemias > 200 mg/dl

en los 30, 60 o 90 minutos durante la POTG a pesar de presentar tolerancia normal a la glucosa. A su vez, el estudio *Diabetes Prevention Trial type-1* (DPT-1) que evaluó 704 familiares de pacientes con diabetes tipo 1 y autoinmunidad positiva seguidos durante 7 años (autoanticuerpos antiislotes, ICA) encontró que el poder predictivo de diabetes tipo 1 de la glucemia una hora post-carga era superior al de la glucemia en ayunas y de la glucemia dos horas post-carga [61]. El área bajo la curva ROC para detectar pacientes que desarrollaron diabetes tipo 1 fue: para la glucemia basal: $0,53 \pm 0,02$; de la glucemia dos horas post-carga: $0,66 \pm 0,02$; y de la glucemia una hora post-carga $0,71 \pm 0,02$ [61]. En conclusión, en niños y adolescentes con evidencias de autoinmunidad pancreática es posible mejorar la estimación del riesgo de padecer diabetes tipo 1 mediante el valor de la glucosa una hora post-carga. No obstante, el punto de corte de 155 mg/dl no fue específicamente evaluado en estos pacientes, por lo que sería recomendable dar importancia únicamente a los valores > 200 mg/dl para este fin.

En niños y adolescentes con sobrepeso / obesidad la prevalencia de prediabetes resulta variable. Se estima que un 5 – 20 % presentan sólo GAA, 5 – 10 % sólo TAG aislada y aparentemente, debido a que este parámetro no suele ser evaluado, un 10 % presentaría sólo glucosa una hora post-carga > 155 mg/dl [62-67]. Dado que se ha demostrado que los estados prediabéticos en niños con sobrepeso/obesidad se caracterizan más por un defecto en la secreción de insulina que en la disminución de la sensibilidad [68], un marcador de las alteraciones en la funcionalidad de la célula β lograría una mejor evaluación del futuro riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 de estos pacientes. Hasta el momento, si bien se ha descrito menor funcionalidad de la célula β en niños con glucosa una hora > 155 mg/dl [49], e incluso un mayor riesgo de desarrollo de prediabetes [50], aún no hay reportes que asocien directamente el valor de > 155 mg/dl a un mayor riesgo de diabetes manifiesta en niños y adolescentes con sobrepeso / obesidad.

Por otro lado, se ha reportado que los adolescentes con sobrepeso / obesidad y autoinmunidad pancreática presentan mayor glucemia una hora post-carga que aquellos con autoanticuerpos negativos [69]. En este último estudio, los valores de glucemia en los otros puntos de la POTG (a los 30, 90 y 120 minutos) no fueron significativamente diferentes entre los pacientes con y sin autoinmunidad. De este modo, la glucosa una hora post-carga podría identificar niños y adolescentes en los cuales sería útil evaluar marcadores de autoinmunidad pancreática.

A continuación, se describen un análisis realizado en población adulta y un caso clínico que reflejan la importancia de evaluar la glucemia una hora post-carga durante la POTG en la práctica clínica.

Casos de aplicación.

Ejemplo de aplicación en población adulta.

En un estudio en el que se evaluaron 30 pacientes adultos (edad: 48 ± 10 años), de sexo masculino con elevado riesgo de diabetes tipo 2 asociado a hemocromatosis here-

ditaria, se observó que 4 pacientes presentaron GAA acorde a definición de la OMS, 5 TAG y 21 tolerancia normal a la glucosa. Por otro lado, entre los 30 pacientes, 18 presentaron glucemia una hora post-carga > 155 mg/dl. Entre estos 18 se ubicaron los 4 pacientes con GAA, 4 de los 5 pacientes con TAG y 10 con tolerancia normal. Al comparar dentro del grupo de tolerancia normal a los pacientes con ($n = 10$) y sin glucosa una hora postcarga alterada ($n = 11$) se observaron diferencias significativas en el índice de masa corporal (30 ± 3 vs. 27 ± 2 kg/m², $p < 0,05$), la sensibilidad a la insulina, evaluado por el índice de Matsuda [$3,8$ ($2,1 - 4,2$) vs. $5,5$ ($4,5 - 7,6$); $p < 0,01$] y el *disposition index*, indicador de la funcionalidad de la célula β [$2,0$ ($1,4 - 3,7$) vs. $5,5$ ($3,8 - 8,1$); $p < 0,01$]. De este modo es posible especular que los 10 pacientes con alteraciones en la glucosa una hora post-carga presentan un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 asociado a una menor funcionalidad de la célula β a pesar de presentar tolerancia normal a la glucosa. Lo destacable de este estudio es que demuestra que al incluir la evaluación de la glucosa una hora post-carga durante la POTG se pudo identificar 18 pacientes con elevado riesgo de diabetes en lugar de los 9 pacientes que presentaron pre-diabetes acorde a las definiciones actuales. En conclusión, en esta población de pacientes con hemocromatosis hereditaria, la glucosa una hora post-carga permitió identificar pacientes con menor funcionalidad de la célula β , a pesar de presentar tolerancia normal a la glucosa. Sería interesante evaluar la utilidad de la glucosa una hora post-carga en otras poblaciones de riesgo a fin de poder diseñar eficientes estrategias de prevención.

Caso de aplicación en población pediátrica.

Caso. Adolescente de 13 años que concurre a control nutricional, derivada por pediatra de cabecera por hiperinsulinemia basal.

Antecedentes personales: fue prematura de 35,5 semanas, con bajo peso de nacimiento 2350 g, sin complicaciones asociadas, internación conjunta con su madre, no tomo pecho. Presentó bronquiolitis al año de vida, operada de adenoidectomía a los 6 años de edad.

Presenta antecedentes familiares de abuelo materno con diabetes tipo 2, cardiopatía, obesidad, e hipotiroidismo; y abuela paterna con hipertensión y sobrepeso sin control clínico. Hermana con sobrepeso. Al momento de la consulta presenta:

Peso	62 kg (p 90-97)
Talla	153 cm (p 25-10)
IMC	26,4 kg/m ² (p>97)

Presenta laboratorio con hemograma normal, glucemia en ayunas 97 mg/dl, insulinemia 32,8 mU/l y hepatograma normal. Microalbuminuria de 24 hs 3 mg/24hs. HbA1C: 5.4

%. Perfil tiroideo normal, perfil lipídico alterado con C-HDL de 39 mg/dl y triglicéridos de 146 mg/dl. Se le solicita POTG.

Glucosa ₀ :	92 mg/dl	Insulina ₀ :	33 mU/l
Glucosa _{1h} :	172 mg/dl	Insulina _{1h} :	> 300 mU/l
Glucosa _{2h} :	78 mg/dl	Insulina _{2h} :	> 300 mU/l

Dada su insulino resistencia y presencia de acantosis nigricans, comienza tratamiento con Metformina, 500 mg/día, dieta hipocalórica y ejercicio.

Evolución: Presentó buena tolerancia a la metformina con poca adherencia al tratamiento dietario, no realiza actividad física. No tuvo buena evolución de peso. Si bien disminuyó la acantosis, no es constante con la toma de Metformina. Se le solicita laboratorio control durante el tratamiento.

La paciente concurre luego de 7 meses con los siguientes valores:

Colesterol Total: 176 mg/dl; C-HDL: 38 mg/dl; C-LDL: 121 mg/dl; triglicéridos: 86 mg/dl. Hepatograma normal. HbA1c: 5,2 %.

Glucosa ₀ :	92 mg/dl	Insulina ₀ :	23 mU/l
Glucosa _{2h} :	96 mg/dl	Insulina _{2h} :	118 mU/l

Discusión del caso.

La paciente es una adolescente de 13 años que presenta un importante proceso de resistencia a la insulina evidenciado tanto en la insulinemia basal con la que concurre, así como por los valores de insulinemia > 300 mU/l en la primera y segunda hora durante la POTG. Asimismo, presenta acantosis nigricans, signo relacionado a la obesidad y a la resistencia a la insulina [70]. Como factor de riesgo adicional, la paciente fue prematura (35 semanas) condición que se ha asociado a mayor predisposición a desarrollar resistencia a la insulina [71]. El valor de la glucosa una hora post-carga radicó en que fue la única determinación glucémica que se vio alterada durante la POTG. Tanto la glucemia basal como la de dos horas post-carga estuvieron dentro del rango de referencia. Si bien la medición de insulinemia dos horas post-carga se encontró marcadamente alterada, la evaluación de insulinemia requiere de instrumental de mayor complejidad respecto a la glucemia. Por tal motivo, la medición de glucemia una hora post-carga podría ser realizada en laboratorios de baja complejidad y otorgar información valiosa aún en situaciones en las que la determinación de insulinemia no se encuentre disponible. Por último, durante la evolución se observó una mejora de la sensibilidad a la insulina asociada a la toma de metformina tanto por el valor de insulinemia 2 horas post-carga como por la disminución de la acantosis. Lastimosamente, no se evaluó nuevamente la glucemia a la hora.

Discusión

La evaluación de la glucosa una hora post-carga durante la POTG es un indicador sencillo y de fácil interpretación del riesgo de diabetes y sus complicaciones. Esta relación se fundamenta en que la glucosa una hora post-carga expresa la funcionalidad de la célula β , evento fisiopatológico crucial en el desarrollo de diabetes. La exposición de los casos de aplicación ilustra que su implementación no requiere de la puesta a punto de nuevas metodologías ni instrumental, así como no precisa de la validación de índices que requieren de múltiples muestras durante la POTG, con la determinación simultánea de la glucemia e insulinemia. Del mismo modo, se evita el empleo de fórmulas matemáticas complejas. Las evidencias provenientes de importantes estudios longitudinales sugieren entonces el uso de la glucosa una hora post-carga, empleando 155 mg/dl (como punto de corte) como un factor de riesgo independiente para el futuro desarrollo de diabetes. Esta determinación cobra aún mayor relevancia si se considera el hecho de que se presentan pacientes con glucosa a la hora alterada, pero con tolerancia normal a la glucosa. Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se comparó la utilidad de la glucosa una hora post-carga vs. la, tradicionalmente utilizada, glucosa dos horas post-carga para predecir el desarrollo de TAG y distintos eventos clínicos en una cohorte de 4867 adultos [72]. Los resultados de dicho estudio señalaron que la glucosa una hora post-carga fue mejor predictor de diabetes y mortalidad cardiovascular que la glucosa dos horas post-carga. Por tal motivo, los autores concluyeron que aparte de reducir los tiempos para el paciente, la glucosa una hora post-carga sería el estudio de elección al momento de evaluar pacientes con intolerancia a los hidratos de carbono. De todos modos, estos estudios no sugieren modificaciones para el diagnóstico de diabetes en el cuál se emplea la glucosa dos horas post-carga.

En conclusión, la incorporación de la glucosa una hora post-carga en la práctica clínica permitiría orientar las pautas de monitoreo y de intervención nutricional en los pacientes con intolerancia a los hidratos de carbono y/o elevado riesgo para el desarrollo de diabetes.

Referencias bibliográficas

1. Chilton R, Wyatt J, Nandish S, Oliveros R, Lujan M. *Cardiovascular* comorbidities of type 2 diabetes mellitus: defining the potential of glucagonlike peptide-1-based therapies. *Am J Med*. 2011;124[1 Suppl]:S35-53.
2. Diabetes Prevention Program. The 10-year cost-effectiveness of lifestyle intervention or metformin for diabetes prevention: an intent-to-treat analysis of the DPP/DPPOS. *Diabetes Care*. 2012;35[4]:723-30.
3. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2017. *Diabetes Care*. 2017;40[Suppl 1].
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: World Health Organization. 2006:1–50.
5. Faerch K, Vaag A, Holst JJ, Hansen T, Jorgensen T, Borch-Johnsen K. Natural history of insulin sensitivity and insulin secretion in the progression from normal glucose tolerance to impaired fasting glycemia and impaired glucose tolerance: the Inter99 study. *Diabetes Care*. 2009;32[3]:439-44.
6. Hanley AJ, Williams K, Gonzalez C, D'Agostino RB, Jr., Wagenknecht LE, Stern MP, et al. Prediction of type 2 diabetes using simple measures of insulin resistance: combined results from the San Antonio Heart Study, the Mexico City Diabetes Study, and the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes*. 2003;52[2]:463-9.
7. Lyssenko V, Almgren P, Anevski D, Perfekt R, Lahti K, Nissen M, et al. Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54[1]:166-74.
8. Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90[1]:493-500.
9. Cersosimo E, Solis-Herrera C, Trautmann ME, Malloy J, Triplitt CL. Assessment of pancreatic beta-cell function: review of methods and clinical applications. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10[1]:2-42.
10. Abdul-Ghani MA, Williams K, DeFronzo RA, Stern M. What is the best predictor of future type 2 diabetes? *Diabetes Care*. 2007;30[6]:1544-8.
11. Yeni-Komshian H, Carantoni M, Abbasi F, Reaven G. Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy, nondiabetic volunteers. *Diabetes Care*. 2000;23:171–75.
12. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes*. 1993;42[11]:1663-72.
13. Facchini FS, Hua N, Abbasi F, Reaven GM. Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86[8]:3574-8.
14. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin

- resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S262-8.
15. Reaven GM. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr*. 2005; 25:391-406.
 16. Viitasalo A, Lakka TA, Laaksonen DE, Savonen K, Lakka HM, Hassinen M, et al. Validation of metabolic syndrome score by confirmatory factor analysis in children and adults and prediction of cardiometabolic outcomes in adults. *Diabetologia*. 2014;24.
 17. Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2005;54(11):3252-7.
 18. Howard G, O'Leary DH, Zaccaro D, Haffner S, Rewers M, Hamman R, et al. Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation*. 1996;15;93(10):1809-17.
 19. Gast KB, Tjeerdema N, Stijnen T, Smit JW, Dekkers OM. Insulin resistance and risk of incident cardiovascular events in adults without diabetes: meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(12):e52036.
 20. Czernichow S, Bruckert E, Bertrais S, Galan P, Hercberg S, Oppert JM. Hypertriglyceridemic waist and 7.5-year prospective risk of cardiovascular disease in asymptomatic middle-aged men. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(5):791-6.
 21. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care*. 2006;29(5):1130-9.
 22. Meigs JB, Muller DC, Nathan DM, Blake DR, Andres R. The natural history of progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Diabetes*. 2003;52(6):1475-84.
 23. DECODE study group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe*. *Lancet*. 1999;354(9179):617-21.
 24. DeFronzo RA, Abdul-Ghani M. Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol*. 2011;108(3 Suppl):3B-24B.
 25. DeFronzo RA, Banerji MA, Bray GA, Buchanan TA, Clement S, Henry RR, et al. Determinants of glucose tolerance in impaired glucose tolerance at baseline in the Actos Now for Prevention of Diabetes (ACT NOW) study. *Diabetologia*. 2010;53(3):435-45.
 26. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009;58(4):773-95.
 27. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237(3):E214-23.
 28. Gudipaty L, Rosenfeld NK, Fuller CS, Gallop R, Schutta MH, Rickels MR. Effect of exenatide, sitagliptin, or glimepiride on beta-cell secretory capacity in early type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37(9):2451-8.
 29. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
 30. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2402-10.
 31. Ballerini M, Bergadá I, Rodríguez M, Keselman A, Bengolea V, Pipman V, et al. Concentración de insulina e índices de insulinosensibilidad en niños y adolescentes sanos. *Arch Argent Pediatr*. 2016;114:329-36.
 32. Esteghamati A, Ashraf H, Khalilzadeh O, Zandieh A, Nakhjavani M, Rashidi A, et al. Optimal cut-off of homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) for the diagnosis of metabolic syndrome: third national surveillance of risk factors of non-communicable diseases in Iran (SuRFNCD-2007). *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:26.
 33. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999;22(9):1462-70.
 34. Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care*. 2001;24(3):539-48.
 35. Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Van Haeften T, et al. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000;23(3):295-301.
 36. Gutt M, Davis CL, Spitzer SB, Llabre MM, Kumar M, Czarnecki EM, et al. Validation of the insulin sensitivity index (ISI [0,120]): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;47(3):177-84.
 37. Furugen M, Saitoh S, Ohnishi H, Akasaka H, Mitsumata K, Chiba M, et al. Matsuda-DeFronzo insulin sensitivity index is a better predictor than HOMA-IR of hypertension in Japanese: the Tanno-Sobetsu study. *J Hum Hypertens*. 2012;26(5):325-33.
 38. Andreozzi F, Gastaldelli A, Mannino GC, Sciacqua A, Succurro E, Arturi F, et al. Increased carotid intima-media thickness in the physiologic range is associated with impaired postprandial glucose metabolism, insulin resistance and beta cell dysfunction. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):277-81.
 39. Mulvey CK, McNeill AM, Girman CJ, Churchill TW, Terembula K, Ferguson JF, et al. Differential associations of oral glucose tolerance test-derived measures of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function with coronary artery calcification and microalbuminuria in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37(1):124-33.
 40. Szosland K, Lewinski A. In quest for method of insulin re-

- sistance assessment in everyday clinical practice-Insulin resistance indices. *Diabetes Metab Syndr*. 2016;10(1 Suppl 1):S120-5.
41. Radikova Z, Koska J, Huckova M, Ksinantova L, Imrich R, Vidas M, et al. Insulin sensitivity indices: a proposal of cut-off points for simple identification of insulin-resistant subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2006;114(5):249-56.
 42. Abdul-Ghani MA, Lyssenko V, Tuomi T, DeFronzo RA, Groop L. Fasting versus postload plasma glucose concentration and the risk for future type 2 diabetes: results from the Botnia Study. *Diabetes Care*. 2009;32(2):281-6.
 43. Oh TJ, Lim S, Kim KM, Moon JH, Choi SH, Cho YM, et al. One-hour postload plasma glucose concentration in people with normal glucose homeostasis predicts future diabetes mellitus: a 12-year community-based cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017;86(4):513-9.
 44. Van Cauter E, Mestrez F, Sturis J, Polonsky KS. Estimation of insulin secretion rates from C-peptide levels. Comparison of individual and standard kinetic parameters for C-peptide clearance. *Diabetes*. 1992;41(3):368-77.
 45. Utzschneider KM, Prigeon RL, Faulenbach MV, Tong J, Carr DB, Boyko EJ, et al. Oral disposition index predicts the development of future diabetes above and beyond fasting and 2-h glucose levels. *Diabetes Care*. 2009;32(2):335-41.
 46. Abdul-Ghani MA, Stern MP, Lyssenko V, Tuomi T, Groop L, DeFronzo RA. Minimal contribution of fasting hyperglycemia to the incidence of type 2 diabetes in subjects with normal 2-h plasma glucose. *Diabetes Care*. 2010;33(3):557-61.
 47. Bianchi C, Miccoli R, Trombetta M, Giorgino F, Frontoni S, Faloia E, et al. Elevated 1-hour postload plasma glucose levels identify subjects with normal glucose tolerance but impaired beta-cell function, insulin resistance, and worse cardiovascular risk profile: the GENFIEV study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(5):2100-5.
 48. Manco M, Panunzi S, Macfarlane DP, Golay A, Melander O, Konrad T, et al. One-hour plasma glucose identifies insulin resistance and beta-cell dysfunction in individuals with normal glucose tolerance: cross-sectional data from the Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular Risk (RISC) study. *Diabetes Care*. 2010;33(9):2090-7.
 49. Tfayli H, Lee SJ, Bacha F, Arslanian S. One-hour plasma glucose concentration during the OGTT: what does it tell about beta-cell function relative to insulin sensitivity in overweight/obese children? *Pediatr Diabetes*. 2011;12(6):572-9.
 50. Kim JY, Goran MI, Toledo-Corral CM, Weigensberg MJ, Choi M, Shaibi GQ. One-hour glucose during an oral glucose challenge prospectively predicts beta-cell deterioration and prediabetes in obese Hispanic youth. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1681-6.
 51. Fiorentino TV, Marini MA, Andreozzi F, Arturi F, Succurro E, Perticone M, et al. One-Hour Postload Hyperglycemia Is a Stronger Predictor of Type 2 Diabetes Than Impaired Fasting Glucose. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(10):3744-51.
 52. Alyass A, Almgren P, Akerlund M, Dushoff J, Isomaa B, Nilsson P, et al. Modelling of OGTT curve identifies 1 h plasma glucose level as a strong predictor of incident type 2 diabetes: results from two prospective cohorts. *Diabetologia*. 2015;58(1):87-97.
 53. Fiorentino TV, Andreozzi F, Mannino GC, Pedace E, Perticone M, Sciacqua A, et al. One-Hour Postload Hyperglycemia Confers Higher Risk of Hepatic Steatosis to HbA1c-Defined Prediabetic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4030-8.
 54. Orenca AJ, Daviglus ML, Dyer AR, Walsh M, Greenland P, Stamler J. One-hour postload plasma glucose and risks of fatal coronary heart disease and stroke among non-diabetic men and women: the Chicago Heart Association Detection Project in Industry (CHA) Study. *J Clin Epidemiol*. 1997;50(12):1369-76.
 55. Succurro E, Marini MA, Arturi F, Grembiale A, Lugara M, Andreozzi F, et al. Elevated one-hour post-load plasma glucose levels identifies subjects with normal glucose tolerance but early carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):245-9.
 56. Sciacqua A, Maio R, Miceli S, Pascale A, Carullo G, Grillo N, et al. Association between one-hour post-load plasma glucose levels and vascular stiffness in essential hypertension. *PLoS One*. 2012;7(9):e44470.
 57. Sciacqua A, Miceli S, Carullo G, Greco L, Succurro E, Arturi F, et al. One-hour postload plasma glucose levels and left ventricular mass in hypertensive patients. *Diabetes Care*. 2011;34(6):1406-11.
 58. Succurro E, Arturi F, Lugara M, Grembiale A, Fiorentino TV, Caruso V, et al. One-hour postload plasma glucose levels are associated with kidney dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(11):1922-7.
 59. Sosenko JM, Palmer JP, Raffin-Mervis L, Krischer JP, Cuthbertson D, Mahon J, et al. Incident dysglycemia and progression to type 1 diabetes among participants in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care*. 2009;32(9):1603-7.
 60. Elding Larsson H, Larsson C, Lernmark A. Baseline heterogeneity in glucose metabolism marks the risk for type 1 diabetes and complicates secondary prevention. *Acta Diabetol*. 2015;52(3):473-81.
 61. Sosenko JM, Palmer JP, Greenbaum CJ, Mahon J, Cowie C, Krischer JP, et al. Increasing the accuracy of oral glucose tolerance testing and extending its application to individuals with normal glucose tolerance for the prediction of type 1 diabetes: the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care*. 2007;30(1):38-42.
 62. Di Bonito P, Pacifico L, Chiesa C, Valerio G, Miraglia Del Giudice E, Maffei C, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in children and adolescents with overweight/obesity. *J Endocrinol Invest*. 2017;40(4):409-16.
 63. Shalitin S, Abrahami M, Lilos P, Phillip M. Insulin resistance and impaired glucose tolerance in obese children and adolescents referred to a tertiary-care center in Israel. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(6):571-8.
 64. Guerrero-Romero F, Violante R, Rodriguez-Moran M.

- Distribution of fasting plasma glucose and prevalence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in the Mexican paediatric population. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009;23(4):363-9.
65. Al Amiri E, Abdullatif M, Abdulle A, Al Bitar N, Afandi EZ, Parish M, et al. The prevalence, risk factors, and screening measure for prediabetes and diabetes among Emirati overweight/obese children and adolescents. *BMC Public Health.* 2015;24; 15:1298.
 66. Hagman E, Reinehr T, Kowalski J, Ekblom A, Marcus C, Holl RW. Impaired fasting glucose prevalence in two nationwide cohorts of obese children and adolescents. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(1):40-5.
 67. Fintini D, Cappa M, Brufani C, Bernardini S, Barbetti F. Prevalence of elevated 1-h plasma glucose and its associations in obese youth. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016; 116:202-4.
 68. Bacha F, Lee S, Gungor N, Arslanian SA. From pre-diabetes to type 2 diabetes in obese youth: pathophysiological characteristics along the spectrum of glucose dysregulation. *Diabetes Care.* 2010;33(10):2225-31.
 69. Libman IM, Barinas-Mitchell E, Marcovina S, Bacha F, Hannon T, Tfayli H, et al. beta-cell autoimmunity in overweight non-diabetic youth: any implications? *Pediatr Diabetes.* 2011;12(3 Pt 2):207-11.
 70. Hirschler V, Aranda C, Oneto A, Gonzalez C, Jadzinsky M. Is acanthosis nigricans a marker of insulin resistance in obese children? *Diabetes Care.* 2002;25(12):2353.
 71. Hofman PL, Regan F, Jackson WE, Jefferies C, Knight DB, Robinson EM, et al. Premature birth and later insulin resistance. *N Engl J Med.* 2004;18;351(21):2179-86.
 72. Pareek M, Bhatt D, Nielsen ML, Jogannathan R, Eriksson K, Nilsson PM, Bergman M, Olsen MH. Enhanced predictive capability of a 1-hour oral glucose tolerance test: a prospective population-based cohort study. *Diabetes Care* 2017 .dc171351 [Epub ahead of print].

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación mediante los estados vaginales básicos de la disfunción vaginal según diferentes factores de riesgo y caracterización de la microbiota lactobacilar

Perazzi, Beatriz Elizabeth^{1*}; Maldonado, Verónica²; Losada, Mirta¹; Susuki, Verónica²; Diaz Altuzarra, María del Carmen¹; Cocucci, Silvina¹; Rodriguez, Ana Paula¹; Montalvo, Eduardo¹; Ocampo, Pamela¹; Cora Eliseht, Martha²; Provenzano, Sergio²; Vay, Carlos¹; Tatti, Silvio²; Famiglietti, Angela¹.

¹Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Programa de Diagnóstico, Terapéutica y Vacunación del Tracto Genital Inferior, División Ginecología y Obstetricia, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Contacto: Prof. Dra. Beatriz Elizabeth Perazzi; Lavalleja 2726 (1824) Lanús Oeste; beatrizperazzi@gmail.com; bperazzi@ffyba.uba.ar

Resumen

Introducción: La microbiota vaginal es un complejo de microorganismos, que varía según el nivel estrogénico y factores externos que generen disfunción vaginal (DV). Aunque los lactobacilos constituyen una línea de defensa contra la infección vaginal, sus distintas especies pueden contribuir de manera diferente en dicha protección. **Objetivos:** Evaluar la DV mediante los estados vaginales básicos (EVB) y el estudio microbiológico. **Caracterizar** las especies de lactobacilos y su capacidad protectora de la DV en distintos grupos de riesgo. **Materiales y Métodos:** Estudio consecutivo y prospectivo de 658 pacientes sintomáticas y asintomáticas, clasificadas en los siguientes grupos: anticonceptivos orales (ACO), preservativo (PRE), dispositivo intrauterino (DIU), embarazadas, menopáusicas sin terapia hormonal de reemplazo, VPH positivas y control. Se les realizó toma de fondo de saco vaginal para estudio de los EVB mediante BACOVA y cultivo en agar sangre y Tioglicolato modificado para trichomonas. La identificación de las especies de lactobacilos se realizó mediante pruebas convencionales, MALDI-TOF y secuenciación del gen ADNr 16S. Se midió la producción de H₂O₂ de las especies de lactobacilos, mediante un ensayo semicuantitativo. **Método estadístico:** Test de Chi cuadrado y Fisher. Se consideró significativo $p < 0,05$. **Resultados:** Se estudiaron 448 pacientes: 18 - 24 años (n: 65), 25 - 50 años (n: 186) y mayores de 50 años (n: 118) y grupo control (n: 79) y 210 pacientes embarazadas: colonizadas por EGB (n: 37), con candidiasis (n: 25), colonizadas con EGB y con candidiasis (n: 15) y grupo control no colonizadas (n: 133). La VB fue la patología más prevalente en todos los grupos etarios. Un 45,0 % del grupo VPH de 18 - 24 años presentaron DV. En aquellas que utilizaron ACO predominó la microbiota lactobacilar: 18 - 24 años (65,2 %) y 25 - 50 años (67,6 %), al igual que las que utilizaron preservativo de 25 - 50 años (62,7 %). Un 40,7 % del grupo con DIU de 25 - 50 años presentaron DV. Un 20,2 % de las pacientes menopáusicas presentaron DV, con una prevalencia de microbiota lactobacilar de 43,4 % ($p < 0,01$). Se identificaron 78 % de aislamientos de lactobacilos: *L. crispatus* (n: 68), *L. gasseri* (n: 56) y *L. jensenii* (n: 54). Pacientes menopausicas presentaron mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de todos los grupos ($p < 0,01$). Los grupos ACO y PRE mostraron mayor prevalencia de *L. crispatus* al igual que el control respecto de las menopáusicas ($p < 0,01$). El grupo VPH mostró menor prevalencia de *L. crispatus* respecto del control ($p = 0,01$) y similar a las pacientes menopáusicas y mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de ACO y PRE ($p = 0,04$ y $0,02$ respectivamente). Las pacientes embarazadas con candidiasis y las colonizadas con EGB mostraron mayor prevalencia de *L. gasseri* (37,8 % y 40 % respectivamente) que las no colonizadas. Las pacientes embarazadas con candidiasis y colonizadas con EGB no presentaron *L. crispatus* y mostraron mayor prevalencia de *L. gasseri* (66,6 %). Un 96 % de los aislamientos de *L. crispatus* produjeron fuertemente H₂O₂, a diferencia de los de *L. gasseri* que ninguno fue productor fuerte ($p < 0,0001$). El método MALDI-TOF demostró excelente concordancia con la secuenciación del ADNr 16S. **Conclusiones:** Se observó DV en los distin-

tos grupos de riesgo, asociada a levaduras y/o VB, resaltándose el efecto protector de *L. crispatus* en ACO y preservativo y en este último con reacción inflamatoria. Contrariamente, las pacientes con VPH y con DIU mostraron una tendencia a desarrollar DV, en coincidencia con la disminución de *L. crispatus* y el aumento de *L. gasseri*. En la menopausia predominó *L. gasseri*, especie relacionada con la predisposición a DV. En las pacientes embarazadas no colonizadas predominó *L. crispatus*, mientras que en las colonizadas por EGB y/o con candidiasis predominó *L. gasseri* asociado a estos microorganismos de origen intestinal.

Palabras clave: disfunción vaginal, estados vaginales básicos, especies de lactobacilos, grupo etario, embarazo, anticoncepción, virus del papiloma humano.

Abstract

Introduction: The vaginal flora is a complex of microorganisms which varies according to the estrogenic level and external factors that generate vaginal dysfunction (VD). While lactobacilli constitute a line of defense against vaginal infection, their different species can contribute differently in such protection. **Objectives:** To evaluate the VD by the basic vaginal states (BVS) and the microbiological study, and characterize the species of lactobacilli and their protective capacity against VD, in different risk groups. **Material and methods:** Consecutive, prospective study that included 658 symptomatic and asymptomatic patients. Patients were classified in the following groups: oral contraceptives (OC), condoms (CO), intrauterine device (IUD), pregnant and menopausal patients (no hormone replacement therapy, no contraception), human papillomavirus (HPV) - positive and controls. All patients underwent clinical examination and took vaginal fornix to study BVS by BAVACO and culture on blood agar and modified thioglycolate medium for trichomonas. The species of lactobacilli were identified by conventional tests, MALDI-TOF and 16S rDNA gene sequencing. The production of H₂O₂ by different species of lactobacilli was measured by a semiquantitative test. **Statistical method:** Chi square test [2] and Fisher. $P < 0.05$ was considered significant. **Results:** The patients studied (n: 448) were 18 - 24 years old (n: 65), 25 - 50 years old (n: 186), 50 years old or older (n: 118) and a control group (n: 79). Also, 210 pregnant patients were studied: colonized by GBS (n: 37), with candidiasis (n: 25), colonized with GBS and candidiasis (n: 15) and control non-colonized group (n: 133). Bacterial vaginosis was the most prevalent pathology in all age groups. The HPV patients of the 18 - 24 age group showed VD of 45.0 %. In patients who used OC, a predominance of lactobacillar microbiota was observed (65.2 %) in the 18 - 24 age group and (67.6 %) in the 25 - 50 age group, like those who used CO of 25 - 50 years (62.7 %) with inflammatory reaction. Patients who used IUD of the 25 - 50 age group showed VD of 40.7 %. Also, 20.2 % of menopausal patients had VD and the prevalence of lactobacillar microbiota was 43.4 % ($p < 0.01$). About 78 % isolates of lactobacilli were identified: *L. crispatus* (n: 68), *L. gasseri* (n: 56) and *L. jensenii* (n: 54). Menopausal patients had higher prevalence of *L. gasseri* with respect to all groups ($p < 0.01$). The CO and OC groups showed higher prevalence of *L. crispatus* like the control with respect to menopausal patients ($p < 0.01$). The HPV group showed lower prevalence of *L. crispatus* with respect to the control ($p = 0.01$) and similar to menopausal patients and higher prevalence of *L. gasseri* with respect to OC and CO ($p = 0.04, 0.02$ respectively). Pregnant patients with candidiasis and the ones colonized by GBS showed higher prevalence of *L. gasseri* (37.8 % and 40 % respectively) compared to non-colonized. Pregnant patients with candidiasis and colonized with GBS did not present *L. crispatus* and showed higher prevalence of *L. gasseri* (66.6 %). Ninety-six percent of *L. crispatus* isolates were strong producers of H₂O₂, unlike *L. gasseri* isolates, none of which were strong producers ($p < 0.0001$). The MALDI-TOF method showed excellent agreement with 16S rDNA sequencing. **Conclusions:** VD was observed in the different risk groups associated with the presence of BV and/or yeasts, highlighting the protective effect exerted by *L. crispatus* in OC and CO and in the latter with inflammatory reaction. In contrast, patients with HPV infection and IUD showed a tendency to develop DV, coinciding with a decrease in *L. crispatus* and an increase in *L. gasseri*. Menopause patients showed predominance of *L. gasseri*, species related to the predisposition to VD. *L. crispatus* predominated in pregnant patients non-colonized, while in the GBS colonized ones and/or with candidiasis predominated *L. gasseri* associated with these intestinal-origin microorganisms.

Key words: vaginal dysfunction, basic vaginal states, *Lactobacillus* species, age group, pregnancy, contraception, human papilloma virus.

Introducción

La microbiota vaginal es un complejo sistema de microorganismos relacionados entre sí y en permanente equilibrio que varía desde el nacimiento, con un predominio de lactobacilos en la primera semana de vida, hasta la menarca, caracterizada por la presencia de microbiota intermedia correspondiente a bacterias de localización intestinal y de piel. En la pubertad, como consecuencia de la maduración estrogénica, la vagina normal contiene más de 18 especies de lactobacilos, con un franco predominio de *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* y, en menor proporción, una gran variedad de especies de bacterias aeróbicas y anaeróbicas e inclusive de levaduras [1]. Esta microbiota vuelve a alterarse en la menopausia, asemejándose a la etapa prepúber con predominio de bacilos gram negativos [2]. La falta de lactobacilos en la mucosa vaginal favorece el desarrollo de oportunistas y el desarrollo de vaginosis bacteriana y mayor riesgo de contraer infecciones de transmisión sexual como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [2].

Se ha determinado, desde hace tiempo, que las bacterias productoras de ácido láctico (LAB) son las encargadas de mantener en equilibrio la microbiota vaginal, evitando así las infecciones del tracto genitourinario. En las mujeres adultas sanas, el pH es de 4,5 y a su vez las especies predominantes de lactobacilos mantienen el pH bajo a través de su actividad de fermentación, la que protege el área contra la invasión de microorganismos indeseables [3]. La producción de ácido láctico se considera que es el principal mecanismo de protección contra las infecciones vaginales; aunque, algunas especies de lactobacilos producen también peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, existen discrepancias con respecto al efecto protector del H_2O_2 sobre el microambiente vaginal, ya que se ha podido comprobar que las diferentes especies y, más aún, cepas de la misma especie de lactobacilos difieren en la capacidad de producción del mismo [4,5].

Otro de los temas importantes para tener en cuenta de la microbiota vaginal es que se ha demostrado que es región específica, es decir que varía según la población de mujeres que se estudie, no sólo con respecto al grupo etario sino de la región donde habitan [6]. De allí radica la importancia de determinar las poblaciones de lactobacilos específicas de la Argentina.

En la menopausia existen grandes cambios en las células epiteliales como disminución del glucógeno, que podrían contribuir a la comprensión de los mecanismos generales de la colonización por microorganismos asociados a la vaginosis bacteriana (VB) [7].

El concepto clínico de disfunción vaginal (DV) abarca un número elevado de síndromes, y se ha demostrado en estudios previos la dimensión alarmante de los mismos, dado que un 68% de las mujeres asintomáticas en edad fértil mostraron indicadores indubitables de un estado anormal del contenido vaginal, revelando alteraciones generadoras de disfunción de la vagina [8].

El origen de la DV puede responder a factores etiológicos sistémicos o a factores externos, entre los que se incluyen los

procesos infecciosos y en ese contexto se debe considerar la influencia de los anticonceptivos. Se han detectado diferencias en las frecuencias de los síndromes de DV en función del tipo de anticoncepción utilizado, a saber, anticonceptivos orales combinados, implante de dispositivo intrauterino (DIU) o preservativos [8,9]. Si bien existen reportes acerca del efecto de métodos anticonceptivos sobre la microbiota, en el país hay muy pocos estudios diseñados en una comunidad medianamente uniforme que hayan investigado la influencia que ejercen cada uno de estos métodos sobre la microbiota vaginal y sobre los lactobacilos en particular [10]. Tampoco es bien conocido el impacto que ejerce el virus del papiloma humano (VPH) sobre la microbiota vaginal.

El embarazo se asocia a un gran número de infecciones del tracto genital relacionadas con complicaciones perinatales [11,12]. Por otra parte, cabe aclarar que durante el embarazo se producen cambios hormonales como el aporte de estrógeno, que influyen en la microbiota lactobacilar. Teniendo en cuenta la publicación de Perazzi *et al.* [11], quienes describieron una mayor prevalencia de candidiasis en las pacientes colonizadas con EGB, sería importante estudiar las diferentes especies de lactobacilos en dichas pacientes.

Los objetivos de este trabajo fueron: evaluar la DV mediante los estados vaginales básicos (EVB) a través de la metodología del balance del contenido vaginal (BACOVA) y el estudio microbiológico, caracterizar las especies de lactobacilos y determinar su capacidad protectora de la disfunción vaginal en los distintos grupos etarios y subgrupos de riesgo y evaluar la utilidad de diferentes metodologías en la identificación de dichas especies.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio consecutivo, prospectivo, experimental, transversal y de prevalencia, en el cual se incluyeron pacientes mayores de 18 años, con inicio de relaciones sexuales, que presentaron, o no, síntomas al momento de la consulta; atendidas en la División Ginecología del Hospital, entre octubre del 2013 y noviembre de 2016.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital y todas las pacientes dieron su consentimiento informado. La población estudiada se clasificó en los siguientes grupos:

- 1) Control: en edad fértil de 18 a 49 años no incluidas en los otros grupos
- 2) Pacientes que utilizaron anticonceptivos orales (ACO)
- 3) Pacientes que utilizaron preservativo (PRE)
- 4) Pacientes que utilizaron DIU
- 5) Pacientes con lesiones causadas por el virus del papiloma humano (VPH)
- 6) Menopáusicas sin tratamiento hormonal de reemplazo (THR), sin VPH y sin método anticonceptivo
- 7) Pacientes embarazadas colonizadas y no colonizadas por EGB y/o con candidiasis.

Los diferentes métodos anticonceptivos fueron utiliza-

dos por las pacientes por un período mayor a 6 meses.

Asimismo, los distintos grupos de riesgo se estratificaron por grupo etario para el análisis de los resultados.

Los criterios de exclusión fueron: uso de antibióticos (ATB) locales o sistémicos dentro de los 15 días previos a la consulta, malformaciones genitales, pacientes en tratamiento con corticoides o quimioterapia, sin inicio de relaciones sexuales, quienes no tengan abstinencia sexual dentro de las 48 horas previas al estudio, pacientes inmunocomprometidas con colagenopatías, vasculopatías y/o transplantadas.

A todas las pacientes se les realizó examen clínico y toma de fondo de saco vaginal para el estudio microbiológico por metodología convencional y estudio de los EVB mediante BACOVA.

El estudio microbiológico del contenido vaginal incluyó los siguientes exámenes:

1. Extendidos para coloración de Gram y May-Grunwald Giemsa prolongado.
2. Observación en fresco con 1 ml de solución fisiológica (SF).
3. Determinación de pH de la secreción vaginal.
4. Observación en fresco con 1 ml de KOH al 10 % y prueba de aminas.
5. Cultivo en medio líquido (Tioglicolato modificado) para *T. vaginalis*, con incubación de 7 días a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂ [13].
6. Cultivo en agar base Columbia con 5 % de sangre humana y en agar Man Rogosa con incubación de 48 horas, a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂, conservando la muestra en medio de Stuart.

La detección de candidiasis se realizó a través de la observación en fresco con solución fisiológica (SF) y con KOH al 10 % y por cultivo en agar Sabouraud y agar sangre.

La investigación de *T. vaginalis* se realizó a través de la observación microscópica directa con SF, la coloración de May-Grunwald Giemsa prolongado y el cultivo en tioglicolato modificado [13,14]. El diagnóstico de VB se realizó utilizando el criterio de Nugent cuando el *score* fue ≥ 7 [15] y el criterio de Amsel, es decir, la presencia de 3 o más de los siguientes criterios [16]:

- Observación de *clue-cells* en la coloración de Gram [célula cubierta con bacilos cortos gram negativos y/o alteración de la morfología celular].
- pH $\geq 4,5$.
- Prueba de aminas positiva.
- Descarga vaginal fina y homogénea.

En el caso de las pacientes asintomáticas, el diagnóstico de VB se efectuó solamente utilizando el criterio de Nugent.

El estudio del BACOVA, incluyó el análisis morfológico del contenido vaginal en función de la relación del valor numérico (VN) y la reacción inflamatoria vaginal (RIV), identificándose cinco EVB: microbiota normal (I), microbiota normal más reacción inflamatoria (II), microbiota intermedia (III), VB (IV) y vaginitis microbiana inespecífica (V) (Fotos 1 a 5) [17]. El valor numérico se determinó evaluando los diferentes mor-

fotipos en la coloración de Gram según el criterio de Nugent [15]. La cuantificación de leucocitos se evaluó mediante tinción de May-Grunwald Giemsa y se expresó como número de leucocitos por campo (400X) calculando el recuento medio de leucocitos dentro de 10 campos microscópicos no adyacentes [17].

La investigación de la portación de estreptococo grupo B (EGB) se realizó en hisopado anal e introito vaginal en la semana 35 a 37 de embarazo. Ambos hisopos se sembraron en caldo Todd Hewitt suplementado con colistina (10 µg/ml) y ácido nalidíxico (15 µg/ml). Luego de 24 horas de incubación a 37°C se realizaron subcultivos en agar cromogénico, con posterior incubación a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 48 horas. Las colonias compatibles con EGB se identificaron con las pruebas bioquímicas convencionales.

Para el aislamiento de las distintas especies de lactobacilos se utilizó el agar sangre y el agar Man Rogosa y la identificación se efectuó por medio de pruebas convencionales basadas en la fermentación de hidratos de carbono [18], mediante Espectrometría de Masa BD™ Bruker MALDI-TOF (Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz, con detector de iones por Tiempo de Vuelo), utilizando una base de datos que incluyó más de 90 especies de lactobacilos, considerando un *score* $\geq 1,7$ para nivel de especie [19], a través de secuenciación del gen ADNr 16S (método de referencia) [20].

Se midió la producción de H₂O₂ por parte de las diferentes especies de lactobacilos, mediante un ensayo semicuantitativo (Merckquant Peroxide Test), expresándose los resultados en los siguientes rangos: negativo, 1 - 3, 3 - 10 y 10 - 30 mg/l de H₂O₂ [21].

Para comparar las prevalencias de los EVB y de las especies de lactobacilos en los distintos grupos etarios y subgrupos de riesgo se utilizó el test de Chi cuadrado (χ^2) y el test de Fisher.

Foto 1: EVB I.- MICROBIOTA NORMAL (MN): Lactobacilos: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.

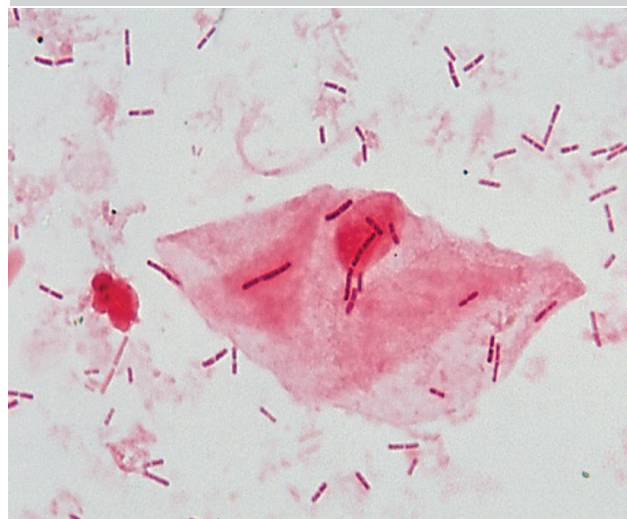


Foto 2. EVB II.-MICROBIOTA NORMALCON REACCIÓN INFLAMATORIA (MN+RIV): Levaduras con pseudohifas: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.

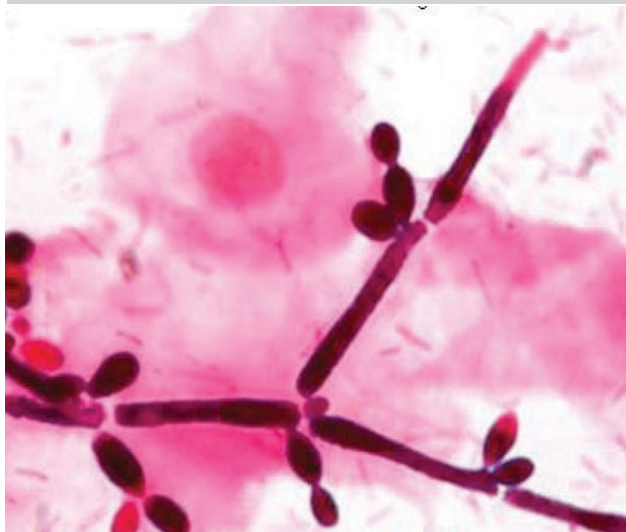


Foto 3. EVB III.-MICROBIOTA INTERMEDIA (MI): Lactobacilos y morfotipos compatibles con anaerobios: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.

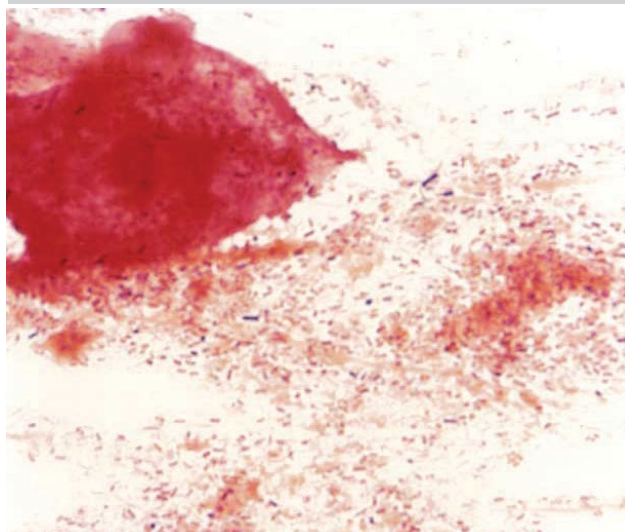


Foto 4. EVB IV.-VAGINOSIS BACTERIANA (VB): Morfotipos compatibles con anaerobios: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.

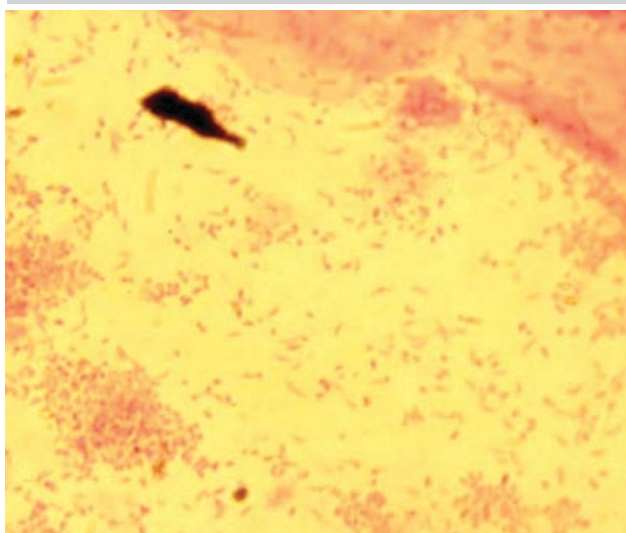
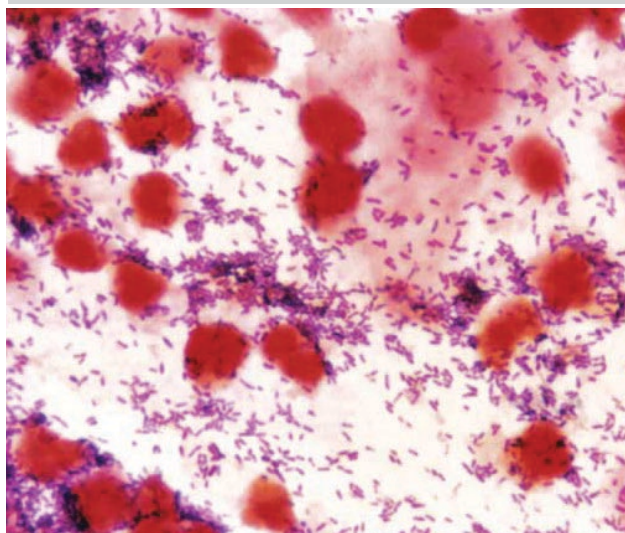


Foto 5. EVB V.-VAGINITIS MICROBIANA INESPECIFICA (VMI): Morfotipos bacterianos extraños: corineformes: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.



Resultados

Se estudiaron 448 pacientes no embarazadas, quienes se dividieron en 3 grupos etarios, de 18 a 24 años ($n=65$), de 25 a 50 años ($n=186$) y mayores a 50 años ($n=118$) y en un grupo control ($n=79$). En los 3 grupos etarios se observó un predominio de pacientes asintomáticas con prevalencias para los grupos de 18 a 24 años, 25 a 50 años y mayores de 50 años de 72,3 %, 69,9 % y 86,4 %, respectivamente. También se estudiaron 210 mujeres embarazadas divididas en tres grupos, colonizadas por EGB ($n=37$), con candidiasis ($n=25$), colonizadas con EGB y con candidiasis ($n=15$) y en un grupo control no colonizadas ($n=133$).

La distribución de los EVB en cada grupo etario y en el control, correspondientes a las pacientes no embarazadas,

se observa en la tabla I. Las prevalencias de EVB de desbalance del contenido vaginal (III, IV y V) (DCV) en el grupo de 18 a 24 años, de 25 a 50 años y mayores de 50 años fueron similares a las prevalencias de EVB con microbiota normal (I y II) respecto del control, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0,20$; $0,98$ y $0,08$, respectivamente).

La distribución de los patógenos (levaduras, VB y trichomonas) según los EVB en cada grupo etario y en el control se observa en la tabla II. La VB se asoció exclusivamente a los EVB IV y V en todos los grupos etarios y en el control. Las levaduras se asociaron principalmente al EVB I en todos los grupos etarios y en el control y en menor medida a los EVB II al V, en los grupos de 18 a 24 años y de 25 a 50 años.

Tabla I. Distribución de los estados vaginales básicos (EVB) según cada grupo etario y en el control

GRUPO DE ESTUDIO	18-24 años (n=65)		25-50 años (n=186)		>50 años (n=118)		Control (n=79)	
	n	%	N	%	N	%	n	%
I	27,0	41,6	79,0	42,5	72,0	61,0	41,0	51,9
II	8,0	12,3	45,0	24,2	20,0	16,9	11,0	13,9
III	3,0	4,6	6,0	3,2	2,0	1,7	5,0	6,3
IV	13,0	20,0	29,0	15,6	14,0	11,9	14,0	17,7
V	14,0	21,5	27,0	14,5	10,0	8,5	8,0	10,2
Total	65,0	100	186	100	118	100	79	100

Tanto el grupo de 18 a 24 años como los grupos de 25 a 50 y mayor de 50 años presentaron mayores prevalencias de VB (41,5 %; 25,8 % y 19,5 %) que de levaduras (18,4 %; 14,0 % y 7,6 %), respectivamente, resultando estas diferencias estadísticamente significativas para todos los grupos etarios ($p = 0,01$). La distribución de los patógenos (levaduras, VB y trichomonas) según BACOVA y cultivo en cada grupo etario y en el control se observa en la tabla III.

Un 45,0 % de las pacientes con VPH del grupo de 18 a 24 años, presentaron algún grado de desbalance del contenido vaginal. Sin embargo, ninguno de los grupos etarios de pacientes con VPH, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los EVB de desbalance y los EVB con microbiota normal al comparar con el grupo control ($p = 0,55$; $p = 0,65$; $p = 0,21$, respectivamente) (Tabla IV).

Al analizar la influencia de los ACO se observó un predominio de microbiota lactobacilar (65,2 % en el grupo de 18 a 24 años y 67,6 % en el grupo de 25 a 50 años), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los EVB con microbiota lactobacilar y los EVB de desbalance,

al comparar con el grupo control ($p = 0,81$ y $0,94$, respectivamente) (Tabla V).

Las pacientes que utilizaron PRE mostraron prevalencias de EVB de desbalance del contenido vaginal en el grupo de 18 a 24 años de 61,9 % y en el de 25 a 50 años de 38,4 %, no mostrando diferencias significativas entre los EVB de desbalance y los EVB con microbiota lactobacilar en ambos grupos ($p = 0,06$ y $0,81$, respectivamente), al comparar con el grupo control (Tabla VI). Las pacientes que utilizaron este método se asociaron a EVB con reacción inflamatoria en 41,7 % y 40,4 % en los grupos de 18-24 años y 25-50 años respectivamente.

Las pacientes del grupo de 25 a 50 años que utilizaron DIU mostraron prevalencias de EVB de desbalance del contenido vaginal de 40,7 %. Sin embargo, estas pacientes no mostraron diferencias significativas entre los EVB de desbalance y los EVB con microbiota normal al comparar con el grupo control ($p = 0,74$) (Tabla VII).

Las pacientes menopáusicas que no utilizaron ningún método anticonceptivo, ni presentaban VPH, ni recibían THR

Tabla II. Distribución de levaduras, vaginosis bacteriana y trichomonas según los estados vaginales básicos (EVB) en cada grupo etario y en el control.

EVBS	LEVADURAS								VAGINOSIS BACTERIANA								TRICHOMONAS							
	18-24 años (n=65)		25-50 años (n=186)		>50 años (n=118)		Control (n=79)		18-24 años (n=65)		25-50 años (n=186)		>50 años (n=118)		Control (n=79)		18-24 años (n=65)		25-50 años (n=186)		>50 años (n=118)		Control (n=79)	
	N	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	5	7,7	7	3,8	7	5,9	8	10,1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,6	0	0	1	0,9	0	0
II	3	4,6	5	2,7	2	1,7	3	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	2	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,3	
IV	1	1,5	4	2,1	0	0	3	3,8	13	20,0	28	15,1	15	12,7	15	19,0	1	1,6	0	0	0	0	0	0
V	3	4,6	8	4,3	0	0	3	3,8	14	21,5	20	10,7	8	6,8	7	8,8	2	3,1	1	0,5	0	0	0	0
Total	12	18,4	26	14,0	9	7,6	17	21,5	27	41,5	48	25,8	23	19,5	22	27,8	4	6,3	1	0,5	1	0,9	1	1,3

Tabla III. Prevalencia de levaduras, vaginosis bacteriana y trichomonas según BACOVA y cultivo en cada grupo etario y en el control.

PATÓGENO	18-24 años (n=65)				25-50 años (n=186)				>50 años (n=118)				Control (n=79)			
	BACOVA		Cultivo		BACOVA		Cultivo		BACOVA		Cultivo		BACOVA		Cultivo	
	n	%	N	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Levaduras	12	18,4	17	26,1	26	14,0	35	18,8	9	7,6	9	7,6	17	21,5	19	24,0
VB	27	41,5	27	41,5	48	25,8	48	25,8	23	19,5	23	19,5	22	27,8	22	27,8
Trichomonas	4	6,1	4	6,1	1	0,5	2	1,1	1	0,8	1	0,8	1	1,3	2	2,5

► ^aVB: vaginosis bacteriana

(n = 99), presentaron estados de desbalance del contenido vaginal en 20,2 %, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los EVB de desbalance y los EVB con microbiota normal al comparar con el control (p = 0,05) [Tabla VIII]. La prevalencia de microbiota lactobacilar en este grupo fue de 43,4 %, la que resultó estadísticamente significativa respecto del control (p = 0,01) [Tabla IX].

Se identificaron 195/250 (78 %) de aislamientos de lactobacilos predominando *L. crispatus* (n = 68), *L. gasseri* (n = 56) y *L. jensenii* (n = 54) en toda la población de pacientes no embarazadas. En la Foto 6 se visualiza la morfología de *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri* en la coloración de Gram. Las pacientes menopáusicas presentaron mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de todos los grupos y del control (p < 0,01). Los grupos ACO y PRE mostraron mayor prevalencia de *L. crispatus* al igual que el control respecto de las menopáusicas (p < 0,01). El grupo VPH mostró menor prevalencia de *L. crispatus* respecto del control (p = 0,01) y similar a las pacientes menopáusicas y mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de ACO y PRE (p= 0,04; 0,02 respectivamente) [Tabla X].

Por otra parte, en todas las pacientes embarazadas se identificaron 210 especies de lactobacilos, predominando *L. gasseri* (n=61), *L. crispatus* (n=59) y *L. jensenii* (n=56). La totalidad de las pacientes embarazadas presentaron

menor prevalencia de *L. crispatus* (28,1 %) en comparación al grupo control de pacientes no embarazadas (55,0 %), en forma estadísticamente significativa (p < 0,01). En concordancia con esta disminución, se observó una tendencia a presentar una mayor prevalencia de *L. jensenii* (26,7 %) en comparación al grupo control de pacientes no embarazadas (15,0 %), aunque no resultó estadísticamente significativo (p=0,08). La prevalencia de *L. gasseri* fue similar entre las pacientes embarazadas y el grupo control (29,0 % y 25,0 %, respectivamente) (p = 0,74).

Las pacientes embarazadas con candidiasis y las colonizadas con EGB mostraron mayor prevalencia de *L. gasseri* (37,8 % y 40 %, respectivamente) en comparación al grupo control de pacientes embarazadas no colonizadas (20,3 %), en forma estadísticamente significativa (p = 0,03). Las pacientes embarazadas con candidiasis y colonizadas con EGB no presentaron *L. crispatus* y mostraron mayor prevalencia de *L. gasseri* (66,6 %) en comparación al grupo control no colonizadas (29,3 % y 20,3 % respectivamente), encontrándose diferencias estadísticamente significativas (p= 0,01 y < 0,01, respectivamente). La totalidad de las pacientes embarazadas colonizadas mostraron una mayor prevalencia de *L. gasseri* (44,1 %) en comparación al grupo control no colonizadas (20,3 %) (p < 0,01). La totalidad de las pacientes embarazadas colonizadas mostraron una ten-

Tabla IV. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes con virus del papiloma humano (VPH) según cada grupo etario.

GRUPO DE ESTUDIO	18 – 24 años (n=20)		25 – 50 años (n=45)		> 50 años (n=15)		Control (n=79)	
	N	%	n	%	N	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IV – V)	9	45,0	13	28,9	3	20,0	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	11	55,0	32	71,1	12	80,0	52	65,8
Total	20	100	45	100	15	100	79	100

Tabla V. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes que utilizan anticonceptivos orales (ACO) según cada grupo etario.

GRUPO DE ESTUDIO	18 – 24 años (n=23)		25 – 50 años (n=38)		Control (n=79)	
	n	%	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	8	34,8	12	32,4	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	15	65,2	26	67,6	52	65,8
Total	23	100	38	100	79	100

dencia a presentar menor prevalencia de *L. jensenii* (19,5 %) en comparación al grupo control no colonizadas (30,8 %) ($p = 0,05$). Asimismo, la totalidad de las pacientes embarazadas colonizadas también mostraron una menor prevalencia de *L. iners* (3,9 %) en comparación al grupo control no colonizadas (14,2 %) ($p = 0,01$) [Tabla XI].

La producción de H_2O_2 por parte de las diferentes especies de lactobacilos estudiadas se muestra en la tabla XII. Un 96 % de los aislamientos de *L. crispatus* produjeron fuertemente H_2O_2 ($> 3 \text{ mg/l}$), a diferencia de los aislamientos de *L. gasseri* que ninguno fue productor fuerte, un 49 % lo hizo débilmente y un 51 % resultó negativo ($p < 0,0001$). Asimismo, un 61% de los aislamientos de *L. jensenii* produjeron fuertemente H_2O_2 , un 27 % lo hizo débilmente y el 12 % restante fue negativo, lo que también resultó diferente en forma significativa respecto de los aislamientos de *L. gasseri* ($p < 0,0001$).

En la especie *L. gasseri*, la mayoría de los azúcares presentan diversos tipos bioquímicos, con lo cual no pudo ser diferenciada esta especie de *L. crispatus* y *L. jensenii* y en particular dependiendo del resultado de la lactosa. Además, varios aislamientos fueron identificados como *L. gasseri* por fermentar la rafinosa y sin embargo resultaron *L. crispatus* por medio de MALDI- TOF y secuenciación del DNAr 16S. Asimismo, varios de los aislamientos estudiados no se pudieron diferenciar entre *L. gasseri* y *L. jensenii* a través de la fermentación de azúcares, siendo entonces ambas especies posibles, aunque por MALDI- TOF y secuenciación del

ADNr 16S resultaron ser *L. jensenii*. La metodología MALDI-TOF MS (espectrometría de masa) MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Germany) mostró una concordancia del 100 % con la secuenciación del gen ADNr 16S para todas las especies de lactobacilos estudiadas [Tabla XIII].

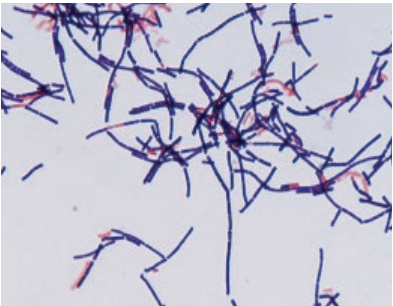
Discusión

Se observaron variaciones en la microbiota vaginal según el grupo etario, siendo los patógenos más prevalentes la VB y la candidiasis. Cabe destacar la mayor prevalencia de VB respecto de candidiasis en todos los grupos etarios, tal como lo describe la literatura [22]. En lo que respecta a la candidiasis, predominó en el EVB I en todas las edades, sugiriendo su rol como colonizante. Sin embargo, resaltamos que las pacientes en que se asoció a EVB con RIV (II y V) correspondieron a la edad fértil, al igual que lo refiere Tibaldi et al [23].

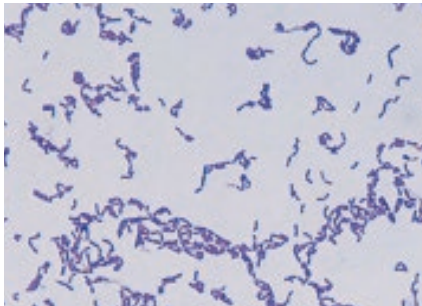
Un 45,0 % de las pacientes con VPH correspondientes al grupo etario de 18 a 24 años presentaron algún grado de DV, que si bien no se diferenció significativamente del grupo control esto podría deberse al tamaño muestral. Estos resultados coinciden con lo que refiere la literatura, al describir prevalencias de entre 25 - 60 % aproximadamente de VB en pacientes con VPH [24,25], demostrando una asociación positiva entre ambos patógenos, tal como lo refiere Gillet et al. [25].

En las pacientes con ACO en edad fértil, se observó el pre-

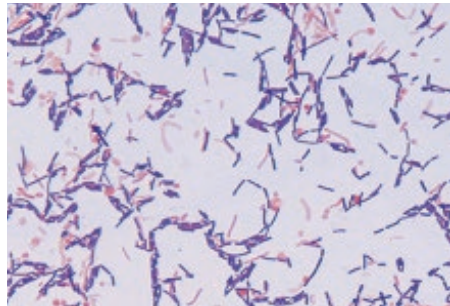
Foto 6. Morfología de Lactobacillus spp.: observación en la coloración de Gram (1000X)



► L. crispatus



► L. jensenii



► L. gasseri

Tabla VI. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVV) de desbalance del contenido vaginal en pacientes que utilizan anticonceptivos orales (ACO) según cada grupo etario.

GRUPO DE ESTUDIO	18 – 24 años (n=21)		25 – 50 años (n=73)		Control (n=79)	
	n	%	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	13	61,9	28	38,4	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	8	38,1	45	61,6	52	65,8
Total	21	100	73	100	79	100

dominio de la microbiota lactobacilar, al igual que lo descrito en la literatura [9,26]. Esto podría ser explicado a partir de la hipótesis más aceptada, la que afirma que el equilibrio de la microbiota del contenido vaginal de la mujer en edad fértil está prioritariamente establecido por mecanismos hormonales, principalmente por el “efecto estrógeno”, que tiende a disminuir la frecuencia de VB, tal como lo refieren Vodstrcil *et al.* [10] y Tibaldi *et al.* [23].

En las pacientes que utilizaron PRE, tanto de los grupos de 18 - 24 años como de 25 - 50 años presentaron una tendencia a EVB con RIV al utilizar este método. Estos resultados coinciden con la literatura que hace referencia a la presencia de dermatitis vaginales, vulvovaginitis alérgicas e irritativas y estados inflamatorios asociados al uso de PRE, ya sea por la influencia del látex o por los espermicidas (nonoxinol-9) [27,28].

Un 40,7 % de las pacientes del grupo de 25 a 50 años que utilizaron DIU presentaron algún grado de DV, que si bien no se diferenció significativamente del control esto podría deberse al tamaño muestral. Resultados similares fueron descritos por Gupta *et al.* [9], quienes refirieron que los métodos de barrera alteran el ecosistema vaginal por representar un cuerpo extraño con permanencia física por largos tiempo. Madden *et al.* [29] demostraron que la incidencia de VB fue superior en las usuarias de DIU con relación a otros métodos. Las pacientes menopáusicas que no utilizaron método anticonceptivo, ni presentaban VPH, ni recibían THR presentaron estados de DV de 20,2 %, similar al grupo control. Estos

resultados correlacionan con un elevado porcentaje de microbiota lactobacilar (43,4 %), en coincidencia con lo referido por Pabich *et al.* [30].

Las especies de lactobacilos predominantes en toda la población estudiada fueron *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*, tal como lo describe la literatura que refiere que, a pesar de existir algunas diferencias según las poblaciones estudiadas, estas tres especies representan las más frecuentes en la mayoría de las mujeres provenientes de los diferentes países del mundo [4,6,20]. Sin embargo, cabe aclarar que los resultados obtenidos dependen de técnicas sesgadas como el cultivo, dado que su limitada capacidad puede ser el resultado de la combinación óptima de nutrientes, temperaturas de crecimiento, niveles de oxígeno o, potencialmente la necesidad de co-cultivar con socios microbianos clave [4].

El grupo VPH presentó menor prevalencia de *L. crispatus* respecto del control y mayor de *L. gasseri*, respecto de ACO y PRE, en coincidencia con lo descrito por Gao *et al.* [24] y por Dareng *et al.* [31]. Estos resultados se corresponden con los descritos por Clarke *et al.* [32], quienes relataron que la elevación del pH se asociaba con un mayor riesgo de infección por VPH, dado que se observó que *L. crispatus* es capaz de acidificar el medio vaginal a pH menor de 4,0, mientras que otros como *L. gasseri* alcanzan un pH mas elevado que oscila entre 4,4- 5,0 [1,6].

Los grupos ACO y PRE mostraron mayor prevalencia de *L. crispatus* al igual que el control respecto de las pacientes

Tabla VII. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVV) de desbalance del contenido vaginal en pacientes con dispositivo intrauterino (DIU) según cada grupo etario.

GRUPO DE ESTUDIO	25 – 50 años (n=27)		Control (n=79)	
	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	11	40,7	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	16	59,3	52	65,8
Total	27	100	79	100

Tabla VIII. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes menopáusicas.

GRUPO DE ESTUDIO	> 50 años (n=99)		Control (n=79)	
	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	20	20,2	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	79	79,8	52	65,8
Total	99	100	79	100

menopáusicas, en coincidencia con estudios que evaluaron la influencia del ciclo menstrual sobre la microbiota, sugiriendo que los niveles de estradiol promueven el desarrollo de *L. crispatus* [26]. Asimismo, la asociación entre el uso de preservativo y *L. crispatus* también fue descrita por Ma *et al.* [33].

Las pacientes menopáusicas presentaron mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de todos los grupos al igual que lo descrito por Brotman *et al* [34]. Sin embargo, la presencia de esta especie no brindaría un rol protector, teniendo en cuenta que ningún aislamiento de esta especie produjo fuertemente H₂O₂. Resultados similares fueron descriptos por diversos autores, tales como Song *et al.* [5], quienes refirieron que sólo un 40% de las cepas de *L. gasseri* fueron fuertemente productoras de H₂O₂. Además, el escaso rol protector de *L. gasseri* se asocia también con su menor capacidad de disminuir el pH vaginal [6] y, por lo tanto, con una mayor predisposición a estados de vaginosis bacteriana [1,35]. A diferencia de *L. gasseri*, el 96 % y el 61 % de los aislamientos de *L. crispatus* y *L. jensenii* respectivamente, produjeron fuertemente H₂O₂, lo que indicaría el rol protector de estas especies. Resultados similares también fueron descriptos por Song *et al.* [5] y Pendharkar *et al* [36], quienes refirieron que la mayoría (> 85 %) de las cepas de *L. crispatus* y *L. jensenii* producen fuertemente H₂O₂.

En las pacientes embarazadas las especies más prevalentes fueron *L. crispatus* y *L. gasseri* seguido de *L. jensenii*,

al igual que lo describieron Petricevic *et al.* [2] y El Aila *et al* [37]. En la literatura no existen reportes que describan las especies de lactobacilos prevalentes en el embarazo según estén o no colonizadas por EGB y/o con candidiasis. En este trabajo se detectó que las pacientes embarazadas colonizadas con EGB y/o con candidiasis presentaron mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de las no colonizadas y que en el caso particular de las pacientes colonizadas por EGB y con candidiasis, no presentaron *L. crispatus* a diferencia de las no colonizadas en quienes esta especie resultó ser una de las predominantes. Asimismo, la totalidad de las pacientes embarazadas colonizadas mostraron una tendencia a presentar menor prevalencia de *L. jensenii*.

Estos hallazgos podrían deberse a que, en las pacientes colonizadas tanto por EGB como con candidiasis, dichos microorganismos provendrían del tracto intestinal y probablemente las especies de lactobacilos que los acompañan tengan el mismo origen. De esta forma se explicaría la asociación de ellos con *L. gasseri*, una especie con escaso rol protector, en lugar de *L. crispatus* y *L. jensenii* que son las especies predominantes y protectoras del contenido vaginal. En este sentido, el escaso rol protector de *L. gasseri* se relacionaría con una mayor predisposición a la adquisición de distintas infecciones vaginales tales como vaginosis bacteriana e infecciones de transmisión sexual, que se relacionarían con complicaciones perinatológicas.

La fermentación de los hidratos de carbono constituye

Tabla IX. Frecuencia de microbiota lactobacilar en pacientes menopáusicas.

GRUPO DE ESTUDIO	> 50 años (n=99)		Control (n=79)	
	n	%	n	%
Microbiota no lactobacilar	56	57,6	27	34,2
Microbiota lactobacilar	43	43,4	52	65,8
Total	99	100	79	100

Tabla X. Distribución de las especies de *Lactobacillus* en los distintos grupos de riesgo de las pacientes no embarazadas.

GRUPO DE ESTUDIO						
Especies	Preservativo (n=44)	ACO ^a (n=32)	VPH ^b (n=36)	DIU ^c (n=10)	Menopáusica (n=33)	Control (n=40)
<i>L. crispatus</i> (n=68)	19	12	9	2	4	22
<i>L. gasseri</i> (n=56)	5	4	12	3	22	10
<i>L. jensenii</i> (n=54)	12	14	11	5	6	6
<i>L. iners</i> (n=9)	5	1	2	0	0	1
<i>L. salivarius</i> (n=3)	1	1	0	0	1	0
<i>L. vaginalis</i> (n=3)	0	0	2	0	0	1
<i>L. paracasei</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0
<i>L. rhamnosus</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0
Total (n=195)	44	32	36	10	33	40

► a ACO: Anticonceptivo oral; b VPH: Virus del Papiloma humano; c DIU: Dispositivo intrauterino

una metodología muy laboriosa y que no mostró utilidad en la diferenciación bioquímica de las principales especies del contenido vaginal (*L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri*).

El método MALDI-TOF MS (espectrometría de masa) demostró excelente concordancia con la secuenciación de ADNr 16S (método de referencia), para todas las especies

de lactobacilos estudiadas tal como lo describieron Anderson *et al.* [38]. Por lo tanto, este estudio permitió demostrar que esta metodología resultó ser una herramienta confiable y rápida que puede ser implementada en la práctica clínica para caracterizar las especies de lactobacilos vaginales.

En conclusión, se observó DV en los distintos grupos eta-

Tabla XI. Distribución de las especies de *Lactobacillus* de pacientes embarazadas según la colonización.

Especies	Candida spp (n=37)	EGB ^a (n=25)	Candida spp + EGB (n=15)	CONTROL (no colonizada) (n=133)
<i>L. gasseri</i> (n=61)	14	10	10	27
<i>L. crispatus</i> (n=59)	14	6	0	39
<i>L. jensenii</i> (n=56)	7	6	2	41
<i>L. iners</i> (n=22)	0	2	1	19
<i>L. johnsonii</i> (n=2)	0	0	1	1
<i>L. vaginalis</i> (n=5)	1	1	1	2
<i>L. paracasei</i> (n=1)	0	0	0	1
<i>L. acidophilus</i> (n=1)	0	0	0	1
<i>L. mucosae</i> (n=2)	0	0	0	2
<i>L. murinus</i> (n=1)	1	0	0	0
Total (n=210)	37	25	15	133

► EGB: Estreptococo grupo B

Tabla XII. Producción de H₂O₂ por las diferentes especies de *Lactobacillus*.

Especies	Nº de especies que producen la siguiente cantidad de H ₂ O ₂ (mg/l)			
	negativa	1-3	3-10	10-30
<i>L. crispatus</i> (n=127)	0	5	42	80
<i>L. gasseri</i> (n=117)	60	57	0	0
<i>L. jensenii</i> (n=110)	13	30	67	0
<i>L. iners</i> (n=31)	0	16	15	0
<i>L. johnsonii</i> (n=2)	0	0	2	0
<i>L. vaginalis</i> (n=5)	1	1	2	3
<i>L. salivarius</i> (n=3)	0	0	3	0
<i>L. paracasei</i> (n=1)	0	1	0	0
<i>L. rhamnosus</i> (n=1)	0	0	1	0
<i>L. acidophilus</i> (n=1)	0	0	1	0
<i>L. mucosae</i> (n=2)	0	1	1	0
<i>L. murinus</i> (n=1)	0	1	0	0
Total (n=401)	74	112	134	83

rios y en sus subgrupos de riesgo, asociada a la presencia de levaduras y/o VB, siendo la VB el patógeno más prevalente en todos los grupos etarios. Se resalta el efecto protector ejercido por *L. crispatus* en ACO y PRE y en este último con RIV. Contrariamente las pacientes con infección por VPH y con DIU mostraron una tendencia a desarrollar DV, en coincidencia con la disminución de *L. crispatus* y el aumento de *L. gasseri*. En la menopausia predominó *L. gasseri*, especie relacionada con la predisposición a la DV. En las pacientes embarazadas no colonizadas predominó *L. crispatus* y *L. jensenii* (especies protectoras), mientras que en las colonizadas por EGB y/o con candidiasis predominó *L. gasseri* (especie con escaso rol protector), asociada a estos microorganismos de origen intestinal. La espectrometría de masa resultó ser una metodología confiable y rápida que puede ser implementada en la práctica clínica para caracterizar las especies de lactobacilos vaginales.

Referencias bibliográficas

- Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosch DW, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome* 2013;1:29.
- Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Kronendorfer I, Janitschek C, Kneifel W, et al. Characterisation of the oral, vaginal and rectal *Lactobacillus* flora in healthy preg-

- nant and postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 160:93–9.
- Nam H, Whang K, Lee Y. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy. *J Microbiol* 2007; 45:515-20.
- Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011;118:533-49.
- Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Liu CX, Kato H, Watanabe K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol* 1999;37:3062-4.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4680-7.
- Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P, et al. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J Clin Microbiol* 2002;40:2147–52.
- Fosch S, Yones C, Trossero M, Grosso O. The influence of different contraceptive methods on vaginal microbiota: Clinical study. *Health* 2013;5:19-24
- Gupta K, Hillier SL, Hooton TM, Roberts PL, Stamm WE. Effects of contraceptive method on the vaginal microbial flora: a prospective evaluation. *J. Infect. Dis* 2000;181:595–601.
- Vodstrcil LA, Hocking JS, Law M, Walker S, Tabrizi SN,

Tabla XIII. Identificación de las especies de *Lactobacillus* mediante metodología de espectrometría de masa MALDI-TOF MS y ADNr 16S.

ESPECIES	MALDI-TOF-MS	ADNr 16S	Concordancia [%]
<i>L. crispatus</i>	92	92	100
<i>L. gasseri</i>	95	95	100
<i>L. jensenii</i>	89	89	100
<i>L. iners</i>	32	31	100
<i>L. salivarius</i>	3	3	100
<i>L. vaginalis</i>	8	8	100
<i>L. johnsonii</i>	2	2	100
<i>L. paracasei</i>	2	2	100
<i>L. mucosae</i>	2	2	100
<i>L. murinus</i>	1	1	100
<i>L. rhamnosus</i>	1	1	100
<i>L. acidophilus</i>	1	1	100
TOTAL	328	328	100

Fairley CK, et al. Hormonal contraception is associated with a reduced risk of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. PLoS One 2013;8:e73055.

11. Perazzi B, Coppolillo E, Losada M, Cora Eliseht M, Malamud de Rudavega H, de Torres R, et al. Estudio de la microbiota vaginal en pacientes embarazadas portadoras de estreptococo grupo B. Revista de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Buenos Aires 2008;205:12-19.
12. Subtil D, Denoit V, Le Gouëff F, Husson MO, Trivier D, Puech F. The role of bacterial vaginosis in preterm labor and preterm birth: a case-control study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002;10:41-6.
13. Poch F, Levin D, Levin S, Dan M. Modified thioglycolate médium: a simple and reliable means for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1996;34:2630-1.
14. Perazzi BE, Menghi CI, Coppolillo EF, Gatta C, Eliseth MC, de Torres RA, et al. Prevalence and comparison of diagnostic methods for *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Argentina. Korean J Parasitol 2010;1:61-5.
15. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991;29:279-301.
16. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D,

Holmes KK. Nonspecific vaginitis: Diagnosis criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med 1983;74:14-22.

17. De Torres RA, editor. 2012. Proyecto BACOVA, Programa PROSAR, Manual de Procedimientos BACOVA. Fundación Bioquímica Argentina. [On-line] <http://www.fba.org.ar/programas/prosar/bacova.html>. Consultado el 06 de junio de 2016.
18. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carrol KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology. 11th edition. Washington DC, ASM Press, 2015.
19. Karas M, Krger R. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. Chemical Reviews 2003;03:427440.
20. Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, SO JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries on 16S rRNA gene sequences. J Appl Microbiol 2002;92:451-9.
21. Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, et al. Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm Barth and relation with outcome. J Clin Microbiol 2004;42:713-17.
22. Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Aaspõllu A, Väin E, et al. Characterization of the vaginal micro- and mycobioime in asymptomatic reproductive-age Estonian women. PLoS One 2013;8:e54379.
23. Tibaldi C, Cappello N, Latino MA, Masuelli G, Marini S, Benedetto C. Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. Clin Microbiol Infect 2009;15:670-9.
24. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. BMC Infect Dis 2013;13:271.
25. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. BMC Infect Dis 2011;11:10.
26. van de Wijgert JH, Verwijs MC, Turner AN, Morrison CS. Hormonal contraception decreases bacterial vaginosis, but oral contraception may increase candidiasis: implications for HIV transmission. AIDS 2013;27:2141-53.
27. Moraes PS, Taketomi EA. Allergic vulvovaginitis. Ann Allergy Asthma Immunol 2000;85:253-65.
28. Schreiber CA, Meyn LA, Creinin MD, Barnhart KT, Hillier SL. Effects of long-term use of nonoxynol-9 on vaginal flora. Obstet Gynecol. 2006;107:136-43
29. Madden T, Grentzer JM, Secura GM, Allsworth JE, Peipert JF. Risk of bacterial vaginosis in users of the Intrauterine device: a longitudinal study. Sex Transm Dis 2012;39:217-22
30. Pabich WL, Fihn SD, Stamm WE, Scholes D, Boyko EJ,

- Gupta K. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. *J Infect Dis* 2003;188:1054-8.
31. Dareng EO, Ma B, Famooto AO, Akarolo-Anthony SN, Offiong RA, Olaniyan O, Dakum PS, *et al.* Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiol Infect* 2016;144:123-37
 32. Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, *et al.* A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis* 2012;12:33.
 33. Ma L, Lv Z, Su J, Wang J, Yan D, Wei J, Pei S. Consistent condom use increases the colonization of *Lactobacillus crispatus* in the vagina. *PLoS One* 2013;8:e70716.
 34. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Fadrosh D, Chang K, Silver MI, *et al.* Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause* 2014;21:450-8.
 35. Chernes TL, Hillier SL, Meyn LA, Busch JL, Krohn MA. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 2008;35:78-3.
 36. Pendharkar S, Magopane T, Larsson PG, de Bruyn G, Gray GE, Hammarström L *et al.* Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infectious diseases* 2013;13:43
 37. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Saerens B, Santiago GL, *et al.* Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microfloramicroflora. *BMC Infect Dis* 2009;14:67.
 38. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, Clad A, Karygianni L, Hellwig E, *et al.* Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol* 2014;14:312.

CURSOS ABA

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

CICLO LECTIVO 2018

PROGRAMA DE EDUCACIÓN CONTINUA

Informes e inscripción

Secretaría de la Asociación Bioquímica Argentina

Venezuela 1823 Piso 3 [1096] – Buenos Aires -Argentina

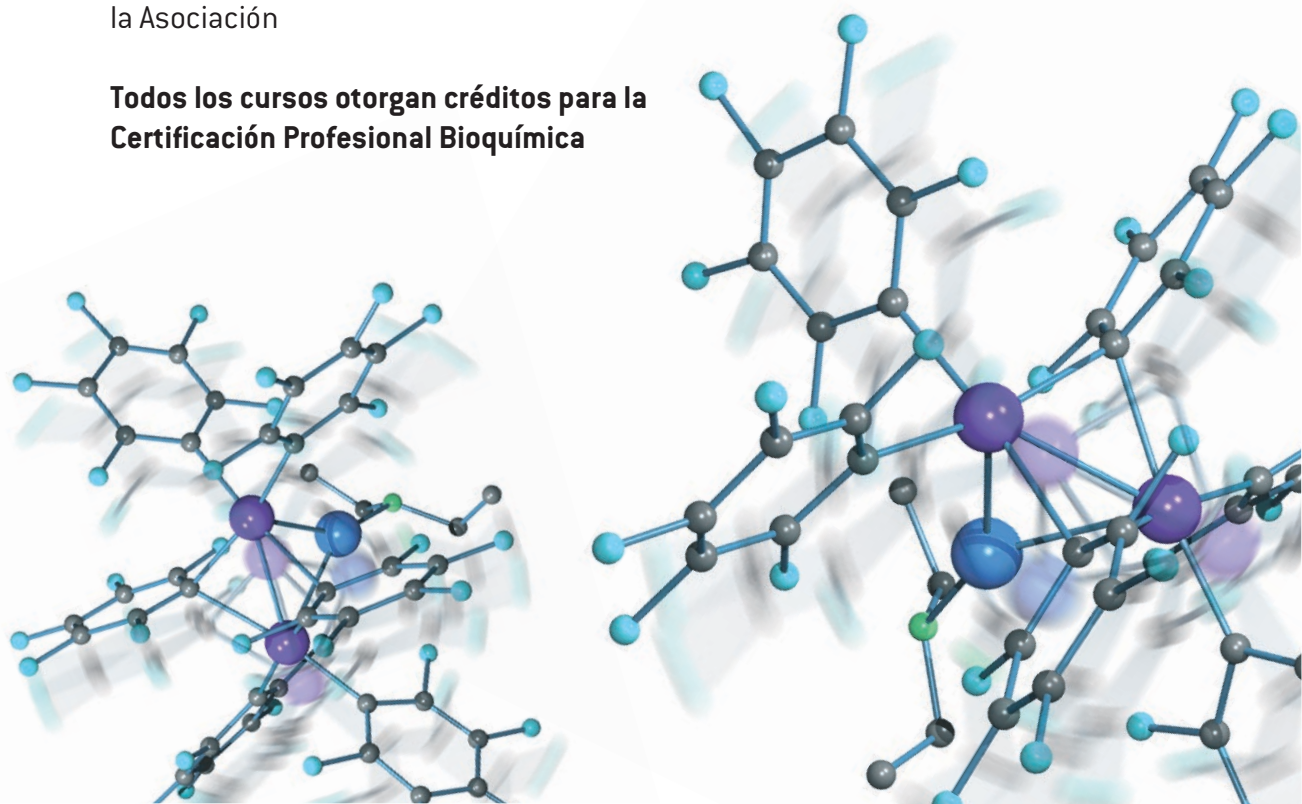
Tel: [011] 4381-2907 Telefax: [011] 4384-7415 - De 15 a 19 Hs.

Consultas administrativas: [cursos@aba-online.org.ar](mailto: cursos@aba-online.org.ar)

Programas completos disponibles en: <http://www.aba-online.org.ar/>

Nota para no socios: abonando la primera cuota social y adhiriendo al débito automático por tarjeta, podrá acceder a los cursos ABA como socio, recibiendo además todos los beneficios de la Asociación

**Todos los cursos otorgan créditos para la
Certificación Profesional Bioquímica**



PROGRAMA DE EDUCACION CONTINUA ABA 2018. Anuncio de cursos

Nota: Los programas de los cursos estarán publicados en la página Web a partir del 20 Febrero 2018

	NOMBRE DEL CURSO	FECHA DE INICIO	DURACION	DIRECTOR/ES
1	INMUNOLOGÍA CLÍNICA (Nuevo)	A definir	ANUAL	Dr. Fernando Chirido Dr. Orlando Gabriel Carballo
2	CURSO ANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA - VERSIÓN 2018	2 de abril	ANUAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovenski
3	EVALUACIÓN DE LA PAREJA INFERTIL - "ROL BIOQUÍMICO EN EL LABORATORIO"	9 de aril	ANUAL c/15 días	Dr. Eduardo Mormandi Dra. Patricia Otero
4	EL LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA. Actualización de los procedimientos de diagnóstico. (Nuevo)	16 de abril	ANUAL 1 módulo p/mes 2 clases p/módulo	Dra. Patricia Otero
5	CURSO GASES EN SANGRE Y MEDIO INTERNO	23 de abril	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvia B. González
6	PRINCIPIOS BÁSICOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS DE HEMOSTASIA (Nuevo)	23 de abril	CUATRIMESTRAL	Dr. Ricardo Forastiero Dra. Cristina Duboscq Dra. Marta Martinuzzo
7	DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS A PARTIR DE CASOS CLÍNICOS	23 de abril	CUATRIMESTRAL	Dra. Mónica Aixalá Dra. Silvia B. González
8	INFECCIONES SEVERAS, AGENTES MULTIRRESISTENTES Y SU POSIBLE ABORDAJE - 2018	8 de mayo	ANUAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovenski
9	BIOQUÍMICA FORENSE "EL ROL DEL BIOQUÍMICO FORENSE EN LA INVESTIGACIÓN CRIMINAL	30 de abril	CUATRIMESTRAL c/ 15 días	Dr. Christian Jaroszewski
10	EL LABORATORIO CLÍNICO EN PEDIATRÍA	7 de mayo	SEMESTRAL	Dra. Sandra Ayuso Dra. Viviana Osta
11	CURSO INTEGRAL SOBRE LÍQUIDOS DE PUNCIÓN	7 de mayo	BIMESTRAL	Dr. Luis Palaoro
12	AUTOMATIZACIÓN E INTERFERENCIAS EN LOS RESULTADOS HEMATOLÓGICOS SU INTERPRETACIÓN A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE CASOS	14 de mayo	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Osta
13	INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y SUS APLICACIONES CLÍNICAS II	21 de mayo	SEMESTRAL	Dr. Luis Bastos Dra. María de la Paz Domínguez
14	TÓPICOS DE HEMATOLOGÍA EN EL NEONATO. CASOS CLÍNICOS	4 de junio	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Osta
15	FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGÍA CLÍNICA y ANALÍTICA (Nuevo)	5 de junio	SEMESTRAL	Dra. Gloria Alvarez
16	ACTUALIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE DISPROTEINEMIAS Y HEMOGLOBINOPATÍAS (Nuevo)	25 de junio	SEMESTRAL	Dra. Raquel Osatinskyra Dra. Isabel Desimone Dra. Isabel Crispiani
17	INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y SUS APLICACIONES CLÍNICAS I	2 de julio	SEMESTRAL	Dr. Luis Bastos Dra. María de la Paz Domínguez
18	PATOLOGÍAS POCO FRECUENTES Y SU DIAGNÓSTICO A TRAVÉS DEL FROTIS	9 de julio	CUATRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso
19	APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA CURSO POR CONVENIO: ABA- GRCF	16-Jul	CUATRIMESTRAL	Dra. Viviana Novoa Dra. Emilse Bermejo
20	CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS. ¿CÓMO Y QUÉ INFORMAR? (Nuevo)	16 de julio	TRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso
21	SALUD FETAL. "Herramientas no- invasivas para el screening y detección de aneuploidias y preeclampsia. Una puesta al día"	21 de agosto	CUATRIMESTRAL	Dra. Patricia Maidana
22	TÓPICOS EN EMERGENTOLOGÍA: Sepsis y Biomarcadores (Nuevo)	Segundo semenstre	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvia Gonzalez
23	ESTUDIO DE ENFERMEDADES HEMORRAGÍPARAS (Nuevo)	Segundo semenstre	A DEFINIR	Dr. Ricardo Forastiero Dra. Cristina Duboscq Dra. Marta Martinuzzo
24	EL BIOQUÍMICO EN EL BANCO DE SANGRE (Nuevo)	Segundo semenstre	SEMESTRAL	Dr. Jorge Rey
25	LOS CURSOS DE CALIDAD ANALÍTICA SE DICTAN EN LA PLATAFORMA GMIGLIARINO CONSULTORES CON 20% DE DESCUENTO PARA SOCIOS ABA	Visite la WEB de ABA	TODO EL AÑO	Dr. Gabriel Migliarino

SOLICITUD DE INSCRIPCION

ASOCIACION
BIOQUIMICA
ARGENTINA



ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA

Fundada el 3 de septiembre de 1934

Miembro Fundador:

Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina (CUBRA); Coordinadora de Colegios Bioquímicos de Ley de la República Argentina; Sociedad de Bioquímica y Patología Clínica del MERCOSUR.

Institución Invitada:

Ente Coordinador de Unidades Académicas de Facultades de Farmacia y Bioquímica (ECUAFyB.)

Miembro Adherente:

Asociación Latinoamericana Patología Clínica.

Integrante:

Comisión Nacional de Certificación Bioquímica (COCERBIN); Comisión de Elaboración de Normas y Guías de Laboratorio del Ministerio de Salud y Acción Social; Consejo Asesor y del Comité de Auditoría Interna Programa de Acreditación de Laboratorios de la Fundación Bioquímica Argentina.

La ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA es la primera entidad Bioquímica de nuestro país, y la precursora de muchas otras en Latinoamérica.

Los objetivos que llevaron a su creación, siguen vigentes en la actualidad:

- 1 | Promover la educación continua de los bioquímicos.
- 2 | Editar la Revista Bioquímica y Patología Clínica, que es la revista científica de la Asociación, de distribución cuatrimestral.
- 3 | Desarrollar cursos de capacitación y actualización, en la Ciudad de Buenos Aires y el Interior del País.
- 4 | Cada 2 años, organiza en los años pares el Congreso Nacional Bioquímico y en los años impares, las Jornadas de Actualización ABA.
- 5 | En su sede tiene un aula docente de 30 asientos y un moderno laboratorio de trabajos prácticos.
- 6 | Asimismo, la Asociación ha implementado el Programa de Certificación Bioquímica, mediante el cual se puede acceder a los Certificados de Especialista, y de Actualización en una determinada especialidad o en Bioquímica Clínica.
- 7 | En la Asociación funcionan además, diferentes Comisiones Internas y las Divisiones / Secciones, encabezadas por prestigiosos profesionales, para asesorar a la Comisión Directiva y a sus socios.
- 8 | La ABA tiene convenios de cooperación institucional con universidades nacionales, privadas y fundaciones científicas de prestigio.

Los socios de la ABA gozan de aranceles preferenciales en cualquier actividad que desarrolla la Institución y reciben la Revista ByPC sin cargo adicional.

SOLICITUD DE INSCRIPCION

ASOCIACION
BIOQUIMICA
ARGENTINA



Para asociarse, debe hacernos llegar esta solicitud completa en letra clara de imprenta y sin omitir ningún dato. Adjuntar una foto carnet, una fotocopia del título (anverso y reverso, tamaño 10 x 15 cm.) y -de elegir este sistema de pago- el formulario de ingreso al sistema de débito automático por tarjeta de crédito VISA o MASTERCARD (\$45/mes). En su defecto deberá abonar un año por adelantado (\$540/año)

En el caso que usted optara por el pago anual, puede hacerlo en efectivo en nuestra secretaría o mediante cheque y/o giro postal a la orden de “Asociación Bioquímica Argentina”, completo, sin abreviaturas.

Apellido y Nombre
D.N.I. – L.C. – L.E. – C.I.
Fecha de Nacimiento
Domicilio
Localidad C.P.
Provincia País
Teléfono e-mail
Título profesional Otorgado por
Año Nro. Matrícula
Lugar de trabajo
Domicilio
Teléfono e-mail

INFORMES

Secretaría de la Asociación Bioquímica Argentina Venezuela 1823 Piso 3
1096 – Ciudad de Buenos Aires. e-mail: info@aba-online.org.ar.
TELEFAX (011)4384-7415 - TEL: (011) 4381-2907

Horario: Lunes a Viernes de 15:00 a 19:00 Hs.

Dengue - Zika Chikungunya

Dengue

BIO-RAD

- **Platelia Dengue NS1Ag**
ELISA x 96 tests
- **Dengue NS1Ag strip**
Inmunocromatografía – Test Rápido x 25 tests

MP
MP Biomedicals

- **MultiSure** Dengue IgG, IgA, IgM y NS1Ag
Inmunocromatografía – Test Rápido x 20 tests

NOVATEC
IMMUNDIAGNOSTICA GMBH

- **Dengue IgG**
ELISA x 96 tests
- **Dengue IgM**
ELISA x 96 tests
- **Dengue IgM captura**
ELISA x 96 tests

Zika

NOVATEC
IMMUNDIAGNOSTICA GMBH

- **Zika IgM Captura**
ELISA x 96 tests

CHEMBIO
DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC

- **DPP Zika IgM /IgG**
Inmunocromatografía – Test Rápido x 25 tests

Chikungunya

NOVATEC
IMMUNDIAGNOSTICA GMBH

- **Chikungunya IgG**
ELISA x 96 tests
- **Chikungunya IgM Captura**
ELISA x 96 tests



BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

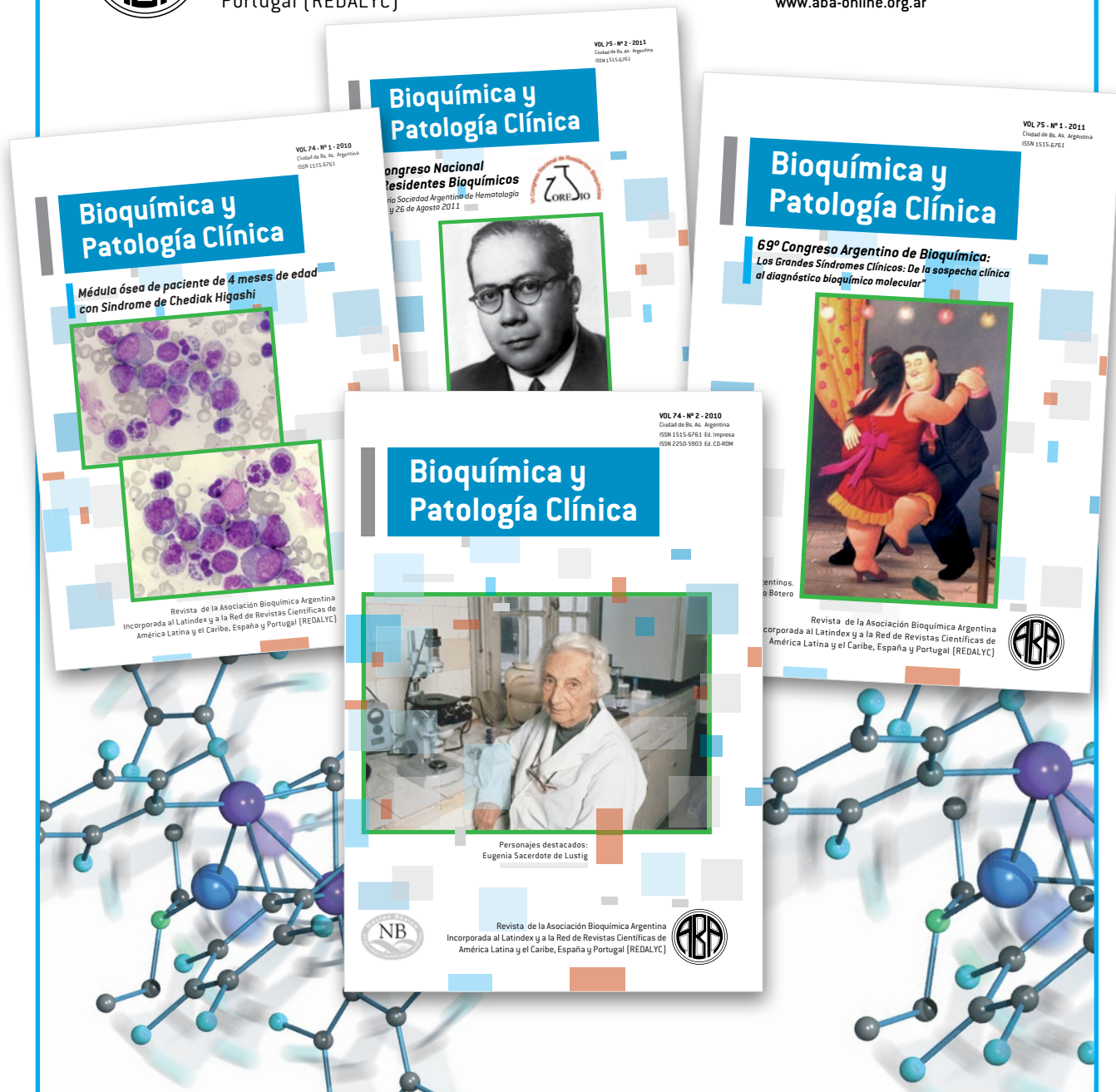
Anuncie en ByPC...

Bioquímica y Patología Clínica



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas
Científicas de América Latina y el Caribe, España y
Portugal (REDALYC)

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)
Buenos Aires - Argentina
Tel/ fax: 4384-7415 - Tel: 4381-2907
e-mail: info@aba-online.org.ar
www.aba-online.org.ar





Analizador Multiparamétrico Totalmente automatizado

ChorusTRIO

- Dispositivo individual de un solo uso que contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo.
- Capacidad multiparamétrica: Procesa hasta 30 diferentes pruebas por corrida.
- La velocidad permite obtener resultados simultáneos de diferentes paneles.
- El primer resultado se obtiene antes de 90 minutos.
- Volumen de muestra:
La muestra se dispensa manualmente.
ELISA: Mínimo de muestra 60 uL
Fijación de complemento: Mínimo de muestra 120 uL



Enfermedades Infecciosas

Adenovirus IgG	Legionella Pneumophila 1-6 IgG
Adenovirus IgA	Measles IgG
Chlamydia Pneumoniae IgG	Measles IgM
Chlamydia Pneumoniae IgM	Mycoplasma Pneumoniae IgA
Chlamydia Pneumoniae IgA	Mycoplasma Pneumoniae IgG
Cytomegalovirus IgG	Mycoplasma Pneumoniae IgM
Cytomegalovirus IgG Avidity	Mumps IgG
Cytomegalovirus IgM	Mumps IgM
Epstein-Barr VCA IgG	Respiratory Syncytial Virus IgG
Epstein-Barr VCA IgM	Respiratory Syncytial Virus IgG
Epstein-Barr EBNA IgG	Rubella IgG
Epstein-Barr Early Antigen IgG	Rubella IgG Avidity
Epstein-Barr Early Antigen IgM	Rubella IgM
Helicobacter Pylori IgG	Syphilis Screen Recombi
Helicobacter Pylori IgA	Treponema IgG
HSV 1 Screen	Treponema IgM
HSV 2 Screen	Toscana Virus IgG (Sandfly Fever Virus)
Herpes Simplex 1+2 IGM	Toscana Virus IgM (Sandfly Fever Virus)
Herpes Simplex 1+2 IgG	Toxoplasma IgG
Influenza A IgG	Toxoplasma IgG Avidity
Influenza A IgG	Toxoplasma IgM
Influenza B IgG	Toxoplasma IgA
Influenza B IgG	Varicella IgG
Legionella Pneumophila IgM	Varicella IgM
Legionella Pneumophila 1 IgG	

Autoinmunidad

ATNA-8	Gliadin-B
ENA-6-S	Deaminated Gliadin
ANA Screen	Preptide-G
SM	Deaminated Gliadin
SS-A	Preptide -A
SS-B	tTg-A
Sci-70	tTg-G
Cemp-B	ASCA-A
Jo-1	ASCA-G
dsDNA-G	PR3
dsDNA-M	MPO
CCP	GBM
RF-G	a-TG
RF-M	a-TPO
Cardiolipin-IgG	TG
Cardiolipin-IgM	LKM-1
Beta 2-Glycoprotein-G	AMA-M2
Beta2-Glycoprotein -M	Insulin
Gliadin-A	

Fijación del Complemento

Bordetella Pertussis	Chlamydia
Borrelia	Echo Virus P Mix
Brucella	Influenza A Virus
Campylobacter Jejuni	Influenza B Virus
Legionella Pneumophila	Mycoplasma Pneumoniae
Leptospira Mix	Parainfluenza Mix
Listeria Monocytogenes	Q-Fever
Shigella Flexneri	Reovirus
Yersinia Enterocolitica	Respiratory Syncytial Virus
Echo Virus N Mix	Coxsackie Virus A Mix
Poliovirus Mix	Coxsackie Virus B Mix
Adenovirus	Achlinococcus

Próximamente disponibles: Borellia IgG - IgM, Vitamina D, Chlamydia Trachomatis IgG - IgA, Parvovirus IgG - IgM, Panel Vacunacion (Tetanos - Difteria - polio IgG), EBV VCA Recombinante.



BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar