

Revista Mexicana de
Patología Clínica
MEDICINA DE LABORATORIO

Volumen 66, Número 1 / Enero-Marzo 2019

Editorial

Anticuerpos antinucleares en pacientes con sospecha clínica de enfermedad autoinmune

Correlation among two methods for glycated hemoglobin determination in diabetic Mexican patients for glycemic control

Disseminated coccidioidomycosis with giant coccidioidoma of the suprarenal gland. Autopsy case report

Expresión genotípica de la CYP3A4 en trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa, Venezuela

Gammaglobulina anti-D e inmunoprofilaxis. Historia, importancia, usos y obtención

Incremento en la medición sigma por la implementación de estrategias en inmunoquímica del Laboratorio Médico Echavarría

Órgano Oficial:

Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio (ALAPAC/ML)

Federación Mexicana de Patología Clínica (FEMPAC)



Disponible en versión completa en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

7



Certificaciones y acreditaciones nacionales e internacionales en el 100% de nuestros procesos.

- Acreditación en la Norma ISO 15189:2007
- Acreditación del College of American Pathologists CAP
- Certificación NGSP de Trazabilidad de Hemoglobina glicosilada

Nosotros podemos afirmarlo.

Y nuestro SERVICIO lo confirma:

- Personal altamente calificado
- Atención personalizada
- Amplio menú de pruebas
- Protocolos de investigación
- Cobertura a nivel nacional

En CARPERMOR podemos afirmarlo...

porque estamos comprometidos con la calidad, damos el mejor resultado.

Contenido / Contents

- 4 Editorial**
Canseco Álvarez Manuel
- 6 Anticuerpos antinucleares en pacientes con sospecha clínica de enfermedad autoinmune**
Antinuclear antibodies in patients with clinical suspicion of autoimmune disease
Santafé-Sarzosa Lorena, Sáenz-Flor Clever, Cuero Rocío, Arévalo Jhoseline
- 13 Correlation among two methods for glycated hemoglobin determination in diabetic Mexican patients for glycemic control**
Correlación entre dos métodos de determinación de hemoglobina glicosilada en pacientes diabéticos mexicanos para control glucémico
Gastélum-Cano José María, García-Alcalá Héctor, Rodríguez-Gallegos Alma Belén, Fragoso-Flores Jaime, Vera-Balderas Ana María
- 20 Disseminated coccidioidomycosis with giant coccidioidoma of the suprarenal gland. Autopsy case report**
Coccidioidomicosis diseminada con coccidioidoma gigante de la glándula suprarrenal. Reporte de caso de autopsia
Lazos-Ochoa Minerva, Tovar-Echavarri Mariana, Romero-Cabello Raúl, Romero-Feregrino Raúl
- 27 Expresión genotípica de la CYP3A4 en trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa, Venezuela**
Genotypic expression of CYP3A4 in workers exposed to inhibitor pesticides of the colinesterase, Venezuela
Marrero Sharim, Guevara Harold, Eblen-Zajjur Antonio, Sequera Mónica, Blanco Elizabeth
- 37 Gammaglobulina anti-D e inmunoprofilaxis. Historia, importancia, usos y obtención**
Anti-D gamma globulin and immunoprophylaxis. History, importance, uses and procurement
Aguila Rodríguez Yisell, Pacheco Morejón Johanna, Izquierdo Hernández Mairelys, Sánchez Frenes Pedro, Benítez Zayas Marlen Beatriz, Sánchez Bouza María de Jesús
- 46 Incremento en la medición sigma por la implementación de estrategias en inmuunoquímica del Laboratorio Médico Echavarría**
Improvement in sigma measurement through the implementation of strategies for immunochemistry of Laboratorio Médico Echavarría
Salazar-Agudelo Sorany Cristina, Ruiz-Cadavid Alejandra, Salazar Jéssica Verónica

Revista Mexicana de Patología Clínica y MEDICINA DE LABORATORIO

DIRECTORIO

Editor: Dr. Alberto Zamora Palma

COMITÉ EDITORIAL

Área de Bacteriología

Dra. Silvia Giono Cerezo

Investigador Titular. SNI: Nivel I. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F.

Área de Banco de Sangre y Medicina Transfusional

Dr. Héctor Rodríguez-Moyado

Ex-Director del Banco Central de Sangre CMN Siglo XXI, IMSS. Miembro Honorario de la Asociación Mexicana de Medicina Transfusional, A.C. Miembro Titular de la Asociación Mexicana para el Estudio de la Hematología, Ciudad de México.

Área de Inmunología

Dr. Fernando Antonio Santoscoy Tovar

Jefe del Área de Laboratorio y del Departamento de Microbiología: Bacteriología, Micología, Parasitología y Virología, Unidad de Patología Clínica, Guadalajara, Jalisco, México. Miembro e Inspector del College of American Pathologists (CAP). Miembro de la American Society for Microbiology, de la American Society for Clinical Pathology y de la Clinical Ligand Assay Society.

Área de Hematología

Dra. Blanca Stéffano de Perdomo

Doctor en Medicina, DM, Postgrado en Patología Clínica. Coordinadora del Comité de Expertos de Normalización y Control de Calidad en Hemostasis y Trombosis del Grupo Latinoamericano de Hemostasis y Trombosis (CLAHT). Coordinadora del Programa Nacional Uruguayo de Evaluación Externa de Calidad en Hematología (CECC). Director Técnico del Centro de Estudios e Investigación de Hemostasis y Trombosis (Laboratorio HYGEA, Montevideo, Uruguay).

Área de Bioética y Normativa

Dr. Eduardo García Solís

Médico, Patólogo Clínico, Diplomado en Inmunología Clínica. Director Operativo de la Comisión de Bioética del Estado de Campeche. Académico Numerario de la Academia Nacional de Investigación Clínica. Miembro de la Asociación Mexicana de Medicina Interna, Capítulo Campeche. Miembro de la Sociedad Yucateca de Cardiología. Miembro del Colegio Médico de Campeche, México.

Dr. Jorge Manuel Sánchez González

Médico, Patólogo Clínico, Acad. de la Academia Nacional de Cirugía.

Área de Genética Médica

Dr. Fabio Salamanca Gómez

Médico Genetista, Coeditor de Archives of Medical Research y de Gaceta Médica de México. Profesor Titular de Cursos de Genética en la UNAM y en varias universidades más. Miembro Numerario de la Academia Nacional de Medicina, la Academia Mexicana de Ciencias, la Academia Mexicana de Cirugía y la Academia Mexicana de Pediatría. Coordinador de Investigación en Salud, IMSS, México.

Área de Infectología

Dr. Gustavo Barriga Angulo

Jefe de Laboratorio del Hospital de Infectología, Centro Médico «La Raza», Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México.

Área de Micología Médica

Dr. Arturo Rubén López Martínez

Profesor Titular C de Tiempo Completo. Médico Cirujano, Doctorado en Ciencias Biomédicas. Nivel de Sistema Nacional de Investigadores II. Jefe del Laboratorio de Micología Médica, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México.

Área de Parasitología Médica

Dr. Werner Apt Baruch

Departamento de Medicina Interna-Gastroenterología. Especialidad en Parasitología. Presidente de la Sociedad Chilena de Parasitología (SOCHIPA). Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Campus Sur, Santiago de Chile, Chile.

Dr. Raúl Romero Cabello

Médico Infectólogo del Hospital General de México, Profesor Titular de Parasitología y Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Miembro de 20 asociaciones médicas, nacionales e internacionales, de Pediatría, Infectología y Parasitología. Ex-Presidente de la Sociedad Mexicana de Parasitología y de la Federación Latinoamericana de Parasitología.

Área de Bioquímica Clínica

Dr. José Roberto Barba Evia

Médico Especialista en Patología Clínica. Subdirector de Auxiliares de Diagnóstico, Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán, IMSS. Profesor de la Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán y de la Universidad Anáhuac Mayab, de las cátedras de Patología Clínica, Parasitología Médica y Hematología Clínica.



ÓRGANO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN
MEXICANA DE PATOLOGÍA CLÍNICA
(FEMPAC)

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA DE PATOLOGÍA CLÍNICA/MEDICINA
DE LABORATORIO (ALAPAC/ML)

AGRUPACIONES DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y DIRECTIVAS ACTUALES:

Mesa Directiva de la Federación Mexicana de Patología Clínica (FEMPAC): 2018-2020

Presidente: Dr. Manuel Canseco Álvarez

Vicepresidente: Dr. Miguel Ángel Reyes Núñez

Secretaria/Tesorera: Dra. Margarita Gutiérrez Ahuactzin

Agrupaciones integrantes de FEMPAC

Asociación Mexicana de Patología Clínica, AC

Asociación Oaxaqueña de Patología Clínica

Colegio de Médicos Patólogos Clínicos de Jalisco, AC

Colegio de Patólogos Clínicos del Centro de la República Mexicana, AC

Colegio Médico de Patólogos Clínicos del Noreste de México

Colegio Poblano de Patología Clínica, AC

Colegio Médico de Patólogos Clínicos de Veracruz

La Federación Mexicana de Patología Clínica es miembro de la Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio (ALAPAC/ML), y de la World Association of Societies of Pathology (Anatomic and Clinical) [WASPALM].

Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio Junta Directiva 2018-2020

Presidente: Dra. Carolina Prieto Castillo (Chile)

Presidente Alterna 2021: Dra. Gabriela Ma. Moreira Corazza (Uruguay)

Presidente Alterno 2022: Dr. Reynaldo Denis de Armes (Cuba)

Secretario Permanente: Dr. José M. Carreón Moldiz (Bolivia)

Secretaria: Dra. María Jesús Vial (Chile)

Secretario Alterno: Dr. Juan Carlos Hormazábal O. (Chile)

Tesorera: Dra. Isabel Briceño Lizana (Chile)

Tesorero Alterno: Dr. Marcelo Díaz de Valdés (Chile)

Vicepresidencias

Actividades Gremiales y Coordinación:

Dr. Pablo López Pedrozo (Uruguay)

Dr. Enrique Abraham Marcel (Cuba)

Dra. Zulema Berrios Fuentes (Perú)

Control de Calidad y Acreditación:

Dr. Clever Sáenz Flor (Ecuador)

Dr. Armando Moreno de la Cruz (Perú)

Relaciones Industriales:

Dr. Luis Narváez Grijalva (Ecuador)

Dra. Luisiane Vieira (Brasil)

Dr. José Luis Hernández Montiel (México)

Planes Futuros:

Dr. Julio Sempertegui Vega (Ecuador)

Dr. Wilson Shcolnik (Brasil)

Dr. Manuel Canseco Álvarez (México)

Miembros Adherentes

Representante de la Asociación

Bioquímica Argentina:

Dra. Silvia Morilla (Argentina)

Representante de la Sociedad Venezolana

de Bioanalistas Especialistas:

Dra. Yaniska Franquiz (Venezuela)

Directiva de la World Association of Societies of Pathology & Laboratory Medicine 2017-2019

Presidente: Dr. Robert Verna (Italia)

Past-President: Dr. Masami Murakami (Japón)

Secretario Tesorero: Dr. Francesco Curcio (Italia)

Presidente Electo: Dr. Walter Alallón (Uruguay)

Director Norteamérica: Dra. Catherine Hayward (Canadá)

Director Sudamérica: Dr. Nairo Sumita (Brasil)



Imagen de la portada: Coccidioidomycosis: esférulas liberadoras de endoesporas. Tinción de Grocott.

Imagen publicada en la pág. 25 del volumen 66, número 1, Enero-Marzo de 2019, en el artículo Disseminated coccidioidomycosis with giant coccidioidoma of the suprarenal gland. Autopsy case report de Lazos-Ochoa M, et al.

La Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio es el órgano oficial de difusión de la Federación Mexicana de Patología Clínica, AC y de la Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores.

Se publica trimestralmente. Suscripción anual en México: \$600.00,

para otros países: US\$100.00. Tiraje de 2,000 ejemplares.

Derechos reservados conforme a la Ley. Certificado de Licitud de Título Núm. 3023, Certificado de Licitud de Contenido Núm. 1929, Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo Núm.

04-2013-09171153400-102. Publicación periódica. Permiso de Correos PP09-0478.

La Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio está indexada en: Medigraphic Literatura Biomédica; www.medigraphic.com/patologiaclinica, Latindex, PERIODICA UNAM, Literatura Latinoamericana en Salud (LILACS), Centro Latinoamericano y del Caribe en Ciencias de la Salud (BIREME), São Paulo, Brasil. Toda correspondencia o remesa deberá dirigirse al Editor de la Revista: Dr. Alberto Zamora Palma, E-mail: alberto.zamora@medigraphic.com

Arte, diseño, composición tipográfica, prensa, impresión y acabado por Graphimedic, SA de CV, Tel. 8589-8527 al 31. E-mail:emyc@medigraphic.com. Impresa en México.

Disponible en versión completa en Medigraphic, Literatura Biomédica: www.medigraphic.org.mx

Editorial

Canseco Álvarez Manuel*

El presente número tiene una connotación especial en la Patología Clínica Nacional e Internacional por dos decisiones trascendentales, la primera es el cambio de editor de nuestra revista, el Dr. Enrique Navarrete Cadena culmina sus actividades como editor después de una fructífera gestión académica, la cual inició en marzo de 1984. Agradecemos el tesón, dedicación y cariño que le brindó a su labor editorial. Asimismo, damos la bienvenida al Dr. Alberto Zamora Palma como nuevo editor a partir del presente número, destacado patólogo clínico, que ha colaborado como coeditor durante tres años y que posee amplia experiencia en esta especialidad médica. Le deseamos éxito en esta nueva encomienda de vida.

La segunda decisión, igual de importante, es el cambio de nombre de nuestra revista, cuya denominación *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* cambia a *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*; el Consejo de representantes de la Federación Mexicana de Patología Clínica, AC, (FEMPAC) consideró la necesidad de fortalecer la identidad nacional de nuestra revista, la cual desde el primer número del año 2012 se llamó *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* por iniciativa del Dr. Enrique Navarrete Cadena, aprobada por la Asamblea de FEMPAC, con el propósito de ampliar el reconocimiento y alcance de la revista, así como de ofrecer un canal más de difusión editorial a los patólogos clínicos ibero-latinoamericanos.¹

* Presidente de la Federación Mexicana de Patología Clínica.

Correspondencia:
**Canseco Álvarez
Manuel**
Dirección General de Sanidad, Sección de Planes, Tecamachalco, Edo. Mex.
E-mail: mancanseco@gmail.com

Desde el inicio de actividades en 1948 como Revista Mexicana de Laboratorio Clínico, se convirtió en un canal de comunicación de la Patología Clínica Nacional, y a partir de la creación de la FEMPAC ha sido el Órgano Oficial de Difusión. En agosto de 1994, recibe el nombramiento de Órgano Oficial de Difusión de la Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio (ALAPAC).

El cambio de nombre a *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* refuerza el carácter nacional de la misma, con alcances en todo el orbe. Los aspectos legales y administrativos han sido responsabilidad permanente de la FEMPAC. Como revista académica, invitamos a toda la comunidad científica a enviar sus artículos para publicación; recordemos que lo que nos hace mejores personas es nuestra capacidad de compartir.

Para finalizar, se debe destacar que nuestra revista está, entre otros índices (ver lista), en: **Medigraphic Literatura Biomédica; www.medigraphic.com/patologiaclinica**, Latindex, PERIODICA UNAM, Literatura Latinoamericana en Salud (**LILACS**), Centro Latinoamericano y del Caribe en Ciencias de la Salud (**BIREME**), São Paulo, Brasil.

Fraternalmente.

REFERENCIA

1. Navarrete CE. Informe de la gestión editorial 1985-2018 de la Revista Latinoamericana de Patología Clínica. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2018; 65 (4): 184-191.

www.medigraphic.org.mx

Lista de bibliotecas e índices que incluyen en su acervo a la *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*.

Medigraphic Literatura Biomédica
<http://www.medigraphic.org.mx>

Biblioteca de la Universidad de Regensburg, Alemania
<http://ezb.uni-regensburg.de/>

University of Nevada, Reno EU
<http://wx2mz2qh4l.search.serialssolutions.com/?L=WX2MZ2QH4L>

Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
<http://www.revbiomedicas.unam.mx>

Universidad de Laussane, Suiza
<http://www2.unil.ch/perunil/>

Biblioteca de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Artes, Hochschule Hannover (HSH), Alemania
<http://www.hs-hannover.de/bibl/literatursuche/medien/elektronische-zeitschriften/index.html>

LATINDEX. Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
<http://www.latindex.org/>

Biblioteca Virtual en Salud (BVS, Brasil)
<http://portal.revistas.bvs.br>

Yeungnam University College of Medicine Medical Library, Korea
http://medlib.yu.ac.kr/journal/subdb1.asp?table=totdb&Str=%B1%E2%C5%B8&Field=ncbi_sub

Biblioteca del Instituto de Biotecnología UNAM.
<http://www.biblioteca.ibt.unam.mx/revistas.php>

Asociación Italiana de Bibliotecas (AIB)
<http://www.aib.it/aib/commiss/cnur/peb/peba.htm3>

Max Planck Institute for Comparative Public Law and International Law
http://www.mpil.de/en/pub/library/research-tools/ejl.cfm?fuseaction_ezb=mnotation&colors=3&lang=en¬ation=WW-YZ

Wissenschaftszentrum Berlin für Sozialforschung, Berlin WZB
<https://www.wzb.eu/de/literatur-daten/bereiche/bibliothek>

Virtuelle Bibliothek Universität des Saarlandes, German
<http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/search.phtml?bibid=SULB&color=7&lang=de>

Google Académico
<http://scholar.google.com.mx/>

PERIÓDICA: Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias (UNAM)
<http://periodica.unam.mx>
 Total de registros localizados: 390 (como Revista Mexicana) + 37 (como Revista Latinoamericana)

Ulrich's International Periodicals Directory,
 00294860 Ulrichs Accession Number: 0611404XXX

Fundación Ginebrina para la Formación y la Investigación Médica, Suiza
http://www.gfmer.ch/Medical_journals/Revistas_medicas_acceso_libre.htm

Library of the Carinthia University of Applied Sciences (Austria)
<http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/fl.phtml?bibid=FHTK&colors=7&lang=en>

Biblioteca electrónica de la Universidad de Heidelberg, Alemania
<http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/search.phtml?bibid=UBHE&colors=3&lang=de>

Biblioteca de la Universidad de Bielefeld, Alemania
https://www.digibib.net/jumpto?D_SERVICE=TEMPLATE&D_SUBSERVICE=EZB_BROWSE&DP_COLORS=7&DP_BIBID=UBBIE&DP_PAGE=search&LOCATION=361

Biblat (Bibliografía Latinoamericana en revistas de investigación científica y social) UNAM
<http://biblat.unam.mx>

Biblioteca de la Universidad Norte de Paraná, Brasil
http://www.unopar.br/bibli01/biologicas_periodicos.htm

Research Institute of Molecular Pathology (IMP)/ Institute of Molecular Biotechnology (IMBA) Electronic Journals Library, Viena, Austria
http://cores.imp.ac.at/max-perutz-library/journals/details/?tx_ezbfe_pi3%5Bjournal_id%5D=15410&cHash=fdad59462ec615fca78fe7904be12aee

Google Books
<http://www.google.com/books?id=IdibHgzyKs8C&lr=&hl=en>

Anticuerpos antinucleares en pacientes con sospecha clínica de enfermedad autoinmune

Antinuclear antibodies in patients with clinical suspicion of autoimmune disease

Santafé-Sarzosa Lorena,* Sáenz-Flor Klever,*[†]
Cuero Rocío,[‡] Arévalo Jhoseline*,[§]

Palabras clave:

ANA, automatización, concordancia, prevalencia, antígenos.

Keywords:

ANA, automation, agreement, prevalence, antigens.

* Synlab Solutions in Diagnostics. Quito-Ecuador.

† Carrera de Medicina. Facultad de Ciencias Médicas-Universidad Central del Ecuador.

§ Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Central del Ecuador.

Correspondencia:
Klever Sáenz Flor
Synlab Solutions in Diagnostics
Calle A N 31-145 y
Av. Mariana de Jesús,
Quito-Ecuador,
EC170102,
Telefax: 00593-2-
2920911, ext. 331.
E-mail: kleber.saenz@
netlab.com.ec
URL: www.synlab-sd.
com

Recibido:
12/02/2019

Aceptado:
29/03/2019

RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes (EAI) se caracterizan por producir autoanticuerpos contra estructuras del núcleo y citoplasma. La determinación de anticuerpos antinucleares (ANA) se emplea para su cribado. Se estima una incidencia de EAI entre 1-20/100,000 habitantes al año con una prevalencia de 3 al 5% en población general. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es el método de referencia para la determinación de ANA y establece expresividad y patrón en células HEp-2. Se realizó un estudio epidemiológico transversal para establecer la prevalencia de expresividad de ANA y sus antígenos específicos en 540 muestras de pacientes con sospecha clínica de EAI. Se determinó la expresividad de ANA usando plataforma HELIOSTM y paralelamente IFI no automatizada con lectura por dos observadores entrenados para establecer concordancia entre métodos. Las muestras positivas (HELIOSTM) fueron sometidas a detección cualitativa de IgG (17 antígenos ANA) usando ensayo enzimoinmunoensayo de membrana. La edad promedio de los pacientes fue de 43.4 ± 16.7 años con predominio del sexo femenino (75.8%). La expresividad de ANA (IFI-HELIOSTM) fue de 27.9% ($IC_{95\%}$ 24.1-31.7%), 30.9% en mujeres y 17.24% en hombres ($p < 0.05$).ⁱ El patrón más frecuente fue el moteado fino (35.76%). El 31.8% ($IC_{95\%}$ 24.4-39.2%) de los ANA positivos ($n = 151$) expresaron algún anticuerpo por inmunoblot, siendo el más frecuente el dsADN (25%). La concordancia IFI manual frente a HELIOSTM fue alta (Kappa 0.79). La prevalencia de ANA identificada es comparable a la de otras poblaciones y existe una relación directamente proporcional entre el título de ANA-IFI y la expresividad de antígenos por inmunoblot.

ABSTRACT

Autoimmune diseases are characterized by the production of autoantibodies against own structures of the nucleus and cytoplasm. AID's incidence estimation is between 1-20/100,000 habitants per year, with a prevalence of 3 to 5% in general population. Indirect immunofluorescence (IIF) is the reference method for ANA determination establishing expressiveness and pattern in HEp-2 cells. Antinuclear antibodies (ANA) are used for screening of Autoimmune disease. This study aims to determine the prevalence of expressiveness of ANA and their specific antigens in patients AID's clinical suspicion and the agreement of IFI-ANA automated and IFI-ANA manual. This is a cross-sectional epidemiologic study carried out in 540 samples from patients with clinical suspicion of AID. Patient's average age was 43.4 ± 16.7 years, with a prevalence of female sex (75.8%). An automatic diagnostic platform (HELIOSTM) was used to determine the expressiveness of ANA. Simultaneously, two trained observers to establish agreement between methods read IIF manual. Positive samples from automated system were subjected to qualitative detection of IgG (17 antigens ANA) using Immunoblot assay. The expressiveness of ANA-IIF was 27.9% ($CI_{95\%}$ 24.1 - 31.7%), from which 30.9% positive expressiveness were from women and 17.24% in men ($p < 0.05$). The most frequent pattern observed was fine speckled (35.76%). Overall, 31.8% ($IC_{95\%}$ 24.4-39.2%) of the ANA positive patients ($n = 151$) expressed some antibodies by immunoblot, being the most frequent the dsDNA (25%). The agreement between IIF manual and HELIOSTM was high (Kappa 0.79). The identified ANA's prevalence is comparable to other populations. A directly proportional relationship between the titles of ANA-IIF and the expression of antigens by Immunoblot was established.

ⁱ T de diferencia de proporciones.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes (EAI) tienen una incidencia estimada a nivel mundial de 90/100,000 personas al año y una prevalencia de 3 al 5% en población general.¹⁻⁴ Caracterizadas por pérdida de la tolerancia inmunológica con producción de autoanticuerpos contra estructuras del núcleo y citoplasma celular que provocan daño local o sistémico.^{5,6}

La determinación de anticuerpos antinucleares (ANA) en sustratos de células humanas HEp-2 por (IFI) es el estándar de oro en el cribado diagnóstico de (EAI) establecido por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI),^{7,8} permitiendo identificar inmunoglobulinas de tipo IgG en enfermedades autoinmunes, reumáticas, hepáticas, virales, gástricas y malignas con significancia clínica al relacionarse con la sintomatología del paciente.^{2,3,8-11} Se han establecido prevalencias de expresividad de ANA que oscilan de 1.1-20% en poblaciones seleccionadas (donantes de sangre, personal de salud, entre otros).^{2,10-12}

Si bien la IFI es una técnica altamente sensible 70.96% y específica 85.87%, con un VPP de 77.88% y VPN de 80.85%,¹³ una de sus principales limitaciones es el alto grado de entrenamiento que deben tener los observadores para definir tanto su positividad como los diferentes patrones, estos últimos de particular importancia para uso clínico, por cuánto se asocian con uno u otro tipo de enfermedad autoinmune.^{6,11,14-16}

A lo antes expuesto se suman las condiciones técnicas de montaje del ensayo que pueden generar variaciones en su calidad, por ejemplo, «background» que atentan contra su reproducibilidad tanto intraobservador como interobservador, con concordancias publicadas que oscilan entre la intensidad de fluorescencia ($\kappa = 0.602$) y el reconocimiento del patrón de tinción ($\kappa = 0.627$).^{17,18}

En años recientes se han desarrollado plataformas automatizadas para IFI en busca de mejorar el desempeño de la prueba diagnóstica, disminuyendo los factores de variación asociados a la técnica y empleando sistemas de comparación contra patrones de imagen que apoyen al operador en la definición tanto de positividad como de patrón identificado.^{19,20} La sensibilidad declarada para este tipo de plataformas IFI es de 96.7%, con especificidad de 89.2%²¹ con concordancias públicas intraobservador e interobservador de 90 y 95% entre la interpretación manual y automatizada ($\kappa = 0.554-0.69$), lo que mejora su desempeño diagnóstico.²¹⁻²³

Sobre la base de lo expuesto, el presente estudio establece la prevalencia de ANA empleando un anali-

zador automatizado de fluorescencia en población con sospecha clínica de (EAI) en muestras remitidas para este propósito a un laboratorio de análisis médicos, así como la definición del patrón de mayor frecuencia y su relación con el anticuerpo específico establecido mediante inmunoblot. Paralelamente, se evaluó la concordancia de hallazgos de la plataforma automatizada frente a la metodología estándar de IFI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio epidemiológico analítico transversal de punto con la finalidad de establecer la prevalencia de expresividad de anticuerpos antinucleares ANA en 540 muestras remitidas de sujetos con sospecha clínica de enfermedad autoinmune,ⁱⁱ en los meses de julio a septiembre de 2017 en NETLAB S.A., un laboratorio clínico de derivación localizado en Quito-Ecuador. Las muestras fueron seleccionadas con base en muestreo secuencial, eliminándose del mismo aquellas muestras con cualquier grado de ictericia, lipemia o hemólisis.

Una vez seleccionadas, se procedió a ejecutar ensayo automatizado de ANA-IFI empleando plataforma HELIOS™ (AESKU. SYSTEMS)^{21,24} y paralelamente ensayo ANA-IFI no automatizado (Orgentec®)²¹ ambos conforme a protocolo recomendado y validado por fabricante. En ambos casos el cut-off empleado fue de 1:80.^{25,26} La IFI no automatizada fue evaluada por dos lectores entrenados en rutina y se calificaron como positivos únicamente aquellos casos en que ambos lectores concordaron en el criterio.

En las muestras calificadas como positivas, se procedió a realizar inmunoblot para la determinación de 17 antígenos específicos (AESKU-DIAGNOSTICS).

La información fue recopilada en una base de datos para posterior limpieza y análisis en SPSS 14.0. Las variables cuantitativas se expresaron en promedio y desviaciones estándar, mientras que las cualitativas en frecuencias simples y porcentajes. La prevalencia de expresividad de ANA se presenta en porcentajes acompañados de sus correspondientes intervalos de confianza al 95%. Para el análisis inferencial se aceptó como válido un nivel de significación de 95% ($\alpha = 0.05$), se empleó T de diferencia de promedios para variables cuantitativas, previa prueba F, y variables

ⁱⁱ Muestra representativa calculada con muestreo aleatorio simple partiendo de una probabilidad esperada de expresividad del 50% a un nivel de significación del 95% y un error de inferencia del 10%.

cualitativas T de diferencia de proporciones. Para el análisis de concordancia entre método automatizado y manual para ANA-IFI se usó repetibilidad compleja y test Kappa de Cohen.²⁷

RESULTADOS

Se estudió un total de 540 muestras de pacientes remitidos con solicitud de anticuerpos antinucleares ANA.

La edad promedio de los pacientes fue de 43.4 ± 16.7 años (rango: 2-94 años), siendo de sexo femenino el 75.8% ($n = 424$). La edad promedio de las mujeres

Cuadro I. Prevalencia de expresividad ANA por grupo de edad (ciclo de vida).	
Grupos de edad (n)	Prevalencia % (IC _{95%})
Preescolar (6)	50.0 (10-90)
Escolar (7)	28.6 (Nc)
Adolescentes (16)	12.5 (Nc)
Adultos Jóvenes (273)	24.9 (19.8-30)
Adultos (182)	29.7 (23.1-36.3)
Adultos mayores (56)	39.3 (26.5-52.1)

Nc = No calculable.

Cuadro II. Frecuencia de patrones fluorescentes ANA-IFI HELIOS™.	
Patrón	n (%)
Moteado fino	56 (37.1)
Moteado fino denso	30 (19.9)
Moteado grueso	20 (13.2)
Patrón mixto	13 (8.6)
Nucleolar homogéneo	10 (6.6)
Homogéneo	6 (4.0)
Citoplasmático mitocondrial	5 (3.3)
Centrómero	3 (2.0)
NUMA1/NUMA2	2 (1.3)
Múltiples puntos nucleares	1 (0.7)
Pocos puntos nucleares	1 (0.7)
Nucleolar punteado	1 (0.7)
Citoplasmático granular fino	1 (0.7)
Citoplasmático granular	1 (0.7)
Aparato de Golgi	1 (0.7)
Total	151 (100.0)

fue de 43.1 ± 16.3 años y de los hombres de 44.3 ± 18.1 años ($p > 0.05$).ⁱⁱⁱ

La prevalencia de expresividad de ANA por IFI automatizada fue de 27.9% (IC_{95%} 24.1-31.7%), siendo en las

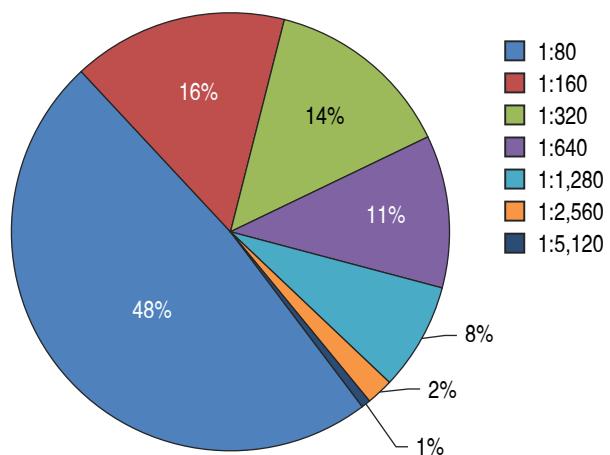


Figura 1. Frecuencia de titulación máxima ANA positivos.

Patrón	Frecuencias relativas de expresividad antígenos ANA por inmunoblot por patrón IFI identificado.
Homogéneo (n = 6)	66.7 (Nc)
Moteado fino denso (n = 30)	33.3 (16.4-50.2)
Centrómero (n = 3)	100 (Nc)
Moteado fino (n = 56)	19.6 (2.2-37)
Moteado grueso (n = 20)	55.0 (33.2-76.8)
Múltiples puntos nucleares (n = 1)	0 (Nc)
Pocos puntos nucleares (n = 1)	0 (Nc)
Nucleolar homogéneo (n = 10)	10 (Nc)
Nucleolar punteado (n = 1)	0 (Nc)
Citoplasmático granular fino (n = 1)	100 (Nc)
Citoplasmático granular (n = 1)	0 (Nc)
Citoplasmático mitocondrial (n = 5)	0 (Nc)
Aparato de Golgi (n = 1)	0 (Nc)
NUMA1/NUMA2 (n = 2)	0 (Nc)
Patrón mixto (n = 13)	38.5 (12-65)

Nc = No calculable.

ⁱⁱⁱ T de diferencia de proporciones.

mujeres de 30.9% ($IC_{95\%}$ 22.5-39.3%) y en los hombres de 17.24% ($IC_{95\%}$ 13.6-20.8) ($p < 0.05$).

La prevalencia de expresividad de ANA por grupos de edad (ciclo de vida) se describe en el cuadro I.

En los patrones identificados en las muestras ANA positivas predominó el moteado fino presente en el 37.1% ($n = 56$) (cuadro II).

Entre las muestras positivas (títulos $> 1:80$), la dilución más frecuente fue 1:80, seguida de 1:160 (figura 1).

La expresividad de antígenos por inmunoblot en los sujetos ANA positivo por inmunofluorescencia ($n = 151$) fue de 31.8% ($IC_{95\%}$ 24.4-39.2%). Las frecuencias de expresividad por tipo de patrón ANA (cuadro III).

El anticuerpo más frecuente entre quienes mostraron un inmunoblot positivo ($n = 48$) fue el dsADN, presente en 10.4% de los casos como patrón único. Las frecuencias de expresión de anticuerpos se detallan en la figura 2.

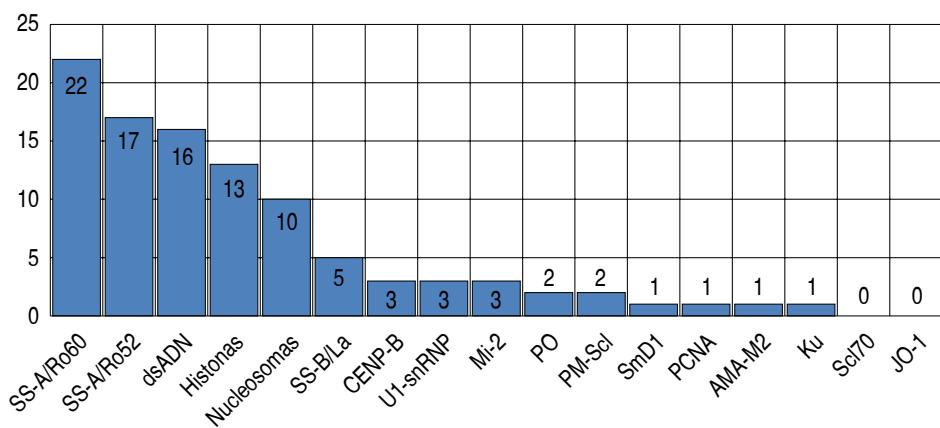


Figura 2.

Frecuencia de expresión de anticuerpos ANA (inmunoblot) sujetos ANA IFI positivos ($n = 151$).

Cuadro IV. Expresividad de antígenos (inmunoblot) por concordancia IFI automatizada (HELIOS™) frente a IFI-tradicional.

IFI automatizada (títulos)	Expresividad de antígenos ANA (inmunoblot) n (%)																	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	Total
1:80	1 (9.1)	0	0	0	0	0	3 (27.3)	3 (27.3)	1 (9.1)	0	0	0	0	0	1 (9.1)	1 (9.1)	1 (9.1)	11
1:160	1 (20)	0	0	0	0	1	3 (20)	0 (60)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
1:320	4 (28.6)	2 (14.3)	3 (21.4)	0	0	0	2 (14.3)	2 (14.3)	1 (7.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	14
1:640	6 (16.2)	5 (13.5)	6 (16.2)	1 (2.7)	1 (2.7)	1	6 (16.2)	5 (13.5)	1 (2.7)	1 (2.7)	0	2	1	0	1	0	0	37
1:1,280	4 (17.4)	3 (13)	4 (17.4)	0	0	0	4 (17.4)	4 (17.4)	1 (4.3)	2 (8.7)	0	0	0	0	1	0	0	23
1:2,560	0	0	0	0	0	0	3 (42.8)	2 (28.6)	0	0	0	1	0	0	1	0	7	
1:5,120	0	0	0	0	0	0	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	0	0	0	0	0	0	0	3	

A = SS-A/Ro60; B = SS-A/Ro52; C = dsADN; D = Histonas; E = Nucleosomas; F = SS-B/La; G = CENP-B; H = U1-snRNP; I = Mi-2; J = PO; K = PM-Scl; L = SmD1; M = PCNA; N = AMA-M2; O = Ku; P = Scl 70; Q = JO-1

Cuadro V. Concordancia IFI automatizada-(HELIOS™) frente a IFI-tradicional.

IFI automatizada	IFI Tradicional n (%)	
	Positivo	Negativo
Positivo	110 (72.9)	41 (27.1)
Negativo	—	389 (100.0)
Total	110 (20.4)	430 (79.6)

La frecuencia de positividad de antígenos por (inmunoblot) por dilución se presenta en el cuadro IV.

Al analizar la concordancia entre ANA-IFI automatizada comparada con ANA-IFI, ésta fue de 92.4% (kappa 0.79) (*cuadro V*).

DISCUSIÓN

Las enfermedades autoinmunes son patologías multifactoriales, y sistémicas que provocan daño intrínseco asociado a un defecto del reconocimiento de lo propio, generando lesiones de afectación local o sistémica cuyo diagnóstico es crucial para un adecuado tratamiento, lo que afecta directamente el pronóstico de este tipo de pacientes.^{27,28}

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) desempeña un papel importante en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes y es considerada en la actualidad como el «estándar de oro» con sensibilidades reportadas superiores al 90%.

Una de las limitaciones de la IFI tradicional es la dificultad en su estandarización y la baja concordancia entre observadores.^{9,21-23} Por esta razón, se han desarrollado plataformas automatizadas orientadas a disminuir las variaciones analíticas con sensibilidades de hasta 96.7%.¹⁸

Se estudiaron las muestras provenientes de 540 sujetos con sospecha clínica de patología autoinmune remitidas para análisis de ANA. La media poblacional de la serie estudiada (43.4 ± 16.7 años) está por sobre lo evidenciado en otros estudios, donde habitualmente se encuentra alrededor de los 30 años; esto se debe probablemente a que en la mayoría de estudios se evalúan poblaciones de donantes de sangre.^{2,29}

La prevalencia de expresividad de ANA (IFI-HELIOS™) detectada fue de 27.9% (IC_{95%} 24.1-31.7%), siendo mayor en mujeres (30.9%) que en hombres (17.24%) debido a que las enfermedades autoinmunes en mujeres tienen mayor prevalencia a causa de factores hormonales relacio-

nados con la menopausia, lo que además puede justificar la mayor prevalencia identificada en el grupo de adultos y adultos mayores, en quienes se suma la disminución de la actividad de los linfocitos T reguladores, que conlleva la activación de linfocitos autorreactivos con capacidad de atacar a antígenos propios.^{2,30-32}

La prevalencia encontrada es superior a la reportada en otras poblaciones, donde oscila entre 8.2²⁹ y 10.7%,² con una titulación de corte de 1:40 y 1:80 respectivamente, ya que en el presente estudio se trata de población con sospecha clínica, a diferencia de los estudios analizados en donantes de sangre.^{25,33}

El patrón más frecuente fue el moteado fino (35.76%), el cual está asociado a patologías autoinmunes tipo LES, esclerodermia, Sjögren, entre otras,² seguidas del moteado fino denso (19.9%), que permite discriminar enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas de otros procesos inflamatorios.^{31,34-37}

Al estudiar la expresividad antigénica empleando inmunoblot, 31.8% (IC_{95%} 24.4-39.2%) de los ANA positivo (n = 151) expresaron algún tipo de anticuerpo, siendo el más frecuente el SS-A/Ro60, un antígeno extraíble del núcleo frecuentemente asociado a LES, lupus cutáneo subagudo, dermatomiositis, entre otros; además se expresa habitualmente en patrones fluorescentes tipo moteado fino, el patrón de mayor frecuencia en esta serie de casos.³⁸

Al analizar la concordancia entre la IFI manual frente a la automatizada (HELIOS™), ésta fue, en términos de repetibilidad, compleja de 92.4% y corregida la probabilidad de concordancia por azar, y mostró un índice Kappa de 0.79, lo que confiere una buena concordancia²⁷ similar a la reportada por otros estudios, donde este indicador osciló entre 0.60²⁷ y 0.984.³⁸

En definitiva, el presente estudio demuestra una elevada concordancia entre la IFI automatizada y el no automatizado; sin embargo, es importante considerar que en 11 casos marcados como negativos para el análisis, se marcaron como tal por discordancia entre los observadores (al menos uno lo identificó como positivo), es decir, una discordancia de 7.3% entre ellos, lo que ratifica la bondad del uso de IFI en plataformas automatizadas al eliminar las potenciales discordancias en la definición de positividad.

Aspectos éticos

El presente estudio respeta las normativas de investigación en sujetos humanos y se realizaron dentro del consentimiento tácito de un procedimiento diagnóstico habitual, preservando la confidencialidad de los participantes.

El soporte brindado por AESKU.GROUP se limitó a la provisión de los reactivos e insumos requeridos, sin que esto haya significado conflicto de intereses en los hallazgos reportados.

Agradecimientos

A AESKU.GROUP y VIBAG por el soporte brindado de reactivos e insumos para la realización del presente estudio.

REFERENCIAS

- WHO OMS, Environmental health criterio. 236. [En línea]. 2006. [Último acceso: 02 Julio 2017]. Available: <http://www.who.int/ips/publications/ehc/ehc236.pdf?ua=1>.
- La Rosa FC, Lozano FV. Prevalencia de anticuerpos antinucleares en personas aparentemente sanas. Lima-Perú. Rev Latinoamer Patol Clin. 2017; 64 (1): 8-13.
- Mora OC, Sampértegui DV. Lupus eritematoso sistémico: manifestaciones clínicas y criterios de laboratorio. [En línea]. 2016. [Último acceso: 19 Mayo 2017]. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/6308/1/12482.pdf>.
- Anaya JM. ¿Qué son las enfermedades autoinmunes y por qué son importantes? El Espectador, p. Sección Salud., 2017.
- Pérez FO. Prevalencia de las enfermedades autoinmunes en espondiloartropatías seronegativas y viceversa. [En línea]. 2011. [Último acceso: 28 Julio 2017] Disponible en: <http://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/2668/7185708-2011.pdf?sequence=1..>
- Fernández MT, Sánchez MC, Junco CR, Denises GG, Iglesias GI. Importancia diagnóstica de los anticuerpos antinucleares. Revista Cubana de Reumatología. 2016; 18 (2): 192-195.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality assurance or laboratory test for autoantibodies to nuclear antigens: 1. Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and 2. Microtiter Enzyme Immunoassay Methods. Approved Guideline. NCCLS. 2012; 26 (13).
- Carlos A, Zepeda J. Anticuerpos antinucleares. Una familia diversa. Revista Médica Hondureña. 2002; 70 (4): 189-193.
- Carballo O, Ingenito F, Ginaca A, Carabajal P, Costa M, Balbaryski J. Primer Consenso Argentino para la estandarización de la determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta-HEp-2. Scielo. 2012; 46 (1): 3-13.
- Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S et al. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. Mod Rheumatol. 2008; 18 (2): 153-160.
- Menor AR, Rodríguez GJ, Martín MM, Rodríguez VM, Aranda VC, De la Iglesia SJ. Asociación entre títulos de anticuerpos antinucleares y conectivopatías sistémicas en una Unidad de Reumatología. Reumatología Clínica. 2016; 13 (3): 150-155.
- Carpinelli MM, Giménez V, Ferreira L, Rovira C, Picagüa E, Granados E. Frecuencia de los patrones de anticuerpos antinucleares en pacientes con sospecha clínica de LES. Mem. Inst. Invest. Cienc. Salud 2010; 8 (2): 27-33.
- Choque HM, Sosa TL, Paz GM. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de IFI-ANA frente el ensayo inmunoenzimático para antígenos nucleares extractables (perfil ENA). Scielo. 2007; 1 (2): 17-22.
- Hernández RD, Cabiedes J. Immunological techniques that support the diagnosis of the autoimmune diseases. Reumatol Clin. 2010; 3: 173-177.
- Rivero JR. A look to laboratory diagnosis of autoimmune diseases. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2013; 29 (2): 1-17.
- Robles MA, Ramos CM. Interpretación de resultados. [En línea]. 2005. Disponible en: www.doyma.es/jano.
- Rigon A, Infantino M, Merone M, Lannello G, Tincani A, Cavazzana I et al. The inter-observer reading variability in anti-nuclear antibodies indirect (ANA) immunofluorescence test: a multicenter evaluation and a review of the literature. Autoimmun Rev. 2017; 16 (12): 1224-1229.
- Phetsouvanh R, Thojaikong T, Phoumin P, Sibounheuang B, Phommasone K et al. Inter-and intra-operator variability in the reading of indirect immunofluorescence assays for the serological diagnosis of scrub typhus and murine typhus. Am J Trop Med Hyg. 2013; 88 (5): 932-936.
- AESKU diagnostics, Inmunofluorescencia Guía, AESKU, 2015.
- Jörn Voigt, Christopher Krause, Edda Rohwäder et al. Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEp-2 Cells. Clinical and Developmental Immunology. 2012, Article ID 651058, 1-7.
- Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, Tonutti E, Bassettie D, Pesente F et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems. Autoimmun Rev. 2014; 13 (3): 292-298.
- Kivity S, Gilburd B, Agmon LN, Garcia CM, Tzafrir Y, Sofer Y et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. Clinical Rheumatology. 2012; 31 (3): 503-509.
- Bossuyt X, Coorema S, De Baere H, Verschueren P, Westhovens R, Blockmans D et al. Detection of antinuclear antibodies by automated indirect immunofluorescence analysis. Clin Chim Acta. 2013; 416 (415): 101-6.
- Meroni P, Bizzaro N, Cavazzana I, Orietta BM, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. BMC Medicine. 2014; 12: 38.
- Benítez CP, Rincón CO, Quintero J, Aristizábal B. Concordancia entre la determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia e inmunoensayo lineal. Medicina & Laboratorio 2011; 17 (9-10): 429-43.
- Copple SS, Sawitzke AD, Wilson AM, Tebo AE, Hill HR. Enzyme-linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence confirmation of antinuclear antibodies: a statistical analysis. Am J Clin Pathol. 2015; 135 (51): 678-84.
- Viera AJ, Garret M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Fam Med. 2005; 37 (5): 360-363.
- Cabiedes J, Núñez AC. Reumatología clínica. [En línea]. 2009. Disponible en: <http://www.elsevier.es>.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador, Lupus eritematoso sistémico (LES). Guía de Práctica Clínica, Quito: Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013.
- Toledo PS, Vivar N. Valores de Referencia de anticuerpos antinucleares en personas aparentemente sana. Quito-Ecuador. Rev Latinoamer Patol Clin. 2010; 57 (4): 190-195.
- Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson LM, Norris JM, De Roos AJ. Epidemiology of environmental exposures in humans autoimmune disease. Journal of Autoimmunity. 2012; 39 (4):259-71.
- Fairweather D, Rose NR. Women and Autoimmune Diseases. Emerg Infect Dis. 2004; 10 (11): 2005-2011.
- Brito Fde A, Santos SM, Ferreira GA, Pedrosa W, Gradišse J, Costa LC et al. Detection of anti-nuclear antibodies by indirect

- immunofluorescence on HEp-2 cells: setting the appropriate screening dilution for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. Rev Bras Reumatol. 2013; 54: 13-20.
34. Jardue AN, González Al. Immunopatogenia de las enfermedades autoinmunes. Revista Médica Clínica Condes. 2012; 23 (4): 464-472.
35. Bentow C, Fritzler MJ, Mumment E, Mahler M. Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: results from an international internet-based survey. Autoimmun Highlights. 2016; 7 (8): 1-7.
36. Kang SY, Lee WI. Clinical significance of dense fine speckled pattern in antinuclear antibody test using indirect immunofluorescence method. Korean J Lab Med. 2009; 29 (2): 145-51.
37. Malyavantham K, Suresh L. Analysis of DFS70 patterns and impact on ANA screening using a novel Hep-2 ELITE/DFS70 knockout substrate. Autoimmun Highlights. 2017; 8 (1): 3.
38. Bastías C, Sidgman GF, Rodríguez MC. Laboratorio de Inmunología en la Práctica Clínica. Revista Médica Clinica Condes. 2015; 26 (6): 712-820.

Correlation among two methods for glycated hemoglobin determination in diabetic Mexican patients for glycemic control

Correlación entre dos métodos de determinación de hemoglobina glicosilada en pacientes diabéticos mexicanos para control glucémico

Gastélum-Cano José María,*‡ García-Alcalá Héctor,‡§ Rodríguez-Gallegos Alma Belén,*‡
Fragoso-Flores Jaime,*‡ Vera-Balderas Ana María*

Keywords:

Glycated hemoglobin,
glycemic
control, capillary
electrophoresis,
ion exchange
chromatography,
diabetes mellitus.

Palabras clave:
Hemoglobina
glicosilada,
control glucémico,
electroforesis capilar,
cromatografía de
intercambio iónico,
diabetes mellitus.

ABSTRACT

Glycated hemoglobin (HbA_{1c}) is a molecule derived from the non-enzymatic union of glucose in the β chain of Hemoglobin (Hb) A of red blood cells proposed for the American Diabetes Association (ADA) as the best test to evaluate long term glycemic control. The precision in its determination is a very important issue. The objective of this study was to analyze correlation and to determine glycemic control classification concordance among two methods: Ion-Exchange High-performance Liquid Chromatography (IE-HPLC) and Capillary Electrophoresis (CE) using two commercial instruments. A total of 249 samples from diabetic patients (n) were tested for HbA_{1c} by both methods. Results were analyzed by correlation, Bland-Altman scatter plots and calculating CE's sensitivity (Sn), specificity (Sp), positive and negative predictive values (PPV and NPV) to identify glycemic control (HPLC $HbA_{1c} < 7\%$). The correlation was statistically significant ($r = 0.9906$, $p < 0.0001$), Kappa correlation 0.959 ($p < 0.05$); Bland-Altman plot analysis showed high level of agreement. CE Sn, SP, PPV and NPV were respectively: 98%, 98, 99% and 97%. Considerable differences in glycemic control classification were not observed. CE in Capillarys 2FP seems to be a good alternative method for HbA_{1c} measuring for glycemic control.

RESUMEN

La hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) es una molécula derivada de la unión no enzimática de glucosa en la cadena β de hemoglobina (Hb) A propuesta por la Sociedad Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés) como la mejor prueba para evaluar control glucémico a largo plazo. La precisión en su determinación es de gran importancia. El objetivo del presente estudio fue analizar correlación analítica y determinar concordancia en la clasificación de control glucémico de dos métodos: cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico (HPLC) y electroforesis capilar (EC). Se determinó HbA_{1c} de un total de 249 muestras (n) de pacientes diabéticos por ambos métodos. Se analizó correlación, gráficos de Bland-Altman y la sensibilidad (Sn) especificidad (Sp) y valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN) de EC para identificar pacientes controlados (HPLC $HbA_{1c} < 7\%$). El análisis de correlación fue estadísticamente significativo ($r = 0.9906$, $p < 0.0001$), Kappa de 0.959 ($p < 0.05$), el gráfico Bland-Altman muestra buena concordancia. Sn, Sp, VPP y VPN fueron, respectivamente, 98%, 98%, 99% y 97%. No se apreciaron diferencias considerables en la clasificación de control glucémico. Por lo cual, EC en Capillarys 2FP parece un buen método alternativo para determinación de HbA_{1c} para control glucémico.

* Laboratorios Ruiz.

‡ Universidad Popular
Autónoma del Estado
de Puebla.

§ Centro de
Hematología y
Medicina Interna.

Received:
20/02/2019
Accepted:
26/03/2019

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease characterized by carbohydrates, protein and lipids metabolism alteration. Four different diabetes categories are currently recognized by ADA: type 1 DM, type 2 DM, gestational diabetes and specific types of diabetes according to its general

classification.¹ Type 2 or non-insulin-dependent DM (T2DM), is characterized by insulin resistance and generally associated to abnormal secretion of this hormone.² Insulin resistance, is on the one hand, a result of prolongate exposure of cells to this molecule; resulting in decrease of intracellular signaling activation, and therefore, low physiological function.^{3,4}

Correspondence:
**Dr. José María
Gastélum-Cano**
 Department of Clinical Laboratory, Laboratorios Ruiz, S.A. Mártires del 2 de octubre 808, Anzures, 72530, Puebla, México.
 Tel. 2438100, ext. 273,
 Mobile: +52 (222)27942753
E-mail: jma.gastelumc@gmail.com

Nowadays, treatment of type 2 diabetic population include a non pharmacological approach, that involve changes in lifestyle as diet, physical activity and smoke cessation, along with pharmacologic support, that include oral hypoglycemic agents as biguanides, sulphonylureas, thiazolidinediones, alpha-glucosidase inhibitors, nonsulfonylurea insulin secretagogues, dipeptidyl peptidase-IV inhibitors, sodium glucose-linked transporter-2 inhibitors, Glucagon-like peptide-1 agonists and finally, when therapeutic goal can't be reached and in special cases, insulin.^{5,6}

In Mexico, T2DM has a very high prevalence according with the last national health & nutrition survey (9.2% in adults older than 20 years, and special affection in 60-69 years old population with 26.3%)⁷ and is the main cause of disabling complications during productive life,⁸ as blindness, lower limbs amputation, chronic kidney disease, renal insufficiency, vascular and cerebrovascular diseases. At the present, early disease detection and glycemic control, are the two proposed strategies for micro and macrovascular complication diminishing. Both of them, have proved effectiveness in many studies, mainly in delaying microvascular disease.⁹

The most important marker for early detection and glycemic control evaluation is glycated hemoglobin (HbA_{1c}), a non-enzymatic glycation product of hemoglobin A (Hb) β chain molecule.^{10,11} After first HbA_{1c} publications at later 70's, and due to the evidence about its utility in clinical field, it was included as most important test for glycemic control goals. Optimal value has varied little since then, being 7.0% (53 mmol/mol IFCC) the most accepted goal for suitable control. This HbA_{1c} value with regard of glycemic control, should be adequately to patients conditions as age, complications, hypoglycemia risk and time of evolution, oscillating around 7.5% (58 mmol/mol) as monitoring marker in diabetes.⁵

Owing to HbA_{1c} testing is indispensable for diabetes management, many assays were designed for its determination, which drove to an inaccuracy increasing. Because of this, in 1996 National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) was founded

as a regulator and standardization organism for HbA_{1c} assays and for their harmonization. In 2002, IFCC reference method for HbA_{1c} determination was released, based in High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (HPLC/MS) or HPLC/Capillary Electrophoresis (HPLC/CE) approaches which were basis for routine assays performance standardization around world and their traceability.¹²

In these days, great variety of commercial approved by United States Food and Drugs Administration (FDA) instruments, exists in market as well as diverse of methodologies for HbA_{1c} determination.¹³ Recently, CE for HbA_{1c} measuring has been introduced in world market, demonstrating reliability when compared with HPLC methods.^{12,14} Both of them have an additional advantage for determining Hb most common varieties with non or scarce interference, even though, some IE-HPLC have demonstrate interference with some of them.¹³

The objective of the present research was to analyze correlation among CE using Capillarys 2 Flex Piercing Sebia (Capillarys 2FP) and IE-HPLC in Bio-Rad D-10 Hemoglobin Testing System (D-10 System) instruments for HbA_{1c} measuring in Mexican diabetics patients, for concordance determination in glycemic control among CE and IE-HPLC as reference method, making use of ADA current classification^{1,5} looking for important differences.

To the knowledge of the authors, EC against IE-HPLC performance in these instruments has not been evaluated in diabetic Mexican population for glycemic control until this day.

MATERIALS AND METHODS

A total of 249 peripheral blood samples (n) drawn by venipuncture in EDTA K2 tubes for routine HbA_{1c} analysis were done, obtained from Mexican diabetes outpatients who attainted to control laboratory tests to Laboratorios Ruiz, Puebla, Mexico during January and February 2016. Such patients were subsequent and previously diagnosed with T2DM, reason for why were selected in order to study concordance among these two methods in glycemic control. Specimens analyzed in

this work were used according to internal protocols for research and under supervision of institutional authorities for ethical and compliance of Helsinki Declaration of 1975.

Study population was composed by 97 male (39%) and 152 female subjects (61%) with a median age of 58 years old and mean of 54 (\pm 15). Not all patients had fasting serum glucose in the same day that control studies were analyzed.

HbA_{1c} determination was done for all blood samples in primary tube in the same day of extraction, by IE-HPLC method in D-10 System and then, almost simultaneously, by CE in Capillarys 2FP.

D-10 System precision was determined by using first opinion control material Lymphocheck Diabetes Control® in two levels with Lot Number 33910; a 3.1% and 3.0% of coefficient of variation (CV) for level 1 and 2 (respectively), were obtained. Accuracy was evaluated by participation in Bio-Rad External Quality Assurance (EQAS) program®, registering satisfactory Z-Score of -1.8 and -0.73 for January and February, respectively. On the other hand, Capillarys 2FP instrument was subjected to an analytical protocol for imprecision, performing 2.55% and 1.79% CV in levels 1 and 2 (respectively) with target value of 3%. Then, another exercise was carried out for accuracy, obtaining a relative bias of 2.5 in level 1 and 1.74 in level 2 with target value of \leq 3.5%.

The results here obtained from both instruments were analyzed with Pearson correlation (R) and Bland-Altman graphic, done by statistics software MedCalc 12.5.0.0 (Ostend, Belgium). Additionally, Cohen's Kappa index was calculated by using SPSS 8.0 (Chicago, EUA) and a contingency table was done with Catmaker 1.1 (Oxford, England) for Sensibility (Sn) Specificity, Positive (PPV)

and Negative (NPV) Predictive Values for CE in glycemic control identification for diabetic patients (defined as HbA_{1c} < 7.0% o 53 mmol/mol), according to American Diabetes Association (ADA)⁵ for comparation to reference method (HPLC de IC D-10 System).

RESULTS

An R coefficient of 0.9906 ($p < 0.0001$) was obtained; it demonstrates a good correlation among two measuring series (figure 1). Bland-Altman graphic demonstrate that most of determinations were between agreement limits (-0.6733 a 0.4219), with narrow two standards deviation (SD) of \sim 1.1% (\sim 12.0 mmol/mol) HbA_{1c}, with mean differences (MD) among two methods of -0.13 (IC -0.1606 a -0.0908) and with aleatory scatter (figure 2).

Differences in glycemic control classification for IE-HPLC method in D-10 System and Capillarys 2FP is shown in table I. There can be observed a small difference of 1 from 249 patients, misclassified as uncontrolled by the last device.

When evaluating concordance for clinical stages in glycemic control, Sn y Sp of 98% (IC 95%; 96-100%), PPV of 99% and NPV of 97% (IC 95%; 97-100% for CE method by Capillarys 2FP instrument were obtained when comparing with reference method (table II). Furthermore, Cohen's Kappa index of 0.959 ($p < 0.05$) was shown. Hemoglobin variants were not detected among studied patients by none of these methods.

DISCUSSION

The confidence in method for HbA_{1c} determination is currently a basis in surveillance of diabetic patients and

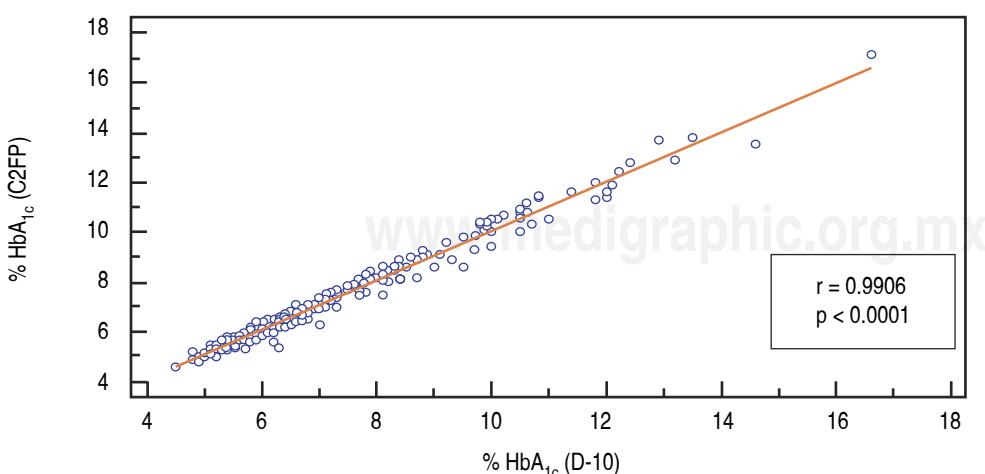


Figure 1.

Scatter diagram correlation among methods (CE and IE-HPLC) with Capillarys 2FP (C2FP) and D-10 System (D-10), respectively.

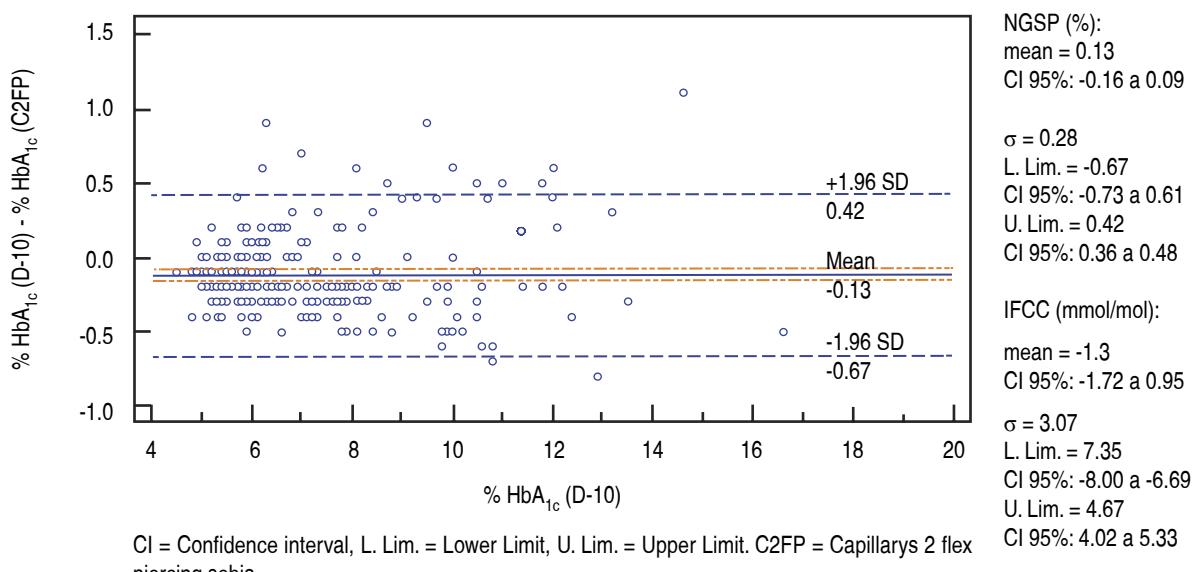


Figure 2. Bland-Altman Scatter diagram for CE and IE-HPLC comparison in capillarys 2FP (C2FP) and D-10 System (D-10), respectively.

Table I. Differences in glycemic control classification in diabetic patients according to ADA criteria.

% (mmol/mol)	HbA _{1c}			Difference		
	HPLC (n)	%	CE (n)	%	Patients	%
< 7.0 (< 53)	143	57.4	142	57.0	1	0.4
≥ 7.0 (≥ 53)	106	43.0	107	43.0	-1	-0.4
Total (n)	249	100.0	249	100.0		

$\chi^2 = 0.0$; p = 1.0000.

decision making for therapeutics. Almost all medical associations, mainly ADA and American Association of Clinical Endocrinologists, and their different algorithms, define HbA_{1c} < 7% (< 53 mmol/mol) as suitable glycemic control; even though, this goal should be adapted for each patient according to its clinical conditions. Starting from accomplishment of such therapeutic goal, is from decisions are taken and a prognostic is established.

Diversity of developed methods for HbA_{1c} measuring since DCCT study publishing, had as main consequence a poor correlation among them and reference method, which forced to establish a standardization in HbA_{1c} determination. In this context, studies as the here present, aid in decision making in HbA_{1c} new methods choosing.

The excellent correlation described in this work, among two methods agree with those reported in literature.¹⁵

Some discrepancies were observed, exhibiting positive values that surpass the superior limit of agreement, which can be appreciated in Bland-Altman graphic (figure 2). This suggests that in evaluated instruments, CE appear to underestimate occasionally HbA_{1c} values when comparing with IE-HPLC for unknown reasons. Moreover, mean difference among D-10 System and Capillarys 2FP (-0.13%), show a hardly positive bias, which can be corroborated in clinical classification (table I). Other works comparing CE with IE- HPLC in Tosoh G7 system, rather suggest a negative bias.¹⁶ Nonetheless, this can be a finding related with instrument and no to method.

Table II. Nosographic evaluation among methods.

		HbA _{1c} HPLC (D-10)	
		< 7.0 (53 mmol/mol)	≥ 7.0 (53 mmol/mol)
	n = 249		
HbA _{1c} CE (Capillarys)	< 7.0 (53 mmol/mol) ≥ 7.0 (53 mmol/mol)	140 3	2 104

*NGSP (IFCC): % (mmol/mol).

Table III. Potential interferences for the evaluated instruments.

Interference	D-10 System	C2FP
Frequent Hb variants (HbS, HbC, HbD, HbE)	No ²²	No ^{19,22,30,31}
HbF	No (\leq 10%) ²²	No (\leq 15%) ^{22,30,32}
β-thalassemia	No ²³	No ³²
Hb concentration	—	No (2.1-19.5 g/dL) ^{30,32}
Bilirubin	No (\leq 60 mg/dL) ^{33,34}	No (\leq 60 mg/dL) ^{17,30,32,35}
Triglycerides	No (\leq 6,000 mg/dL) ^{33,34}	No (\leq 2,890 mg/dL) ^{17,30,32,35}
Cholesterol	—	No (\leq 397.9 mg/dL) ¹⁷
Glucose	No (\leq 2,000 mg/dL) ³³	No (\leq 5,000 mg/dL) ¹⁷
Vitamin C	No (\leq 300 mg/mL) ³³	No (\leq 300 mg/mL) ^{17,35}
Total protein	No (\leq 21 g/dL) ³³	No (\leq 14.9 g/dL) ³⁵
Rheumatoid factor	No (\leq 750 IU/mL) ³³	No (\leq 1,076 IU/0mL) ³⁵
Acetylsalicylic acid	No (\leq 1,000 mg/dL) ³³	No (\leq 1,000 mg/dL) ³⁵

Otherwise, difference among two methods in glycemic control classification was in 1 of 249 patients, which is certainly, a minimal difference. Such disagreement looks like an acceptable thing when comparing the advantages that CE offers. When look at Sn, Sp, PPV y NPV for glycemic control by using CE, it can be observed that this new method has an excellent agreement when comparing with reference method. Is remarkable, due to the high NPV obtained, a scarce probability of a misdiagnose glycemic dyscontrol by this methodology in Capillarys 2FP (3%). To the knowledge of the authors, this comparison has not been made in the past.

Based on results, CE method by Capillarys 2FP looks like it accomplishes with similar analytic and clinical characteristics in glycemic control when comparing with IE-HPLC in D-10 System in Mexican diabetic patients. The differences here found, looks like minimal at analytic

level and agrees with results from other works related to other instruments correlation with the same methods, in which Capillarys 2FP is used, and concludes that this latter, CE by this device is a suitable one for de HbA_{1c} quantification.¹⁵⁻¹⁷

It has been documented before, that CE by using Capillarys 2FP is, besides being suitable for HbA_{1c}, so it is for other analytes such as serum protein electrophoresis and Hb variants. Further, HbA_{1c} determination by this instrument is not interfered by most of common Hb variants^{15,18} or total Hb concentration.¹⁹ Whereas instruments based in IE-HPLC for HbA_{1c} determination have demonstrated being interfered by some of these, overestimating or underestimating real concentration.^{13,16,18}

At least, 14 Hb variants have been described in Mexico,²⁰ the most frequent is HbS as a result of African-

Mexican miscegenation. The frequency of this latter is widely variant in order of the geographical zone; mainly in some communities in east (4.11%)²¹ and west coasts of Mexico, where it is estimated that there are places where prevalence is as high as in some African regions.²¹ Given this, it is imperious having a methodology for HbA_{1c} determination not being interfered by Hb variants. In our institution, some of these variants have been detected in routine HbA_{1c} measuring (data not shown).

As far as is known, evaluated instruments in this work, are not interfered by most common Hb variants (HbS, HbC, HbD, HbE). The only difference is in HbF case; where Capillarys 2FP is able to measure HbA_{1c} confidently as high values as 15%; unlike its homologue, that show impairment after 10% of HbF.²² HbA_{1c} determination in these devices, has not been interfered neither by β-thalassemia.^{19,23} Other researches have proved these instruments against less frequent Hb variants, concluding that D-10 System do not show interference by many of them.²⁴ Albeit, contrary evidence about interference exists for some of such rare variants in this instrument,²⁵⁻²⁸ reason for why still being an active field of study. *Table III* show characteristics for both of these analyzers against some common interferences in HbA_{1c} determining.

On the other hand, CE by Capillarys 2FP allows a trustworthy determination of samples stored in refrigeration (4 °C) up to 7 days after collected.²⁹ Whereas that experimentally, samples stability has been observed is not threatened up to 4 days at room temperature (25 °C), which is a reasonable time lapse for samples shipment.¹⁷

Moreover, for best determining of convenience for the use of one or the other; it is appropriate to additionally make a cost-benefit evaluation, as no research of this type is available in literature, as far as authors know, and such goals are out from those set for the present work.

According to the results here obtained, it looks suitable using one method or the other with the evaluated instruments. No considerable differences among them were observed in glycemic control. For that reason, CE by Capillarys 2FP seems to be a very good alternative for HbA_{1c} determination for Mexican diabetes patients by virtue of its comparable Sn and Sp when compared with reference method, and due to its scarce probability of glycemic decontrol underestimation; in addition, to its technical advantages previously discussed.

Authors contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting

or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' disclosures or potential conflicts of interest:

Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest: None.

Research funding: Research was financed by Laboratorios Ruiz own resources for investigation.

REFERENCES

- American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes 2018. *Diabetes Care*. 2018; 41: S13-S27. doi: 10.2337/dc18-S002.
- Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci*. 2007. doi: 10.1007/s12038-007-0038-8.
- Zick Y. Insulin resistance: A phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol*. 2001. doi: 10.1016/S0962-8924(01)02129-8.
- Paz K, Hemi R, LeRoith D et al. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997. doi: 10.1074/jbc.272.47.29911.
- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2018 Abridged for Primary Care Providers. *J Clin Appl Res Educ*. 2018; 41 (Supplement 1): S1-S159. doi: 10.2337/dc13-S011.
- Vijan S. Type 2 diabetes. *Ann Intern Med*. 2010. doi: 10.7326/0003-4819-152-5-201003020-01003.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco JA, Shamah-Levy T et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. 2a. ed. Inst Nac Salud Pública. 2013. doi: 10.4206/agrosur.1974.v2n2-09.
- Herrington WG, Alegre-Díaz J, Wade R et al. Effect of diabetes duration and glycaemic control on 14-year cause-specific mortality in Mexican adults: a blood-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018; 6 (6): 455-463. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30050-0.
- Sattar N, Preiss D. HbA1cin type 2 diabetes diagnostic criteria: addressing the right questions to move the field forwards. *Diabetología*. 2012; 55 (6): 1564-1567. doi: 10.1007/s00125-012-2510-8.
- Shapiro R, McManus MJ, Zalut C, Bunn HF. Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J Biol Chem*. 1980; 255 (7): 3120-3127.
- Penttilä I, Penttilä K, Holm P et al. Methods, units and quality requirements for the analysis of haemoglobin A 1c in diabetes mellitus. *World J Methodol*. 2016; 6 (2): 133. doi: 10.5662/wjm.v6.i2.133.
- Jeppsson J-O, Kobold U, Barr J et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40 (1): 78-89. doi: 10.1515/CCLM.2002.016.
- Rhea JM, Molinaro R. Pathology consultation on HbA1c methods and interferences. *Am J Clin Pathol*. 2014; 141 (1): 5-16. doi: 10.1309/AJCPQ23GTTMLAEVL.
- Herpol M, Lanckmans K, Van Neyghem S et al. Evaluation of the Sebia Capillarys 3 Tera and the Bio-Rad D-100 systems for the measurement of hemoglobin A1c. *Am J Clin Pathol*. 2016; 146 (1): 67-77. doi: 10.1093/ajcp/aqw081.

15. Dessi M, Pieri M, Pignalosa S, Martino FG, Zenobi R. Performances of capillary electrophoresis and HPLC methods in HbA1c determination: diagnostic accuracy in HbS and HbD-Iran variants' presence. *J Clin Lab Anal.* 2015; 29 (1): 57-60. doi: 10.1002/jcla.21728.
16. Klingenberg O, Furuset T, Hestbråten CR et al. HbA1c analysis by capillary electrophoresis—comparison with chromatography and an immunological method. *Scand J Clin Lab Invest.* 2017; 77 (6): 458-464. doi: 10.1080/00365513.2017.1338747.
17. Wu X, Chao Y, Wan Z et al. A comparative evaluation of the analytical performances of Capillarys 2 flex piercing, tosoh HLC-723 G8, premier Hb9210, and roche cobas c501 tina-quant gen 2 analyzers for HbA1cdetermination. *Biochem Medica.* 2016; 26 (3): 353-364. doi: 10.11613/BM.2016.039.
18. Lin CN, Emery TJ, Little RR, et al. Effects of hemoglobin C, D, E, and S traits on measurements of HbA1c by six methods. *Clin Chim Acta.* 2012; 413 (7-8): 819-821. doi: 10.1016/j.cca.2011.12.019.
19. Urrechaga E. High-resolution HbA 1c separation and hemoglobinopathy detection with capillary electrophoresis. *Am J Clin Pathol.* 2012; 138 (3): 448-456. doi: 10.1309/AJCPVYW9QZ9EVFXI.
20. Cobián JC, Sánchez-López JY, Magaña MT, Chávez ML, Perea FJ, Ibarra B. Types and frequencies of hemoglobin disorders in the pacific coast of four states of Mexico. *Rev Investig Clin.* 2009.
21. Ruiz-Reyes G. Abnormal hemoglobins and thalassemias in Mexico. *Rev Invest Clin.* 1998.
22. National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). HbA1c Assay Interferences. [Accessed 5 November 2018] <http://www.ngsp.org/interf.asp>.
23. Chandrashekhar V. Hb A1c Separation by high performance liquid chromatography in hemoglobinopathies. *Scientifica (Cairo).* 2016; 2016: 1-5. doi: 10.1155/2016/2698362.
24. Little RR, La'Ulu SL, Hanson SE, Rohlfing CL, Schmidt RL. Effects of 49 different rare Hb variants on HbA1c measurement in eight methods. *J Diabetes Sci Technol.* 2015; 9 (4): 849-856. doi: 10.1177/1932296815572367.
25. Gupta M, Datta P, Rao P. Haemoglobin hope: a rare Hb variant causing spuriously elevated HbA1c Values on HPLC Assay. 2016: 1-3. doi: 10.7860/NJLM/2016/14873.
26. Chakraborty S, Chanda D, Gain M, Krishnan P. Interference of the hope hemoglobin with hemoglobin A1c results. *Lab Med.* 2015; 46 (3): 221-225. doi: 10.1309/LME82XNY6SYVWDYQ.
27. Dimeski G, Pretorius CJ, Russell AW, Miller SP, Bird RJ, Ungerer JPJ. A case of discordant HbA1c: A method-dependent error. *Med J Aust.* 2009; 191 (6): 347-349. doi: dim10266_fm [pii].
28. Kim, Jong Taek Winter E. William, Hong-yuan Luo, Chui David HN. Interference of hemoglobin A1c due to hemoglobin franklin park. *J Appl Lab Med.* 2018; 03 (05): 1-3.
29. Sebia. Capillarys Hb A1c Using the Capillarys 2 flex-piercing instrument.
30. Jaisson S, Leroy N, Meurice J. First evaluation of Capillarys 2 Flex Piercing® (Sebia) as a new analyzer for HbA1c assay by Capillary electrophoresis. *Clin Chem Lab Med.* 2012; 50 (10): 1769-1775. doi: 10.1515/cclm-2012-0017.
31. Baroncini D, Zaffaroni M, Moiola L et al. Long-term follow-up of pediatric MS patients starting treatment with injectable first-line agents: A multicentre, Italian, retrospective, observational study. *Mult Scler J.* 2018; 1-9. doi: 10.1177/1352458518754364.
32. Urrechaga E. High-resolution HbA1cseparation and hemoglobinopathy detection with capillary electrophoresis. *Am J Clin Pathol.* 2012; 138 (3): 448-456. doi:10.1309/AJCPVYW9QZ9EVFXI.
33. Food and Drugs Administration. Decision Memorandum Assay and Instrument Combination Template k161681. [Accessed January 19, 2019] https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K161687.pdf.
34. Marzullo C, Minery M. abc Évaluation de l'analyseur D10® pour le dosage. 2008; 66 (1): 95-99.
35. Food and Drugs Administration. Decision Memorandum Assay and Instrument Combination Template k171861. [Accessed January 19, 2019] https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K171861.pdf.

Disseminated coccidioidomycosis with giant coccidioidoma of the suprarenal gland. Autopsy case report

Coccidioidomycosis diseminada con coccidioidoma gigante de la glándula suprarrenal. Reporte de caso de autopsia

Lazos-Ochoa Minerva,* Tovar-Echavarri Mariana,* Romero-Cabello Raúl,^{‡,§}
Romero-Feregrino Raúl^{§,||}

Keywords:

Coccidioidomycosis,
coccidioides immitis,
coccidioides posadasii,
coccidioidoma.

Palabras clave:

Coccidioidomycosis,
coccidioides immitis,
coccidioides posadasii,
coccidioidoma.

ABSTRACT

Coccidioidomycosis is an endemic systemic mycosis produced by *Coccidioides*. The fungus is endemic to arid zones of North America. Two species with infectious potential are known: *Coccidioides immitis*, responsible for infections in the states of California, Texas, Arizona, and New Mexico (USA) and *Coccidioides posadasii*, endemic to the deserts of northern Mexico. We present a case of disseminated coccidioidomycosis, with a coccidioidoma of the left suprarenal gland studied at Hospital General de México «Dr. Eduardo Liceaga». In cases of primary hematogenous dissemination, it is more common for the course of the disease to have a fatal outcome; such cases are associated with factors of immunocompromise. In conclusion, coccidioidomycosis is very uncommon in its disseminated form. The formation of fungal balls is not exclusive to the lungs, since it can be found in any infected organ, even in the suprarenal gland.

RESUMEN

La coccidioidomycosis es una micosis sistémica endémica producida por los coccidioides. El hongo es endémico de las zonas áridas de América del Norte. Se conocen dos especies con potencial infeccioso: *Coccidioides immitis*, responsable de las infecciones en los estados de California, Texas, Arizona y Nuevo México (EE.UU.) y *Coccidioides posadasii*, endémica de los desiertos del norte de México. Presentamos un caso de coccidioidomycosis diseminada, con un coccidioidoma de la glándula suprarrenal izquierda estudiado en el Hospital General de México «Dr. Eduardo Liceaga». En los casos de diseminación hematogéna primaria, es más común que el curso de la enfermedad tenga un resultado fatal; tales casos están asociados con factores de compromiso inmunológico. En conclusión, la coccidioidomycosis es muy poco común en su forma diseminada. La formación de bolas fúngicas no es exclusiva de los pulmones, ya que se encuentra en cualquier órgano infectado, incluso en la glándula suprarrenal.

INTRODUCTION

Coccidioidomycosis is an endemic systemic mycosis produced by dimorphous fungi of the genus *Coccidioides*, which infect humans and other species through inhalation in the form of arthroconidia. The fungus is endemic to arid zones of North America.^{1,2} Two species with infectious potential are known: *Coccidioides immitis*,

responsible for infections in the states of California, Texas, Arizona, and New Mexico (USA) and *Coccidioides posadasii*, endemic to the deserts of northern Mexico.³ Sixty percent of *Coccidioides* infections are asymptomatic and indistinguishable from an upper respiratory tract infection; the other 39% develop a symptomatic pulmonary primoinfection and only 1% present disseminated extrapulmonary

* Pathology Service.
Hospital General de México «Dr. Eduardo Liceaga». UNAM Medical School.

† Infectology Service.
Hospital General de México «Dr. Eduardo Liceaga». Microbiology and Parasitology.

UNAM Medical School.

§ Instituto para el Desarrollo Integral de la Salud.

|| Saint Luke Medical School.

Received:
08/02/2019
Accepted:
10/04/2019

Correspondence:
Dr. Raúl Romero Feregrino
Av. Cuauhtémoc 271
int 101, Col. Roma,
Alcaldía Cuauhtémoc,
06700, Ciudad de
México. Tel: 1 52 55
5584-0843
E-mail:
drraulromeroferegrino
@hotmail.com

infection, primarily affecting the central nervous system, skin, bones, and joints.^{4,5} In its saprophytic phase, the fungus is inhaled in the form of arthroconidia which, when they infect the host, form spherules with endospores, which are released. It is possible to identify different parasitic forms which include hyphae, arthroconidia, and coccidioidomas, although the latter are very rare.⁴ We present a case of disseminated coccidioidomycosis, with a coccidioidoma of the left suprarenal gland studied at Hospital General de México «Dr. Eduardo Liceaga».

CLINICAL SUMMARY

Background: Diabetes mellitus of two months' evolution, with irregular treatment. Smoking of 20 years' evolution at a rate of six cigarettes a day. Fall from his own height in June 2016 without needing hospitalization.

Final condition: Onset three months prior to hospitalization, with sudden deterioration of alert state, ataxia, dyslalia, speech impediment and holocranial headache which did not cede with analgesics. A week before admission, patient presented loss of bowel control and visual hallucinations, for which he went to a hospital, where he was admitted for six days with evaluation by the Psychiatric Service, who diagnosed him with psychotic break and prescribed haloperidol and risperidone without improvement. A second evaluation was sought from a private physician, who suspected probable infectious or metabolic etiology and requested cranial tomography, in which no alterations were observed. Under these conditions, the patient was admitted to Hospital General de México «Dr. Eduardo Liceaga».

Physical exploration at admission

Vital signs: blood pressure 100/70 mmHg, heart rate 98 bpm, respiratory rate 40 rpm. Male patient 69 years of age, cachectic, with pallidity of skin and teguments, without central cyanosis, nostrils permeable, oral mucosa dehydrated, anisocoria with left mydriasis; pupillary, consensual, and

photomotor reflex preserved. Precordial area with rhythmic cardiac sounds of adequate intensity, without aggregates. Thorax with bilateral lung crackles, predominantly left in the interscapular vertebral region, without sibilance. Abdomen flat, depressible, without signs of peritoneal irritation, no palpable organ enlargement or tumors. Glasgow 14, disoriented in time, place, and person, with incomprehensible speech.

Evolution and treatment

Patient was admitted to the emergency ward with clinical diagnosis of probable neuroinfection. During his stay in the service, a chest X-ray was taken, which showed the presence of multiple disseminated micronodular lesions, based on which miliary tuberculosis was suspected. He was referred to the Pneumology Service, where he experienced deterioration of respiratory function for which advanced airway management was instituted. He was transferred to Pneumological Intensive Care, where he presented with signs of adult respiratory distress syndrome and a new cranial tomography was taken, which reported no abnormal findings. Lumbar puncture was performed for mycobacterial culture, direct examination of fungi, fungal cultures, cytological and cytochemical



Figure 1. Lungs with nodules irregularly distributed in all lobes.



Figure 2. Left lung with bronchiectasis predominantly in the upper lobe.



Figure 3. Left lung with a cavern in the lower lobe.

studies, which diagnosed probable mycobacterial etiology. Treatment was instituted with DOTBAL and antifungal treatment with amphotericin B. Patient presented with drop in blood pressure, absence of

respiratory sounds with right tension pneumothorax, for which an emergency endopleural catheter was placed; however, he presented irreversible cardiorespiratory arrest.

Laboratory and examining room tests

Blood chemistry: 18.10.16: glucose 196 mg/dL, urea 39 mg/dL, creatinine 0.8 mg/dL, uric acid 1.6 mg/dL.

Blood biometry: 18.10.16: leukocytes $3.5 \times 10^3/\mu\text{L}$,



Figure 4. Ventral surface of the brain with thickening of the leptomeninges.



Figure 5. Brain stem with leptomeningeal thickening that compresses nerves.

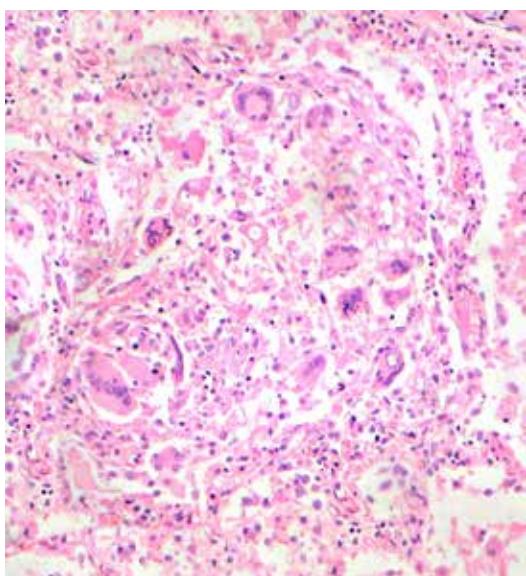


Figure 6. Lung with granulomas with multinucleated giant cells that have phagocytosed microorganisms.

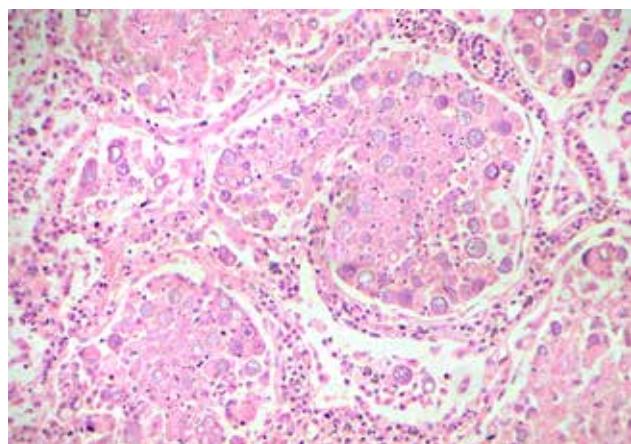


Figure 7. Lung with air spaces occupied by numerous spherules with endospores of *Coccidioides* spp.

neutrophils 83%, hemoglobin 11.7 g/dL, hematocrit 24.4%, platelets $180 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Final clinical diagnose

Septic shock with pulmonary focus.
Probable disseminated tuberculosis.
Probable disseminated coccidioidomycosis.
Severe ARDS.
Right tension pneumothorax.

Summary of autopsy

The autopsy found increased weight of the lungs. On the pleural surface, multiple light gray nodules were observed, measuring $0.5 \times 0.5 \times 0.1$ cm with well-defined limits, distributed irregularly in both lungs; in slices, similar lesions were observed with caseous appearance distributed throughout the pulmonary parenchyma (Figure 1). In the upper lobe of the right lung, bronchiectasis and bronchiolectasias were found (Figure 2) and the lower left lobe presented a pitted

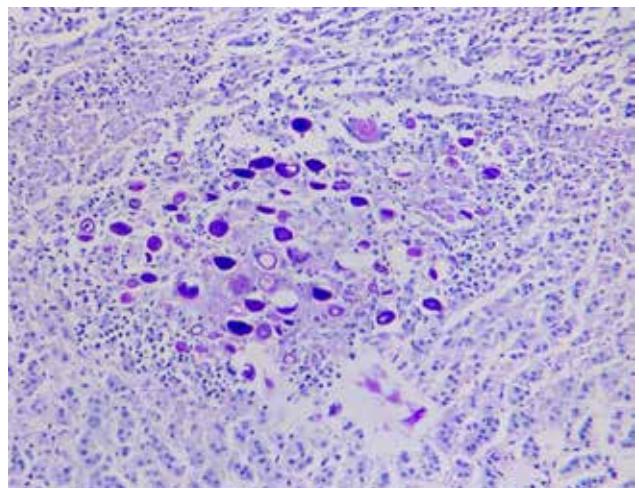


Figure 8. Liver with granulomas among which numerous spherules are identified.

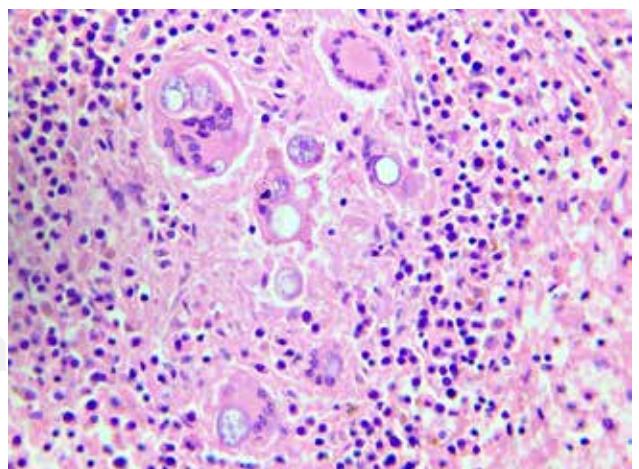


Figure 9. Spleen with granulomas with Langhans giant cells and foreign body reaction associated with spherules with endospores.

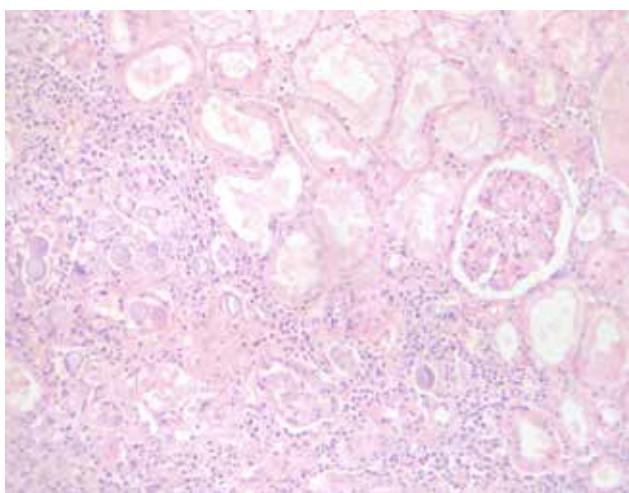


Figure 10. Kidney with numerous microorganisms in the interstitium.



Figure 11. Left adrenal coccidioidoma.

area measuring $4.2 \times 3.5 \times 3.3$ cm, with subpleural localization and heterogeneous inner surface with hemorrhagic areas alternating with areas of caseous appearance (Figure 3).

In the encephalon, the arachnoidea was opaque, grayish white in color, with bilateral frontoparietal predominance and leptomeningeal thickening of the ventral surface (Figures 4 and 5), surrounding and compressing the cranial nerves and circle of Willis.

The microscopic study observed, in the lungs (Figures 6 and 7), thoracic lymph nodes, liver (Figure 8), spleen (Figure 9), thyroid gland, kidneys (Figure 10), and leptomeninges, the architecture altered by numerous granulomas with multinucleated foreign body and Langhans giant cells in response to the presence of numerous spherules measuring 20 μm in diameter on average, with double basophil layer, within some of which endospores corresponding to fungal microorganisms of the genus *Coccidioides* spp. are preserved in their pathogenic levaduriform phase, even observing the phenomenon of endospore expulsion.

The left suprarenal gland was prominent, presenting a nodular lesion, with expansive edges, measuring $4 \times 3 \times 3$ cm, light gray in color, with hard consistency, which was provisionally diagnosed as an «atypical» adenoma (Figure 11); however, histologically it was made up by granulomas, caseous necrosis, and multiple spherules with endospores positive to periodic acid-Schiff (Figures 12 and 13) and Grocott staining (Figure 14) similar to those described in other organs.

With these data, we diagnosed systemic coccidioidomycosis affecting lungs, lymph nodes, liver, spleen, thyroid gland, kidneys, and leptomeninges with left suprarenal coccidioidoma.

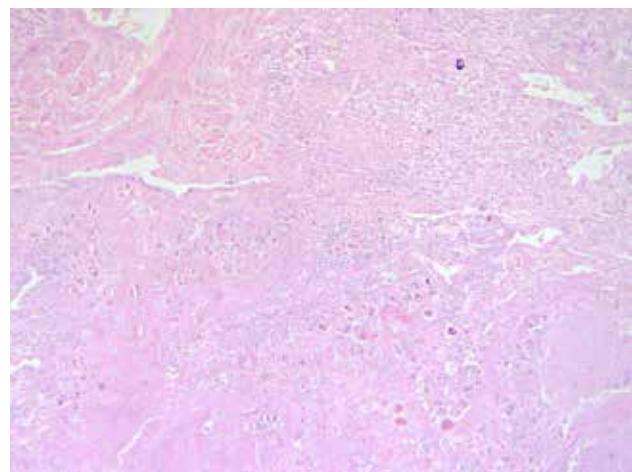


Figure 12. Adrenal gland with extensive areas of caseous necrosis and numerous microorganisms.

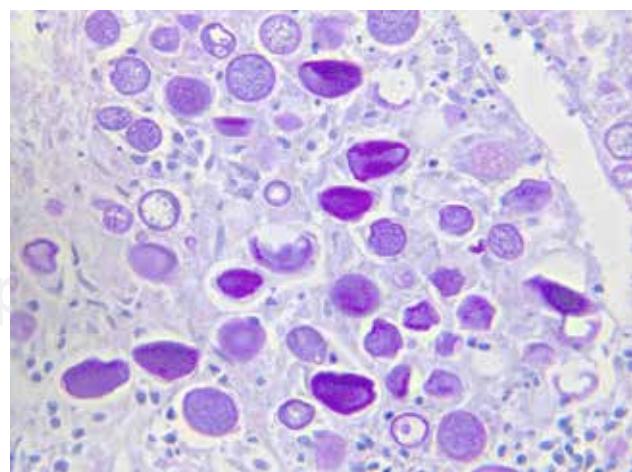


Figure 13. Empty spherules and others with endospores.

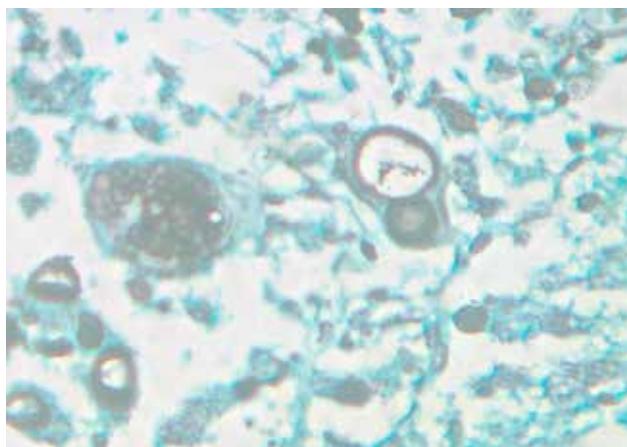


Figure 14. Spherule releasing endospores.

DISCUSSION

One third of coccidioidomycosis infections are symptomatic, mostly presenting as pneumonia. In cases of primary hematogenous dissemination instead of classic pulmonary infection, it is more common for the course of the disease to have a fatal outcome; such cases are associated with factors of immunocompromise such as: human immunodeficiency virus infection (low CD4 T lymphocyte count < 200 u/L), systemic corticosteroid therapy, lymphoid neoplasms, autoimmune disease, pregnancy, and diabetes.^{5,6}

As regards predisposition based on ethnicity, a higher incidence has been documented in black and Philippine males; it is uncommon in Latinos, unless they have a risk factor, which in most cases is diabetes mellitus. Diagnosis is often delayed because serological tests in severely immunocompromised patients are usually negative; studies commonly used to confirm diagnosis are culture and histopathology after bronchoscopy.⁶

Histopathologically, three weeks after infection an inflammatory response begins based on classic granulomas with epithelioid cells, caseous necrosis, and lymphoplasmacytic infiltrate, accompanied by spherules with endospores in their interior. When the infection is chronic, the granulomas are surrounded by collagen fibers.¹ In our case, blood sugar levels remained high and the patient was unaware he was diabetic until two months before his death. Due to such immunosuppression, the clinical form of presentation included neurological symptoms due to arachnoidal dissemination and miliary lung disease, which are manifestations with poor prognosis.

The anatomopathological forms of presentation of coccidioidomycosis are varied and are divided in typical (spherules) and atypical (mycelia); however, the latter have been seen more often in chronic lung disease of 8 months' to 2.5 years' evolution and with comorbidities like type 2 diabetes mellitus, which favor the growth of all the parasitic forms of the fungus. From both a clinical and histopathological standpoint, several forms of presentation of *Coccidioides sp.* have been found: a) spherules/endospores in varying degrees of maturation, b) septate hyphae and pleomorphic cells, c) arthroconidia (rectangular, ovoid, or barrel-shaped) and d) balls of fungi (coccidioidomas).⁷ In this case, histopathologically, two of the forms described were found: spherules with endospores and a suprarenal coccidioidoma.

From a radiographic standpoint, pulmonary coccidioidomycosis has different categories: 1) bronchopneumonia, acute and persistent with chronic fibrocavitory disease, 2) cavities, 3) hilar adenopathy, 4) nodules (coccidioidoma), which are usually associated with cavitations.⁸ In this case we found fibrocavitory disease, miliary disease, and hilar adenopathy.

Visceral compromise by this fungus is rare, the organs involved are commonly those of the genital tract, liver, spleen, peritoneum, and even the heart.^{1,5} The suprarenal gland is a site rarely affected by mycotic diseases; however, some cases have been described where they are accompanied by disseminated mycoses. Such cases involve other fungi like *Paracoccidioides sp.*, which has a high affinity for the suprarenal gland, with an incidence of 85-90% in autopsy studies, *Histoplasma sp.* (a published case), *Blastomyces sp.*, and *Cryptococcus sp.*,^{9,10} which have even formed lesions so large that their primary differential diagnosis is neoplastic, as occurred in this case.

In conclusion, coccidioidomycosis is very uncommon in its disseminated form. The formation of fungal balls or coccidioidomas is not exclusive to the lungs, since it can be found in any infected organ, even in the suprarenal gland, which has very scant affinity for the fungus.

REFERENCES

1. DiCudo DJ. Coccidioidomycosis: A review and update. J Am Acad Dermatol. 2006; 55 (6): 929-42.
2. Negroni R, Arechavala A, Maiolo E. Coccidioidomycosis. Med Cutan Iber Lat Am. 2010; 38 (5): 179-88.
3. Stockamp NW, Thompson GR. Coccidioidomycosis. Infect Dis Clin North Am. 2016; 30 (1): 229-46.
4. Twarog M, Thompson GR. Coccidioidomycosis: Recent Updates. Sem Resp Crit Care Med. 2015; 36 (5): 746-55.

5. Herrera LE, Gómez V, Blanhir JEM. Coccidioidomycosis: Serie de casos. 2006; 65 (4): 206-13.
6. Adam RD, Elliott SP, Taljanovic MS. The spectrum and presentation of disseminated coccidioidomycosis. Am J Med. 2009; 122: 770-77.
7. Muñoz-Hernández B, Palma-Cortés G, Cabello-Gutiérrez C, et al. Parasitic polymorphism of *Coccidioides* spp. BMC Infectious Diseases. 2014; 14 (1): 213.
8. Winn RE, Johnson R, Galgiani JN et al. Cavitary Coccidioidomycosis with Fungus Ball Formation. Chest. 1994; 105 (2): 412-16.
9. Wagner G, Moertl D, Eckhardt A et al. Chronic Paracoccidioidomycosis with adrenal involvement mimicking tuberculosis. A case report from Austria. Medical Mycology Case Reports. 2016; 14: 12-16.
10. Pereira G, Lanzoni V, Beirao E et al. Disseminated fungal infection with adrenal involvement: Report of two HIV negative brazilian patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015; 57: 527-30.

Expresión genotípica de la CYP3A4 en trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa, Venezuela

Genotypic expression of CYP3A4 in workers exposed to inhibitor pesticides of the cholinesterase, Venezuela

Palabras clave:
Exón; CYP3A4,
plaguicidas,
exposición,
biomarcadores.

Keywords:
Exon; CYP3A4,
pesticides, exposure,
biomarkers.

* Unidad de Toxicología Molecular (UTM). Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Venezuela.

† Doctorado Individualizado. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

§ Centro de Biofísica y Neurociencias, CBN-UC. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Venezuela.

|| Instituto de Ingeniería Biológica y Médica. Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

¶ Departamento de Microbiología. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Universidad de Carabobo. Venezuela.

Recibido:
25/03/2019
Aceptado:
30/04/2019

RESUMEN

Los plaguicidas son responsables de un elevado número de casos de intoxicación, provocando cáncer u otros trastornos. Se realizó un estudio descriptivo-correlacional entre los meses de junio y octubre de 2017 en la Colonia Tovar, estado Aragua, Venezuela, para identificar la prevalencia de sintomatología persistente asociada con exposición a plaguicidas y su relación con los niveles de colinesterasa sanguínea, parámetros hematológicos, bioquímicos de funcionamiento renal-hepático y la expresión genotípica de la CYP3A4. La muestra estuvo representada por 20 trabajadores ocupacionalmente expuestos y un grupo control de 10 sujetos no expuestos. Se realizó análisis de laboratorio clínico y molecular mediante la técnica de PCR. Los resultados más relevantes señalan diferencias estadísticamente significativas de las manifestaciones clínicas y parámetros hematológicos entre grupos expuestos y no expuestos; la expresión de los exones CYP3A4-F y CYP3A4-K del grupo expuesto mostró diferencias estadísticamente significativas y una geolocalización con una densidad aumentada de pacientes expuestos con expresión. Estos resultados de densidad podrían ser el resultado de una mayor exposición a plaguicidas en estas áreas, de una mayor agrupación de estos pacientes o de una combinación de ambos factores, pero en cualquiera de estas situaciones se requiere evaluar la posibilidad de reubicación de los sitios de vivienda.

ABSTRACT

Pesticides are responsible for a high number of cases of poisoning, causing cancer or other disorders. A descriptive-correlational study was conducted between the months of June and October 2017 in Colonia Tovar-Aragua State, Venezuela; to identify the prevalence of persistent symptomatology associated with exposure to pesticides and its relationship with blood cholinesterase levels, hematological parameters, renal-hepatic function biochemicals and genotypic expression of CYP3A4. The sample was represented by 20 workers occupationally exposed; and a control group of 10 subjects not exposed. Clinical and molecular laboratory analysis was performed using the PCR technique. The most relevant results indicate, statistically significant differences of the clinical manifestations and haematological parameters between exposed and non-exposed groups; Expression of exons CYP3A4-F and CYP3A4-K of the exposed group showed statistically significant differences and a geolocation with an increased density of exposed patients with expression. These density results could be the result of a greater exposure to pesticides in these areas, a greater grouping of these patients or a combination of both factors, but in any of these situations it is necessary to evaluate the possibility of relocation of housing sites.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son los responsables de un elevado número de casos de intoxicación y pueden provocar cáncer, efectos neurotóxicos y teratogénicos en la población no expuesta

ocupacionalmente.^{1,2} Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC), ha relacionado de manera no constante el uso de plaguicidas con una serie de efectos a largo plazo.^{2,3}

Correspondencia:
Sharim Marrero
 Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Bioanálisis. Unidad de Toxicología Molecular (UTM), Universidad de Carabobo, Venezuela.
 Tel: +58 416 6482689
 E-mail: smarrero@uc.edu.ve; sharimmarrerob@hotmail.com

Durante años se ha promovido la venta de plaguicidas sin informar adecuadamente el riesgo inherente a su uso; además, algunos de ellos son considerados compuestos orgánicos persistentes (COP). Por ello, el Convenio de Estocolmo⁴ fue el primer gran paso, a este convenio le siguieron otros también internacionales como el de Rotterdam, Basilea y, por último y más reciente, el Código de Conducta para la Distribución y Uso de Plaguicidas.^{1,5,6}

Los principales plaguicidas utilizados hoy día en los países desarrollados pertenecen al grupo de los carbamatos, organofosforados (OF), tiocarbamatos y piretroides.⁶⁻⁸

El conocimiento de las interacciones entre los agentes presentes en el medio ambiente y el hombre ha ido adquiriendo gran relevancia; por tal motivo, la forma en que el organismo humano responde a la exposición de plaguicidas como xenobióticos presenta una gran variación interindividual, debido en parte a alteraciones en el metabolismo de los mismos. Una de las principales enzimas implicadas en este metabolismo es el citocromo P450 (CYP); dentro de esta familia se encuentra la isoforma CYP3A4, la cual cataliza el metabolismo oxidativo a nivel hepático y está implicada en la bioactivación y la detoxificación de inhibidores de la colinesterasa, la cual, dependiendo del compuesto base del plaguicida y su concentración, puede generar subproductos que contribuyen a la toxicidad.⁴ Se ha sugerido que la expresión de CYP3A4 puede modificarse ante la exposición a plaguicidas.^{9,10}

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en su informe 2015-2030 indica que «el uso de plaguicidas se ha incrementado considerablemente a lo largo de los últimos 35 años...». En los países desarrollados, su uso se restringe cada vez más mediante leyes e impuestos y en el futuro se espera que el uso de plaguicidas «inteligentes», el manejo de la agricultura climáticamente inteligente (CSA), variedades de cultivos resistentes y métodos ecológicos de control de plagas (manejo integrado de plagas) logren el objetivo final de reducir la dependencia de los plaguicidas.^{5,11,12} Sin embargo, durante la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (COP23) en 2017, la FAO indicó que la población mundial

crecerá en 2,000 millones de habitantes para el año 2050, por lo que la producción agrícola tendrá que aumentar 60% para poder mitigar la pobreza y adaptarse al cambio climático y, por ende, el incremento en el uso de plaguicidas será mayor.^{1,11,12} A partir de la COP24 en Katowice en 2018, la FAO ayuda a los países a garantizar que se establezcan vínculos para adoptar medidas para combatir el cambio climático y sus efectos.¹³

Resulta oportuno comentar que el número de trabajadores activos a nivel mundial relacionados con la producción agrícola es de 1,300 millones, lo cual corresponde al 50% de la mano de obra en el mundo. Según las estimaciones de la Organización Internacional del Trabajo (OIT), un mínimo de 170,000 trabajadores agrícolas muere cada año, siendo víctimas de lesiones graves causadas por accidentes con maquinaria o por envenenamiento con pesticidas u otros agroquímicos.^{6,14} Por ello, en diciembre de 2018, la Asamblea General de las Naciones Unidas adopta la declaración sobre los derechos de los campesinos y otras personas que trabajan en las zonas rurales, al tiempo que reconoce su contribución al desarrollo sostenible, la biodiversidad y los desafíos a los que se enfrentan, así como se sostiene la necesidad de respetar la identidad cultural, exigir protección social y garantizar igualdad de género en las zonas rurales, declaración aplaudida por la FAO.¹⁵

Los países en desarrollo, a pesar de algunos esfuerzos en positivo, todavía tienen deficiencias importantes en algunos aspectos del manejo de plaguicidas; entre estos países destaca Venezuela, aun cuando firmó el Convenio de Estocolmo el 23 de mayo de 2001 y lo ratificó el 03 de enero de 2005, según la Gaceta Oficial 38.098, «lo que implica su incorporación a la legislación como Ley Aprobatoria o Ley Supra en el artículo 23 de la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela¹⁶ y en los artículos 127 y 129 del Capítulo IX de los Derechos Ambientales, Ley No. 55 sobre sustancias, materiales y desechos peligrosos en su artículo 7, además de la Norma Convenio 2709 del 2002».^{6,17}

En cuanto a los eventos de notificación obligatoria en Venezuela, el Boletín Epidemiológico de la semana 32 de 2014 señala que

entre las principales causas de consulta se encuentran las intoxicaciones por plaguicidas, que ocupan 0.01%; además, existen 463 casos de intoxicaciones por plaguicidas acumulados hasta el mes de agosto del mismo año.¹⁸

Conociendo las secuelas de los plaguicidas, así como sus efectos en el ser humano, en el presente estudio se evaluó la exposición a OF y carbamatos (inhibidores de la colinesterasa) en trabajadores agrícolas del caserío Capachal de Palmarito de la Colonia Tovar mediante la determinación de la actividad de la colinesterasa plasmática, signos y síntomas y el uso y manejo de plaguicidas. Asimismo, se midieron parámetros hematológicos, bioquímicos de functionalismo renal y hepático, la geolocalización de los trabajadores y se procedió a la caracterización genotípica de la isoforma CYP3A4 mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo-correlacional, dando continuidad a una línea de investigación de la Unidad de Toxicología Molecular de la Universidad de Carabobo, Venezuela. Se llevó a cabo entre los meses de junio y octubre de 2017 en la Colonia Tovar, estado Aragua, Venezuela, a unos 63 km al oeste de la ciudad de Caracas, con una población censada por el Consejo Comunal de 57 agricultores. La muestra estuvo representada por un total de 20 trabajadores ocupacionalmente expuestos; mientras que el grupo control estuvo constituido por 10 sujetos del personal que labora en el área administrativa comercial de la ciudad de Valencia, estado Carabobo, Venezuela, aproximadamente a unos 160 km al oeste de Caracas. En los dos grupos se trabajó con personas de ambos géneros, con edades comprendidas entre 21 y 58 años que aceptaran participar en el estudio. El criterio de inclusión para la selección de la muestra fue: ser trabajador agrícola expuesto por un periodo no menor de seis meses, con aparente buena condición de salud, sin hábitos psicosociales (fumar, ingesta de alcohol), y respecto al grupo control se tomó en cuenta la zona residencial y actividad laboral del sujeto alejado del contacto con plaguicidas, en el rango de edad, en aparentes buenas condiciones de salud y sin hábitos psicosociales.

Para llevar a cabo el estudio se aplicaron las normas éticas correspondientes, incluyéndose la carta de consentimiento informado, de acuerdo con lo establecido en los principios éticos para la investigación médica en seres humanos de la declaración de Helsinki.

El instrumento aplicado tanto a los trabajadores expuestos como al grupo control fue una entrevista, la

cual se elaboró considerando lo referido por la literatura internacional y las observaciones empíricas.

Las determinaciones de laboratorio realizadas en muestras de sangre periférica (aproximadamente 10 mL) con y sin anticoagulante fueron: niveles de colinesterasa plasmática, parámetros hematimétricos, actividad enzimática de las transaminasas, creatinina y urea.

Para el análisis molecular de la CYP3A4 se efectuó previamente una extracción de ADN genómico a partir de un total de 200 µL de sangre, empleando *kit* comercial (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, EUA); posteriormente, para la amplificación se aplicó la técnica de PCR convencional, usando cebadores específicos para las regiones que flanquean los distintos exones descritos por Berno et al.¹⁹ (*cuadro I*). La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL, usando la siguiente mezcla de reacción: 12.5 µL Platinum Hot Start PCR 2X Master Mix (Invitrogen, USA), 10 µM de cada uno de los cebadores, de 100 a 200 ng de ADN genómico y agua libre de nucleasa.

La amplificación se realizó en un termociclador automático (Seeamp™, Seegene, Corea del Sur) con los siguientes parámetros: desnaturalización por 12 min a 93 °C, seguida de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s de temperatura de hibridación variable, 2.30 min de extensión a 72 °C y una final por 10 min a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron en un transluminador UVP®.

Cuadro I. Tamaño de secuencia de exones de PCR para la CYP3A4.

Genotipo CYP3A4	Tamaño de exones	Temperatura (°C) de hibridación
Exón A	296	61
Exón B	1,137	59
Exón C	1,192	59
Exón D	1,200	59
Exón E	841	59
Exón F	933	59
Exón G	998	61
Exón H	956	60
Exón I	990	57
Exón J	952	60
Exón K	917	59
Exón L	910	57
Exón M	1,099	59

Fuente: Bibliografía consultada. Berno et al.¹⁹

Durante la entrevista con las personas evaluadas del grupo expuesto realizada en su casa de habitación, se hizo la lectura de las coordenadas de geolocalización mediante un equipo GPS Garmin® con señal detectada de al menos ocho satélites y reportada en grados decimales. Estas lecturas se utilizaron para el levantamiento del mapa bidimensional geográfico de los sujetos y sus valores de actividad de colinesterasa.

Todos los datos fueron analizados a través del programa estadístico PAST versión 3.19.²⁰ Se corroboró el ajuste de las variables cuantitativas a la distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y se obtuvo la media aritmética y la desviación estándar. Las variables cualitativas se presentan en cuadros de distribución de frecuencias absolutas y relativas. Se calcularon medidas de asociación como coeficiente de Pearson (*r*), coeficiente de correlación por rangos de Spearman (*p*) y se realizó la prueba *t* de Student para comparar medias de dos muestras independientes (grupo expuesto y grupo control). Se establecieron comparaciones de proporciones con la prueba *Z*. La diferencia entre los grupos se consideró significativa a un nivel de *p* < 0.05. El mapa de geolocalización se realizó tomando los valores de latitud (coordenada *y*), longitud (coordenada *x*) y la detección de cualquiera de los exones del gen CYP3A4 y aplicando una función de densidad según Kernel Gaussiana de radio = 0.0015 con interpolación por splines cúbicas para generar una matriz de 100 pixeles cuadrados en los ejes *x*, *y*. Los valores de densidad o agrupación de pacientes se convirtieron a una escala de pseudocolor con tono rojo como valor más alto y tono azul como el valor más bajo. Esta metodología permite detectar en la geografía del área estudiada las zonas con pacientes que expresen el exón CYP3A4 correspondiente. Las diferencias entre los mapas se evaluaron mediante el índice de disimilaridad.

RESULTADOS

Se evaluaron 30 individuos adultos de ambos sexos, aparentemente sanos, conformando dos grupos, uno expuesto (GE) y uno control (GC); el GE estuvo conformado por 20 trabajadores (80% del sexo masculino y 20% del femenino); y el GC por 10 trabajadores (90% del sexo masculino y 10% del femenino).

Sin diferencias estadísticamente significativas respecto al promedio de edad de ambos grupos, para el GE 40.45 ± 10.37 (*p* = 0.644) y para el GC 42.20 ± 8.01 (*p* > 0.05). La antigüedad en años de trabajo entre los expuestos fue de 19-20 años con una desviación estándar ± 12.98 años, un límite inferior de dos años y un límite superior

de 50 años. Con relación a las actividades que ejecutan los trabajadores que componen el GE, 75.0% mezclan y fumigan, con predominio estadísticamente significativo (*Z* = 2.85; *p* = 0.002).

Es importante resaltar que los 20 trabajadores expuestos manipulan directamente los plaguicidas y laboran aproximadamente 4.15 ± 2.32 horas diarias, con un valor promedio de antigüedad aplicando plaguicidas de 19.20 ± 12.98 años. Además, se pudo establecer que dichos trabajadores tienen un tiempo promedio por cada ciclo de fumigación de 6.20 ± 2.04 días al mes, realizando dichos ciclos de fumigación 12 veces en el año, lo que daría un estimado de 74 días de fumigación en un año calendario.

En cuanto al nivel de instrucción de la muestra en estudio en el GE, 60% culminó la primaria y seis trabajadores son bachilleres, lo que corresponde a 30.0%; por el contrario, en el grupo control, 60% son universitarios.

Tanto en el GE como en el GC se observó que ningún trabajador presentó consumo de tabaco ni de alcohol y 70% conoce los efectos nocivos para la salud causados por los plaguicidas que utilizan (*cuadro II*).

Del total del GE, 95% de los trabajadores recibió instrucciones para el manejo de los plaguicidas, 55% conoce el significado del rótulo de los envases en los que se expende el plaguicida y 5% usa plaguicidas en su hogar (sólo un trabajador refirió usar piretroide de forma ocasional). Respecto a quién suministró la información sobre el uso de plaguicidas, la mayoría refirió que fue suministrada por compañeros de labores (55%), 15% por agrotécnico, 15% por un vecino y 15% por lectura del folleto.

De los trabajadores del GE, 100% lava la ropa de trabajo aparte de la ropa normal, no ingiere alimentos en la zona de fumigación, se cambia la ropa después de la jornada, usa el uniforme lavado después de la fumigación, cambia los equipos de protección personal cuando están dañados, se lava las manos antes de comer y no se baña en ríos cercanos a su vivienda; 95% se lava las manos inmediatamente después de la jornada, 70% toma agua durante la jornada, 70% se baña inmediatamente después de fumigar y 30% lo hace algunas horas después de fumigar, adicionalmente emplea equipos de protección personal (*cuadro III*).

Los datos suministrados por los trabajadores demuestran que 70% guarda los plaguicidas en un depósito aislado; 30% lo hace en el domicilio; respecto al material ya usado, nadie reutiliza el envase eliminado ni lo entierra sin lavado previo, 5% quema el envase usado sin lavado previo, 40% lo entierra con lavado previo y 40% lo quema

Cuadro II. Tipos de plaguicidas que usan los trabajadores expuestos.

Insecticida/ grado toxicidad	Número de trabajadores con respuesta afirmativa	%
Karate (fungicida/Ib)	11	55.0
Mercamil (carbamato/Ia)	11	55.0
Bravo 500 (fungicida/Ib)	10	50.0
Folpan (fungicida/IV)	7	35.0
Pyrine (OF/II)	5	25.0
Curacrón (OF/II)	5	25.0
Captán (fungicida/Ib)	4	20.0
Curazín (fungicida/III)	4	20.0
Paratón (OF/Ia)	3	15.0
Malatión (OF/III)	3	15.0
Amidor (OF/III)	3	15.0
Fulgor (carbamato/III)	3	15.0
Gramonzón (herbicida/II)	3	15.0
Manzate (fungicida/III)	3	15.0
Danol (OF/Ia)	2	10.0
Difós (OF/IV)	2	10.0
Triazol (fungicida/II)	1	5.0
Score (fungicida/III)	1	5.0
Curacarb (fungicida/III)	1	5.0
Fugitane (OF/IV)	1	5.0
Kuik (carbamato/Ib)	1	5.0
Glifosán (herbicida/IV)	1	5.0
Sumo (insecticida/IV)	1	5.0
Clorfluoazuro (insecticida/IV)	1	5.0
Drago (piretroide/II)	1	5.0

Fuente: Entrevista realizada.

y entierra con lavado previo; 10% acumula los envases en un vertedero de basura, 5% lo acumula en el almacén y en el vertedero de basura.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, los signos y síntomas referidos por los trabajadores expuestos fueron: 30% presentó alergias y 30% refirió picazón, con predominio estadísticamente significativo, en comparación con los trabajadores del grupo no expuesto ($Z = 2.21$; $p = 0.01$).

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para los valores de hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM, monocitos al comparar las medias de los GE y GC (cuadro IV). La matriz de corre-

Cuadro III. Equipos de protección utilizados por el grupo expuesto a plaguicida.

Equipo de protección	n	%
Gorra/sombrero, chaqueta, botas de goma y paño de boca	11	55.0
Botas de goma, paño de boca y gorra/sombrero	4	20.0
Gorra/Sombrero y botas de goma	1	5.0
Gorra/sombrero y paño de boca	1	5.0
Gorra/sombrero, paño de boca/braga, botas de goma,	1	5.0
Gorra/sombrero, chaqueta, paño de boca	1	5.0
Botas de goma, tapaboca con filtro, braga	1	5.0
Total	20	100.0

n = Frecuencia.

Fuente: Entrevista realizada.

lación de Pearson para los parámetros hematimétricos y bioquímicos con la colinesterasa en el GE evidenció que existe correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con la urea ($r = 0.500$; $p = 0.025$) y con la TGP ($r = 0.455$; $p = 0.044$).

En relación con la colinesterasa, la media del GE fue de 6.43 ± 1.24 y para el GC fue de 8.20 ± 1.87 . De los valores de colinesterasa obtenidos en el GE, 15% (tres trabajadores) se ubica por debajo del rango de normalidad y existe diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.005$) entre las medias para el biomarcador de efecto en estudio.

En los 30 trabajadores evaluados la expresión genética de la CYP3A4 estuvo presente para el exón A, exón E y exón M, con una prevalencia de 100% en ambos grupos. El exón F se expresó en 83.3% de la muestra, con diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias ($Z = 2.94$; $p = 0.001$). El exón K estuvo presente en 86.7% del total estudiado, sin diferencias estadísticamente significativas ($Z = 0.19$; $p = 0.42$). El exón H estuvo presente sólo en un trabajador expuesto (3.3% de la muestra), sin diferencias significativas respecto a los no expuestos ($Z = 0.36$; $p = 0.35$) (cuadro V).

No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias de acetilcolinesterasa en el grupo expuesto y no expuesto según la presencia o

Cuadro IV. Parámetros hematimétricos y bioquímicos de grupos en estudio.

Parámetros hematimétricos y bioquímicos	Grupo expuesto			Grupo control			p	Valores de referencia
	n	X	DE ±	n	X	DE ±		
Hemoglobina g/dL	20	15.50	1.09	10	14.00	1.16	0.002	12.0-16.0 g/dL
Hematocrito %	20	46.90	3.92	10	42.50	2.90	0.004	40.0-50.0%
Hematies $10^6/\mu\text{L}$	20	5.12	0.33	10	5.10	0.50	0.874	4.0-5.50 $\times 10^6/\text{mm}^3$
Leucocitos $10^3/\mu\text{L}$	20	6.99	1.83	10	6.00	1.36	0.138	4.0-10.0 $\times 10^3/\text{mm}^3$
VCM (fL)	20	91.60	4.96	10	83.80	7.57	0.02	82-95fL
CHCM (g/dL)	20	33.10	0.82	10	32.90	1.04	0.809	31.5-35.5 g/dL
HCM (pg)	20	30.20	1.69	10	27.70	3.03	0.005	27-32 pg
Linfocitos %	20	33.00	6.25	10	35.90	4.84	0.218	17.0-48.0%
Monocitos %	20	3.20	2.07	10	6.10	2.60	0.002	0-8%
Eosinófilos %	20	2.90	2.29	10	2.70	1.05	0.746	0-6%
Neutrófilos %	20	59.80	7.45	10	55.30	5.47	0.098	43.0-76.0%
Plaquetas 10^3 U/L	20	220.90	36.58	10	235.80	38.90	0.314	150-450 $\times 10^3/\text{mm}^3$
Urea (mg/dL)	20	27.10	9.95	10	32.80	23.10	0.353	15.0-45.0 mg/dL
Creatinina (mg/dL)	20	0.75	0.14	10	0.86	0.15	0.076	0.5-1.4 mg/dL
TGO/AST (U/L)	20	28.8	9.05	10	31.0	8.33	0.525	0-40.0 U/L
TGP/ALT (U/L)	20	28.8	12.88	10	37.3	11.51	0.091	0-38.0U/L

n = Frecuencia, X = Media, DE ± = Desviación estándar, p = t de Student.

Fuente: Exámenes de laboratorio realizados.

ausencia de los exones F, H y K ($p > 0.05$), ni al comparar las medias de los parámetros hematimétricos y bioquímicos estudiados en el grupo expuesto y no expuesto según la presencia de los exones mencionados. Tampoco hubo correlaciones estadísticamente significativas entre los valores de colinesterasa y la presencia de los exones F, H y K. No se evidenciaron correlaciones estadísticamente significativas entre los valores de colinesterasa y la sintomatología ni entre la expresión de exones y la sintomatología entre los trabajadores expuestos ocupacionalmente a los plaguicidas inhibidores de la colinesterasa.

Los exones CYP3A4-F y CYP3A4-K se seleccionaron con base en las diferencias estadísticas encontradas entre el grupo expuesto y el grupo control. La figura 1 presenta los mapas de geolocalización de densidad de pacientes con expresión de los exones CYP3A4-F (izquierda) o CYP3A4-K (derecha) del grupo expuesto, mostrando en ambos casos mayor densidad de pacientes en el cuadrante nororiental del área estudiada. Ambos mapas indicaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el cuadrante norte de ambos mapas basado en el índice de disimilaridad.

DISCUSIÓN

En cuanto a la media del grupo expuesto, Cárdenas et al. (2010) reportaron una situación similar en su estudio realizado en Colombia del total de trabajadores participantes, 78.9% eran hombres y 21.1% eran mujeres con rango de edad entre 18 y 40 años en ambos sexos expuestos a plaguicidas.²¹ En 2015, se llevó a cabo otro estudio con una edad media para individuos del grupo expuesto de 39.6 ± 10.8 , similar a los valores reportados por este estudio.²²

La antigüedad en años, promedio de horas diarias laborando y ejecutando actividades de mezcla y fumigación coinciden con los resultados encontrados por Gómez et al. (2010)²³ y por Toro-Osorio et al. (2017).²⁴

Al comparar el nivel académico en el presente estudio, el mismo es contrario al estudio de Castiblanco en 2014, en el cual 72.1% alcanzó la secundaria y 5% es profesional y cuenta con maestría.²⁵

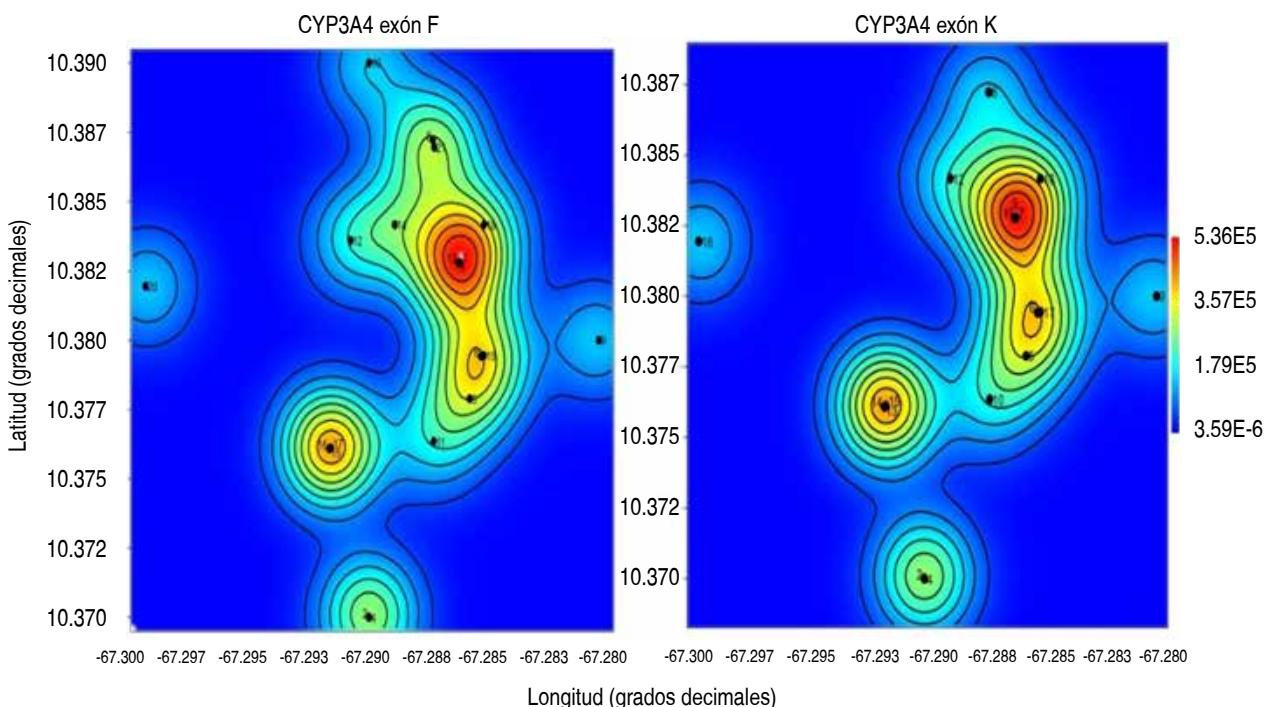
Para el valor de colinesterasa se detectó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las medias para el biomarcador de efecto en estudio. Similares resultados se obtuvieron de los estudios de Castiblanco (2014)

Cuadro V. Comparación de prevalencias de expresión de los exones en el grupo expuesto a plaguicidas y grupo control.

Exones expresados	Grupo expuesto (n = 20)		Grupo control (n = 10)		Z	p
	f	%	f	%		
Exón A	20	100.0	10	100.0	—	—
Exón E	20	100.0	10	100.0	—	—
Exón M	20	100.0	10	100.0	—	—
Exón F	20	100.0	5	50.0	2.94	0.001
Exón K	17	85.0	9	90.0	0.19	0.420
Exón H	1	5.0	0	0.0	0.36	0.350
Exón B	0	0.0	0	0.0	—	—
Exón C	0	0.0	0	0.0	—	—
Exón D	0	0.0	0	0.0	—	—
Exón G	0	0.0	0	0.0	—	—
Exón I	0	0.0	0	0.0	—	—
Exón J	0	0.0	0	0.0	—	—
Exón L	0	0.0	0	0.0	—	—

F = Frecuencia.

Fuente: Exámenes de laboratorio realizados.



Fuente: Exámenes de laboratorio realizados.

Figura 1. Localización geográfica de los expuestos ocupacionalmente a plaguicidas vs expresión CYP3A4.

y Matheus et al. (2017), reportándose diferencias significativas con una $p < 0.01$ y $p < 0.000$, respectivamente,^{25,26} lo que permite inferir que al mantenerse condiciones hostiles o de estrés en los individuos se esté dando una estimulación del sistema metabólico como una primera respuesta adaptativa al ambiente; esta respuesta adaptativa fue descrita por primera vez por Kashyap en 1984 y luego nuevamente reportada por García et al. (2015), en la cual pudieron establecer que ante una exposición crónica a plaguicidas, el sistema metabólico responde con un incremento de la actividad enzimática, con el fin de establecer nuevamente el equilibrio del sistema;²⁷ en cambio, en el estudio de Toro-Osorio et al. (2017) no existe diferencia significativa en los niveles de exposición a plaguicidas entre los agricultores estudiados.²⁴

Los plaguicidas más utilizados por los trabajadores de este estudio son del tipo organofosforados (categorías II y Ia), y en el caso de los Carbamatos, categoría Ia, III y Ib. Estos datos tienen concordancia con los aportados por estudios de Gómez et al. (2010), Toro et al. (2017) y López et al. (2018). Los organofosforados son los insecticidas más utilizados para el control de plagas en los cultivos tanto a nivel internacional como en Venezuela, éstos junto con los carbamatos son los involucrados con más frecuencia en intoxicaciones en todo el mundo.^{23,24,28} Sin embargo, según la información suministrada por el grupo estudiado de Capachal de Palmarito, 70% conoce los efectos nocivos para la salud causada por los plaguicidas que utilizan.

Con relación a recibir instrucciones para el manejo de los plaguicidas, conocer el significado del rótulo de los envases y uso de plaguicidas en el hogar, los porcentajes coinciden con los reportados por Duran et al. (2017), en los cuales los agricultores emplean plaguicidas sin ninguna capacitación formal previa, lo cual representa un enorme riesgo, ya que éste es un tema muy amplio y de alta complejidad.²⁹

Los trabajadores agrícolas, la mayoría de bajo nivel sociocultural, no utilizan las debidas medidas de protección, ya sea por falta de conocimiento, descuido o porque las empresas no proveen el equipamiento necesario a sus trabajadores, planteamientos que consideran, junto con otros, la agricultura como una de las actividades más peligrosas, según la OIT, que genera trabajo físico excesivo, estrés psicológico, desequilibrios en el ritmo del trabajo y, por consiguiente, mayores riesgos de accidentes y enfermedades por exposición sin control del uso excesivo de plaguicidas, sin períodos de carencia, lo que se traduce como explotación laboral, considerada por la OIT como la nueva forma de esclavitud del siglo XXI.³⁰

Siguiendo con el punto relacionado con el manejo adecuado de la información para el uso correcto de pla-

guicidas, los resultados son comparables con el estudio de Toro et al. (2017),²⁴ al igual que los reportados por Cárdenas et al.²³ El incumplimiento de estas medidas higiénicas propicia la presencia de síntomas asociados a la exposición a plaguicidas, mezclas de solventes, orgánicos y metales pesados, por lo cual resulta interesante plantear la aplicación de una batería de test neuroconductuales para detectar precozmente los posibles efectos neurocomportamentales de los plaguicidas en los sujetos estudiados.^{31,32} El estudio llevado a cabo por Muñoz (2011) refirió la prevalencia en toda la muestra en estudio del síndrome muscarínico.³³

Los datos suministrados por los trabajadores demuestran similitud en porcentajes con el trabajo de Varona et al. (2016); en cambio, García et al. (2006) refieren que la mayoría del grupo expuesto almacena correctamente los plaguicidas.^{23,34}

Respecto a los resultados de los exámenes de laboratorio, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para los valores de hemoglobina, hematocrito, VCM y HCM y monocitos, los cuales pueden justificarse por la diferencia de altura con respecto al lugar de residencia tanto del grupo expuesto como del grupo control. Sin embargo, en estudios realizados por Ahmadi et al. (2018), los resultados fueron contrarios a los expuestos en este estudio, pudiendo asociar estos hallazgos con daños oxidativos y presencia de citocinas inflamatorias inducidas por la presencia de xenobióticos.³⁵

A nivel renal, con la urea se evidenció correlación estadísticamente significativa, analito de suma utilidad para los fines de determinar una alteración en la función renal, debida a una disminución en la capacidad del organismo para eliminar sustancias químicas potencialmente genotóxicas; sin embargo, estudios llevados a cabo por Lebov et al. (2016) indican que se requieren estudios epidemiológicos adicionales para confirmar el efecto nefrotóxico y desarrollo de posteriores patologías renales por exposición.³⁶

Es importante resaltar que la diferencia significativa entre los dos grupos para los valores de TGP pueden estar relacionados con el hecho de que los plaguicidas se metabolizan en el hígado y dicha enzima es específica en este órgano, lo que facilita la identificación de hepatopatías y de otros padecimientos; en este contexto, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, debido a la generación de estrés oxidante caracterizado por lipoperoxidación membranal de los hepatocitos, disminución de la síntesis de ATP, daño estructural y necrosis celular, incremento en el depósito de lípidos y disminución de glucógeno.³⁷ Sería de gran utilidad, por tanto, intensificar las medidas de protec-

ción de estos trabajadores para evitar consecuencias mayores en el futuro y establecer terapias racionales que prevengan ese daño.³⁸

En la figura 1, mapas de geolocalización de densidad de pacientes expuestos a plaguicidas con expresión del exón F (izquierda) o K (derecha) en el área estudiada. La escala de pseudocolores indica la mayor (roja) o menor (azul) densidad relativa (unidades arbitrarias) de pacientes con expresión de cada exón. La localización de cada paciente específico es indicada con un punto negro y su respectivo número. Los contornos indican las líneas de isodensidad relativa. En cada mapa el norte es arriba y el este a la derecha.

Nótese en ambos mapas mayor densidad de pacientes con expresión genética en el cuadrante nororiental del área estudiada.

Los resultados del estudio de geolocalización sugieren una densidad aumentada de pacientes expuestos con expresión CYP3A4 exones F y K incrementada en el sector nororiental del área estudiada con diferencias en las densidades para cada uno de estos exones. Estos resultados de densidad podrían ser el resultado de una mayor exposición a plaguicidas en estas áreas, de una mayor agrupación de estos pacientes o de una combinación de ambos factores, pero en cualquiera de estas situaciones se requiere evaluar la posibilidad de reubicación de los sitios de vivienda.

Diversos estudios sugieren que las diferencias en los niveles basales de la CYP constituyen una de las principales fuentes de variabilidad interindividual en la respuesta a xenobióticos. En este contexto, el presente estudio puso en evidencia la expresión del exón F de la CYP3A4 en 100% de los expuestos a plaguicidas, a diferencia de 50% de expresión del mismo gen en los no expuestos y la expresión del exón H de la CYP3A4 en un paciente expuesto ocupacionalmente a la metabolización del mismo xenobiótico, lo que permite inferir que la diferencia entre individuos en la expresión o actividad de las enzimas CYP se puede deber a factores fisiológicos, patológicos, ambientales y/o genéticos. Estos últimos pueden corresponderse a repeticiones nucleotídicas, inserciones, delecciones o polimorfismos de un nucleótido, lo cual modifica la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas y su expresión. Por lo expuesto anteriormente, las diferencias en la regulación, expresión y actividades de las enzimas de la CYP450 en fase I y II del metabolismo pueden ser factores para definir la susceptibilidad del individuo y que podrían contribuir a los efectos en la salud en el caso de exposiciones a plaguicidas por largos períodos, lo cual debería tenerse en cuenta en futuros estudios a fin de mejorar la predicción de tales efectos.³⁹

REFERENCIAS

- Correa A. Manual de Registro de Plaguicidas para Centroamérica. FAO 2.011. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/as399s.pdf>.
- FAO y OMS. Las nuevas directrices sobre plaguicidas pretenden suprimir más rápidamente las toxinas peligrosas. Roma 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/414021icode/>
- Androutsopoulos V, Kanavouras K, Tsatsakis K. Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: implications in neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 256: 418-424.
- Yerena C, Hernández C, Ramírez J, Riaño M, López M et al. Influencia de polimorfismo del CYP2E1 sobre el riesgo de intoxicación aguda por exposición a plaguicidas. *Bioquímica*. 2005; 30 (3): .
- PNUMA. Los Convenios sobre productos químicos y desechos peligrosos. 2004. Disponible en: <http://archive.basel.int/pub/threeConventions-s.pdf>.
- Marrero S, González S, Guevara H, Eblen A. Evaluación de la exposición a organofosforados y carbamato en trabajadores de una comunidad agraria. *Comunidad y Salud*. 2017; 15 (1): 30-41.
- Repetto M, Repetto G. Toxicología Fundamental. Ediciones Díaz Santos. Cuarta Edición; 2009. Madrid España.
- Baconi D, Bárcá M, Manda G, Ciobanu A, Balalau C. Investigation of the toxicity of some organophosphorus pesticides in a repeated dose study in rats. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; 54 (2): 349-356.
- Buratti F, Testai E. Evidences for CYP3A4 autoactivation in the desulfuration of dimethoate by the human liver. *Toxicology*. 2007; 241 (11): 33-46.
- Lemaire G, De Sousa G, Rahmani R. A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68 (12): 2347-2358.
- FAO. Bonn: La FAO lanza una guía para adaptar la agricultura al cambio climático. 2017. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2017/11/1421982>.
- FAO. Boletín Informativo. 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/climatechange/epic/que-hacemos/que-es-la-agricultura-climáticamente-inteligentemente/es/-Wqp9PujOUdV>.
- FAO. Katowice: La FAO insta a ampliarla respuesta al cambio climático en la agricultura. 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/1174848/icode/>.
- Programa de Seguridad y Salud en el Trabajo y Medio Ambiente Departamento de la Protección del Trabajo Oficina Internacional del Trabajo OIT. Seguridad y Salud en la agricultura. Ginebra Suiza 2000. Disponible en: http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/@ed_protect/@protrav/@safework/documents/publication/wcms_117460.pdf.
- FAO. Boletín Informativo 2018. La FAO aplaude una resolución histórica de la ONU que consangra los derechos de los campesinos y los trabajadores rurales. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/1175226/icode/>.
- Gil M. Proyecto Internacional de Eliminación de los COP. Informe Ciudadano de la Situación de los Contaminantes Orgánicos Persistentes en Venezuela. Fundación Aguaclara; 2006. Disponible en: <http://docplayer.es/15000477-Informe-ciudadano-de-la-situacion-de-los-contaminantes-organicos-persistentes-en-venezuela.html>.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (Ministerio de Fomento). Norma Venezolana. Caracas: FONDONORMA; 2002. COVENIN: 2709.
- Boletín epidemiológico semana 32 Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). REVEP; 2013. Disponible en: http://www.bvs.gob.ve/boletin_epidemiologico/2013/Boletin_32_2014.pdf.

19. Berno G, Zaccarelli M, Gori C, Tempestilli M, Antinori A et al. Analysis of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human CYP3A4 and CYP3A5 genes: potential implications for the metabolism of HIV drugs. *Medical Genetics*. 2014; 15: 76.
20. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont Electronica* 2001; 4 (1): 9. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
21. Cárdenas O, Silva E, Morales L, Ortiz J. Uso de plaguicidas inhibidores de acetilcolinesterasa en once entidades territoriales de salud en Colombia, 2002-2005. *Biomédica*. 2010; 30 (1):
22. Rosales J. Uso de marcadores genotoxicológicos para la evaluación de agricultores expuestos a plaguicidas organofosforados. *An Med*. 2015; 76 (3): 247-252.
23. Gómez M, Cáceres J. Toxicidad por insecticidas organofosforados en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela 2008. *Bol Mal Salud Amb*. 2010; 50 (1): 119-125. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/bmsa/v50n1/art12.pdf>.
24. Toro B, Rojas A, Díaz J. Niveles de colinesterasa sérica en caficultores del Departamento de Caldas, Colombia. *Rev Salud Pública*. 2017; 19 (3): 318-324.
25. Castiblanco A. Caracterización de la actividad enzimática y polimorfismo genéticos de butirilcolinesterasa (BCHE) en una población de trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de colinesterasa en el municipio de Soacha 2014. Tesis Magister en Toxicología. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Departamento de Toxicología. Facultad de Medicina. Bogotá, Colombia.
26. Matheus T, Aular Y, Bolaños A, Fernández Y, Barrios E, Hung M. Actividad de butirilcolinesterasa y micronúcleos en trabajadores agrícolas expuestos a mezcla de plaguicidas. *Salud de los Trabajadores*. 2017; 25 (1): 23-26.
27. García R, Parrón T, Requena M, Alarcón R, Tsatsakis A, Hernández A. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sciences*. 2015; 145: 274-283.
28. López G, Paredes D, Rojas A, Medina I, Barron B et al. Implicaciones del contexto socioeconómico en la exposición a plaguicidas en Jornaleros Huicholes. *Rev Int Contam Ambie*. 2018; 34: 73-80.
29. Durán A, González M, Vargas G, Mora D. Situaciones de riesgo potencial relacionadas con la aplicación de agroquímicos en los sistemas hortícolas. *Agronomía Costarricense*. 2017; 41 (2): 67-77.
30. Organización Internacional del Trabajo (OIT). Los Convenios de la OIT sobre seguridad y salud en el trabajo: una oportunidad para mejorar las condiciones y el medio ambiente de trabajo. Publicaciones, Centro Internacional de Formación de la OIT 2009. Disponible en: http://www.ilo.org/buenosaires/publicaciones/WCMS_BAI_PUB_118/lang--es/index.htm.
31. Otero G, Porcayo R, Aguirre D, Pedraza M. Estudios Neuroconductuales en sujetos laboralmente expuestos a plaguicidas. *Rev Int Contaminación Ambiental*. 2000; 6 (2): 67-74.
32. Caraballo M, Blanco G. Evaluación neuropsicológica de trabajadores expuestos a solventes orgánicos en una empresa de transporte público. *Revista Facultad de Medicina*. 2005; 28 (1): 79-88.
33. Muñoz M. Aspectos bioéticos en el control y aplicación de plaguicidas en Chile. *Acta Boeth [Revista en internet]* 2011; 17(1): 95-104 Disponible en: www.revistas.uchile.cl/index.php/AB/article/download/15683/16154.
34. Varona M, Díaz S, Briceño L, Sánchez C, Torres C, Palma R, Groot H, Idrovo A. Determinantes sociales de la intoxicación por plaguicidas entre cultivadores de arroz en Colombia. *Rev Salud Pública*. 2016; 18 (4): 617-629.
35. Ahmadi N, Mandegary A, Jamshidzadeh A, Mohammadi M, Mohammadi M, Salari E et al. Hematological Abnormality, oxidative stress and genotoxicity induction in the Greenhouse Pesticide Sprayers. *Toxics*. 2018; 6 (1): 1-15.
36. Lebov J, Engel L, Richardson D, Hogan S, Hoppin J, Sadler D. Pesticide use and risk of end-stage renal disease among licensed pesticide applicators in the agricultural health study. *Occup Environ Med*. 2016; 73 (1): 3-12.
37. Fuentes V, Quezada C, Martínez M, Jaramillo F, Rodríguez L, Jaramillo F et al. Hepatoxicidad subaguda y crónica producida por el plaguicida Paratión-metílico en la rata. *Rev Mex Cienc Farm*. 2011; 42 (3): 50-59.
38. Astiz M. Efecto de Contaminantes ambientales sobre el metabolismo lipídico y el Sistema de defensa antioxidante en tejidos de rata. [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de la Plata, Argentina, 2009.
39. Quiñones L, Lee K, Varela N, Escala M, García K et al. Farmacogenética del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. *Rev. Med Chile*. 2006; 134: 499-515.

Gammaglobulina anti-D e inmunoprofilaxis. Historia, importancia, usos y obtención

*Anti-D gamma globulin and immunoprophylaxis.
History, importance, uses and procurement*

Aguila Rodríguez Yisell,* Pacheco Morejón Johamna,† Izquierdo Hernández Mairelys,§
Sánchez Frenes Pedro,|| Benítez Zayas Marlen Beatriz,¶ Sánchez Bouza María de Jesús**

Palabras clave:
gammaglobulina
anti-D,
inmunoprofilaxis
anti-D.

Keywords:
Gamma
globulin anti-D,
immunoprophylaxis
anti-D.

* Doctora en medicina.
Especialista de 1^{er}
grado en Medicina
General Integral y en
Laboratorio Clínico.
Profesora Asistente.

Máster en Educación
Médica. Sección
de Hospitales y
Especialidades de la
Dirección Provincial de
Salud de Cienfuegos,
Cuba.

† Doctora en medicina.
Especialista de 1^{er}
grado en Medicina
General Integral y en
Laboratorio Clínico.
Asesora municipal de
laboratorios clínicos.
Dirección Municipal
de Salud. Cienfuegos,
Cuba.

Recibido:
26/03/2019
Aceptado:
30/04/2019

RESUMEN

La obtención de gammaglobulina anti-D relaciona todas las actividades de la cadena transfusional. El uso de este hemoderivado en la prevención de la aloinmunización anti-Rhesus constituye un asunto de especial interés de la medicina transfusional actual. Este trabajo relaciona los aspectos históricos, bioquímicos, inmunológicos y genéticos del sistema Rh, además de las actividades para la obtención de plasma humano hiperimmune anti-D que incluyen el reclutamiento, la selección y la inmunización de donantes voluntarios. La disponibilidad y cobertura de este medicamento para la asistencia sanitaria no alcanza la magnitud necesaria. Varios factores inciden sobre este aspecto, la falta de un criterio unificado para los esquemas de inmunización, la necesidad de reclutar y fidelizar donantes voluntarios, aspectos éticos y económicos entre otros elementos logísticos. La utilización de anticuerpos monoclonales puede constituir una alternativa ventajosa y promisoria, pero aún no es técnicamente posible su utilización en la producción de derivado sanguíneo.

ABSTRACT

Obtaining anti-D gamma globulin relates all the activities of the transfusion chain. The use of this hemoderivative in the prevention of anti-Rhesus alloimmunization is a matter of special interest in current transfusion medicine. This work relates the historical, biochemical, immunological and genetic aspects of the Rh system. In addition, activities for human hyperimmune anti-D plasma collection include recruitment, selection, and immunization of volunteer donors. The availability and coverage of this medicine for health care does not reach the necessary magnitude. Several factors affect this aspect, the lack of unified criteria for immunization schemes, the need to recruit and retain voluntary donors, ethical and economic aspects, among other logistical elements. The use of monoclonal antibodies may be an advantageous and promising alternative, but it is not yet technically possible to use them in the production of blood derivatives.

INTRODUCCIÓN

Historia: el descubrimiento del grupo sanguíneo Rh en 1940 por Philip Levine, Landsteiner y Weiner abrió un nuevo horizonte en el desarrollo de la medicina transfusional.

Sus trabajos experimentales con animales de laboratorio constituyen investigaciones clásicas en la medicina moderna. Inmunizaron conejos con eritrocitos del mono *Macacus Rhesus*. Los anticuerpos obtenidos aglutinaron los eritrocitos de 85% de los individuos y se planteó que éstos eran portadores del factor Rh, o sea, Rh positivo. Al 15% restante se le clasificó como Rh negativo.¹

Un poco después se reportó que los anticuerpos anti-Rh obtenidos en conejos eran de igual especificidad que los encontrados por Levine y Stetson en 1939 en una puérpera con un hijo afectado por enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHRN). De esta forma, se describió el conflicto materno fetal por incompatibilidad Rh.¹

Investigaciones ulteriores demostraron que los anticuerpos obtenidos en conejos por inmunización con eritrocitos del mono *Macacus Rhesus* reconocían antígenos diferentes a lo que hoy se conoce como el antígeno Rh D y se les agrupó en un nuevo sistema denominado con las iniciales de sus descubridores LW.^{1,2}

§ Doctora en medicina. Especialista de 1^{er} grado en Medicina General Integral y de Laboratorio Clínico. Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital General Universitario «Dr. Gustavo Aldereguía Lima de Cienfuegos», Cuba.
 || Doctor en medicina. Especialista de 2^o grado en Laboratorio Clínico. Máster en Salud Pública, Investigador agregado, Profesor Auxiliar. Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos. Cuba.
 ¶ Doctora en medicina. Especialista de 1^{er} grado en Laboratorio Clínico. Profesora instructora. Laboratorio de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Cienfuegos. Cuba.
 ** Doctora en medicina. Especialista de 2^o grado en Bioquímica Clínica, Máster en Enfermedades Infecciosas, Investigadora agregada, Profesora Auxiliar. Universidad de Ciencias Médicas de Cienfuegos. Cuba.

Correspondencia:
Dra. Yisell Aguila Rodríguez
 E-mail: yisellar@jagua.cfg.sld.cu;
 pedrosf@jagua.cfg.sld.cu.

Características bioquímicas, inmunológicas y genéticas del sistema Rh

Hoy se conoce que el sistema Rh es el más polimórfico de los grupos sanguíneos eritrocitarios. Consta hasta el momento de más de 50 antígenos. Con la excepción de los antígenos D, C, c y E, es infrecuente encontrar reacciones hemolíticas en las que se identifiquen anticuerpos de esas especificidades, ya que en su mayoría son antígenos de alta o baja incidencia y por lo tanto, muy pocos receptores producen anticuerpos contra ellos.^{1,3}

Los genes RHD y RHCE, muy cerca uno de otro en el cromosoma 1, codifican las proteínas Rh de 416 aminoácidos; una codifica para el antígeno D y la otra para los antígenos CE en varias combinaciones (ce, cE, Ce, o CE).³⁻⁵

Los términos Rh positivo y Rh negativo hacen referencia únicamente a la presencia o ausencia del antígeno D en los hematíes.^{1,2}

A diferencia del sistema ABO, los individuos que carecen del antígeno D, o sea, Rh negativo, no presentan anticuerpos anti-D naturales en el suero. La formación de estos anticuerpos se produce por exposiciones a hematíes D positivo a través de las transfusiones de sangre o embarazos.^{5,6}

La inmunogenicidad de este antígeno es tal que 80% de los individuos RhD negativo producen anticuerpos anti-D con la transfusión de una unidad de sangre RhD positivo. Estos anticuerpos son los responsables de la EHFRN en las mujeres embarazadas RhD negativo.^{5,7}

Expresión débil del antígeno D (D débil)

La gran mayoría de los individuos RhD positivo muestran aglutinación definida con el reactivo anti-D. En ocasiones, los eritrocitos D positivo no reaccionan con los reactivos anti-D en las técnicas convencionales y la detección del antígeno D requiere una incubación prolongada con el anti-D o el empleo de la técnica de antiglobulina (Coombs). Con anterioridad, esta expresión fenotípica era nombrada como Du.^{1,2}

El D débil se define como un fenotipo que tiene menor expresión del antígeno D y responde a varias circunstancias genéticas, ya que el gen RhD puede codificar para una expresión

debilitada del antígeno D (cDe). Otro de los fenómenos bien conocidos es el debilitamiento del antígeno D por la presencia del gen C en posición transversal con respecto al D, es decir, en el cromosoma opuesto (CDe/Ce).^{1,2}

D parcial

La producción de anti-D en un paciente D positivo es muy infrecuente. Los eritrocitos de estos individuos carecen de algunos de los epítopos del antígeno D y el anticuerpo anti-D que producen es contra la parte del antígeno que no está presente en sus células; por esta causa se clasifican como D parcial. El antígeno D consta de 16 epítopos y se han descrito cerca de 12 tipos de D parcial de acuerdo con la dotación de epítopos presentes y ausentes que corresponden también con la presencia o ausencia de los 10 exones del gen RhD.^{1,2,8}

Rh nulo

Existen individuos que carecen de todos los antígenos del sistema Rh sobre sus eritrocitos, lo cual puede deberse a la ausencia de un gen regulador que permite la expresión de los genes Rh o a la presencia de un gen amorfó en el locus Rh. Esta anomalía da lugar a un síndrome de hemólisis crónica resultante en la inestabilidad de la membrana del eritrocito debido a la falta de los polipéptidos correspondientes.^{1,2,8}

La prevalencia del antígeno D es muy baja entre los indios americanos (1%), Asia (1%) y África (4%). Sin embargo, la mayoría de los países europeos tienen una prevalencia de individuos Rh D negativo mayor de 15% (Austria 19%, Inglaterra 17%, España 17%, Irlanda 16%, Dinamarca 16%, Holanda 16.3% y Suecia 18%). En América, Uruguay reporta 12% y Cuba una prevalencia de 13.51%.^{1,2,7}

Inmunoprofilaxis anti-D

La inmunoprofilaxis anti-D en pacientes Rh negativo aloinmunitados constituye en la actualidad una práctica médica segura y efectiva. La cobertura y acceso a este derivado del plasma es un problema para algunos sistemas sanitarios, sobre todo en aquellos países de bajos ingresos o en vías de desarrollo.

Una premisa indispensable para la disponibilidad de este hemoderivado es contar con sistemas de salud organizados en la donación voluntaria de sangre como fuente de obtención de plasma a partir de humanos aloinmunizados, además de la necesidad de disponer de infraestructura tecnológica para las donaciones de plasma por aféresis junto con la industria fraccionadora que incluya el transporte, conservación y manufactura de los productos hemoderivados.

En este artículo se realiza una revisión bibliográfica acerca de la historia, importancia, usos y obtención de plasma hiperinmune anti-D necesario en la fabricación de gammaglobulina específica para la inmunoprofilaxis.

DESARROLLO

Producción de gammaglobulina anti-D: la fuente de obtención es el plasma hiperinmune anti-D de origen humano.

Procedimiento para la obtención de plasma hiperinmune: para ello es indispensable disponer de donantes sanos dispuestos a ser inmunizados y evaluados de forma periódica para la comprobación de los títulos en cada donación y proceder a inmunizar a los que así lo requieran.

Inmunización de individuos: se realiza para estimular una antigua aloinmunización en mujeres Rh negativo menopáusicas o antiguos transfundidos o para crear una nueva inmunización.

Como principio rector de todo esquema de inmunización se debe usar la mínima dosis de antígeno y el menor número de inmunizaciones para obtener la respuesta deseada.⁹

Requerimientos mínimos a tener en cuenta para el programa de inmunización:

1. Disponer de ensayo para detectar y/o cuantificar el anticuerpo deseado.
2. El mínimo nivel de anticuerpo requerido.
3. Diseño de un esquema de inmunización que incluya datos acerca de la dosis, intervalo entre las inmunizaciones, total de dosis y vías de administración.
4. Criterios para considerar a un donante prospectivo como no respondedor.
5. Consentimiento informado del donante para participar.

Los donantes de eritrocitos (inmunógeno) deben reunir, además de los criterios de selección establecidos en el país para seleccionar donantes de sangre, los siguientes criterios:

1. Los donantes deben ser fenotipados para los antígenos ABO, Rh, Kell, Fya/Fyb, Jka/Jkb y S/s.

2. Es muy ventajoso, de ser posible, seleccionar individuos homocigóticos para el antígeno D, el fenotipo recomendado por Genetet es el ccDEE debido a la mayor cantidad de sitios D que existen en ellos.¹⁰
3. El volumen de sangre total extraído no debe exceder de 450 a 500 mL en un periodo de más de 12 semanas.
4. Los eritrocitos obtenidos para inmunización deben ser congelados antes de su uso por un periodo, como mínimo, de seis a 12 meses, dependiendo de la sensibilidad y el rango del test realizado para marcadores infecciosos. El donante debe ser reanalizado antes de la congelación y uso de las células como inmunógeno.
5. Se recomienda la leucorreducción de la donación y aplicación de tecnología de ácidos nucleicos (TAN) para la pesquisa de los marcadores infecciosos (tecnología de ácidos nucleicos TAN para HBV, HCV y HIV).

Receptores del inmunógeno (donante de plasma hiperinmune anti-D)

1. Los receptores deben ser fenotipados para los antígenos ABO, Rh, Kell, Fya/Fyb, Jka/Jkb y S/s antes de la inmunización.
2. Los eritrocitos del donante y receptor deben ser comparados con la mayor cantidad de sistemas de grupos sanguíneos posibles. Sólo pueden utilizarse eritrocitos ABO compatibles. Además, se aceptan incompatibilidades para el sistema Rh (C y D). No deberá aceptarse incompatibilidad con otros sistemas como Kell, Fy, Jk y S/s.
3. Los donantes inmunizados deben portar una tarjeta u otro método apropiado que señale la existencia de anticuerpos en caso de tener que ser transfundidos de emergencia.
4. Se recomienda que los donantes tengan menos de 60 años y no trabajen en ocupaciones peligrosas como choferes, operadores de maquinarias pesadas, trabajadores de alturas y pilotos.

Esquemas de inmunización

No existe en la literatura un protocolo unánime, se considera efectivo aquel esquema de inmunización que logre la respuesta de anticuerpos en 65-70% de los donantes RhD negativo y que los anticuerpos anti-D se detecten entre los nueve meses de iniciarse la inmunización. Además, que no se detecten anticuerpos contra antígenos de otros sistemas de grupos sanguíneos.¹¹

La Dra. Fernández y colaboradores, en el Banco de Sangre de Santa Clara utilizan el siguiente esquema de inmunización:⁹

0 días: primera dosis: 10 mL del inmunógeno por vía endovenosa.

15 días: segunda dosis: 10 mL del inmunógeno por vía endovenosa.

45 días: tercera dosis: 10 mL del inmunógeno por vía endovenosa.

Cuatro meses: cuarta dosis de 5 mL por vía endovenosa.

Dosis de refuerzos cada seis meses: 1 mL por vía subcutánea.

Este equipo considera al donante como respondedor cuando el valor del título de anticuerpos alcanza 1/512. Cuando no se obtiene esta cifra, le administran una dosis secundaria de 5 ml por vía endovenosa; en el caso del donante que no llega a tener el título de anti-D requerido (1/512), se considera como no respondedor, y se excluye del programa. Para la dosis de mantenimiento se utiliza 1 ml por vía endovenosa, si fuera necesario.

Asimismo, reporta haber logrado con ese esquema de inmunización una respuesta en más de 90% de los donantes con niveles óptimos de título de anticuerpos anti-D con una frecuencia de cinco dosis de inmunización en un periodo de seis meses.

Molé, del Banco de Sangre Provincial de Granma, informa haber tenido éxito con el siguiente esquema de inmunización para la sensibilización de los donantes anti-D en el que utilizó glóbulos rojos lavados O positivo.¹¹

1 mL intramuscular + 5 mL endovenoso primer día.

1 mL intramuscular + 5 mL endovenoso 15 días.

1 mL intramuscular + 10 mL endovenoso 15 días.

1 mL intramuscular + 10 mL endovenoso 15 días.

Cuando se alcanzan títulos de anticuerpos 1:512 o superiores cuantificados mediante aglutinación, se inicia el proceso de plasmadonación. A partir de la segunda donación se inicia el periodo de descanso, en el cual se realiza un examen clínico y humoral completo y se administra una inyección de 1 mL intramuscular de mantenimiento.

Genetet y Mannonni expresan haber obtenido buenos resultados con la inyección de 5 mL de inmunógeno (hematíes lavados con fenotipo ccDEE) endovenoso, seguido de dos mL por igual vía a los tres meses. Utilizan una inmunización de refuerzo de 2 mL en dependencia del comportamiento del título.¹⁰

En Cuba la regulación 35-2003 de CECMED establece: «los plasmas específicos serán titulados por un método adecuado y validado, previamente acordado con la industria, la cual definirá la potencia o concentración

de anticuerpos requerida para cada plasma específico. El plasma específico se obtendrá mediante la aplicación de esquemas de inmunización aprobados según la regulación vigente sobre inmunización de donantes de plasma específico».¹²

Producción industrial de gammaglobulina anti-D.

Esta inmunoglobulina es preparada a partir del plasma de individuos inmunizados al antígeno D que es enviado a los centros de fraccionamiento industrial. A éste se le realiza un proceso industrial de fraccionamiento e inactivación viral.

En este proceso se incluye el método de fraccionamiento de Cohn con etanol y un proceso de cromatografía por el cual se obtiene un producto de alta pureza.

El método de Cohn, descrito por Edwin Cohn en Harvard en 1943, distingue hasta cinco «fracciones» en las que se obtienen productos concentrados de FVIII, complejo protrombínico, inmunoglobulinas (fracciones II y III), antitrombina III (fracción IV) y albúmina (fracción V).

Se agregan dos procesos de inactivación viral, el solvente-detergente para remover los virus con cubierta lipídica (VIH, hepatitis B y C) y la nanofiltración para remover otros virus sin cubierta lipídica (parvovirus B19, hepatitis A).¹³

Esta preparación acarrea dos problemas principales: uno es el del abastecimiento de la materia prima, el plasma hiperinmune sobre todo en la Unión Europea (UE), donde desde hace años se han prohibido los protocolos de inmunización de sujetos sanos «voluntarios» Rh negativo para la obtención de plasma con fines de fraccionamiento, las industrias importan plasma de América del Norte (EUA y Canadá). El segundo problema son los aspectos éticos ligados a la inmunización de sujetos sanos, teóricamente voluntarios.⁷

Obtención de inmunoglobulina anti-D a partir de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales, desde su descubrimiento en 1975 por Kohler y Milstein, tienen como ventaja que no necesitan como fuente plasma humano, reducen los costos de manufactura, son productos de alta pureza y no tienen riesgo de transmitir enfermedades, por lo cual no necesitan procedimientos de inactivación de patógenos. El objetivo de la primera etapa es seleccionar linfocitos B productores de anticuerpos humanos y la segunda es obtener la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes anti-D.⁵ Actualmente, existen cuatro anticuerpos monoclonales anti-D recombinantes que se están investigando en ensayos clínicos de tipo IgG 1 e Ig G 3.⁴

La inmunoprofilaxis anti-D

En 1900, von Dungern determinó con experimentos en conejos que la inmunización activa provocada por un antígeno determinado puede prevenirse por la administración pasiva de anticuerpos específicos contra el antígeno.⁷

En 1943, Levine observó que los anticuerpos anti-D se desarrollan más frecuentemente en aquellas mujeres que carecen de las aglutininas naturales anti-A y anti-B del sistema ABO. En 1956 se demostró que la incompatibilidad ABO feto materna ejercía una protección frente a la inmunización anti-D gracias a los experimentos realizados por Stern y cols.⁷

A partir de 1960 dos grupos de investigadores, uno en Liverpool y otro en Nueva York, comenzaron a efectuar trabajos experimentales sobre la prevención de la inmunización anti-D. El grupo inglés basó sus trabajos en los hallazgos anteriores de la protección ABO y la técnica de Kleihauer de elución ácida, descrita en 1957, para distinguir la hemoglobina (Hb) fetal de la del adulto.⁷

El grupo de Nueva York, en cambio, desarrolló sus trabajos experimentales basados en el reporte de Theobald Smith de 1909, en el que se demuestra que la respuesta inmunitaria frente al toxoide de la difteria podía ser inhibida por un exceso de antitoxina.

En 1960 el Dr. Finn, en un simposio médico en Liverpool, sugirió: *It might be possible to destroy any fetal red cell found in their maternal circulation following delivery by means of a suitable antibody. If successful, this would prevent the development of erythroblastosis, so mimicking natural protection afforded by ABO incompatibility.*⁷

El primer trabajo científico fue realizado por Stern y colaboradores en 1961, en el cual a 16 hombres voluntarios O Rh D negativo se les injectó repetidamente eritrocitos O Rh D positivo sensibilizados con suero anti-D. Ninguno de los 16 hombres se inmunió, mientras que en subsecuentes inyecciones de eritrocitos no sensibilizados en 10 hombres produjo la inmunización anti-D en cinco hombres después de la segunda inyección.⁷

Finn y su equipo, también en 1961, determinaron la incidencia y cantidad de eritrocitos fetales en la circulación de 256 madres Rh negativo. Los glóbulos rojos fetales se encontraron en 30 muestras (11.7%), y en cuatro (1.6%) el volumen de la hemorragia feto-materna fue superior a 5 mL. En la misma publicación, Finn y colaboradores injectaron a hombres voluntarios Rh negativo con eritrocitos Rh positivo.⁷

La subsecuente administración intravenosa de suero anti-D que contiene inmunoglobulinas M y G acelera la depuración de los eritrocitos Rh positivo, por lo que concluyen que una manera de prevenir la inmunización

anti-D en madres ABO compatibles puede ser mediante la rápida destrucción de los glóbulos rojos fetales inyectando suero anti-D, lo cual produce una rápida depuración, similar a la que se da cuando existe incompatibilidad ABO.⁷

En 1963 Clarke y colaboradores, del grupo de Liverpool, realizaron tres series de experimentos donde hombres voluntarios Rh negativo fueron inyectados con eritrocitos Rh positivo.⁷

En el primer experimento, 30 minutos después de la inyección de los eritrocitos, a la mitad de los hombres se les administró plasma que contenía anticuerpos anti-D del tipo IgM, lo cual tendría un efecto de protección similar a los anticuerpos ABO naturales que son también IgM. En el segundo experimento la mitad de los hombres voluntarios fue inyectada con 30-50 mL de plasma que contenía anticuerpos anti-D del tipo IgG.

Ocho de 13 hombres tratados con anti-D IgM desarrollaron inmunización (54%), mientras que sólo uno de 11 no tratados (9%) se inmunió, por lo que concluyeron que los anticuerpos anti-D completos (IgM) no sólo no previenen la inmunización anti-D, sino que parecen estimularla. En el segundo experimento, sólo tres de 21 hombres tratados con IgG anti-D (14%) y 11 de los 21 no tratados (54%) desarrollaron inmunización, lo cual sugiere una protección mediante anticuerpos incompletos (IgG). En el tercer trabajo se demostró que los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos IgG desaparecían más rápido de la circulación.

En 1968 la Food and Drugs Administration (FDA) en EUA aprobó la primera preparación comercial de inmunoglobulina anti-D, RhoGam de Ortho Clinical Diagnostics.⁷

En 1971, Pollack y su equipo establecieron la relación de la cantidad de inmunoglobulina anti-D (Ig RhD) necesaria para neutralizar un volumen determinado de eritrocitos fetales: 20 microgramos (μg) de IgRhD por ml de eritrocitos o 10 μg por mL de sangre fetal.

Finalmente, la primera profilaxis RhD antenatal durante la gestación fue realizada en Manitoba, Canadá en 1968. En la fase inicial 300 μg de Ig RhD eran administrados a las 34 semanas de gestación. Luego se cambió el protocolo y se administró una dosis a las 28 semanas y otra similar a las 34 semanas. Por último, la profilaxis antenatal se redujo a una sola dosis a las 28 semanas de gestación y una segunda IgRhD se administraba postparto si el recién nacido era Rh positivo.⁷

Mecanismo de acción

La inmunoglobulina RhD (IgRhD) es un hemoderivado producido a partir del fraccionamiento industrial de plasmas de individuos aloinmunizados en el que predo-

mina el anticuerpo anti-D de la clase inmunoglobulina G (IgG).^{14,15}

Una dosis de 300 µg de anti-D es suficiente para contrarrestar los efectos inmunitantes de 15 mL de eritrocitos Rh D positivo, o aproximadamente un total de 30 mL de sangre (efecto dosis dependiente).^{15,16}

Este efecto protector de la IgG anti-D en los individuos D negativo expuestos a células D positivo probablemente resulta de la interferencia con el reconocimiento antigeníco en la fase de inducción de la inmunización. La IgRhD en la circulación materna se une a los glóbulos rojos fetales (GRF) Rh D positivo y éstos son secuestrados en el bazo. Básicamente, las funciones de este órgano del sistema inmunitario son:⁷

1. Retirar células sanguíneas senescentes y microorganismos extraños por filtración.
2. Desarrollar la respuesta inmunitaria frente a antígenos foráneos.

Estas actividades están anatómicamente separadas, una se cumple en la pulpa roja y otra en la pulpa blanca. La rápida desaparición de los GRF sensibilizados de forma pasiva en la pulpa roja evitaría el contacto del antígeno D con las células inmunocompetentes de la pulpa blanca donde se produce la respuesta inmunitaria. Por ello, la inmunoprofilaxis con IgRhD no es efectiva una vez que se ha iniciado la respuesta inmunitaria. A los 13 días de la administración de 1 mL de eritrocitos RhD positivo la infusión de 100 µg de IgRhD neutraliza la inmunización en 50% de los casos.⁷

Se desconoce el mecanismo por el cual la inmunoglobulina anti-D suprime la inmunización a Rh (D) positivo. Sin embargo, la supresión puede relacionarse con la eliminación de los eritrocitos en la circulación antes de alcanzar los sitios inmunocompetentes. También podría tratarse de un mecanismo más complejo que involucraría el reconocimiento del antígeno extraño y la presentación del antígeno por las células apropiadas en los sitios específicos en presencia o ausencia de anticuerpos.^{15,16}

Las inmunoglobulinas disminuyen el paso transplacentario de anticuerpos y/o bloquean los receptores Fc del sistema reticuloendotelial fetal, disminuyendo así el grado de fagocitosis de los hematíes fetales.¹⁷

El producto se une a las moléculas del antígeno RHO (D) de eritrocitos Rh positivo. Estos antígenos son enmascarados y reconocidos por el sistema inmunitario como extraños, lo que previene la sensibilización e induce la opsonización del eritrocito cargado de anticuerpos.¹⁵

Donoso plantea tres hipótesis para tratar de explicar el mecanismo de acción de la inmunoglobulina anti-D:¹⁶

1. Protección dada por el bloqueo de los sitios antigenicos del eritrocito fetal por la Ig anti-D, evitando de este modo que dichos antígenos se pongan en contacto con las células inmunocompetentes.
2. La gammaglobulina anti-D al unirse a los sitios antigenicos del eritrocito fetal producirá una desviación de las células hacia sitios donde hay células con poca o ninguna capacidad de formar anticuerpos como sería el hígado.
3. Mecanismo de inhibición central del sistema Ag- Ac, en este caso, la acción protectora del anti-D pasiva es en las células, mismas que forman Ac y la producción de Ac inmunitarios se impide a través de un mecanismo de retroalimentación.

Como el mecanismo de profilaxis es mediante la administración pasiva de anticuerpos, no es una vacuna y tiene un efecto temporal, por lo cual debe repetirse la dosis en cada acto inmunizante. La IgRhD adecuadamente preparada mediante doble inactivación viral, como otras preparaciones de inmunoglobulinas, es un hemoderivado seguro que tiene un escaso riesgo de transmisión viral. Cada microgramo (µg) equivale a cinco unidades internacionales (UI).¹⁵

Usos de la inmunoglobulina anti-D

Cuando una sustancia extraña (antígeno) entra en contacto con el sistema inmunitario de un individuo, generalmente se produce una respuesta inmunitaria, ya sea mediada por células (inmunidad celular) o por anticuerpos (inmunidad humorral). Cuando la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos es producida por antígenos de individuos de la misma especie se denomina aloinmunización. En el hombre, esto ocurre usualmente ante transfusiones de hemocomponentes, compartir jeringas en la drogadicción intravenosa, gestaciones y/o trasplante de órganos y tejidos.

Cuando la mujer embarazada carece de los antígenos que el feto posee en sus glóbulos rojos y éstos penetran en la circulación materna, puede producirse una respuesta inmunitaria. La enfermedad hemolítica perinatal (EHP) es una patología típicamente producida por una reacción de hipersensibilidad tipo II mediada por anticuerpos dirigidos contra antígenos de la superficie celular.⁷

La formación de las células sanguíneas en el embrión humano comienza en la tercera semana de gestación y el antígeno D del sistema Rh ha sido demostrado en la membrana eritrocitaria a partir del día 38. Se han encontrado eritrocitos fetales en la circulación materna en los abortos espontáneos o provocados en el curso del primer

trimestre, por lo que existe riesgo de inmunización. La dosis mínima para producir una inmunización primaria sería de 0.01 a 0.03 mL de glóbulos rojos fetales, lo que equivale a un eritrocito fetal cada 100.000 maternos.⁷

En la práctica, el volumen de sangrado de una hemorragia fetomaterna (HFM) es variable, siendo en 99.5% de los casos menor de 15 mL. Sin embargo, un tercio de los individuos de la especie humana no responde a la estimulación antigenica (tolerancia inmunológica), es decir, no forman anticuerpos a pesar de entrar en contacto con el antígeno. Este carácter estaría regulado genéticamente por los genes de respuesta inmunitaria. A su vez, la incompatibilidad en el sistema ABO entre madre y feto disminuye el riesgo de aloinmunización y aproximadamente un tercio de las mujeres RhD negativo tendrá fetos también RhD negativo. Por lo tanto, el riesgo de inmunización anti-D por embarazo es de alrededor de 15%.⁷

Si los anticuerpos maternos corresponden a la clase inmunoglobulina G (IgG) cruzan la placenta hacia el feto frecuentemente en embarazos subsiguientes, y se produce una reacción antígeno-anticuerpo *in vivo* cuando las células fetales poseen el antígeno correspondiente. Se dice entonces que la madre está aloinmunizada a antígenos de glóbulos rojos humanos y que los eritrocitos fetales se encuentran sensibilizados, pues tienen el anticuerpo unido al antígeno presente en su membrana celular.^{15,16} Estos glóbulos rojos sensibilizados con la IgG son retirados de la circulación fetal por los macrófagos del sistema retículo endotelial, principalmente en el bazo, que tienen receptores para la fracción Fc de la inmunoglobulina o C3b del complemento, produciéndose una hemólisis extravascular.^{7,16}

Los anticuerpos de la clase IgG (monómeros) cuando se unen al antígeno de la membrana de los eritrocitos no producen aglutinación, dado que la distancia entre los dos fragmentos Fab (sitios de unión al antígeno) del anticuerpo no alcanzan a cubrir la distancia intercelular (50-100 Å) entre dos glóbulos rojos determinada por el potencial zeta. En el caso de las moléculas de IgM (pentámeros) más grandes se produce aglutinación directa.⁷

Para detectar la presencia del anticuerpo IgG por la técnica de aglutinación es necesario utilizar el suero de Coombs,¹⁸ procedimiento descrito en 1945 por Coombs, veterinario que inyectó a un conejo inmunoglobulinas humanas produciendo en el animal una respuesta inmunitaria humorada. Dado que la fracción Fc de la IgG humana es la fracción antigenica de la molécula, los fragmentos Fab del anticuerpo del conejo (antiglobulina humana) se unen a los Fc de la IgG unida a los eritrocitos formando un puente y haciendo visible su presencia mediante la

aglutinación de los glóbulos rojos. La magnitud de la aglutinación suele ser proporcional a la cantidad de IgG fijada.^{5,7}

Inmunoprofilaxis antes del parto

La IgRhD debe administrarse a una mujer RhD negativo con pruebas para anticuerpos anti-D negativo, luego de cualquier acontecimiento obstétrico capaz de permitir el ingreso de células fetales a la circulación materna: el aborto espontáneo o terapéutico, el embarazo ectópico, la amniocentesis, la extracción de muestras de vellosidades coriónicas, la cordocentesis, la hemorragia anteparto o la muerte fetal entre otros.^{2,7,19-21}

Si cualquiera de estas posibilidades ocurre antes de las 13 semanas de gestación, una dosis de 50 µg de IgRhD es adecuada para proteger contra el pequeño volumen HFM durante el primer trimestre. Desde las 13 semanas en adelante hasta el término se debe dar una dosis de IgRhD de 250-300 µg intramuscular o 120 µg intravenosa.^{2,7}

Se administra también IgRhD antes del parto entre las 28 y 32 semanas de gestación, dado que de las mujeres que desarrollan anticuerpos anti-D durante el embarazo, 92% lo hacen a esta edad gestacional.^{7,21}

Las mujeres RhD negativo aloinmunizadas, pero con anticuerpos diferentes al D (por ejemplo anti-c, anti-e, anti-C, anti-E, anti-Kell) son candidatas a la administración de IgRhD para evitar que se agregue un anticuerpo anti-D.^{1,7}

No se debe administrar IgRhD a las mujeres embarazadas RhD positivo, D débil, ni a las que ya están aloinmunizadas.⁷

Inmunoprofilaxis postparto

La sangre de cordón de recién nacidos de madres D negativo se debe someter a pruebas para grupo sanguíneo ABO, RhD y la prueba de Coombs directa (CD). Una mujer RhD negativo cuyo recién nacido es RhD negativo no debe recibir IgRhD. En caso de que el recién nacido sea RhD positivo o Du con CD negativa, la madre debe recibir una dosis de 300 µg de IgRhD intramuscular o 120 µg intravenosa lo antes posible dentro de las 72 horas posteriores al parto. Si pasan más horas es mejor hacer la inmunoprofilaxis que no hacerla. En algunos casos ha sido efectiva aún administrada hasta 13 días después del parto.^{7,19,21}

Una mujer embarazada Rh negativo con prueba de Coombs indirecta negativa (CI) puede tener también un RN con CD positiva debido a un conflicto ABO, por lo cual debe recibir inmunoglobulina anti-D postparto. Una

mujer embarazada Rh negativo con Cl positiva por un anticuerpo diferente al D (anti-C, anti-e, anti-Kell) puede tener un RN RhD positivo con CD positiva o negativa. En ambos casos debe recibir inmunoprofilaxis anti-D postparto.

Un RN Rh D positivo puede tener una CD positiva porque la madre Rh D negativo también presenta una CD positiva por autoanticuerpos (casi siempre antifosfolípidos) que pasan la placenta. En estos casos también debe realizarse inmunoprofilaxis cuando el RN es Rh D positivo.

En Uruguay se utiliza una preparación intravenosa de anti-D para la supresión de la inmunización anti-D. Se recomienda una dosis de 120 µg (600 UI) de IgRhD intravenosa dentro de las 72 posteriores al parto, dado que con la administración intravenosa se alcanza una concentración plasmática de IgRhD 2.5 veces superior y más precozmente que la intramuscular. La administración intravenosa tiene como ventajas que se necesita menos dosis, es de acción más rápida, no depende de la superficie corporal y es menos costosa. Administrar una dosis de 120 µg intramuscular antenatal y otra igual postparto tiene un costo promedio similar al suministro de una sola dosis intramuscular postparto de 300 µg.⁷

No existe un criterio universal para la inmunoprofilaxis anti-D. La dosis de inmunoglobulina anti-D a administrar así como las pruebas para determinar el volumen de la hemorragia fetomaterna varían de un país a otro.^{7,21,22}

Transfusiones incompatibles de eritrocitos en pacientes Rh (D) negativo

La dosis recomendada es de 20 µg (100 UI) de inmunoglobulina anti-D por cada 2 mL de sangre Rh (D) positivo transfundida o por 1 mL de concentrado de eritrocitos. Se deben realizar pruebas de seguimiento para detectar los eritrocitos Rh (D) positivo cada 48 horas y administrar inmunoglobulina anti-D adicional hasta que los eritrocitos Rh (D) positivo hayan sido eliminados de la circulación. Una dosis máxima de 3,000 µg (15.000 UI) es suficiente incluso si más de 300 mL de sangre Rh (D) positivo o 150 mL de concentrado de eritrocitos fueran transfundidos.^{7,21}

CONSIDERACIONES FINALES

La obtención de la gammaglobulina anti-D relaciona todas las actividades de la cadena transfusional desde la promoción, reclutamiento y selección de donantes hasta la vigilancia de efectos adversos después del uso del producto.

A pesar de la importancia que posee el uso de este hemoderivado en la prevención de la EHFRN y en las

transfusiones incompatibles, su disponibilidad y cobertura para la asistencia sanitaria no ha alcanzado la magnitud que requiere.

Varios factores inciden sobre este aspecto, la falta de criterio unificado para los esquemas de inmunización que se aplican a los donantes, la necesidad de reclutar y fidelizar donantes voluntarios, aspectos éticos y económicos, entre otros elementos logísticos.

La obtención de inmunoglobulina anti-D mediante el uso de anticuerpos monoclonales resulta ventajosa y promisoria, pero aún no es técnicamente posible su producción.

REFERENCIAS

1. Ballester Santovenia JM, Alfonso Valdés ME, Bencomo Hernández AA, Macías Abraham C. ABC en medicina transfusional. Guías clínicas. Cuba 2da ed. La Habana: Instituto de Hematología e Inmunología; 2016.
2. Lambertino MJ, Villegas GS. Aloinmunización Rh en mujeres gestantes, una mirada al diagnóstico y a su aproximación terapéutica. Ginecol Obstet Mex 2014; 82: 744-754. [citado 13 febrero 2019] Disponible en: <http://www.femecog.org.mx>.
3. Vázquez M, Castillo D, Pávez Y, Maldonado M, Mena A. Frecuencia de antígenos del sistema sanguíneo Rh y del sistema Kell en donantes de sangre. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter Ciudad de la Habana. 2015 [citado 14 marzo 2019]: 31 (2); Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892015000200007.
4. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 11th ed. London: Blackwell Scientific Publications; 2009.
5. Barrera, MF. Incompatibilidades sanguíneas materno-fetales en recién nacidos atendidos en el servicio de neonatología del hospital José María Velasco Ibarra. Enero-Junio 2010. 2014. [Citado 14 marzo 2019] Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/3444>.
6. Hernández M, Iglesias T, Abascal H. Isoinmunización ABO en recién nacidos en Pinar del Río. 2017 [citado 13 marzo 2019]: 21 (4); Disponible en: <http://revcmpinar.sld.cu/index.php/publicaciones/article/view/3152/html>.
7. Decaro J. Prevención de la inmunización anti-RhD en la gestación y transfusión de hemocomponentes. Arch gin obstet. 2009; 47 (1-3): 18-29. [Citado 13 marzo 2019] Disponible en http://www.clausen.com.uy/img/experiencia_clinica/03_actualizacion_diagnostica_terapeutica.pdf.
8. Colectivo de Autores. Manual técnico. El sistema Rh. P 389-410. 17ma edición. 2008.
9. Fernández I, Moreno R, Olivera D. Propuesta de inmunización para donantes de plasmaférésis anti-D. Rev Medicentro. 2012; 16 (2):
10. Genetet B, Mannoni P. Donación de sangre. Extracción y organización. En: Genetet B, Mannoni P. La transfusión. La Habana: Científico-Técnica; 1984.
11. Molé JR et al. Programa de plasmaférésis productiva e inmunización de donantes anti-D en Manzanillo. Multimed 1997; [citado 14 marzo 2019] : 1 (3). Disponible en: <http://www.multimedgrm.sld.cu/articulos/1997/V1-3/8.html>.
12. Ministerio de Salud Pública. Regulación 35-2003. Requisitos del plasma humano como materia prima farmacéutica. CECMED. [Citado 18 enero 2019] Disponible en: http://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/Reg_35-03.pdf.

13. Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation. World Health Organization. WHO Technical Report Series No 941, 2007. [Cited 14 March 2019] Available in: <https://www.who.int/biologicals/publications/ECBS%202005%20Annex%204%20Human%20Plasma%20Fractionation.pdf>.
14. Cabrera L, Vega, MC. Implementación de metodología para la producción de Inmunoglobulinas específicas en la ESPH "Adalberto Pesant" y desarrollo de estrategias para garantizar el suministro adecuado de plasma hiperinmune. 2013 [Citado 18 enero 2019] Disponible en: <https://www.researchgate.net>.
15. Rhophylac. Ficha técnica. CSL BehringGmbH. 2015 [Citado 18 enero 2019] Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2015/11/5/92976.pdf>.
16. Albuja D. Frecuencia de eritroblastosis en recién nacidos que presentan hiperbilirrubinemia en el Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora de Quito, 2015. Disertación de grado. [Citado 14 marzo 2019] Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13289/>.
17. Ugarte L, Cuadra M, Lete I, Lapuente O, González J. Enfermedad hemolítica perinatal causada por anticuerpos anti-M y tratada con Inmunoglobulinas intravenosas fetales. Progresos de Obstetricia y Ginecología. 2015; [Citado 13 marzo 2019]: 58 (7): 327-329. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pog.2015.02.012>.
18. Vizueta C, López B, Balon J, Zambrano R. Incompatibilidad Rh en el embarazo. Dom Cien. ISSN: 2477-8818, pp. 32-46. 2017 [Citado 13 marzo 2019]; 3 (4): Disponible en: <https://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/index>.
19. Donoso E. Uso de la inmunoglobulina anti-D en la prevención de la isoimunización Rh. [Citado 13 febrero 2019] Disponible en: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>.
20. McBain RD, Crowther CA, Middleton P. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. 2015 [Cited 14 March 2019]. Available in: https://www.cochrane.org/CD000020/PREG_anti-d-administration-pregnancy-preventing-rhesus-alloimmunisation.
21. Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Hemolítica por Isoimunización a Rh en el Recién Nacido. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. México, CENETEC; 2018 [Citado 13 marzo 2019]. Disponible en: <http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc>.
22. Inmunoglobulina anti-RhO. Formulario Nacional de Medicamentos. Cuba. 2018. [Citado 18 enero 2019] Disponible en: <http://fnmedicamentos.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=381>.

Incremento en la medición sigma por la implementación de estrategias en inmunoquímica del Laboratorio Médico Echavarría

Improvement in sigma measurement through the implementation of strategies for immunochemistry of Laboratorio Médico Echavarría

Salazar-Agudelo Sorany Cristina,* Ruiz-Cadavid Alejandra,† Salazar Jéssica Verónica§

Palabras clave:

Sigma, control de calidad, inmunoquímica, laboratorio.

Keywords:
Sigma, quality control, immunochemistry, laboratory.

*Coordinadora

Postanalítica.

†Analista de investigación, desarrollo e innovación.

§Analista de diagnóstico clínico en fase analítica.

Laboratorio Médico Echavarría.

Correspondencia:

Sorany Cristina

Salazar-Agudelo

Laboratorio Médico Echavarría

Cerrada 46 Núm. 14-

175, Medellín,

Tel: 444-4343,

Opción 3 ext. 129,

E-mail:

coordpostanalitica@labechavarria.com

Recibido:

26/03/2019

Aceptado:

04/07/2019

RESUMEN

Seis sigma es una herramienta de gestión de la calidad que introduce el concepto de mejora basado en la medida de la variabilidad de un proceso en comparación con metas analíticas establecidas. El propósito de este estudio fue determinar el cambio en la medición sigma de los mensurandos del área de inmunoquímica con la implementación de estrategias de mejoramiento y estandarización en el Laboratorio Médico Echavarría. Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo, empleando los informes de control de calidad internos entre los meses enero y agosto de 2018 para extraer la medida sigma de los mensurandos de inmunoquímica controlados a nivel nacional. En todos los programas se demostró un aumento de la medición > 3.00 en agosto en comparación con enero, además de un porcentaje de incremento total de 14.3% y una disminución generalizada en los inferiores a 1.65. Estos resultados evidenciaron que la implementación de estrategias de mejoramiento y estandarización ha permitido conseguir una mejora en las mediciones sigma, lo cual apunta a la mejora de la confiabilidad en la validación de los resultados, la disminución del número de reprocessos del material de control, falsos rechazos y aceptaciones, calibraciones y tiempo invertido en el análisis de los errores.

ABSTRACT

Six Sigma is a quality management tool that incorporates the improvement concept, based on the variability measure of a process compared with some established analytic goals. The purpose of this study was to determine change over sigma of immunochemistry mensurands, with improvement and standardization strategies in Laboratorio Médico Echavarría. A retrospective descriptive study was made and the internal quality control reports were used between January and August of 2018, to get sigma measurement of controlled immunochemistry mensurands nationally. In all the programs, an increase of sigma measurement > 3,00 was demonstrated in August compared with January, besides a total increase percentage of 14.3% and general decrease to those below 1,65. These results showed that implementation of improvement and standardization strategies have allowed the achievement of improved sigma measurements, that pointed to most trustable results, decrease of control reagents retested, false rejections and acceptances, calibrations and time taken for error analysis.

INTRODUCCIÓN

La calidad se define, según la Organización Internacional para la Normalización (ISO, por sus siglas en inglés) como el grado en que un conjunto de características inherentes

cumple con los requisitos; asimismo, el control de la calidad se enfoca en alcanzar los requerimientos de la misma.¹ Sus inicios en el laboratorio clínico se dieron en la década de los 40 y alrededor de 1950, Levey y Jennings introdujeron los gráficos para realizar el

análisis de un material de control conjuntamente con cada serie de muestras de pacientes.^{2,3} La evolución de este concepto se dio de la mano de los cambios de las plataformas tecnológicas y de la automatización en los procesos del laboratorio, haciendo necesaria la implementación de nuevas y mejores herramientas estadísticas para el análisis de control de calidad, garantizando la emisión de resultados seguros y confiables para la toma de decisiones asertivas médicas en salud.⁴

El modelo seis sigma es una herramienta de gestión de calidad que introduce el concepto de mejora basado en la medida de la variabilidad de un proceso en comparación con metas analíticas establecidas, en términos de desviación típica o de fallos (defectos) por millón. El valor seis sigma ideal implica que la variabilidad de un proceso debe caber seis veces dentro del límite aceptable preestablecido, para considerar que el proceso funciona perfectamente.^{5,6} Para el laboratorio clínico, un sigma igual o superior a 3.0 se considera como la meta inicial de medición (aceptable) y a su vez indica 66,807 defectos por millón de oportunidades (DPMO); asimismo, un valor sigma 4 corresponde a 6,210 DPMO, 5 a 233 DPMO y 6 corresponde a 3.4 DPMO.⁷

De acuerdo con la medición seis sigma, se pueden identificar los errores en el laboratorio clínico (sistématico y aleatorio) de cada uno de los mensurandos, lo cual facilita al personal de la salud tomar acciones inmediatas (correctivas) y planes de mejora que conllevan aumentar la eficiencia de los procesos.⁸

Para la adecuada implementación de un proyecto seis sigma se debe desarrollar previamente una metodología de análisis del desempeño del sistema, una de ellas es la metodología DMAIC (por las iniciales de definir, medir, analizar, mejorar y controlar), la cual se basa en el seguimiento de un formato estructurado y disciplinado fundado en el planteamiento de una hipótesis, la realización de experimentos y la posterior evaluación para confirmar o rechazar la hipótesis previamente planteada.⁹

Hace unos años, en el Laboratorio Médico Echavarría (LME) se inició la implementación de la medición sigma para el control de la calidad analítica en sus mediciones en las diferentes centrales de procesamiento. Con el cambio tecnológico emprendido en el año 2017 y que permitió unificar la plataforma tecnológica a nivel nacional, facilitando la estandarización y armonización de los instrumentos y procesos, se tomó la decisión de implementar una serie de mejoras basadas en una evaluación objetiva y tangible, con el fin de mejorar el grado de calidad en las mediciones obtenidas a partir de la medición sigma.

El objetivo de este estudio fue determinar el cambio en la medición sigma de los mensurandos del área de inmunoquímica, con la implementación de estrategias de mejoramiento y estandarización en el LME.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo a partir de los informes generados por el proveedor de control de calidad interno Quik SAS, de la medida sigma de los mensurandos controlados a nivel nacional con el control de calidad interno BioRad, registrados en el software Unity Real Time de los programas de química sanguínea, química urinaria, inmunología, marcadores cardíacos, hormonas y marcadores tumorales.

Las mediciones se llevaron a cabo en los sistemas Architect c4000 y c8000 para química (sanguínea y urinaria), inmunología y marcadores cardíacos; para hormonas y marcadores tumorales se utilizaron los sistemas Architect i1000 e i2000. El cambio a esta plataforma tecnológica se realizó en el transcurso del año 2017, con un cronograma de cambio mensual a nivel nacional, logrando así tener los mismos sistemas en 82.3% de las centrales de procesamiento (CDP) en el laboratorio. Posterior a cada cambio, se contó con periodo de familiarización y aprendizaje del usuario y estabilización de la plataforma tecnológica.

Se tuvieron en cuenta los informes generados entre los meses de enero y agosto de 2018 de las CDP ubicadas en las siguientes ciudades: Medellín, Bello, Caldas, Manizales, Popayán, Apartadó, Barranquilla, Montería, Santa Marta, Sincelejo, Bogotá, Cali, Cúcuta, Bucaramanga, Tunja y Villavicencio.

A los mensurandos de los programas se les aplicó la medición sigma a partir de la fórmula:

$$\text{Medida sigma} = \frac{\% \text{ error total} (\%ET) - \% \text{ sesgo}}{\% \text{ coeficiente de variación} (\%CV)}$$

La medida sigma se caracterizó de acuerdo con los siguientes valores relacionados en los informes: menor de 1.65, entre 1.65 y 2.99, entre 3.00 y 4.99 y mayor o igual a 5.00.

Una vez identificados los analitos que se encontraban en una escala menor de 3.00, se clasificaron las posibles causas (por imprecisión e inexactitud).

Con el objetivo de mejorar aquellos mensurandos que se hallaban con baja medida sigma y para mantener la escala de aquéllos que presentaban buen comportamiento, se llevaron a cabo las siguientes estrategias en el transcurso del periodo evaluado:

1. Armonización de los instrumentos de medición mediante la unificación de los valores diana y metas analíticas, permitiendo tener la misma referencia a nivel nacional.
2. Evaluación de la validez de las dianas y las metas analíticas teniendo en cuenta los informes de la plataforma tecnológica clasificados por percentiles.
3. Creación de guías de manejo para el uso del material del control de calidad para minimizar la variación por cambios de usuario.
4. Programación de reglas de Westgard de acuerdo con los desempeños obtenidos en la medición sigma.

Para los ocho meses analizados, se determinaron los porcentajes para los mensurandos en las diferentes escalas de la medición sigma.

Además, se calculó el porcentaje de variación del total de los mensurandos con medida sigma > 3.00 del mes de agosto en comparación con el de enero.

RESULTADOS

Se analizó el total de los siguientes mensurandos por programa de control interno, los cuales se detallan en el cuadro I.

Respecto a las estrategias implementadas resaltaron las siguientes:

- Se unificaron los valores diana y las metas analíticas de cada uno de los mensurandos para todas las CDP, logrando la estandarización de las evaluaciones obtenidas, a las cuales se les dio validez con la compa-

Cuadro I. Número de mensurandos evaluados por programa y por mes.

Programa	Mes								Total
	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	
Química sanguínea	708	705	708	758	698	806	764	728	5,875
Química urinaria	81	91	137	137	135	125	122	123	951
Inmunología	43	38	35	35	37	41	40	35	304
Marcadores cardiacos	18	24	27	24	24	24	24	21	186
Hormonas	157	188	195	165	207	255	241	177	1,585
Marcadores tumorales	12	9	9	9	9	9	9	9	75
Total	1,019	1,055	1,111	1,128	1,110	1,260	1,200	1,093	8,976

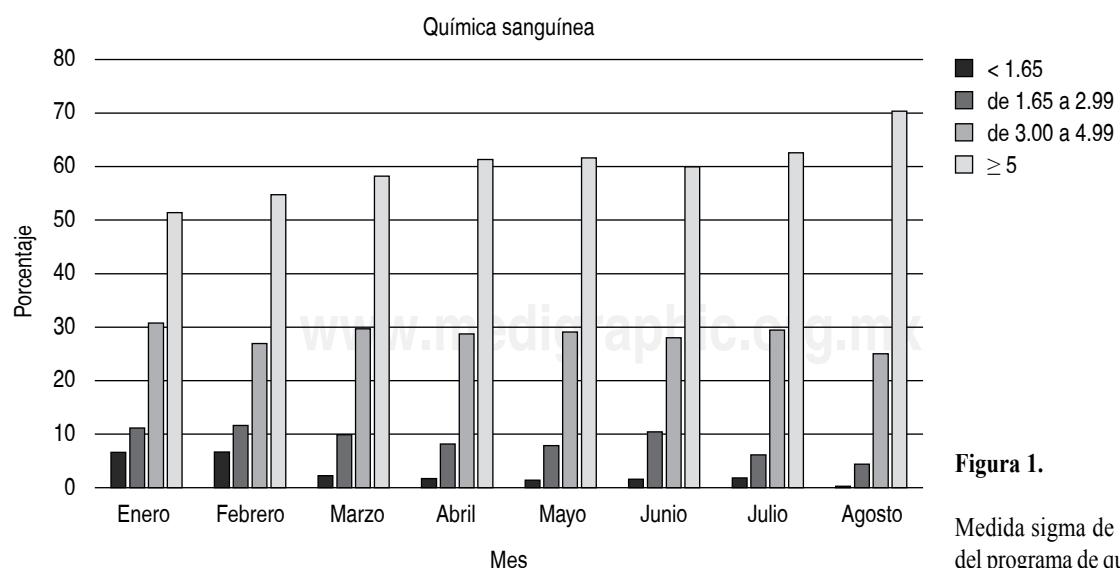


Figura 1.

Medida sigma de los mensurandos del programa de química sanguínea.

ración de las metas establecidas según los percentiles de la plataforma analítica.

- Se unificó en una matriz global la información del manejo del control de calidad interno y externo según las recomendaciones de los insertos de cada uno de los programas.
- Teniendo un periodo de estabilización de la medición sigma comparada a nivel nacional, en el mes de mayo se realizó la programación de las reglas de Westgard según la recomendación que éste hace a partir del resultado de sigma para los mensurandos, así: 6σ o más (1_{3s}), 5σ ($1_{3s}, 2_{2s}$, R_{4s}), 4σ ($1_{3s}, 2_{2s}$, $R_{4s}, 4_{1s}$) y 3σ o menos ($1_{3s}, 2_{2s}$, $R_{4s}, 4_{1s}, 8x$).³

Los porcentajes de las diferentes escalas de la medición sigma de los mensurandos durante el periodo analizado y para cada uno de los programas se muestran en las figuras 1 a 6.

En el programa de química sanguínea se presentó un aumento en el porcentaje de mensurandos con medición sigma aceptable (> 3.00), pasando de 82.2% en enero a 95.3% en agosto; de igual forma, los porcentajes de química urinaria, inmunología, marcadores cardíacos, hormonas y marcadores tumorales, aumentaron de 90.1 a 94.3%, 81.4 a 97.1%, 55.6 a 95.2%, 80.3 a 84.7% y 66.7 a 88.9%, respectivamente.

A su vez, en el programa de química sanguínea se observó una disminución en el porcentaje de mensuran-

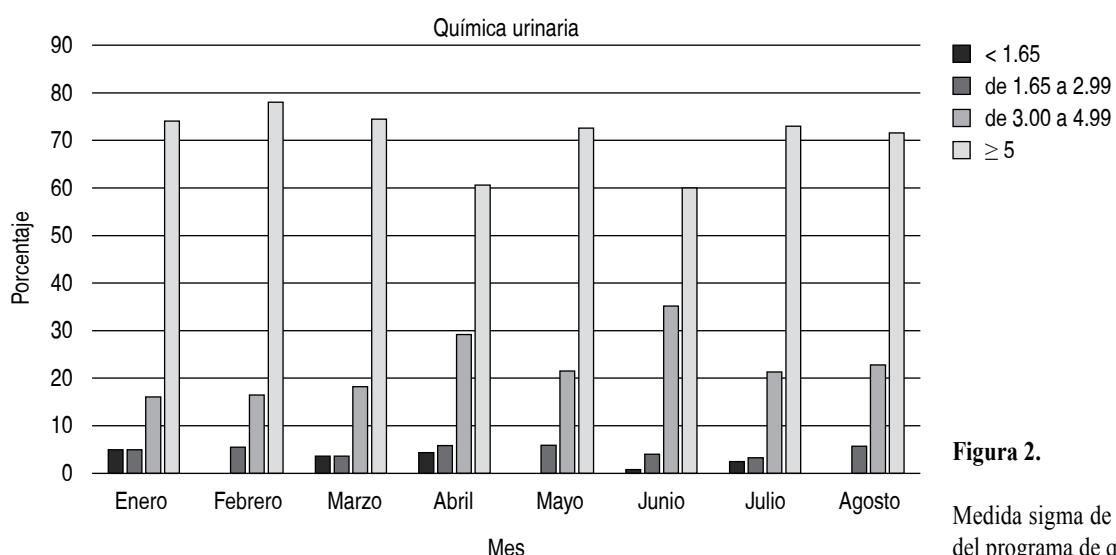


Figura 2.

Medida sigma de los mensurandos del programa de química urinaria.

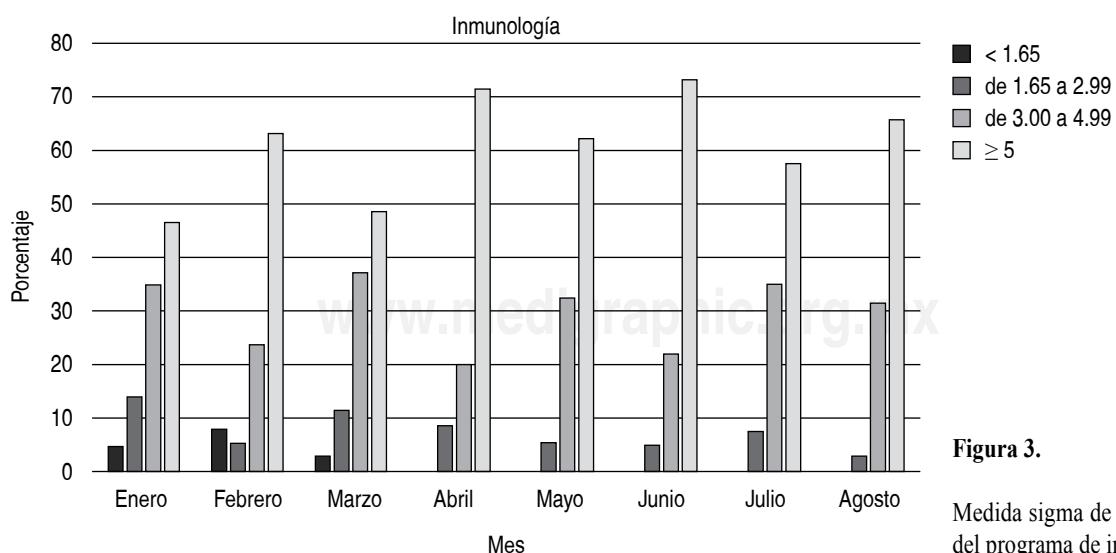


Figura 3.

Medida sigma de los mensurandos del programa de inmunología.

dos con medición sigma < 1.65 de 6.6 a 0.3%; de igual forma, los porcentajes de química urinaria, inmunología, marcadores cardíacos, hormonas y marcadores tumorales disminuyeron de 4.9 a 0.0%, de 4.7 a 0.0%, de 33.3 a 0.0%, de 6.4 a 0.6% y de 25.0 a 0.0%, respectivamente.

El porcentaje de cambio/mejora en la medición sigma > 3.00 de los mensurandos por programa y en general del área de inmunoquímica, comparando el mes de inicio y el de finalización del estudio se muestra en el cuadro II.

DISCUSIÓN

Una metodología sistemática y organizada de cada una de las mejoras en el programa de control de calidad es-

tablecido puede favorecer la medición sigma a través de la implementación de estrategias que involucren acciones preventivas y correctivas.^{10,11}

Por su parte, si bien la automatización de los laboratorios clínicos ha traído un gran avance en la estandarización y aumento de la calidad en los resultados, es primordial contar con personal altamente capacitado y comprometido en el correcto manejo de cada uno de los procesos de los cuales hace parte.

Aunque las metas analíticas sean establecidas por cada laboratorio, éstas no deberían ser ajenas a la realidad del desempeño analítico que tienen las diferentes plataformas tecnológicas (reportes de manufactura) para poder realizar una evaluación objetiva del des-

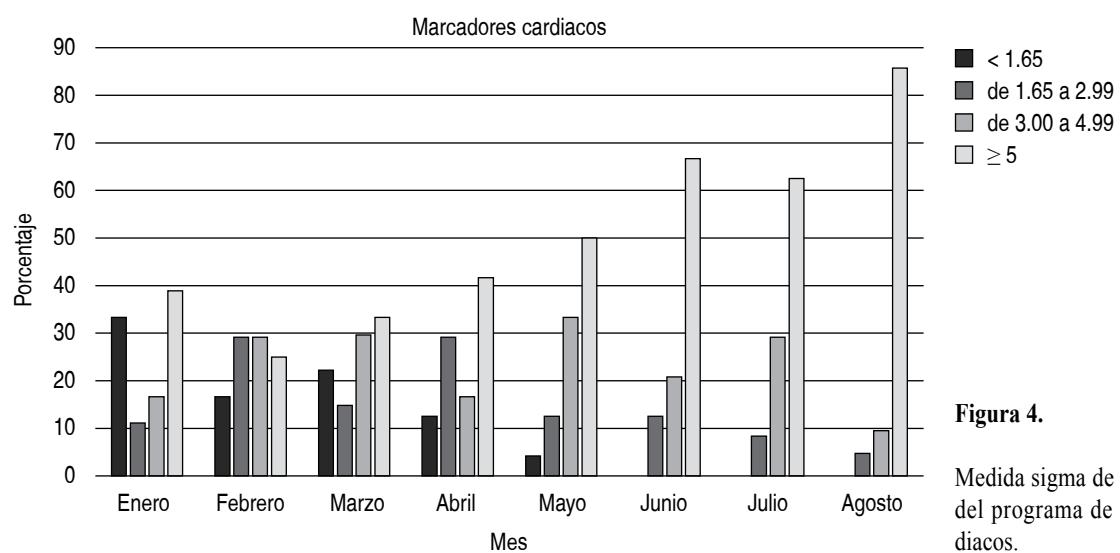


Figura 4.

Medida sigma de los mensurandos del programa de marcadores cardíacos.

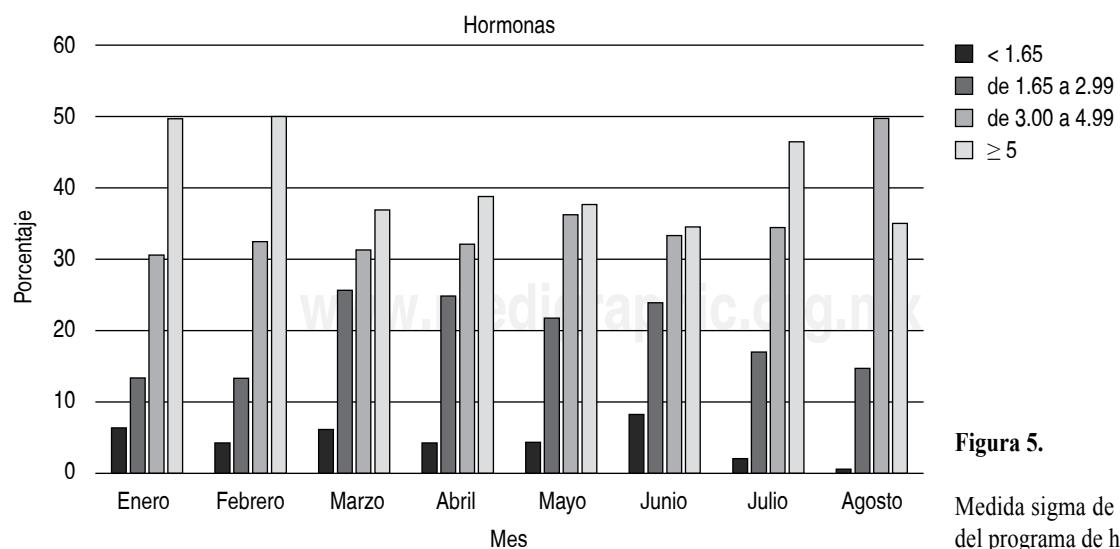


Figura 5.

Medida sigma de los mensurandos del programa de hormonas.

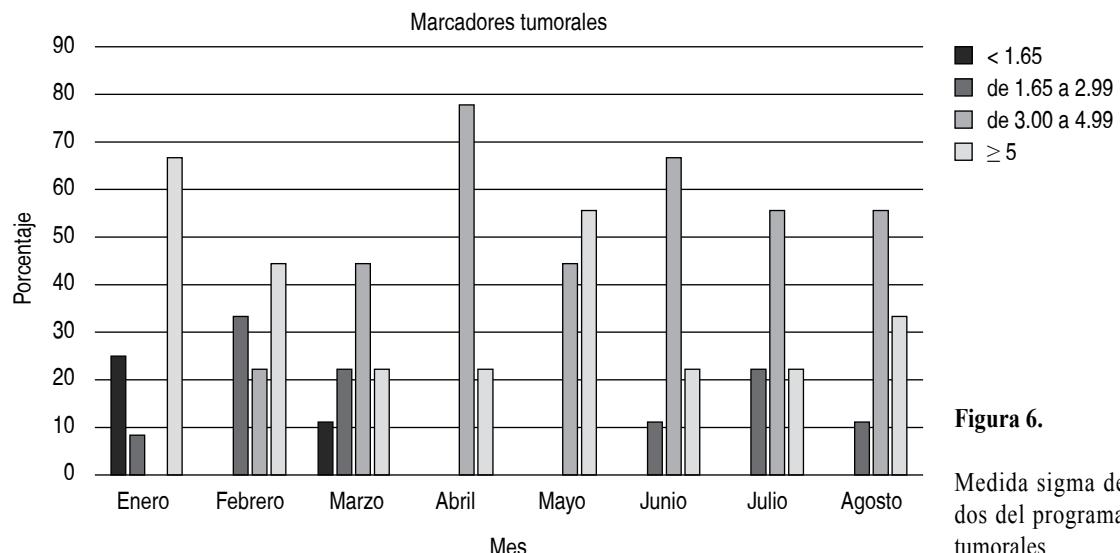


Figura 6.

Medida sigma de los mensurandos del programa de marcadores tumorales.

Cuadro II. Porcentaje de cambio de la medición sigma > 3.00 entre enero y agosto.

Programa	Enero	Agosto	% cambio
Química sanguínea	82.2	95.3	16.0
Química urinaria	90.1	94.3	4.6
Inmunología	81.4	97.1	19.3
Marcadores cardiacos	55.6	95.2	71.4
Hormonas	80.3	84.7	5.6
Marcadores tumorales	66.7	88.9	33.3
Total	81.8	93.5	14.3

empeño individual bajo las condiciones de proceso de cada laboratorio.

Por lo anterior, con el fin de armonizar los métodos y realizar una trazabilidad global del desempeño del control de calidad en el LME, se tomaron como base los reportes unificados de los resultados de la medición sigma, los cuales permitían identificar los mensurandos críticos por ciudad que debían ser intervenidos y así, reconocer situaciones generalizadas que pudieran estar relacionadas con la plataforma analítica. Posterior a estas intervenciones y tal como se evidenció en este trabajo, se presentó un incremento en la medición sigma de los mensurandos de todos los programas, siendo mayor el observado en los de marcadores cardiacos y marcadores tumorales; esto puede explicarse por el bajo número de mensurandos, teniendo en cuenta que los cambios en alguno de ellos se reflejan en la variación del porcentaje.

CONCLUSIONES

Con este trabajo fue posible evidenciar que los resultados de la implementación de una metodología sistemática y organizada de las estrategias para la mejora del control de calidad se reflejaron en el aumento de la medición sigma de los mensurandos de los programas de inmunoquímica a nivel nacional, con un porcentaje de incremento total de 14.3% en las mediciones mayores de 3.00 sigma y con una disminución generalizada en los inferiores a 1.65.

Es claro que la implementación de la medición sigma permite mejorar la confiabilidad en la validación de los resultados, conllevando a la disminución del número de reprocesos del material de control, falsos rechazos y aceptaciones, calibraciones y tiempo invertido en el análisis de los errores, ya que permite enfocarse en los mensurandos que requieren intervención.

REFERENCIAS

- Asociación Española de Normalización y Certificación. Laboratorios clínicos Requisitos particulares para la calidad y la competencia. UNE-EN ISO 15189:2007. Madrid: AENOR; 2007.
- Sunderman W. The History of Proficiency Testing/Quality Control. Clin Chem. 1992; 38 (7): 1205-1209.
- Levey S, Jennings ER. The use of control charts in the clinical laboratory. Am J Clin Pathol. 1950; 20: 1059-1066.
- Díaz A. Aspectos del aseguramiento de la calidad en los laboratorios de hemostasia. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2002; 18 (2).
- Westgard S. Six Sigma metric analysis for analytical testing processes. Abbott MS-09-7907 V4 0. 2009.
- Ricós C, Perich C, Álvarez V, Biosca C, Doménech M, Jiménez C et al. Aplicación del modelo Seis-Sigma en la mejora de la calidad analítica del laboratorio clínico. Rev Lab Clin. 2009; 2 (1): 2-7.

7. Westgard J. Conceptos básicos de Seis Sigma. En: Westgard J, editores. Seis Sigma: diseño y control de calidad. 2da ed. Bogotá-Colombia: Editorial Writer's Book Company SAS; 2018. p. 31-45.
8. Del Campillo S, De Elías R, Kiener G, Kiener O, Barzón S. Especificaciones de calidad en base a error total: ¿Cuál es la mejor elección? *Acta Bioquím Clin Latinoam*. 2017; 51 (2): 227-235.
9. Terrés A. SIX SIGMA: determinación de metas analíticas. *Rev Mex Patol Clin*. 2007; 54 (1): 28-39.
10. Westgard J. Internal quality control: planning and implementation strategies. *Ann Clin Biochem*. 2003; 40 (6): 593-611.
11. Cumplido C, Hernández J, Andujo S, Guzmán H. Implementación de sigma métrico como parte esencial del control de calidad interno en hematología. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2015; 62 (3): 140-145.

www.medigraphic.org.mx

Instrucciones para los autores

La **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio** es el órgano oficial de difusión de la Federación Mexicana de Patología Clínica (FEMPAC) y de la Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio (ALAPAC/ML). La revista publica artículos originales, casos clínicos, temas de revisión, informe de casos clínicos, notas de historia, editoriales por invitación, cartas al editor y noticias varias de la FEMPAC y la ALAPAC/ML. Para su aceptación, todos los artículos son analizados inicialmente al menos por dos revisores y finalmente ratificados por el Comité Editorial.

La **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio** acepta, en términos generales, las indicaciones establecidas por el *International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)*. La versión actualizada de las *Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals* se encuentra disponible en www.icmje.org. Una traducción al español de esta versión de las Recomendaciones para la preparación, presentación, edición y publicación de trabajos académicos en revistas médicas se encuentra disponible en: www.medigraphic.com/requisitos

El envío del manuscrito implica que éste es un trabajo que no ha sido publicado (excepto en forma de resumen) y que no será enviado a ninguna otra revista. Los artículos aceptados serán propiedad de la **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio** y no podrán ser publicados (ni completos, ni parcialmente) en ninguna otra parte sin consentimiento escrito del editor. El autor principal debe guardar una copia completa del manuscrito original.

Los artículos deberán enviarse al editor de la **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, a la dirección electrónica: alberto.zamora@medigraphic.com

Los requisitos se muestran a continuación en la lista de verificación. El formato se encuentra disponible en www.medigraphic.com/patologiaclinica/instrucciones (PDF). Los autores deberán descargarla e ir marcando cada apartado una vez que éste haya sido cubierto durante la preparación del material para publicación.

La lista de verificación en formato PDF deberá enviarse junto con el manuscrito, también deberá adjuntar la forma de transferencia de derechos de autor. Los manuscritos inadecuadamente preparados o que no sean acompañados de la lista de verificación serán rechazados sin ser sometidos a revisión.

ASPECTOS GENERALES

- Los artículos deben enviarse en formato electrónico. Los autores deben contar con una copia para su referencia.
- El manuscrito debe escribirse con tipo arial tamaño 12 puntos, a doble espacio, en formato tamaño carta, con márgenes de 2.5 cm en cada lado. La cuartilla estándar consiste en 30 renglones, de 60 caracteres cada renglón (1,800 caracteres por cuartilla). Las palabras en otro idioma deberán presentarse en letra itálica (cursiva).
- El texto debe presentarse como sigue: 1) página del título, 2) resumen y palabras clave [en español e inglés], 3) introducción, 4) material y métodos, 5) resultados, 6) discusión, 7) agradecimientos, 8) referencias, 9) apéndices, 10) texto de las tablas, 11) pies de figura. Cada sección se iniciará en hoja diferente. El formato puede ser modificado en artículos de revisión y casos clínicos, si se considera necesario.
- Numeración consecutiva de cada una de las páginas, comenzar por la página del título.

- Anote el nombre, dirección y teléfono de tres probables revisores, que no pertenezcan a su grupo de trabajo, a los que se les puede enviar su artículo para ser analizado.

TEXTO

Página de título

- Incluye:
- 1) Título en español e inglés, de un máximo de 15 palabras y título corto de no más de 40 caracteres,
 - 2) Nombre(s) de los autores en el orden en que se publicarán, si se anotan los apellidos paterno y materno pueden aparecer enlazados con un guión corto,
 - 3) Créditos de cada uno de los autores,
 - 4) Institución(es) donde se realizó el trabajo y
 - 5) Dirección para correspondencia: domicilio completo, teléfono, fax y dirección electrónica del autor responsable.

Resumen

- En español e inglés, con extensión máxima de 200 palabras.
- Estructurado conforme al orden de información en el texto:
- 1) Introducción,
 - 2) Objetivos,
 - 3) Material y métodos,
 - 4) Resultados y
 - 5) Conclusiones.
- Evite el uso de abreviaturas, pero si fuera indispensable su empleo, deberá especificarse lo que significan la primera vez que se citen. Los símbolos y abreviaturas de unidades de medidas de uso internacional no requieren especificación de su significado.
- Palabras clave en español e inglés, sin abreviaturas; mínimo tres y máximo seis.

Texto

- Manuscrito que no exceda de 10 páginas, dividido en subtítulos que faciliten la lectura.
- Deben omitirse los nombres, iniciales o números de expedientes de los pacientes estudiados.
- Se aceptan las abreviaturas, pero deben estar precedidas de lo que significan la primera vez que se citen y las de unidades de medidas de uso internacional a las que está sujeto el gobierno mexicano.
- Los fármacos, drogas y sustancias químicas deben denominarse por su nombre genérico, la posología

y vías de administración se indicarán conforme a la nomenclatura internacional.

- Al final de la sección de material y métodos se deben describir los métodos estadísticos utilizados.

Reconocimientos

- Los agradecimientos y detalles sobre apoyos, fármaco(s) y equipo(s) proporcionado(s) deben citarse antes de las referencias. Enviar permiso por escrito de las personas que serán citadas por su nombre.

Referencias

- Se identifican en el texto con números arábigos y en orden progresivo de acuerdo a la secuencia en que aparecen en el texto.
- Las referencias que se citan solamente en los cuadros o pies de figura deberán ser numeradas de acuerdo con la secuencia en que aparezca, por primera vez, la identificación del cuadro o figura en el texto.
- Las comunicaciones personales y datos no publicados, serán citados sin numerar a pie de página.
- El título de las revistas periódicas debe ser abreviado de acuerdo al *Catálogo de la National Library of Medicine* (NLM): disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals> (accesado 4/Mar/13). Se debe contar con información completa de cada referencia, que incluye: título del artículo, título de la revista abreviado, año, volumen y páginas inicial y final. Cuando se trate de más de seis autores, deben enlistarse los seis primeros y agregar la abreviatura *et al.* Ejemplos:

Artículo de publicaciones periódicas:

Díaz PP, Olay FG, Hernández GR, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara GLE. Determinación de los intervalos de referencia de biometría hemática en población mexicana. Rev Latinoamer Patol Clin 2012; 59 (4): 243-250.

Libros, anotar edición cuando no sea la primera:

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

Capítulo de libro:

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Para más ejemplos de formatos de las referencias, los autores deben consultar: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cuadros

- No tiene.
 Sí tiene.

Número (con letra): _____

- La información que contienen no se repite en el texto o en las figuras. Como máximo se aceptan 50 por ciento más uno del total de hojas del texto.
 Están encabezados por el título y marcados en forma progresiva con números romanos de acuerdo con su aparición en el texto.
 El título de cada cuadro por sí solo explica su contenido y permite correlacionarlo con el texto acotado.

Figuras

- No tiene.
 Sí tiene.

Número (con letra): _____

- Se consideran como tales las fotografías, dibujos, gráficas y esquemas. Los dibujos deberán ser diseñados por profesionales. Como máximo se aceptan 50 por ciento más una del total de hojas del texto.
 La información que contienen no se repite en el texto o en las tablas.
 Se identifican en forma progresiva con números arábigos de acuerdo con el orden de aparición en el texto, recordar que la numeración progresiva incluye las fotografías, dibujos, gráficas y esquemas. Los títulos y explicaciones se presentan por separado.

Las imágenes salen en blanco y negro en la versión impresa de la revista. Sin embargo, si las imágenes enviadas son en color, aparecerán así (en color) en la versión electrónica de internet. Si el autor desea que también se publiquen en color en la versión impresa, deberá pagar lo correspondiente de acuerdo con la casa editorial.

Fotografías

- No tiene.
 Sí tiene.

Número (con letra): _____
en color: _____

- Serán de excelente calidad, blanco y negro o en color. Las imágenes deberán estar en formato JPEG (JPEG), sin compresión y en resolución mayor o igual a 300 ppp. Las dimensiones deben ser al menos las de tamaño postal (12.5 x 8.5 cm), (5.0 x 3.35 pulgadas). deberán evitarse los contrastes excesivos.
 Las fotografías en las que aparecen pacientes identificables deberán acompañarse de permiso escrito para publicación otorgado por el paciente. De no ser posible contar con este permiso, una parte del rostro de los pacientes deberá ser tapado sobre la fotografía.
 Cada una estará numerada de acuerdo con el número que se le asignó en el texto del artículo.

Pies de figura

- No tiene.
 Sí tiene.

Número (con letra): _____

- Están señalados con los números arábigos que, conforme a la secuencia global, les corresponde.

Aspectos éticos

- Los procedimientos en humanos deben ajustarse a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (AMM) y con lo establecido en la Ley General de Salud (Título Quinto) de México, así como con las normas del Comité Científico y de Ética de la institución donde se efectuó.
 Los experimentos en animales se ajustan a las normas del *National Research Council* y a las de la institución donde se realizó.
 Cualquier otra situación que se considere de interés debe notificarse por escrito a los editores.

Transferencia de Derechos de Autor

Título del artículo:

[Redacted text area for article title]

Autor (es):

[Redacted text area for author(s) names]

Los autores certifican que el artículo arriba mencionado es trabajo original y que no ha sido previamente publicado. También manifiestan que, en caso de ser aceptado para publicación en la **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, los derechos de autor serán propiedad de esta revista.

Nombre y firma de todos los autores

[Redacted text area for author signatures]

Lugar y fecha:

[Redacted text area for location and date]

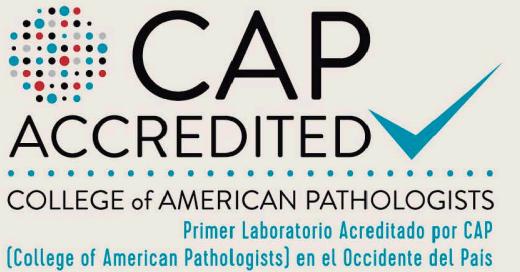


Unidad de
Patología
Clínica

El Laboratorio más confiable

Servicio de Referencia a Laboratorios de todo el País

Procesamiento de pruebas especiales por
la metodología más avanzada



¡COMPARE LA CALIDAD DE NUESTROS SERVICIOS!

Consulte en nuestra página web los resultados de sus pacientes en forma segura, confiable, confidencial y en tiempo real.



Esperamos su visita para que conozca nuestras instalaciones, equipos, sistemas y el departamento de Aseguramiento de Calidad

Laboratorios Centrales:

Av. México 2341 CP 44650, Guadalajara, Jal., México

Laboratorio: Tel. (33) 3669 0310 con 30 líneas

Imagenología: Tel. (33) 3669 0336

Servicio de Referencia: Tel. (33) 3669 0314

lab@upc.com.mx / imagenologia@upc.com.mx

- Agregometría Plaquetaria
- Anatomía Patológica
- Cargas Virales (RT-PCR en Tiempo Real)
- Citología Exfoliativa
- Citometría de Flujo Multiparamétrica
- Contrainmunoelectroforesis
- Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)
- Electroforesis
- Electroquimioluminiscencia
- Ensayo Fluorescente Ligado a Enzimas (ELFA)
- Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA)
- Espectrometría de Absorción Atómica (AAS)
- Espectrometría de Masas en Tandem (MS/MS)
- Espectroscopía de Infrarrojo (IR)
- Genotipos de HIV y HCV
- Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)
- Inmunodifusión Radial (RID)
- Inmunoensayo Enzimático (EIA)
- Inmunofijación
- Inmunofluorescencia (IIF)
- Nefelometría
- PCR-LCD Array
- PCR-RFLP
- Quimioluminiscencia
- Radioinmunoanálisis (RIA)
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Oligonucleótidos de Secuencia Específica (SSO). LABScan (Luminex)
- Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR Tiempo Real) Cualitativo y Cuantitativo
- Técnica de Inmunoensayo Enzimático Multiplicado (EMIT)
- Turbidimetría
- Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) Multiplex. Extensión de Iniciadores Objetivo Específico (TSPE) Multiplex. Luminex xMAP.
- Western Blot



www.upc.com.mx

