



# REVISTA

## DEL COLEGIO DE MICROBIÓLOGOS Y QUÍMICOS CLÍNICOS DE COSTA RICA

Volumen N°21, N°1 • Enero-Marzo, 2015 • ISSN: 2215-3713

### CONTENIDO

- Anticuerpos monoclonales: aplicaciones terapéuticas, elaboración y aspectos de calidad.
  - Uso de anticuerpos monoclonales en inmunohematología y banco de sangre.
  - Identificación de especies de *Malassezia* aisladas de pitiriasis versicolor.
  - Bancos de leche humana: un nuevo reto para las y los profesionales en Microbiología y Química Clínica.
  - Marcadores para el diagnóstico de la enfermedad renal crónica.
- Cartas al editor**
- Primer aislamiento e identificación molecular de *Naegleria fowleri* en Costa Rica.
  - La gran estafa de la próstata



## COLEGIO DE MICROBIÓLOGOS Y QUÍMICOS CLÍNICOS DE COSTA RICA

Tels.: (506) 2224-2602  
(506) 2283-8014  
Fax.: (506) 2225-5138  
Apartado Postal: 4614-1000  
colmqc@racsa.co.cr  
www.microbiologos.cr

### JUNTA DIRECTIVA 2015-2016:

**Presidenta:** Dra. Lidiette Salazar Palma  
**Secretaria:** Dra. Ana Cristina Monge Montero  
**Tesorera:** Dra. Carolina Loría Acosta  
**Fiscal:** Dr. Dennis León Alán  
**Vocal 1:** Dra. Joselyn Quirós Montero  
**Vocal 2:** Dra. Laura Hernández Alvarado  
**Vocal 3:** Dr. Rolando Leiva Escalante

### COMITÉ EDITORIAL:

Dr. Gabriel Muñoz Cernadas (Editor Jefe)  
Universidad de Ciencias Médicas  
CEC-ICIC

Dr. César Cerdas Quesada  
Hospital La Católica.

Dr. Rodrigo Cruz Jiménez  
Hospital Clínica Bíblica

Dr. Marco Luis Herrera Hidalgo  
Hospital Nacional de Niños, CCSS.

Dra. Carolina Loría Acosta  
Hospital San Juan de Dios, CCSS.

Dr. Gustavo Villegas Bermúdez  
Hospital Nacional de Niños, CCSS.

### Revisión de texto en español:

Dr. Carlos Cerdas Chinchilla

### Revisión de texto en inglés:

Rodolfo Gutiérrez Fernández

### Diagramador:

Jorge Vargas González

ISSN: 2215-3713

Derechos reservados ©2015

JVDISEÑO

jvargasg@amnet.cr / 8387+4343



La Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, publicación oficial de este colegio profesional, se publica trimestralmente en español. Constituye un medio de divulgación del quehacer científico de investigadores nacionales e internacionales.

Cumple con un propósito de responsabilidad social con nuestros colegiados y con los gremios profesionales afines.

Esta revista es de acceso libre y sin costo de suscripción.

## ÍNDICE

### Nota del editor

- 1 **Dr. Gabriel Muñoz Cernadas**, Editor jefe.

### Artículos

- 2 **Anticuerpos monoclonales: aplicaciones terapéuticas, elaboración y aspectos de calidad.**  
*José Miguel Chaverri-Fernández, Angie Ortiz Ureña, Departamento de Farmacología, Toxicología y Farmacodependencia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. María Laura Arias Echandi, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.*
- 7 **Uso de anticuerpos monoclonales en inmunohematología y banco de sangre.** *César Cerdas-Quesada, Banco de Sangre, Hospital La Católica, San José, Costa Rica.*
- 12 **Identificación de especies de *Malassezia* aisladas de pitiriasis versicolor.** *Albin Badilla Mora, Laboratorio Clínico, Hospital Metropolitano, Ingrid Salas Campos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Lilliana Sandoval Carpio, Laboratorio Clínico, Hospital México, CCSS*
- 18 **Bancos de leche humana: un nuevo reto para las y los profesionales en Microbiología y Química Clínica.** *Milagro Barboza Castillo. Hospital Dr. Carlos Luis Valverde Vega, CCSS*  
*Robert Moya Vásquez. Comisión Nacional de Lactancia Materna, Ministerio de Salud. Carolina Chaves Ulate. Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.*
- 23 **Marcadores para el diagnóstico de la enfermedad renal crónica.** *Carlos Carvajal Carvajal, Laboratorio Clínico, Hospital de Guápiles, CCSS.*

### Cartas al editor

- 27 **Primer aislamiento e identificación molecular de *Naegleria fowleri* en Costa Rica.** *Elizabeth Abrahams-Sandí, Lissette Retana-Moreira, Departamento Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.*
- 28 **La gran estafa de la próstata.** *Walter Cartín Sánchez, Laboratorio de Estudios Especializados e Investigación Clínica, Hospital Nacional de Niños, CCSS.*

• Instrucciones a los autores

• Próximos eventos

## Nota del editor

---

**H**ace 40 años, exactamente en febrero de 1975, Georges Köhler y César Milstein publicaron en la revista *Nature* el artículo titulado *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity*. En este artículo comunicaban a la comunidad científica el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales, el cual tendría rápidamente una aplicación práctica en el inmunodiagnóstico de diversas enfermedades, en la determinación de marcadores biológicos y en el desarrollo de terapias para muchas patologías como las de origen oncológico e inmune. En 1984, Köhler y Milstein compartieron con Niels Jerne, exdirector del instituto donde se desarrolló la investigación, el premio Nobel de Fisiología o Medicina, galardón obtenido por este hallazgo que marcó un antes y un después en muchas áreas del quehacer científico.

El resultado del trabajo de Köhler y Milstein es también un ejemplo de la interacción entre un tutor y su discípulo: un trabajo en equipo en el cual se reconoce la labor de cada uno de los participantes; esto porque el Dr. César Milstein, de origen argentino y posteriormente nacionalizado británico, fue el director de Köhler en su trabajo posdoctoral en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cambridge, donde se desarrolló el experimento.

Hemos considerado importante celebrar este descubrimiento presentando dos artículos que muestran la aplicación de los anticuerpos monoclonales en el área terapéutica y en el laboratorio clínico, al poner de relieve la importancia de los mismos en nuestro trabajo diario. El primero de estos artículos es el resultado de la colaboración entre

profesionales en farmacia y microbiología, un esfuerzo interdisciplinario que nos remite al trabajo en equipo de Köhler y Milstein. El segundo nos presenta el impacto relevante que han tenido los monoclonales en los bancos de sangre, tanto a nivel de la calidad de los resultados como a nivel económico.

Los trabajos que seguidamente se publican: de investigación relacionados con las diferentes especies de *Malassezia* y sobre los bancos de leche materna, así como las otras contribuciones, además de ser aportes importantes a las áreas específicas que representan, muestran también el resultado eficaz del trabajo interdisciplinario e interinstitucional para el beneficio de quienes nos desempeñamos en las áreas del laboratorio y la salud pública.

También es importante señalar que iniciamos la publicación del volumen 21 de esta revista siempre con el interés de servir a la comunidad de los y las profesionales en microbiología y afines. Agradecemos en primer lugar a todos los que nos han presentado sus trabajos para ser publicados en este medio, así como a los miembros de los diversos consejos editoriales, a los revisores de artículos, a las autoridades del Colegio quienes han sostenido la revista durante estos años y de manera especial al Dr. Bruno Lomonte Vigliotti, quien tuvo la iniciativa de crear la *Gaceta de Patología Clínica*, antecesora de la revista actual. El trabajo, el apoyo y la confianza de todos ustedes nos comprometen a continuar por el camino de la calidad que todos deseamos. ☺

Dr. Gabriel Muñoz Cernadas  
Editor jefe

# Anticuerpos monoclonales: aplicaciones terapéuticas, elaboración y aspectos de calidad

José Miguel Chaverri-Fernández<sup>I</sup>, Angie Ortiz Ureña<sup>I</sup>, María Laura Arias Echandi<sup>II</sup>

## Resumen:

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son componentes del sistema inmune que median interacciones entre antígenos y células efectoras del sistema, pero además son de gran interés diagnóstico y terapéutico, especialmente los de tipo monoclonal, por su efectividad y seguridad, lo cual permite su uso en múltiples enfermedades de tipo inflamatorio, autoinmune, degenerativo e incluso en patologías cardíacas, entre otras. Esto ha provocado el advenimiento de diferentes técnicas de producción que buscan la creación de anticuerpos más similares a los humanos, con el fin de disminuir efectos adversos. No obstante, estas técnicas provocan un aumento en los costos de producción lo cual, sumado al vencimiento de patentes de medicamentos registrados internacionalmente, ha ocasionado que se busque replicar el proceso de producción. En el caso de productos biológicos que no son el medicamento original, estos deben aportar estudios que garanticen su similitud como producto terminado con respecto al medicamento original así como demostrar también su eficacia clínica, en el caso de los medicamentos biológicos, el proceso de fabricación define al medicamento y no es aplicable los conceptos de bioequivalencia tradicionales. Para asegurar la efectividad y seguridad de estos productos se requiere de una buena legislación sobre el proceso de registro y control de medicamentos, la capacitación local de los registradores e inversión en ciencia y tecnología que facilite el análisis de dichos productos en el corto plazo.

**Palabras clave:** Inmunoglobulinas, biosimilares, inmunoterapia

## Abstract:

Immunoglobins or antibodies are components of the immune system that mediate the interactions between antigens and effector cells. Besides their physiological role, they have become of great interest in diagnostic and therapeutic procedures, especially the monoclonal antibodies. Due to their safety and reliability they have been used in several inflammatory, autoimmune, and degenerative diseases and even in cardiac pathologies. This has promoted the development of different production techniques that intend to create antibodies more similar to human with the objective of reducing adverse effects. Nevertheless, such techniques have increased the production costs, which added to the expiration of internationally registered medication patents, have come to encourage the replication of the production method. In the case of biological products that are not the original medication, one must provide studies that guaranty their similitude as a finished product as well as demonstrating their clinical efficacy. Regarding biological medications, the fabrication process defines the medications characteristics and the traditional concept of bioequivalence does not apply. To ensure the effectiveness and safety of these products, the legislation overseeing the process must be adequate, ensuring an appropriate registration and control. Finally, to ensure the local actualization of the registration procedures investment is necessary for improving the technology and research that enables the examination of this particular product in the short term.

**Key words:** Immunoglobulins, biosimilars, immunotherapy

Artículo recibido el 06/02/2015 / Aceptado para su publicación el 20/02/2015.

I. Departamento de Farmacología, Toxicología y Farmacodependencia, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica.

II. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Correspondencia: jose.chaverri@ucr.ac.cr

Las inmunoglobulinas o anticuerpos (Ac) son componentes importantes y multifuncionales del sistema inmune, cuya principal función es mediar las interacciones que se suscitan entre moléculas antigénicas y una gran variedad de efectores de respuestas celulares y humorales en el organismo; por tanto, son capaces de destruir o bloquear dianas celulares específicas.<sup>(1-3)</sup>

Las características propias de los Ac, su especificidad, función y actividad las han convertido en moléculas de interés puestas al servicio de múltiples estrategias terapéuticas y diagnósticas. Desde un punto de vista terapéutico, los preparados de Ac pueden ser de dos tipos: policlonales o monoclonales, siendo estos últimos los más utilizados actualmente debido a su efectividad y seguridad.<sup>(4)</sup>

Los anticuerpos policlonales (AcP) han sido utilizados clínicamente desde 1940 para múltiples indicaciones. Estos se obtienen inoculando linfocitos maduros o timocitos en distintos tipos de animales (usualmente caballos, conejos o cabras). Los anticuerpos generados en el animal reconocerán fundamentalmente varios antígenos de membrana. La calidad de los preparados varía de un lote a otro generando diferencias tanto en efectividad como en efectos adversos.<sup>(4-5)</sup>

El advenimiento de la tecnología del hibridoma de ratón (línea celular híbrida obtenida mediante la fusión de un linfocito B de ratón productor de un anticuerpo específico de interés y una línea celular tumoral humana que no produce inmunoglobulina propia) ha facilitado la síntesis de los primeros anticuerpos monoclonales (AcMs) (Ver figura No 1). Estos preparados de AcMs contienen una mezcla de inmunoglobulinas idénticas, producidas por linfocitos B originarios de una misma clona y que, por lo tanto, reconocen el mismo epitopo (parte de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunológico, específicamente por anticuerpos, células B o células T).<sup>(3,6)</sup>

Desde entonces han surgido varias técnicas para la fabricación de AcMs, con el fin de mejorar la tolerabilidad, eficacia y seguridad del preparado biológico; las principales técnicas desarrolladas son Phage Display, Ribosoma Display, Cell Display, algunas de ellas técnicas de ADN recombinante, además de la técnica del ratón transgénico, la cual “humaniza” al máximo el anticuerpo monoclonal producido.<sup>(1,3,6)</sup>

La seguridad y tolerabilidad de los AcMs producidos mediante las diferentes técnicas se ven comprometidas en relación con la proporción de proteínas no humanas que posea cada anticuerpo; así, entre menos porciones humanas tenga más probable es que se generen

mecanismos de respuesta auto-anticuerpo, se minimice la eficacia y se desencadenen mecanismos de respuesta inmunológica (por ejemplo distintas reacciones alérgicas). Lo anterior por cuanto el sistema inmune detecta que el anticuerpo administrado exógenamente es un producto extraño dentro del organismo y debe de ser eliminado, generando una reacción inmunológica paralela, cuya severidad es difícil de predecir.<sup>(7-9)</sup>

La forma de producción también influye en la manera en que se nombran los AcMs, así, se utilizan sufijos que facilitan distinguir el tipo de anticuerpo según la metodología de fabricación y la proporción humana dentro del mismo (Ver figura No 2). Los sufijos “omab” se utilizan para AcMs murinos, “ximab” para AcMs quiméricos, “zumab” para AcMs humanizados y el “umab” para AcMs totalmente humanos.<sup>(7-9)</sup>

Desde 1986 la producción de AcMs ha aumentado considerablemente, así como sus indicaciones (Ver Figura No 3), tales como: cáncer, enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas (artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, prevención de rechazo de trasplantes de riñón, hígado y corazón), afecciones en vías respiratorias (asma alérgica persistente, profilaxis de la infección por virus sincitial respiratorio), isquemia cardíaca (específicamente la inhibición de la agregación plaquetaria), dislipidemias y enfermedades neurodegenerativas, sólo por mencionar algunas de las más relevantes.<sup>(7,10)</sup>

Además de ello, hasta el día de hoy todos los anticuerpos monoclonales aprobados han demostrado, mediante estudios clínicos pertinentes, ser eficaces, con un margen de seguridad aceptable en la mayoría de los casos, y donde el beneficio supera de manera importante el riesgo.<sup>(9,11)</sup>

El principal problema de este tipo de medicamentos son los altos costos de producción, ya que el proceso mismo de manufactura define al medicamento (AcMs) y a todo lo relacionado con su eficacia y seguridad.<sup>(7,9)</sup> Gran parte de la inversión de la industria farmacéutica mundial está enfocada en este momento en la producción de AcMs, debido a la efectividad clínica demostrada, a su seguridad, y a la alta rentabilidad en el mediano y largo plazo. Por ejemplo, el Adalimumab AcM anti TNF alfa útil en artritis reumatoide vendió en el periodo Jun 2013 - Jun 2014 6.3 billones de dólares, siendo el segundo medicamento más vendido mundialmente.<sup>(12)</sup>

Ante tal situación respecto a costos y rentabilidad, y al empezarse a vencer las patentes de los medicamentos internacionalmente registrados, las compañías fabricantes de medicamentos no originales se han dado a la tarea de tratar emular los procesos de producción de

dichos productos, tratando de ofrecer nuevas opciones con costos más accesibles para la población.<sup>(11,13,14)</sup>

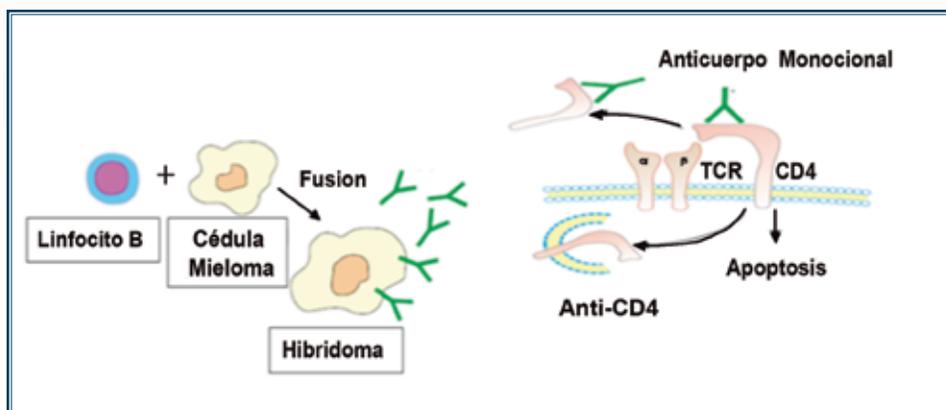
Es lógico que para países en vías de desarrollo esta opción sea atractiva, sin embargo hay muchos detalles que son necesarios de considerar. Este esfuerzo se ve obstaculizado por varios problemas relacionados con los AcMs y con los medicamentos biológicos en general, ya que la comprobación de bioequivalencia tanto *in vivo* como *in vitro* no es viable en estos casos. La bioequivalencia *in vivo* para medicamentos tradicionales compara el comportamiento del medicamento “copia” y el innovador con respecto a que tan rápido llegan estos a sangre y como son eliminados por el organismo, por su parte, la bioequivalencia *in vitro* de medicamentos tradicionales cuantifica el perfil de disolución del medicamento en estudio en medios controlados comparado contra el original. La bioequivalencia *in vivo*, *in vitro* o ambas se solicitan a los medicamentos tradicionales (no de origen biológico) según su categoría biofarmacéutica, dichos análisis permiten garantizar la efectividad del producto “copia” comparado con el medicamento original. Es importante tener claro que los AcMS y productos biológicos en general **no son medicamentos tradicionales**, de tamaño molecular y estructura pequeña, en los que las bioequivalencia *in vivo* e *in vitro* no pueden ser reproducibles.<sup>(15)</sup>

Dichas metodologías no pueden garantizar la efectividad y seguridad de los productos “copia” o no originales de los productos biológicos, específicamente hablando de los AcMs. Los AcMs son estructuras proteicas complejas pues poseen una estructura primaria, secundaria y terciaria que se debe mantener en el tiempo, ya que la variación de un aminoácido en la cadena, cambios en el pH, temperatura o hasta el tipo de excipiente utilizado (por mencionar algunos parámetros) podría variar la disposición espacial del producto y por lo tanto su

efectividad y seguridad. Adicionalmente, su producción (dependiendo de la técnica seleccionada) se realiza mediante técnicas que no son de fácil reproducción. Por tanto, no es posible garantizar la homogeneidad absoluta del producto copia final con respecto al biológico innovador, ya que el medicamento depende del proceso de producción, o podría decirse que el medicamento es el proceso que lo construye.<sup>(16-18)</sup>

Para garantizar que un producto biológico “copia” es semejante al original (biosimilar o biológico no comparable, términos actualmente acuñados) este debe someterse a pruebas muy específicas (dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear, espectroscopia de masas, cristalografía, por mencionar algunas); dichas técnicas son costosas y requieren de conocimiento para su aplicación e interpretación. Adicionalmente las entidades internacionales que aprueban medicamentos como la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) solicitan además estudios clínicos que garanticen su efectividad y seguridad. Considerando estas pautas, es que se puede reconocer entonces que los biosimilares no necesariamente llegarán a ser medicamentos más económicos que el producto original.<sup>(17,18)</sup>

Es claro que para contar con medicamentos biológicos seguros y efectivos localmente se requiere de una buena legislación sobre el proceso de registro y control de medicamentos realizado por el Ministerio de Salud del país, de capacitación local de los registradores y de inversión en ciencia y tecnología que faciliten el proceso de análisis de dichos productos, aspecto en el que se trabaja actualmente pero que requiere aún de mucho tiempo. Es importante tener claro que los (AcMs) son medicamentos efectivos, seguros, que llegaron para quedarse y que el sector salud debe tratar de adaptarse a los cambios que la ciencia y la tecnología le demandan.



**Figura 1.** Formación de híbrido y mecanismo de acción del anticuerpo monoclonal Anti-CD4. Tomado y modificado de Gerd-Rudiger, B, Pezzutto, A. *Color Atlas of immunology*. Editorial Thieme. USA 2003.<sup>(4)</sup>

### Murinos

- 100% del anticuerpo procede del ratón
- El sistema inmunológico humano reconoce estos anticuerpos como extraños y genera sus propios anticuerpos frente a ellos
- La fracción cristalizante (Fc) del AcM es poco funcional

### Quiméricos

- Regiones variables proceden de ratón, fracción de reconocimiento antigénico (Fab) y las regiones Fc son humanas proporción 30:70

### Humanizados

- Regiones de las partes variables de los anticuerpos proceden de ratón siendo el resto del anticuerpo de origen humano (90%)

### Humanos

- 100% humanos
- Reduce riesgo de generar espuesta del sistema inmunológico

Figura 2. Tipo de anticuerpo según su origen y fabricación.

Anticuerpo Monoclonal	Marca Registrada	Blanco Terapéutico	Indicación	Aprobado por la FDA	Aprobado por la EMA
Mepolizumab	Pendiente	IL-5	Asma eosinofílica	Pendiente en revisión	Pendiente en revisión
Necitumumab	Pendiente	EGFR	Cáncer Pulmón	No ha aplicado aún	Pendiente en revisión
Blinatumomab	Pendiente	CD19, CD3	Leucemia Linfoblástica	No ha aplicado aún	Pendiente en revisión
Nivolumab	Opdivo	PD1	Melanoma, Cáncer Pulmón	Pendiente en revisión	Pendiente en revisión
Dinutuzumab	Pendiente	GD2	Neuroblastoma	Pendiente en revisión	No ha aplicado aún
Secukinumab	Pendiente	IL-17	Psoriasis	Pendiente en revisión	Pendiente en revisión
Evolocumab	Pendiente	PCSK9	Hipercolesterolemia	Pendiente en revisión	Pendiente en revisión
Pembrolizumab	Keytruda	PD1	Melanoma	Pendiente en revisión	Pendiente en revisión
Ramucirumab	Cyramza	VEGFR2	Cáncer Gástrico	Pendiente en revisión	2014
Vedolizumab	Entyvio	alfa 4 beta 7	Enfermedad Inflamatoria Intestinal	2014	2014
Siltuximab	Sylvant	IL-6	Enfermedad Castleman	2014	2014
Obinutuzumab	Gasyva	CD 20	Leucemia Linfocítica	2014	2013
Ado-trastuzumab emtansine	Kadcyla	HER2	Cáncer Pulmón	2013	2013
Raxibacumab	Pendiente	B. anthrax PA	Anthrax	NA	2011
Perjeta	Perjeta	HER2	Cáncer de Mama	2013	2012
Brentuximab vedotin	Adcetris	CD30	Linfoma	2012	2011
Belimumab	Benlysta	BLYS	Lupus	2011	2011
Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4	Melanoma	2011	2011
Denosumab	Prolia	RANK-L	Osteoporosis	2010	2010
Tocilizumab	Actemra	IL6R	Artritis Reumatoide	2009	2010
Ofatumumab	Arzerra	CD20	Leucemia Linfocítica	2010	2009
Canakinumab	Ilaris	IL1b	Síndrome Wells	2009	2009
Golimimumab	Simponi	TNF	Artritis Psoriasisica	2009	2009
Ustekinumab	Stelara	IL12/23	Psoriasis	2009	2009
Certolizumab pegol	Cimzia	TNF	Enfermedad de Crohn	2009	2008
Catumaxomab	Removab	EPCAM/CD3	Ascitis Maligna	2009	NA
Eculizumab	Soliris	C5	Hemoglobinuria	2007	2007
Ranibizumab	Lucentis	VEGF	Degeneración Macular	2007	2006
Panitumumab	Vectibix	EGFR	Cáncer Colorectal	2007	2006
Natalizumab	Tysabri	a4 integrina	Esclerosis Múltiple	2006	2004
Bevacizumab	Avastin	VEGF	Cáncer Colorectal	2005	2004
Cetuximab	Erbix	EGFR	Cáncer Colorectal	2004	2004
Efgalizumab	Raptiva	CD11a	Psoriasis	2004	2003
Omalizumab	Xolair	IgE	Asma	2005	2003
Tositumomab-I131	Bexxar	CD20	Linfoma Non-Hodgkin	NA	2003
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20	Linfoma Non-Hodgkin	2004	2002
Adalimumab	Humira	TNF	Artritis Reumatoide	2003	2002
Alectuzumab	Lemtrada	CD52	Leucemia Mieloide	2001	2001
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	CD33	Leucemia Mieloide	NA	2000
Trastuzumab	Herceptin	HER2	Cáncer de Mama	2000	1998
Infliximab	Remicade	TNFa	Enfermedad de Crohn	1999	1998
Palivizumab	Synagis	RSV	Virus Sincitial	1999	1998
Basiliximab	Simulect	IL2R	Rechazo Trasplante	1998	1998
Dacizumab	Zenapax	IL2R	Rechazo Trasplante	1999	1997
Rituximab	MabThera, Rituxan	CD20	Linfoma Non-Hodgkin	1998	1997
Abciximab	Reopro	GPIIb/IIIa	Antiagregante Plaquetario	1995	1994
Muronomab-CD3	Orthoclone Otk13	CD3	Rechazo Trasplante	1986	1986

Figura 3. Anticuerpos Monoclonales aprobados o pendientes de registro en las agencias internacionales de medicamentos FDA y EMA desde 1986 al 2014.

## Referencias:

1. Machado N, Téllez G, Castaño J. (2006). Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infection*, 10(3), 186-197.
2. Levene A, Singh G, Palmieri C. (2005). Therapeutic monoclonal antibodies in oncology. *J R Soc Med*, 98, 146-152.
3. Liossis SN, Tsokos GC. (2005). *Monoclonal antibodies and fusion proteins in medicine. J Allergy Clin Immunol*, 116(4) 721-729
4. The Clinical Immunology Society (2/8/2012) Nomenclature. Obtenida el 10 de febrero de 2014, de <http://biologics.clinimmsoc.org/nomenclature>
5. Roitt I, Delves P. (2001). *Essential Immunology*. Londres: Blackwell Sciences.
6. Olivera JF. (2008). *Cancer Immunology*. N Engl J Med, 358, 2704-15
7. Dübel S, Reichert JM (Eds). (2007). *Handbook of therapeutic antibodies* (3 vols). John Wiley & Sons. Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB& Dewitz MC. (2005). Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotech.*; 23, 1073-1078.
8. Presta LG. (2008) Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol*, 20, 460-470.
9. The Antibody Society. Massachusetts: The Society. (15/11/2014). Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the European Union or United States. Obtenida el 1 de febrero de 2015, de [http://www.antibodysociety.org/news/approved\\_mabs.php](http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php)
10. Giezen TJ, Mantel-Teeuwisse AK, Straus SM, Schellekens H, Leufkens HG, Egberts AC. (2008). Safety-related regulatory actions for biologicals approved in the United States and the European Union. *JAMA*, 300, 1887-1896.
11. The Web MD (2005-2015). Top-Selling Drugs. Obtenida el 1 de febrero de 2015, de <http://www.webmd.com/news/20140805/top-10-drugs>
12. Zink A, Askling J, Dixon WG, Klareskog L, Silman AJ, Symmons DPM. (2009). European biologicals registers: methodology, selected results and perspectives. *Ann Rheum Dis*, 68, 1240-1246.
13. Longstaff C, Whitton C M, Stebbings R & Gray E. (2009). How do we assure the quality of biological medicines? *Drug Discov Today*, 14, 50-55.
14. Welling P (ed). (1991), *Pharmaceutical bioequivalence* (Vol 48). Informa Health Care,
15. Avidor Y, Mabjeesh NJ, Matzkin H. (2003). Biotechnology and drug discovery: from bench to bedside. *South Med J*, 96, 1174-1186.
16. European Medicines Agency (1995-2015). Guideline on similar biological medicinal products . Obtenida el 1 de febrero de 2015, de [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000408.jsp&mid=WC0b01ac058002958c](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000408.jsp&mid=WC0b01ac058002958c)
17. Crommelin DJ, Bermejo T, Bissig M, Damiaans J, Kramer I, Rambourg P, et al. (2005). Pharmaceutical evaluation of biosimilars: important differences from generic low-molecular weight pharm. *Eur J Hosp Pharm Sci*, 1,11-17



## AVISOS DEL COLEGIO

### Nuevas cuotas de colegiatura y laboratorios a partir de enero de 2015

Se avisa a los colegiados que conforme al artículo XLIII del Reglamento Interno del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, corresponde aplicar el aumento automático de la colegiatura y cuota de laboratorio.

A partir de enero del 2015 las cuotas quedan así:

Colegiatura **₡12.200**

Laboratorio **₡6.100**

Técnicos **₡2.000**

# Uso de anticuerpos monoclonales en inmunohematología y banco de sangre

César Cerdas-Quesada<sup>1</sup>

## Resumen:

Los anticuerpos que se generan en la respuesta inmune normal, por parte de los linfocitos B, son policlonales. Si se pudiera aislar cada uno de estos linfocitos estimulados contra un determinado antígeno en una respuesta policlonal y, además, se hacen crecer y clonar en medio de cultivo, de manera que cada uno produjera anticuerpos idénticos y específicos contra cada uno de sus diferentes determinantes antigénicos, se obtendrían anticuerpos monoclonales. La metodología para producir estos anticuerpos es laboriosa, ocupa mucho tiempo, puede verse afectada por factores externos como la contaminación o por factores intrínsecos a la biología celular. Se ha utilizado una amplia variedad de inmunógenos para producir anticuerpos específicos contra el sistema ABO. En varios laboratorios se han generado hibridomas productores de estos anticuerpos con diversas especificidades; se han caracterizado y producido a mediana escala; además, se han analizado para certificarlos como reactivos hemoclasificadores.

**Palabras clave:** Hibridoma, anticuerpos monoclonales, grupos sanguíneos, D parcial, anti T.

## Abstract:

Antibodies generated in the normal immune response by B lymphocytes, are polyclonal. If one could isolate each of these stimulated against a particular antigen in a polyclonal response, and also are grown and cloned into lymphocyte culture medium so that each produce identical and each specific for different antigenic determinants antibodies, monoclonal antibodies are obtained. The methodology for producing these antibodies is laborious, time-consuming, can be affected by external factors such as pollution or cell biology intrinsic factors. Has been used a variety of immunogens to produce specific antibodies against the ABO system. Several laboratories have generated hybridomas producing these antibodies with different specificities; have been characterized and produced to medium scale; also have been analyzed to certify them as hemoclassifiers.

**Key words:** Hybridoma, monoclonal antibody, blood group, partial D, anti T.

Los primeros investigadores que incursionaron en el estudio de los grupos sanguíneos fueron Landois, en 1875, y Erlich y Mongenroth, en 1900.<sup>(1)</sup> Ellos describieron sus observaciones en cuanto a la formación del fenómeno de aglutinación o hemólisis al mezclar eritrocitos de animales de una especie con suero sanguíneo de otras especies y entre animales de la misma especie, respectivamente. Fue Karl Landsteiner<sup>(1)</sup>, en 1900, quien demostró el fenómeno de aglutinación entre eritrocitos y sueros humanos; de esta manera se dio origen al Sistema ABO o primer sistema antigénico, el más reconocido en el ser humano, sobre

el cual recayó el fracaso de las transfusiones que hasta entonces no eran compatibilizadas. Dos años más tarde, Von Decastello y Sturly<sup>(1)</sup> completaron el sistema con el descubrimiento del grupo AB.

El gran interés despertado por el descubrimiento del Sistema ABO y su impacto en la medicina clínica indujeron a muchos investigadores a trabajar y publicar en esta área. Ottemberg y Epstein, en 1908<sup>(1)</sup>, sugirieron la teoría de la herencia del sistema ABO y, en 1910, Von Dungern y Herzfeld<sup>(1)</sup> establecieron definitivamente que esta se realizaba de acuerdo a las leyes de Mendel.

El estudio de los grupos sanguíneos ha contribuido con ciencias como la etnología, la antropología, la genética

Artículo recibido el 22/12/2014 / Aceptado para su publicación el 10/02/2015.

1. Banco de Sangre, Hospital La Católica, San José, Costa Rica.  
Correspondencia: cesar.cerdas@hotmail.com

y la medicina forense, pero el mayor beneficio se ha reflejado en el campo de la medicina transfusional y en el tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido.<sup>(2)</sup>

Hasta principios de los años ochenta, se utilizaron sueros policlonales humanos como fuente de reactivos para la determinación de los grupos del Sistema ABO. La producción de estos sueros está asociada a tareas laboriosas y prolongadas, y, además, a un conjunto de problemas vinculados al manejo y administración de material biológico en humanos y su riesgo de infecciones. A comienzos de esta misma década, se generalizó la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) con aplicaciones médicas, diagnósticas y en la investigación científica.<sup>(3)</sup>

La producción de AcMo a escala industrial ha hecho que, actualmente, sean de uso universal<sup>(4)</sup>, por lo que es importante la selección de los hibridomas. Esta selección puede responder a varios factores como su origen (con una señal de anticuerpo positiva, provenientes de microcultivos donde se favorezca la clonalidad), su avidez (dentro de la población de hibridomas productores de AcMo se seleccionan los de mayor avidez), su viabilidad y tasa de crecimiento celular<sup>(1)</sup>. Debido a que un buen reactivo debe ser específico para el antígeno que se desea detectar, debe ser lo suficientemente potente para dar una buena reacción macroscópica con variantes débiles de los grupos sanguíneos, debe ser estable bajo las condiciones de uso cotidiano (cambios de temperatura, por ejemplo) y, además, su producción debe tener un costo razonable.<sup>(1)</sup>

Un suero ideal, para que funcione como reactivo, debe estar formado por una suspensión de inmunoglobulinas concentradas de alta especificidad, bien caracterizadas y uniformemente reactivas. Hasta la década de los años setenta, los reactivos utilizados en la hemoclasificación eran policlonales, sin embargo, estos fueron reemplazados progresivamente por los reactivos monoclonales de excelente calidad ya disponibles en el mercado.<sup>(2)</sup>

### ***Anticuerpos monoclonales***

Los anticuerpos que se generan en la respuesta inmune normal, por parte de los linfocitos B, son policlonales. Si se pudiera aislar cada uno de estos linfocitos estimulados contra un determinado antígeno en una respuesta policlonal y, además, se pudiera hacerlos crecer y clonar en medio de cultivo, de manera que cada uno produjera anticuerpos idénticos y específicos contra cada uno de sus diferentes determinantes antigénicos, se obtendrían anticuerpos monoclonales. Las células híbridas, linfocitos B más célula de mieloma, tienen la capacidad de tener un crecimiento tumoral heredado de las células

mielomatosas y, además, poseen el gen que codifica la enzima hipoxantina-guanosina-fosforibosil-transferasa o HGPRT heredado de los linfocitos normales, que les permite sintetizar el ADN por la vía alterna o de rescate.<sup>(5)</sup>

La metodología para producir estos anticuerpos es laboriosa, ocupa mucho tiempo, puede verse afectada por factores externos como la contaminación o por factores intrínsecos a la biología celular; además, influyen el grado de inmunización obtenido en los ratones, el tipo de inmunógeno empleado, entre otros factores, los cuales pueden retardar la obtención del producto deseado. Se ha utilizado una amplia variedad de inmunógenos (eritrocitos grupo específicos, membranas celulares de amígdala humana, líneas celulares de cáncer de colon humano, fluido de quiste de ovario, saliva de individuos secretores, oligosacáridos sintéticos y más) para producir AcMo específicos contra el sistema ABO.

Una vez logrados los híbridos, se requieren rigurosas evaluaciones para garantizar que los anticuerpos secretados por las clonas sean los idóneos para trabajar en banco de sangre. Cuando los hibridomas están en crecimiento, se seleccionará aquel o aquellos que produzcan los anticuerpos específicos requeridos. Con el fin de obtener la monoclonalidad, estos híbridos serán sometidos a clonaciones sucesivas a través del método de dilución límite, de manera que los que proliferen en cada pozo provengan de una misma célula híbrida.<sup>(5)</sup> Una vez clonados, podrán mantenerse en cultivo continuo en el laboratorio por corto tiempo, inocularlos en cavidad peritoneal de ratones balb/c para inducir la formación de líquido ascítico o hacerlos crecer en biorreactores para producción de anticuerpos a mayor escala.

Estas técnicas han sido utilizadas para producir anticuerpos contra múltiples antígenos y para usos diversos. Han sido modificadas en el curso del tiempo con el fin de mejorar la obtención de los hibridomas, según el tipo de antígeno utilizado, como por ejemplo, para la obtención de anticuerpos contra antígenos del Sistema Rh, los cuales no pueden producirse sensibilizando ratones.<sup>(2)</sup>

Los AcMo son anticuerpos con una especificidad predeterminada que se preparan en laboratorios; estos pueden comportarse como reactivos, cuya naturaleza bioquímica es bien conocida, pueden ser obtenidos con un alto grado de pureza a partir de una fuente inagotable, sirven para una multitud de propósitos en diversas áreas de la investigación básica y aplicada, así como para diversos desarrollos tecnológicos.<sup>(2,5)</sup>

Estos anticuerpos tienen ventajas con respecto a los anticuerpos policlonales (AcPo) en cuanto su obtención<sup>(5-8)</sup>:

Puede hacerse, *a priori*, una selección de los anticuerpos en relación con su potencia, avidez y especificidad.

1. No hay riesgo de contaminación con otros anticuerpos o proteínas extrañas, si se siguen los estrictos controles de calidad.
2. La concentración de los anticuerpos puede ser medida por diferentes métodos estándar.
3. La fuente es ilimitada.
4. La cantidad de material crudo puede ser cuantificada.
5. En inmunohematología, la expansión de la producción de AcMo ha permitido el desarrollo de nuevas generaciones de pruebas.

En cuanto a su importancia en inmunohematología<sup>(2,5-8)</sup>:

1. Su restringida especificidad y constante de afinidad pueden ayudar a revelar la composición antigénica y pequeñas diferencias en dichas estructuras.
2. Las reactividades diferenciales y las especificidades contra epítomos solapados dentro de un particular grupo antigénico pueden definir y disecar, efectivamente, a un antígeno en particular.
3. Pueden revelar nueva información acerca de la inmunquímica de grupo sanguíneo o confirmar o negar conceptos obtenidos con otros métodos.

A finales de los años setenta y principios de los ochenta, tanto en Inglaterra como en Canadá, se produjeron AcMo IgM anti-A y anti-B con características adecuadas para ser buenos reactivos de identificación eritrocitaria. Posteriormente, estos reactivos fueron producidos a escala industrial con la consiguiente disminución en los costos y con diseminación casi universal. Hasta el momento, las especificidades obtenidas que han sido aprobadas para su uso como reactivos son: anti-A, -B, -AB; anti-M, -N, -He, -Mg; anti-P1; anti-D, -C, -E, -c, -e, -CDE; anti-K; anti-Le<sup>a</sup>, -Le<sup>b</sup>; anti-Jk<sup>a</sup>, -Jk<sup>b</sup>; anti-H. Otras especificidades interesantes son: anti-S, -S *like*; anti-C<sup>w</sup>, -G, -Rh17, -hr<sup>B</sup>, -Rh46; anti-Lu<sup>b</sup>; anti -k; anti-Kp<sup>b</sup>, -Js<sup>b</sup>, -K14; anti-Fy3, -Fy6; anti-Di<sup>b</sup>, -Wr<sup>a</sup>, -Wr<sup>b</sup>; anti-Gy<sup>a</sup> *like*; anti-LW<sup>ab</sup>; anti-Ge<sup>2</sup>, -Ge<sup>3</sup>, -Ge<sup>4</sup>; anti-i; anti-P, -pk, -LKE; anti-Jr<sup>a</sup>; anti-Ok<sup>a</sup>; anti-JMH; anti-AnWj; anti-MER2 y otros.<sup>(5)</sup>

Los criterios que deben tomarse en cuenta en la producción de AcMo, contra el Sistema ABO, para utilizarlos como reactivos:

1. Deben emplearse estrictos criterios para caracterizar los anticuerpos.
2. Debe determinarse, cuidadosamente, la especificidad a diferentes tiempos de incubación, con paneles de células ABO, con células alteradas sensibilizadas, T-transformadas y con B adquirido.
3. La potencia y avidez deben ser, al menos, tan alta como en los AcPo. La avidez puede estar influenciada por el incremento en la concentración de sal. El mecanismo de este fenómeno no es bien conocido, pero es una táctica utilizada por la mayoría de los productores de reactivos. La avidez se manifiesta en una aglutinación casi inmediata, que usualmente se completa a los 30 segundos.
4. Si no se detectan variantes de A y B, se recomienda hacer mezclas de dos AcMo; sin embargo, esto pudiera ser riesgoso ya que se han descrito carencia de sinergismo y hasta antagonismo entre ellos.
5. Investigar la estabilidad de la IgM, es decir, evaluar su comportamiento bajo incubación a 37°C (no debe caer más de dos niveles).
6. Adecuar el soporte proteico que por lo general es bajo, especialmente si la línea de hibridoma se ha cultivado en medio libre de suero.<sup>(6)</sup>

Los métodos para obtener AcMo de ratón (ver figura 1) llevan etapas de extracción de esplenocitos de ratón y fusión mediante polietilenglicol con células HGPRT de cultivo de línea de mieloma. Posteriormente, se seleccionan las células híbridas y se da un proceso de clonamiento y reclonamiento que culmina con un análisis para la selección de variantes. Se amplifican y propagan los clones deseados y, a partir de estos, se puede realizar una producción a mayor escala.<sup>(5-9)</sup>

Como ventajas de este método se tiene: una menor sensibilización de los seres humanos; se selecciona, *a priori*, los anticuerpos de acuerdo a su potencia y especificidad; no hay riesgo de contaminación con otros anticuerpos, proteínas extrañas o agentes infecciosos; la concentración de anticuerpos puede ser medida por diversos métodos estándares con poca variación entre lotes; muchos anticuerpos son IgM, lo que media aglutinación directa y acorta los periodos de incubación; la fuente es potencialmente ilimitada. En inmunohematología, la expansión de la producción de



**Figura 1.** Método para obtener AcMo de ratón.<sup>(5-9)</sup>  
Tomado de Cruz C, León G. Hybridoma; 26 (6), 433-4340, 2007.

AcMo ha permitido el desarrollo de nuevos usos en las pruebas.

Por otro lado, se deben anotar las siguientes desventajas: pueden tener una especificidad relativa (un anticuerpo contra un epítipo simple puede no reaccionar con la totalidad de las células positivas para el antígeno, es decir, las variantes); no pueden utilizarse en terapéutica por la producción de anticuerpos antiespecie; la respuesta del ratón puede ser contra la proteína completa (no distingue polimorfismos); no deben usarse en el estudio de adsorción/elución.<sup>(9)</sup>

Además del uso de ratones, se producen AcMo por metodologías recombinantes con las siguientes ventajas: mayor estabilidad de las clonas, incremento en la cantidad de anticuerpos por transfecciones autólogas repetitivas y la posibilidad de insertar genes manipulados genéticamente.<sup>(10)</sup> Con el uso de fagos, se evita la compleja y costosa tecnología de inmortalizar células; pueden utilizarse para aislar AcMo de cualquier animal utilizando los cebadores apropiados para la amplificación genética; se puede acceder a células B en las cuales haya ARNm de las inmunoglobulinas y pueden almacenarse en bacterias, en fagos o en plásmidos de ADN, congelados o en papel filtro.<sup>(9,11,12)</sup>

### Aportes de los AcMo al laboratorio de inmunohematología

*La determinación de D parcial:* Cuando se realizaban las determinaciones con AcPo, en fase de Coombs indirecto, se obtenían resultados positivos y se transfundían unidades D positivo con la consecuente sensibilización del paciente.

*Los subgrupos de A:* Estos anticuerpos son más sensibles y específicos por lo que detectan mejor las bajas dosis antigénicas.

*Reacciones anti-T y anti-Tk en reactivos policlonales:* El antígeno T (Thomsen-Friedenreich) es el oligosacárido precursor de una variedad de hidratos de carbono de las glicoproteínas eritrocitarias. La activación T es causada por cambios en la estructura de la glicoproteína de la membrana de los glóbulos rojos en ciertos estados patológicos; por ello, se da la aglutinación de esas células transformadas con la mayoría de los sueros humanos normales provenientes de adultos ABO compatibles. El fenómeno es generalmente transitorio; a menudo, solo dura unos pocos días o semanas y rara vez persiste por meses.<sup>(13)</sup>

En conclusión, el desarrollo de reactivos hemoclasificadores, mediante la aplicación de la tecnología para la producción de anticuerpos monoclonales, ha sido exitoso y se han reducido los costos asociados a su producción. En varios

laboratorios se han generado hibridomas productores de estos anticuerpos con diversas especificidades; se han caracterizado y producido a mediana escala; además, se han analizado para certificarlos como reactivos hemoclasificadores.

### Referencias:

1. Wittig O, Alonso JA, Romano EL, Montañó RF. (2006). Producción de anticuerpos monoclonales con especificidad por los grupos sanguíneos A y B. Evaluación de su uso como reactivos hemoclasificadores. *Invest Clin*, 47(3), 253-264.
2. León G, Cruz C, Rojas L. (2004). Producción de anticuerpo monoclonal con especificidad anti B. *Invest Clin*, 45(2), 109-192
3. Kohler G, Milstein C. (1995). Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, 256,495-497.
4. Rouger P, Anstee D. (1988). First international workshop on monoclonal antibodies against human red blood cell and related antigens: final report. *Vox Sang*, 55, 57-58.
5. León G Anticuerpos Monoclonales y Recombinantes en Medicina Transfusional: Desarrollos y Desafíos. (2005). *Revista Argentina de Transfusión*, 31, 6-15
6. Cruz Carlos. León Graciela. (2008). Potent anti A monoclonal antibody. *Hybridoma*, 27(6), 499-500
7. León G, Cruz C. (2007). Obtención de heterobridoma productor de anticuerpos IgM contra el antígeno D del sistema Rh. *Invest Clin*, 48(1), 36-40.
8. Cruz C, León G. (2007). A simple method for the production of antiC3d monoclonal antibody. *Hybridoma*; 26 (6), 433-434
9. León G. Comunicación personal.
10. Siegel D. (2002) Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfus Clin Biol*, 9, 15-22
11. Cogné M, Duchez S, Pascal V. (2009). Transgenesis and humanization of murine antibodies. *Med Sci*, 25(12),1149-1154.
12. Bernett MJ, Karki S, Moore GL, Leung IW, Chen H, Pong E, Nguyen DH, Jacinto J, Zalevsky J, Muchhal US, Desjarlais JR, Lazar GA. (2010). Engineering fully human monoclonal antibodies from murine variable regions. *J Mol Biol*, 396, 1474-1490.
13. Ponce P, Di Vita S, Biondi C, Valverde J. (2012). Exposición del antígeno T eritrocitario por acción de *Ascaris lumbricoides*. *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 46(3), 393-397. 

# Identificación de especies de *Malassezia* aisladas de pitiriasis versicolor

Albin Badilla Mora <sup>1</sup>, Ingrid Salas Campos <sup>2</sup>, Lilliana Sandoval Carpio <sup>3</sup>

## Resumen:

El objetivo del trabajo fue comparar dos métodos de identificación hasta especie de 54 cepas de *Malassezia* spp y conocer la prevalencia de especies en casos de pitiriasis versicolor en Costa Rica. Se realizó una identificación utilizando un esquema de pruebas bioquímicas basado en la utilización del sustrato Tween, la prueba de la esculina y la catalasa. Como segundo método se utilizó un análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), luego de digerir el gen que codifica por un ADN ribosomal 26S con la enzima Hha I. Se analizaron diversos polimorfismos característicos de cada especie. El esquema bioquímico resultó ser muy limitado para la identificación y algunas levaduras no pudieron ser identificadas. Este esquema arrojó datos muy diferentes, comparado con el método molecular. *Malassezia furfur* reflejó ser la especie predominante entre los aislamientos de pitiriasis versicolor en Costa Rica. Este hallazgo difiere con los resultados presentados por otros estudios en diversos países. Se concluye que el método molecular RFLP es rápido, relativamente barato y confiable y puede ser puesto en práctica para realizar estudios similares en el país.

**Palabras clave:** Micosis superficiales, identificación de hongos, RFLP, fragmentos de restricción, micosis en Costa Rica.

## Abstract:

This study's objective was to compare two different methods for identifying the species of 54 *Malassezia* spp strains, and to determine the prevalence of different species related to pityriasis versicolor cases occurring in Costa Rica. The first method consisted of a series of biochemical tests including the following: Tween substrate usage, the esculin test and the catalase test. As a second method, a restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) was performed after having digested the gene that encodes for a 26S ribosomal DNA using the Hha I enzyme. Diverse polymorphisms characteristic of each species were analyzed. The biochemical tests turned out to be very limited in terms of leading to the correct identification, and some of the yeast samples could not be identified. The results these tests generated were very different from those obtained by the molecular method. *Malassezia furfur* turned out to be the predominant species among the samples obtained from the pityriasis versicolor cases. This finding differs with the results presented by other studies in several countries. In conclusion, it is demonstrated that the RFLP method is quick, relatively inexpensive, and reliable, and could be considered as an option for performing similar studies in Costa Rica.

**Key words:** Superficial micosis, fungi identification, RFLP, restriction fragment, micosis in Costa Rica.

## Introducción

La pitiriasis versicolor (PV) es una micosis superficial crónica causada por hongos del género *Malassezia*. Clínicamente se caracteriza por presentar lesiones maculares, finamente descamativas, hipo o hipercrómicas en la cara, el cuello,

el tronco y los brazos y con menos frecuencia en otras áreas del cuerpo <sup>(1)</sup>. Además de la PV, se han descrito otros cuadros asociados a *Malassezia* como dermatitis seborreica, foliculitis y dermatitis atópica <sup>(2, 3)</sup>. La PV está distribuida por todo el mundo. Se han encontrado discrepancias en cuanto a las especies involucradas en este cuadro clínico.

El género *Malassezia* actualmente tiene siete especies internacionalmente reconocidas, *Malassezia furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa*,

Artículo recibido el 04/09/2014 / Aceptado para su publicación el 21/02/2015.

1. Laboratorio Clínico, Hospital Metropolitano, San José, Costa Rica

2. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

3. Laboratorio Clínico, Hospital México, CCSS

Correspondencia: albin.artbadmo@gmail.com

*M. slooffiae* y *M. pachydermatis*. Las seis primeras son lipodependientes - termofílicas y se aíslan a partir de casos clínicos de seres humanos, mientras que *M. pachydermatis* no es lipodependiente y causa patología en animales <sup>(4)</sup>. Actualmente, se sigue investigando el género *Malassezia* y se siguen proponiendo nuevas especies en la comunidad científica, como *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis*, *M. caprae*, *M. equina* y *M. cuniculi*.

Guého y colaboradores desarrollaron desde los años noventa claves bioquímicas para la identificación de las especies más frecuentes de *Malassezia*. Estas pruebas comprenden la asimilación Tween, el análisis de la beta-glucosidasa y la habilidad para degradar el peróxido de hidrógeno por medio de una catalasa <sup>(5)</sup>. En el año 2000, se diseñó una técnica de PCR con cebadores que amplificaban una región codificante de ADNr, el producto obtenido se digiere con enzimas y se presenta un patrón único para las siete especies descritas <sup>(6, 7, 8, 9)</sup>.

Algunos autores han demostrado que *M. globosa* es la especie predominante en países como España e Irán <sup>(10, 11)</sup>, mientras que en Argentina y Bolivia han señalado a *M. sympodialis* <sup>(12, 13)</sup>. Actualmente en Costa Rica no existen datos sobre la frecuencia de las especies de *Malassezia* aisladas de casos de pitiriasis versicolor, por lo que existe una necesidad de conocer cuál es la especie predominante, ya que esto puede conducir a un mayor entendimiento sobre la distribución de la levadura en el país, así como su implicación en otras patologías que afectan al ser humano como la foliculitis, dermatitis y las infecciones sistémicas.

En el presente trabajo se determinó la especie de *Malassezia* predominante en los aislamientos de casos de pitiriasis versicolor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos utilizados

Se trabajó con 54 aislamientos de *Malassezia* recolectados y mantenidos en la micoteca del laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, durante el año 2011. Todos los aislamientos provenían de casos de pitiriasis versicolor que fueron cultivadas en agar Dixon modificado (3,6 % extracto de malta, 0,6 % peptona, 2,0 % bilis de buey, 1 % Tween 40, 0,2 % glicerol, 0,2 % ácido oleico, 1,2 % agar, pH 6) e incubadas a 32 °C, por 7 días. Los aislamientos se mantienen a -70 °C en glicerol al 10 %. Se utilizó como cepa de referencia *Malassezia furfur* ATCC

14521. Todas los aislamientos se subcultivaron en agar Sabouraud glucosado (ASG), por siete días a temperatura ambiente.

### Análisis microscópico

Los aislamientos se cultivaron en medio Dixon modificado a 32 °C por 7 días y se realizó el análisis microscópico con el medio de montaje de Kane (0,02 % de glicerol, 0,02 % de Tween 80, 0,005 % p/v de azul de metileno y agua destilada), el cual tiñe de manera uniforme las levaduras lipofílicas y no penetra en otras levaduras no lipofílicas. El montaje se observó con un aumento de 40 X y 100 X y se buscó diferencias que puedan ser útiles identificando las especies de *Malassezia*.

### Análisis bioquímico

El perfil bioquímico de cada aislamiento se analizó utilizando las pruebas bioquímicas previamente utilizadas por Guého y colaboradores y simplificadas por Rendic y colaboradores, las cuales son reacción de la catalasa, utilización de Tween 20, 40, 60 y 80 y la hidrólisis de la esculina (figura 1) <sup>(5, 14)</sup>.

La reacción de la catalasa fue llevada a cabo en un portaobjetos estéril, para lo cual se colocó una colonia de la cepa y se agregaron unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno al 30 %, la formación de burbujas se tomó como catalasa positiva.

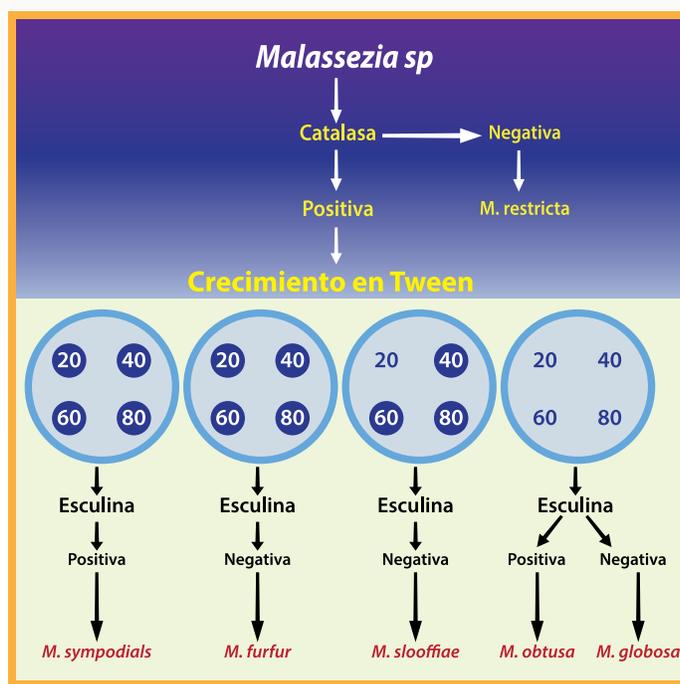


Figura 1. Esquema para la identificación bioquímica de especies de *Malassezia* simplificados por Rendic y colaboradores, 2003.

Para la prueba de utilización de Tween se preparó una suspensión de levaduras a un estándar de McFarland 2. De esta suspensión se tomó 1 ml y se agregó a 16 ml de AGS fundido a temperatura de 55 °C, se mezcló y se colocó en una placa de Petri de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio se realizaron cuatro orificios de 2 mm de diámetro, donde se colocaron 200 µl de Tween 20, 40, 60 y 80 respectivamente. Se incubó por una semana a 32 °C, luego se examinaron los halos de crecimiento.

Para la prueba hidrolisis de la esculina o análisis de la beta-glucosidasa se preparó agar bilis-esculina (40 g bilis, 5 g peptona, 3 g extracto de carne, 1 g esculina, 0,5 g citrato férrico, 15 g agar en un litro de agua destilada). Se subcultivó la levadura sobre el medio, la prueba se leyó a los 3 días de incubación a 32 °C; un resultado positivo se observó cuando el agar se tornó de color negro.

### **Análisis molecular**

#### **Obtención de ADN**

El procedimiento utilizado fue de lisis celular; para lo cual en un microtubo se colocó 200 µl de agua destilada estéril con dos colonias de la levadura y se colocó en baño María a temperatura de ebullición por 10 minutos, luego se llevo a -70 °C por 10 minutos y luego a 100 °C por 15 minutos, enfriando en hielo por 5 minutos. Luego se centrifugó a 12 000 r.p.m., se tomó 100 µl del sobrenadante y se guardó en congelación hasta su uso. Para la prueba molecular se utilizó de 5 µl del lisado de levaduras<sup>(15)</sup>.

#### **Reacción en cadena de la polimerasa**

Se utilizó un par de iniciadores previamente utilizados por Mirhendi y colaboradores; *forward*, 5'TAACAAAGGATTCCCCTAGTA3' y *reverse*, 5'ATTACGCCAGCATCCTAAG 3', estos iniciadores pertenecen a secuencias de ADN ribosomal 26S<sup>(16)</sup>.

Para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un volumen final de 50 µl y se realizó con los reactivos de la casa comercial Fermentas, utilizando la enzima Taq polimerasa, los buffer de trabajo y los dNTP's de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez realizada la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % durante 35 minutos a 80 V y los productos fueron revelados utilizando GelRed y una cámara con exposición a rayos ultravioleta.

#### **Prueba polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción**

Para la identificación por polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) se utilizó la enzima de restricción Hha I, la digestión de los productos del PCR fue llevada a cabo de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. Se visualizaron los patrones de restricción en una electroforesis (agarosa al 2,5 % durante 90 minutos a 96 V) con GelRed en cámara de luz ultravioleta<sup>(15, 16)</sup>.

#### **Análisis de los de los fragmentos de restricción**

Utilizando las secuencias publicadas del gen 26S ADNr para las especies de *Malassezia* estudiadas (número de acceso: AJ249950, AJ249951, AJ249952, AJ249953, AJ249954, AJ249955, AJ249956) se llevó a cabo una digestión virtual utilizando el programa NEB cutter V2.0, la cual consiste en localizar los sitios de corte para cada una de las especies según la enzima utilizada y estimar el tamaño de cada fragmento de restricción para cada especie, con lo cual se obtiene correcto análisis e interpretación de los resultados obtenidos en la digestión.

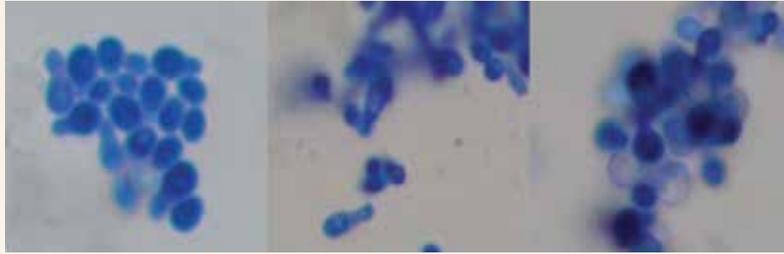
## **RESULTADOS**

Al subcultivar los 54 aislamientos en medio de Sabouraud glucosado no se logro el crecimiento, lo que se demuestra la lipodependencia característica del género *Malassezia*.

Se analizaron las características macroscópicas en medio Dixon, o sea el aspecto de la colonia, color y tiempo de crecimiento, además, se analizaron las características microscópicas con el medio de montaje Kane. Solo la especie identificada como *M. globosa* presentó características microscópicas distintivas, ya que es más grande y la morfología de su blastospora es redondeada y no ovalada como las otras especies (Figura 2).

La prueba de la catalasa dio positiva para todos los aislamientos, lo que descarta la presencia de *M. restricta*. De los 54 (100 %) aislamientos, 39 presentaron crecimiento con los cuatro tipos de Tween (Figura 3), de estas 36 (66 %) fueron beta glucosidasa positiva y se identificaron como *M. sympodialis* y los otros tres (6 %) fueron beta glucosidasa negativo y se identificaron como *M. furfur*.

Tres (6 %) aislamientos no presentaron asimilación de ninguno de los cuatro Tween utilizados y dieron la beta glucosidasa negativa, identificándose como *M. globosa*. A doce (22 %) no se le identifico la especie, ya que dos



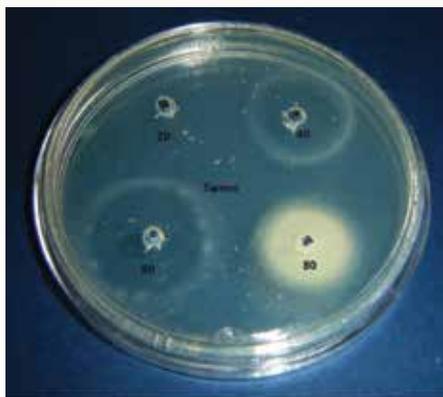
**Figura 2.** Morfología microscópica de las especies de *Malassezia* utilizando colorante de Kane, 100 X (1 *M. sympodialis*, 2 *M. furfur*; 3 *M. globosa*). Elaboración propia, 2011, laboratorio de Micología Médica, Universidad de Costa Rica.



**Figura 3.** Asimilación completa por parte de *M. sympodialis* de los cuatro tipos de Tween. Elaboración propia, 2011, laboratorio de Micología Médica, Universidad de Costa Rica.



**Figura 5.** Digestión del amplicón con la enzima Hha I para la identificación de las especies de *Malassezia* (1-5,8,10,11,13,14,16,17 *M. furfur*; 9,12 *M. globosa*; 15,18 *M. sympodialis*; 7 *Malassezia* spp.). Elaboración propia, 2011, laboratorio de Micología Médica, Universidad de Costa Rica.



**Figura 4.** Asimilación parcial, incompleta o débil del Tween de las especies de *Malassezia* no identificadas por las pruebas bioquímicas. Elaboración propia, 2011, laboratorio de Micología Médica, Universidad de Costa Rica.

presentaron crecimiento en los Tween 40, 60 y 80 y la beta glucosidasa positiva y diez aislamientos presentaron halos de crecimiento atípicos (Figura 4), por lo que se reportaron como *Malassezia* spp.

Por el método molecular de los 36 aislamientos identificados bioquímicamente como *M. sympodialis*, 12 dieron el patrón de restricción de *M. sympodialis*, 16 el de *M. furfur* y 8 no se pudieron identificar molecularmente.

De los tres aislamientos identificados bioquímicamente como *M. furfur*, dos dieron el patrón molecular de *M. furfur* y uno de *M. sympodialis*. Los tres aislamientos identificados bioquímicamente como *M. globosa* dieron el patrón molecular de *M. globosa*. De los 12 que no se identificaron bioquímicamente, cuatro dieron el patrón molecular de *M. furfur*, tres el de *M. sympodialis* y cinco no se identificaron.

En resumen molecularmente se identificaron 22 (40,5 %) aislamientos de *M. furfur*, 16 (29,5 %) de *M. sympodialis*, tres (6 %) de *M. globosa* y 13 (24 %) no se identificaron hasta especie por lo que se reportaron como *Malassezia* spp.

En la figura 5 se pueden observar los distintos fragmentos de restricción característicos para cada

especie identificada, en el pocillo identificado como la cepa número 7 no fue posible determinar con certeza la especie analizada, por lo que se reporto como *Malassezia* spp. Este aislamiento tampoco fue posible identificarlo por medio del análisis bioquímico.

## DISCUSIÓN

Basándose en la digestión virtual realizada se analizaron los patrones obtenidos en las digestiones de los aislamientos, dando discrepancias entre la identificación bioquímica y molecular.

El estudio bioquímico parece que es limitado para la identificación de especies del género *Malassezia*, ya que algunos aislamientos presentaron halos atípicos en la asimilación de Tween. Además, por este método se usa pocas pruebas para discriminar entre una y otra especie, como por ejemplo, solo se usa la prueba de la esculina para hacer la separación entre *M. sympodialis* y *M. furfur*, ya que ambas especies presentan la misma asimilación del Tween. Cabe mencionar que estas dos especies fueron las que presentaron mayores variaciones entre la identificación bioquímica y molecular.

En esta investigación se tomó como de mayor confiabilidad el método de identificación molecular, por lo que *M. furfur* es la especie más prevalente en casos de pitiriasis versicolor, en segundo lugar esta *M. sympodialis* y en tercer lugar *M. globosa*.

Este resultado muestra diferencias con respecto a investigaciones en otras partes del mundo donde *M. furfur* no es la especie prevalente en los aislamientos de pitiriasis versicolor. Por métodos bioquímicos Crespo y colaboradores en España, reportan en casos de pitiriasis versicolor una prevalencia mayor al 90 % de *M. globosa* <sup>(16)</sup>, en Irán esta especie se reportó en un 53 % de aislamientos, seguido de un 25 % identificados como *M. furfur* <sup>(11)</sup>. También en la India <sup>(17, 18)</sup> *M. globosa* se aisló del 50 % de los casos y en Turkia en el 65,1 % de los casos <sup>(19)</sup>. En Bolivia <sup>(13)</sup>, Argentina <sup>(20)</sup> y Brazil <sup>(21)</sup> *M. sympodialis* es la especie dominante.

Utilizando métodos moleculares en un estudio argentino se reporta a *M. sympodialis* como la especie predominante, con un 37,7 % en los aislamientos realizados a partir de PV, seguida de *M. globosa* y *M. furfur* en un tercer lugar <sup>(12)</sup>. En Japón *M. sympodialis* se reporto en el 48 % de los casos, seguido por *M. furfur* <sup>(22)</sup>, así como en Polonia donde representa el 82,9 % de las identificaciones <sup>(23)</sup>. Sin embargo, en Italia *M. globosa* fue la que más se identificó de los casos clínicos <sup>(24)</sup>.

Este es el primer estudio realizado en Costa Rica identificando especies de *Malassezia* en casos de PV y resulta llamativo que sea *M. furfur* la especie dominante en los aislamientos, tal y como se ha reportado en Indonesia <sup>(25)</sup>.

No se han realizado estudios para analizar el porqué de las variaciones en la presentación de las especies, sin embargo, se ha propuesto que podría estar relacionado a las variaciones climáticas de las diversas áreas geográficas. También se ha propuesto que tanto el método de la toma de muestra y la composición del medio de cultivo utilizado para el aislamientos (Dixon, Leeming-Notman, Sabouraud con aceite de oliva) podrían estar involucrados en las especies aisladas, ya que algunas especies son más lipofílicas <sup>(24)</sup>.

La identificación de las especies por pruebas moleculares es rápida y relativamente barata, sí el laboratorio cuenta con la infraestructura adecuada para realizar este tipo de análisis, ya que en dos días es posible tener una identificación completa de la levadura sin necesidad de esperar un lapso de hasta dos semanas como ocurre con pruebas bioquímicas.

Este estudio da paso a mayores investigaciones en nuestro país, como sería conocer cual o cuales son las especies en casos de dermatitis seborreica y la sensibilidad de las mismas.

## Agradecimiento

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica al proyecto 803-B3-004.

## Referencias:

1. Gupta AK, Boekhout T, Theelen B, Summerbell R, Batra R. (2004). Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4253-4260.
2. Hellgren L, Vincent J. The incidence of tinea versicolor in central Sweden. (1983). *Journal of Medical Microbiology*, 16(4), 501-502.
3. Julman C, Hernández I, Godoy G, Cabello I, Cermeño J, Orellán Y, Blanco Y. (2005). Casuística de las micosis en el Hospital Universitario "Ruiz y Páez". *Investigación Clínica*, 46(1): 37-42.

4. Giusiano GE. *Malassezia*: Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. (2006). *Revista Argentina de Microbiología*, 38, 41-48.
5. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. (1996). *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 337-355.
6. Canteros CE, Rivas MAC, Lee W, Perrotta D, Bosco-Borgeat ME, Dave G. (2007). Concordancia entre características fenotípicas y PCR-REA en la identificación de especies de *Malassezia*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(4), 278-282.
7. Guillot J, Deville M, Berthelemy M, Provost F, Guého E. (2000). A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. *Letters in Applied Microbiology*, 31(5), 400-403.
8. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC. (2000). Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1869-1875.
9. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson JrTL. (2004). Skin diseases associated with *Malassezia* species. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(5), 785-798.
10. Crespo V, Ojeda A, Vera A, Crespo A, Sánchez F. (2000). *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. *British Journal of Dermatology*, 143(4), 799-803.
11. Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, Zomorodian K, Saadad F, Zeraati H, Hallaji Z, Rezaie S. (2004) Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. "version electronica", *BC Dermatology*, 2004, 4.
12. Giusiano G, Sosa L, Rojas F, Vanacore S, Magiaterrea M. (2010). Prevalence of *Malassezia* species in pityriasis versicolor lesions in northeast Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(2) 71-74.
13. Tango E, Vargas J. (2009). Caracterización fenotípica de las especies del género *Malassezia* aisladas de pacientes con pitiriasis versicolor en Santa Cruz – Bolivia. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Tropicales*, 1, 33-36.
14. Rendic OE, Díaz JC, Fich SL. (2003). Caracterización de especies del género *Malassezia* en pacientes con dermatitis seborreica y en controles. *Revista Médica de Chile*, 131, 1295-1300.
15. Sosa MA, Peluca GD, Giusiano GE, Mangiaterrea ML. (2006). Modificación de la técnica de PCR RFLP de Mirhendi y col para la diferenciación y tipificación de 11 especies de *Malassezia*. Departamento de Micología. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
16. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugita T, Yamaguchi H. (2005). A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *Journal of Microbiological Methods*, 61(2), 281-284.
17. Shah A, Koticha A, Ubale M, Wanjare S, Mehta P, Khopkar U. (2013). Identification and speciation of *Malassezia* in patients clinically suspected of having pityriasis versicolor. *Indian Journal of Dermatology*, 58, 239.
18. Kaur M, Narang T, Bala M, Gupte S, Aggarwal P, Manhas A. (2013). Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tertiary Care Hospital, Punjab. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 31, 270-4.
19. Rodoplu G, Saracli MA, Gümral R, Taner Yildiran S. (2014). Distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Turkey. *Journal de Mycologie Médicale*, 24, 117-123.
20. Ramadán S, Sortino M, Bulacio L, Marozzi ML, López C, Ramos L. (2012). Prevalence of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Rosario. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(1), 14-19.
21. Petry V, Tanhausen F, Weiss L, Milan T, Mezzari A, Blessmann-Weher M. (2011). Identification of *Malassezia* yeast species isolated from patients with pityriasis versicolor. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86 (4), 803-806.
22. Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. (2000). Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 29-35.
23. Jagielski T, Rup E, Ziórkowska A, Roeske K, Macura AB, Bielecki J. (2014). Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatology*, 14, 3, 2-15.
24. Romano C, Mancianti F, Nardoni S, Ariti G, Caposciutti P, Fimiani M. (2013). Identification of *Malassezia* species isolated from patients with extensive forms of pityriasis versicolor in Siena, Italy. *Revista Iberoamericana de Micología*, 38(4), 231-234.
25. Krisanty BL, Bramono K, Madewisno L. (2009). Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor in Indonesia in relationship with clinical characteristics. *Mycoses*, 52, 257-262. 

# Bancos de leche humana: un nuevo reto para las y los profesionales en Microbiología y Química Clínica

Milagro Barboza Castillo<sup>1</sup>, Robert Moya Vásquez<sup>2</sup>, Carolina Chaves Ulate<sup>3</sup>

## Resumen:

En nuestro país, algunos recién nacidos permanecen hospitalizados por largos períodos en las unidades de Neonatología; como consecuencia, deben ser alimentados con fórmulas lácteas y esto los expone a mayor riesgo de infecciones nosocomiales y a complicaciones propias de su condición. Con el objetivo de disminuir dicha problemática, en el año 2011, se inauguró en el Hospital Dr. Carlos Luis Valverde Vega el Banco de Leche Humana; este se convirtió en una nueva área de trabajo y en un nuevo reto para las y los microbiólogos y químicos clínicos del país. Durante los tres primeros años de labor de este servicio se han atendido un total de 223 donadoras; se han pasteurizado 121 litros de leche donada; esta ha beneficiado a 361 neonatos del hospital donde se ubica el banco y a recién nacidos de otros hospitales del país. El reto para las y los microbiólogos está planteado e implica trabajar en conjunto con enfermeras y médicos pediatras en el crecimiento de una red nacional de bancos de leche que ofrezca las mejores posibilidades de vida a los neonatos del país que requieren hospitalización.

**Palabras clave:** Lactancia, leche humana, bancos de leche.

## Abstract:

In Costa Rica, some newborns stay hospitalized for long periods of time at Neonatology services; consequently, they shall be fed with lactic formula and this represents a major risk for developing nosocomial infections. In order to diminish this situation, in 2011 a Human Milk Bank was inaugurated at the Dr. Carlos Luis Valverde Vega Hospital, representing a new working area and a new challenge for the microbiology professionals of the country. During the first three years of labor of this service, a total of 223 donors have been attended, 121 liters of donated milk has been pasteurized, and 361 newborns from this and other hospitals of the country have received this benefit. The challenge for microbiologists is present and includes the capacity of realizing group work with nurses and pediatricians in order to promote the growth of a national milk bank network that can offer better life possibilities for Costa Rican newborns that need hospitalization.

**Key words:** Nursing, human milk, milk banks.

Artículo recibido el 15/01/2015 / Aceptado para su publicación el 26/02/2015.

1. Banco de Leche Humana, Hospital Dr. Carlos Luis Valverde Vega, CCSS.

2. Comisión Nacional de Lactancia Materna, Ministerio de Salud.

3. Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Correspondencia: evelyn.chaves@ucr.ac.cr

La lactancia, a través de la evolución, le ha permitido al ser humano sobrevivir como especie y obtener el desarrollo alcanzado <sup>(1)</sup>. En los mamíferos, luego del nacimiento, la lactancia provee la nutrición ideal para el individuo en un período muy vulnerable del desarrollo <sup>(2)</sup>. Durante esta etapa, en la que se produce la maduración de los órganos, la leche materna debe ser la única fuente de nutrición <sup>(3)</sup>.

La leche humana es considerada no sólo un alimento, sino, un sistema biológico complejo y dinámico <sup>(4,5)</sup> que provee una combinación única de proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales, vitaminas, enzimas y células vivas; aporta incuestionables beneficios nutricionales, inmunológicos, psicológicos y económicos <sup>(1,2,4)</sup>. Este biomaterial es especie específico y todos los preparados lácteos elaborados para sustituir la leche materna difieren marcadamente de ella, e inclusive, existe suficiente evidencia científica que enumeran los riesgos a los que potencialmente están expuestos los niños y niñas alimentados con sucedáneos de la leche materna <sup>(5)</sup>. Estudios realizados informan de que los infantes alimentados con fórmula tienen un riesgo 72% mayor de ser hospitalizados, en el primer año de vida, por infecciones del tracto respiratorio inferior, comparado con niños alimentados exclusivamente con leche materna al menos durante 4 meses. Las infecciones severas de oídos y garganta se reducen en un 63% en aquellos alimentados exclusivamente con leche materna por 6 meses. Adicionalmente, diferentes estudios reportan que la alimentación con leche humana reduce en un 64% la incidencia de infecciones del tracto gastrointestinal y hasta un 77% en la incidencia de enterocolitis necrotizante en neonatos prematuros <sup>(6)</sup>.

En nuestro país, algunos recién nacidos permanecen hospitalizados por largos períodos de tiempo en las unidades de Neonatología. Cierta número de ellos presenta patologías que les impide, inicialmente, una alimentación enteral. Las madres de estos pacientes se enfrentan a una serie de condiciones que no les permite permanecer con sus hijos o hijas las 24 horas del día para colaborar con su cuidado y alimentación. Esta situación provoca que la producción de leche materna sea muy difícil; esto trae como consecuencia que los recién nacidos deban ser alimentados con fórmulas lácteas, para solventar sus necesidades nutricionales. Esta práctica, a la que se ve obligado el personal de salud, expone al neonato a mayor riesgo de infecciones nosocomiales (diarreas, sepsis neonatal) y complicaciones propias de su condición (mayor riesgo de retinopatía del

prematuro, enterocolitis aguda necrotizante, displasia broncopulmonar) <sup>(7)</sup>.

Con el fin de disminuir la problemática anteriormente descrita, provocada por la ausencia de leche de la propia madre, varios profesionales y madres de familia han luchado para que se tomen medidas para reducir el impacto negativo en los recién nacidos. La mejor alternativa para la alimentación de los neonatos es leche humana donada y procesada en un banco de leche <sup>(8,9)</sup>. Por lo anterior, en el año 2005, representantes del Sector Salud de Costa Rica y de varios países de América Latina firmaron la *Carta Brasilia 2005*; en este documento se comprometieron a implementar bancos de leche humana (BLH) en sus respectivos países; de esta forma acataban el llamado de la Organización Mundial de la Salud.

Posteriormente, en el año 2008, nace la Red Iberoamericana de Bancos de Leche Humana (iberBLH) como un programa de cooperación en la región de Iberoamérica. Esta red se encarga del intercambio de conocimiento y tecnología en el campo de la lactancia materna y bancos de leche humana, como componentes estratégicos para lograr los Objetivos de Desarrollo del Milenio; de esta forma se hace hincapié en la reducción de la mortalidad infantil <sup>(10)</sup>. Esta red nace bajo el amparo de la Red Brasileña de BLH; la realización de cooperaciones internacionales tiene como objetivo la formación de multiplicadores para viabilizar la transferencia de tecnología de BLH a otros países <sup>(10)</sup>. El objetivo de la iberBLH es apoyar la implantación de, al menos, un banco de leche humana en cada país iberoamericano.

A raíz de todo este movimiento, en el año 2011, se inauguró el Banco de Leche Humana ubicado en el Hospital Dr. Carlos Luis Valverde Vega, de San Ramón. Este banco se convirtió en una nueva área de trabajo y por tanto en un nuevo reto para las y los microbiólogos y químicos clínicos (MQC) del país.

### ¿Qué es un banco de leche humana?

Según los historiadores, la leche humana fue el primer tejido humano donado en la historia de la humanidad <sup>(11)</sup>. Existe evidencia de registros del año 1800 a.C. en los cuales el Código de Hammurabi contenía regulaciones sobre las nodrizas que amamantaban al hijo de otra mujer por dinero <sup>(2,11)</sup>.

El primer banco de leche humana, como tal, se abrió en Viena, Austria, en 1909, seguido por uno en Boston y otro en Alemania, en 1919<sup>(1,12)</sup>; desde entonces, muchos otros bancos se han instaurado alrededor del mundo; es Brasil, actualmente, una de las mayores potencias en este campo.

En Costa Rica, el primer banco de leche materna se creó en 1974, en el Hospital Nacional de Niños, impulsado por la Dra. Carmen Moya, neonatóloga de ese centro de salud, seguido por el banco de leche del Hospital San Juan de Dios, en 1977<sup>(13)</sup>.

A inicios de los años 80, con el advenimiento del Virus de Inmunodeficiencia Humana y su transmisión por la leche materna, los bancos de leche se vieron dramáticamente afectados y tuvieron que cerrar sus puertas. Como consecuencia, científicos de algunos países, entre ellos Brasil, se dieron a la tarea de implementar nuevas técnicas para los bancos de leche que permitieran obtener un producto de excelente calidad y máxima seguridad, y desarrollaría el modelo de BLH que actualmente funciona en más de 200 bancos en todo el territorio brasileño, la mayoría de países de América Latina, España, Portugal y algunos países africanos. Bajo este modelo, se define el BLH como “una unidad acondicionada para cumplir con actividades de asistencia en pro del amamantamiento, en donde se promueva, proteja, apoye y acompañe a las madres y sus hijos(as) en todo el proceso de la lactancia materna y donde se realiza a la leche humana donada, una serie de procesos que garantizan la más alta calidad del producto final: Leche Humana Pasteurizada”<sup>(13)</sup>.

### Banco de Leche Humana del Hospital Dr. Carlos Luis Valverde Vega

La donación de leche, al igual que la de otros tejidos humanos, es voluntaria y altruista; las donadoras deben gozar de buena salud y tener un estilo de vida saludable. A través de una entrevista y mediante pruebas serológicas para asegurar la ausencia de anticuerpos contra agentes como HIV, HBV, HCV, Virus HTLV I y II o cuadros infecciosos como Chagas y Sífilis, se selecciona a las donantes. Adicionalmente, a cada donadora se le determinan sus niveles de hemoglobina y hematocrito con el fin de tener una idea general de su estado nutricional.

Las donadoras que cumplan con los requisitos de salud establecidos por la *Guía Técnica para el funcionamiento de Bancos de Leche Humana* (ver cuadro 1) son aceptadas y hacen su donación de leche bajo estrictas normas de higiene. Esta puede hacerse en las instalaciones del Banco, con asistencia del personal de enfermería o en el

hogar de la donante previa educación y orientación sobre el proceso.

**Cuadro 1.** Requisitos de salud, para donadoras, establecidos en la Guía Técnica para el funcionamiento de Bancos de Leche Humana.

Requisito
1. No haber recibido productos sanguíneos en los últimos 12 meses
2. No haber recibido órganos o tejidos en los últimos 12 meses
3. No sufrir enfermedades crónicas o sistémicas que contraindiquen la lactancia natural
4. No tener antecedentes de enfermedad como hepatitis B o C
5. No ser portadora de enfermedades venéreas como sífilis o gonorrea
6. No ser portadora de infección activa por citomegalovirus
7. No fumar. No ingerir bebidas alcohólicas de manera regular
8. No consumir medicamentos que contraindiquen la lactancia natural
9. No tener hijos que presenten cualquier tipo de infección congénita
10. No ser seropositiva por VIH o portadora del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o demostrar conductas de riesgo de contagio

Fuente: Norma nacional para bancos y centros de recolección de leche humana.

### Decreto ejecutivo no. 37271-S (2012)

En el BLH, la leche donada es seleccionada por embalaje, color, olor y presencia de partículas contaminantes; posteriormente, es clasificada por acidez y contenido calórico. La acidez se determina mediante el Método Dornic, que consiste en una titulación con NaOH 0.1N usando fenoltaleína como indicador. El rango de acidez aceptado para la leche de banco va de 1 a 8 grados Dornic. Una acidez aumentada implica la presencia de ácido láctico, producto de la fermentación de lactosa por bacterias de la microbiota normal de la leche o por bacterias contaminantes, por tanto, refleja de manera indirecta el grado de contaminación que posee la leche humana. La medición de la acidez es considerada una prueba fisicoquímica de control de calidad<sup>(14)</sup>. Adicionalmente, la acidez Dornic permite hacer inferencias sobre una mayor biodisponibilidad del calcio ya que, cuanto más baja es la acidez, más biodisponible

es el calcio en la leche humana; un producto con mayor acidez es recomendado en los casos de hipocalcemia <sup>(15)</sup>.

El contenido lipídico y calórico de la leche se puede obtener a través de un crematocrito. La técnica fue descrita por Lucas y su grupo en 1978; varias investigaciones han reportado una buena correlación entre el valor calórico de la leche y el crematocrito <sup>(16, 17)</sup>. El procedimiento utilizado es similar al empleado para la medición de hematocrito. La crema de la leche es la porción superficial obtenida a partir de la centrifugación; esta capa está compuesta por glóbulos de grasa recubiertos por una membrana fosfolipídica que contiene las lipasas y otras enzimas. La clasificación de la leche donada mediante estos dos parámetros permite al personal de salud elegir el producto idóneo para cada receptor en función de sus necesidades, por ejemplo: máxima calidad y pocas calorías para alimentación trófica, o leche hipercalórica para el paciente que requiere ganar peso <sup>(18)</sup>.

Una vez seleccionada y clasificada, la leche donada es pasteurizada; se usa el método Holder o también conocido como LTLT (*low-temperature-long-time*) que consiste en un proceso térmico con el cual la leche es calentada en un Baño María durante 30 minutos a una temperatura de 62,5°C <sup>(8,19,20)</sup>. Este paso es obligatorio en todos los bancos de leche, ya que asegura la inactivación de virus como HIV, HTLV-1 y Citomegalovirus <sup>(20)</sup>. También, dicho proceso inactiva otros microorganismos patógenos, con lo que se previene la transmisión de patógenos al infante <sup>(19,21)</sup>. A pesar de ser el método de pasteurización oficial para los bancos de leche humana, este tratamiento térmico, al igual que cualquier otro proceso aplicado para aumentar la vida útil de los alimentos, puede generar degradación de algunos componentes del material, además, provoca una disminución en la capacidad antioxidante e inactiva la enzima lipasa. Por esta razón, actualmente, a nivel mundial, se investigan diferentes opciones para disminuir dicha pérdida <sup>(8, 22)</sup>.

Luego de llevar a cabo el proceso de pasteurización, se realiza un control bacteriológico utilizando una serie de tres tubos con Caldo Bilis Verde Brillante; estos se incuban por 48 horas a 37°C. Si los cultivos son negativos, el producto final, la leche humana pasteurizada de alta calidad y máxima seguridad, es administrada a los neonatos hospitalizados según prescripción del médico pediatra.

En el Banco de Leche Humana del Hospital de San Ramón, durante el periodo comprendido entre el año 2011 y el 2013, se ha atendido un total de 223 donadoras de las cuales se rechazaron 10: 5 por serología positiva por Virus de Hepatitis B, 1 por VDRL reactivo, 2 por transfusión sanguínea previa y 2 por estilo de vida no saludable. Se han pasteurizado 121 litros de leche humana donada; con esta se han beneficiado 361 neonatos del Hospital Dr. Carlos Luis Valverde Vega y pacientes de otros hospitales del país (Hospital Nacional de Niños, Hospital de San Carlos, Hospital Monseñor Sanabria y Hospital San Juan de Dios) (ver cuadro 2).

**Cuadro 2.** Cantidad de donantes y neonatos beneficiados por el Banco de Leche Humana del Hospital Dr. Carlos Luis Valverde Vega, desde el año 2011 hasta el 2013.

Año	N° donadoras captadas	N° donaciones	Unidades LHP (65 ml)	Unidades LHP entregadas	N° receptores de LHP
2011	67	270	279	210	49
2012	95	690	974	949	145
2013	61	507	615	631	167
<b>Total</b>	<b>223</b>	<b>1467</b>	<b>1868</b>	<b>1790</b>	<b>361</b>

LHP: Leche humana pasteurizada

La labor realizada en estos años, indudablemente, ha sido de gran ayuda para los neonatos hospitalizados, ya que la alimentación con leche materna disminuye el riesgo de sufrir infecciones del tracto gastrointestinal, enterocolitis necrotizante, síndrome de muerte súbita; además, favorece la tolerancia a la alimentación enteral y estimula el desarrollo del sistema nervioso <sup>(2)</sup> entre otros. Todo esto se refleja en menos días de internamiento con una disminución del riesgo de contraer infecciones nosocomiales.

### **Papel del y la profesional en Microbiología y Química Clínica en el banco de leche humana**

La *Norma Nacional para Bancos y Centros de Recolección de Leche Humana* (Decreto Ejecutivo N° 37271-S, 2012) dicta que un profesional microbiólogo y químico clínico debe asumir la responsabilidad técnica por el servicio del BLH <sup>(23)</sup>. Esto implica responder por los procesos de selección, clasificación, pasteurización y distribución de la leche humana pasteurizada, por los procesos de gestión de la calidad y los registros de información; este último aspecto es de suma importancia

ya que el trabajo realizado en el banco de leche debe ser completamente trazable.

Las técnicas utilizadas durante el desarrollo de los procesos que se llevan a cabo en el BLH son tareas comunes a las que están habituados las y los microbiólogos en sus laboratorios. Sin embargo, la o el MQC responsable de un BLH deberá involucrarse y comprometerse con el tema de Lactancia Materna porque es parte de su responsabilidad desarrollar acciones de promoción, protección y apoyo a esta; además, debe trabajar conjuntamente con el personal médico y de enfermería de la Clínica de Lactancia asociada al banco.

Este tema resulta nuevo dentro de la cotidianidad de las y los microbiólogos químicos clínicos; además, es sumamente interesante, debido a la complejidad del fluido que resulta ser la leche materna humana y la magnificencia de la lactancia materna.

El reto está planteado: implica trabajar en conjunto con enfermeras y médicos pediatras en el crecimiento de una red nacional de bancos de leche humana que ofrezca las mejores posibilidades de vida a los neonatos del país que, por diferentes motivos, requieren ser hospitalizados y no pueden ser amamantados por sus madres.

## Referencias:

1. Biasini, A., Stella, M., Malaigia, L., Chin, M., Azzalli, M., Laguardia, M., Rizzo, V. Establishment, operation and development of a donor human milk bank. *E. Hum. Develp* 2013. En prensa <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.07.00>
2. Schellhorn, C. & Valdés, V. (2010). *Lactancia materna contenidos técnicos*. Ministerio de Salud. Chile.
3. Cutbherston W. F. (1999). Evolution of infant nutrition. *Br. J. Nutr*, 81, 358-371
4. Ballard, O. & Morrow, A. (2013). Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. Clin. N. Am*, 60, 49-74.
5. Bertino, E., Giuliani, F., Occhi, L., Coscia, A. Tonetto, P., Marchino, F., Fabris, C. (2012). Benefits of donor human milk for preterm infants: Current evidence. *E. Hum. Develp*, 85, S9-S10
6. American Academy of Pediatrics. (2012). Breastfeeding and the use of humman milk. *Pediatrics*, 129, (3), 827-841
7. Lois D.W. (2002). A.The cost-effectiveness of using Banked donor milk in the neonatal intensive care unit: prevention of necrotizing enterocolitis. *J Hum Lact*, 18(2), 172-177
8. Moltó-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A., López-Sabater, (2012). M.Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chemistry*, 124, 697-702.
9. Vásquez-Román, S. C. Alonso Díaz, C. Medina López, G. Bustos Lozano, M.V. Martínez. C.R. Pallas. (2009). Puesta en Marcha del banco de leche materna donada en una unidad neonatal. *An Pediatr* , 71(4), 343-348.
10. Programa Iberoamericano de Bancos de Leche. Obtenido de [http://www.iberblh.icict.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=47&Itemid=27](http://www.iberblh.icict.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=27)
11. Hernández Gamboa, E. (2008). Genealogía histórica de la lactancia materna. *Rev. Enfermería Actual en Costa Rica*. Obtenido de [www.revenf.ucr.ac.cr/genealogiahistorica.pdf](http://www.revenf.ucr.ac.cr/genealogiahistorica.pdf)
12. Jones F. (2003). History of North American donor milk banking: one hundred years of progress. *J Hum Lact*, 19(3), 313-318,2003.
13. Caja Costarricense de Seguro Social. Guías Técnicas para el funcionamiento de Bancos de Leche Humana 2008, San José, Costa Rica.Torres de Freitas, A., Durán Z., Rodríguez C. (2006). Acidez titulable como control de calidad para la leche humana. *Lact* ,22(3), 335-339
14. Guerra, J., Guimarães, V., Novak, F. Distribución de la leche humana ordeñada. Normas técnicas REDBLH-BR para bancos de leche humana 2004. BLH-IFF/NT- 41.04. <http://www.fiocruz.br/redeblh/media/distribucaoesp.pdf>
15. Vázquez-Román, S., Alonso-Díaz, García-Lara, N., Escuder-Vieco, D., Pallás-Alonso, C. (2013). Medida por crematocrito del contenido calórico de la leche materna donada congelada. *An Pediatr (Barc)*. En prensa. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2013.09.001>
16. Mayans, E. & Martell, M. (1984). Estimación del valor calórico de la leche materna mediante la técnica del crematocrito. *Rev Med Uruguaya*, 10, 160-164
17. Medina, M. C. (2009). Está científicamente demostrado que alimentar a los niños prematuros con leche materna o leche humana donada es superiora hacerlo con fórmulas derivadas de leche de vaca. Nuevas tecnologías. Obtenido de <http://demo.betvalue.com/nets/pdftemp/qi0545k33btf5asze1lzkns.pdf>
18. Contador, R., Delgado J., Delgado F., Cava R., Ramírez R. (2013). Effect of thermal pasteurization or high pressure processing on immunoglobulin and leukocyte contents of human milk. *International dairy journal*, 32,1-5
19. Tully, D., Jones, F., Tully, M. (2001). Donor milk: what's in it and what's not. *J Hum Lact*, 17(2), 152-155.
20. Araujo-Vieira, A., Mendes -Soares, F., Porto -Pimenta, H., Dunshee -Abranches, A., Lopes- Moreira, M. (2011). Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Human Development*, 87, 577-580
21. Heiman, H & Schanler, R. (2007). Enteral nutrition for premature infants: The role of human milk. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 12, 26-34
22. Diario Oficial La Gaceta (2012). Norma Nacional para Bancos y Centros de Recolección de Leche Humana Decreto Ejecutivo Nº 37271-S [http://www.gaceta.go.cr/pub/2012/09/20/ALCA135\\_20\\_09\\_2012.pdf](http://www.gaceta.go.cr/pub/2012/09/20/ALCA135_20_09_2012.pdf)

# Marcadores para el diagnóstico de la enfermedad renal crónica

Carlos Carvajal Carvajal<sup>1</sup>

## Resumen:

La enfermedad renal crónica se define como una alteración funcional o estructural del riñón con una duración mayor a los 3 meses. Para su diagnóstico, se requieren pruebas de laboratorio: la tasa de filtración glomerular (TFG) y la albuminuria. Debido a múltiples factores de diversa índole se prefiere estimar la TFG en lugar de medirla directamente y para la medición de la albúmina se calcula la relación albúmina/creatinina en la primera muestra de orina de la mañana.

**Palabras clave:** Tasa de filtración glomerular, Creatinina, Cistatina C.

## Abstract:

Chronic kidney disease is defined as a functional or structural alteration of the kidney that lasts for more than 3 months. Its diagnosis includes laboratory tests such as the glomerular filtration rate (GFR) and albuminuria. Due to multiple factors of diverse nature the GFR is more commonly estimated than measured directly. To determine the albuminuria the albumin/creatinine ratio of the first voided urine is calculated.

**Key words:** Glomerular filtration rate, creatinine, cystatin C.

La enfermedad renal crónica (ERC) es considerada un problema mayor de salud pública, debido a su alta prevalencia. Además, esta se asocia a un alto riesgo de mortalidad. De lo anterior se deduce la importancia del diagnóstico oportuno, donde el laboratorio clínico cumple un papel fundamental.

El objetivo de este trabajo es revisar las principales pruebas de laboratorio que permiten el diagnóstico y clasificación de la enfermedad renal crónica.

## Definición de la ERC

La enfermedad renal crónica se define como la presencia de anomalías en la estructura o función del riñón por más de tres meses, con implicaciones para la salud<sup>(1)</sup>. La combinación de ambos criterios, funcionales y

estructurales, es la base de la clasificación de la ERC en cinco estadios: G1, G2, G3a; G3b, G4 y G5. Como marcadores de daño renal se citan: albuminuria, anomalías del sedimento urinario, anomalías electrolíticas y de otro tipo debido a desórdenes tubulares, anomalías detectadas por histología o por medio de imágenes o historia de trasplante renal<sup>(2)</sup>.

Las funciones excretora, endocrina y metabólica de los riñones declinan conjuntamente en la mayoría de las enfermedades crónicas y la tasa de filtración glomerular (TFG) se considera como la mejor medida global de la función renal<sup>(3)</sup>. La ERC se categoriza en cinco estadios basados en la TFG estimada (TFGe); se considera como valor umbral una TFG < 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, por más de tres meses, para diagnosticarla.

Una ERC con una TFG < 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> se asocia a mayores complicaciones ligadas a tres mecanismos generales: toxicidad por drogas, complicaciones metabólicas y endocrinas y riesgo de enfermedad cardiovascular y de muerte<sup>(4)</sup>. En adultos, la hipertensión

Artículo recibido el 31/01/2015 / Aceptado para su publicación el 10/03/2015

1. Laboratorio Clínico, Hospital de Guápiles, CCSS.  
Correspondencia: ccarvajal1313@yahoo.com

y la diabetes mellitus constituyen la principal causa de ERC; en cambio, en la población pediátrica, las causas congénitas ocasionan la mayoría de casos de esta enfermedad <sup>(5)</sup>.

### Tasa de filtración glomerular

La TFG no puede ser medida directamente, sin embargo, puede ser determinada por el aclaramiento de un marcador de filtración en la orina. Un marcador de filtración ideal es aquel que sea fisiológicamente inerte, con un bajo peso molecular para ser filtrado libremente por el glomérulo, que no esté unido a las proteínas del plasma y no altere la función renal <sup>(6)</sup>. Además, dicho marcador debe ser capaz de alcanzar una concentración plasmática estable sin ser reabsorbido, secretado o metabolizado por el riñón.

Para la medición de la TFG se pueden utilizar sustancias exógenas como inulina, iotalamato, EDTA, iohexol o DTPA; su medición con estos marcadores se considera como el estándar de oro <sup>(7)</sup>. Desafortunadamente, en la práctica clínica esta metodología es costosa y complicada y, por esta razón, se ha recurrido al uso de sustancias endógenas para determinarla. Específicamente, se ha utilizado la creatinina, una sustancia producida a partir de la fosfocreatina y la creatina presente en el músculo. La creatinina presenta algunas ventajas como marcador de filtración: es filtrada libremente a nivel glomerular y no es reabsorbida ni metabolizada. No obstante, presenta una serie de factores dependientes e independientes del paciente que limitan su uso: existe secreción tubular de la misma <sup>(6)</sup>, la producción de creatinina difiere entre los individuos a través del tiempo, en asociación con cambios en la masa muscular y en la dieta. El grado de secreción tubular varía entre y dentro de los individuos y puede ser afectado por algunos medicamentos, tal como la cimetidina y el trimetoprim <sup>(3)</sup>.

El método empleado para la determinación de la creatinina contribuye a la variabilidad de la prueba. En la práctica clínica rutinaria se pueden emplear dos métodos diferentes para la determinación de este analito: el colorimétrico y el enzimático. El método colorimétrico, basado en la reacción de Jaffé, posee una serie de interferentes positivos y negativos (glucosa, ácido acetoacético, ácido úrico, proteínas en general, bilirrubina y hemoglobina fetal) que restan validez al resultado obtenido <sup>(8)</sup>. El método colorimétrico puede mejorarse disminuyendo los interferentes mediante una determinación cinética, a dos tiempos diferentes, sin embargo, siempre es afectado por ellos. El método enzimático disminuye las interferencias y se considera más específico, más exacto y de mayor precisión.

La exactitud en el uso de la creatinina se ha mejorado utilizando una orina con tiempo (de 24 horas) y midiendo su concentración sérica <sup>(6)</sup>. No obstante, la obtención de la orina de 24 horas se convierte en el principal problema, pues es difícil obtenerla. Actualmente, se está implementando el uso de la proteína cistatina C para medir la TFG, pues presenta varias características que la hacen servir como un nuevo marcador: es producida y secretada a una tasa constante por la mayoría de las células nucleadas, es filtrada libremente por el glomérulo debido a su pequeño tamaño, no es secretada por los túbulos renales, aunque sí es reabsorbida y catabolizada, de manera que no retorna a la sangre <sup>(9)</sup>. A diferencia de la creatinina, la producción de cistatina C no se ve afectada por la masa muscular o por la dieta, permanece constante y sus niveles sanguíneos no son influidos por la edad, el sexo, la dieta o la masa muscular <sup>(10,11)</sup>. Su concentración es casi totalmente dependiente de la TFG y la relación de cistatina C sérica con la TFG medida de forma directa parece estar menos influenciada por las características demográficas y el estado de salud que la creatinina <sup>(12)</sup>. No obstante, en diferentes investigaciones se cita que, bajo ciertas situaciones clínicas, la cistatina C puede presentar un sesgo como marcador de la función renal, por ejemplo, en pacientes con un rápido recambio celular, con enfermedad tiroidea no controlada o cuando utilizan grandes dosis de corticosteroides <sup>(13,14)</sup>.

Otro marcador de daño renal es la proteína NGAL (del inglés *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) que es expresada por una variedad de tejidos humanos (pulmonar, hepático y renal) en varios estados patológicos <sup>(15, 16)</sup>. Específicamente, su forma monomérica de 25 kDa es secretada por las células epiteliales tubulares de riñones dañadas y su nivel aumenta de forma rápida en sangre y orina proporcionalmente al grado de daño renal. A pesar de ser considerada un marcador de daño renal agudo, la NGAL tiene utilidad en la ERC porque la detección de daño renal agudo y su tratamiento disminuyen la posibilidad de padecer un estado crónico de la enfermedad <sup>(16)</sup>. Además, ha sido utilizada para detectar daño renal temprano en pacientes con ERC que han sido sometidos a una cirugía cardíaca <sup>(17)</sup>, procedimiento que exacerba el cuadro crónico.

Ante las dificultades de utilizar los marcadores de filtración glomerular, exógenos o endógenos, y de obtener una muestra de orina de 24 horas confiable, se está recurriendo al cálculo de una TFG estimada (TFGe) a partir de diferentes ecuaciones y utilizando una muestra de sangre. De este modo surgen varias ecuaciones como la MDRD (del inglés "Modification of Diet in Renal

Disease”) y la CKD-EPI (del inglés “Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration”).

### Ecuación MDRD

La ecuación del estudio MDRD fue desarrollada, en 1999, utilizando un ensayo de creatinina no estandarizado (MDRD) y que fue posteriormente mejorada al utilizar un ensayo con una creatinina que podía ser trazada a un método de referencia (MDRD-IDMS, del inglés MDRD-Isotopic Dilution Mass Spectrometry). Sin embargo, la ecuación de MDRD presenta una serie de limitaciones a consecuencia de la población utilizada para su desarrollo (pacientes con ERC). Debido a lo anterior, dicha ecuación subestima la TFG en valores altos ( $TFG > 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ )<sup>(3, 18)</sup>. Esta fórmula funciona mejor en personas con un daño renal leve.

El grupo CKD-EPI desarrolló, en el año 2009, una ecuación para minimizar los errores de la ecuación MDRD. Fue definida a partir de una población de 8 254 personas con y sin ERC en diez estudios y utilizó un ensayo de creatinina estandarizada o trazable<sup>(2)</sup>. Esta nueva ecuación es más exacta que la MDRD, especialmente en valores elevados de TFG<sup>(19)</sup>; minimiza el sobrediagnóstico de ERC que se da al utilizar la fórmula de MDRD. La ecuación CKD-EPI es tan exacta como la MDRD en el subgrupo con una TFGe  $< 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  y, sustancialmente, más exacta en el subgrupo con una TFGe  $> 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ <sup>(6)</sup>.

Posteriormente, el consorcio CKD-EPI desarrolló dos ecuaciones más, una que incorpora la cistatina C en lugar de la creatinina (CKD-EPI<sub>Cys</sub>) y la otra incorpora ambos marcadores (CKD-EPI<sub>Cre-Cys</sub>) para calcular mejor la TFGe. El uso de la cistatina C requirió previamente su estandarización por medio de un material de referencia<sup>(20)</sup>. Todas las ecuaciones citadas (MDRD, CKD-EPI y sus variantes) incorporan variables como la edad, el sexo, la etnia (negros o no negros), aunque para las ecuaciones basadas en cistatina C no se requieren los datos de esta última<sup>(13)</sup>.

En diferentes estudios, en los cuales se comparan las ecuaciones MDRD y CKD-EPI, se ha observado que ambas ecuaciones tienen una exactitud similar para valores TFGe  $< 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , mientras que para valores  $> 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  la CKD-EPI presenta mayor exactitud<sup>(2, 6, 21, 22)</sup>. Adicionalmente, la ecuación MDRD tiende a subestimar la función renal obteniéndose valores menores de TFGe<sup>(18, 23, 24)</sup>. Esto último tiene gran importancia porque, debido a esta subestimación de la función renal con la ecuación MDRD, se obtienen mayores prevalencias de ERC.

Finalmente, al comparar las ecuaciones MDRD, CKD-EPI<sub>creatinina</sub>, CKD-EPI<sub>cistatina C</sub> y CKD-EPI<sub>creatinina-cistatina C</sub>, se obtiene que la ecuación que combina o utiliza ambos marcadores (creatinina y cistatina C) es la que tiene mayor precisión y exactitud en el cálculo de la TFGe; esta mejora se observa también en aquellos pacientes con un índice de masa corporal (IMC)  $< 20$ , un subgrupo con TFGe poco exacto si solo se usa creatinina<sup>(25)</sup>. Además, el uso de la cistatina C en combinación con la creatinina aumenta la asociación entre la TFGe, el riesgo de muerte y el riesgo de llegar a enfermedad renal terminal<sup>(13, 26)</sup>.

### Proteinuria

La proteinuria refleja un aumento de proteínas en la orina y puede ocurrir por una permeabilidad glomerular aumentada a proteínas de alto peso molecular (proteinuria glomerular o albuminuria), por reabsorción incompleta de proteínas de bajo peso molecular normalmente filtradas (proteinuria tubular) o por una concentración aumentada de proteínas de bajo peso molecular (proteinuria por sobreproducción)<sup>(1)</sup>. La proteinuria también puede reflejar la pérdida anormal de proteínas derivadas del riñón y del tracto urinario inferior.

Para la determinación del daño renal en la ERC, se prefiere la determinación de la albuminuria y no la proteinuria. La cuantificación de proteínas presenta dificultades importantes debido a la variabilidad en la composición y proporción de las diferentes proteínas que puedan estar presentes en la orina. Además, la albúmina es el principal componente proteico urinario en la mayoría de las enfermedades renales.

Varias guías internacionales de salud (NICE, KDIGO, K/DOQI, NKDEP) recomiendan la cuantificación de la proteinuria usando la relación albúmina/creatinina (RAC)<sup>(27, 28)</sup>. La muestra utilizada es la primera orina de la mañana y puede reemplazar a la orina de 24 horas, según estudios comparativos realizados<sup>(29)</sup>. Algunas guías recomiendan repetir la medición de la RAC para evitar el sobrediagnóstico debido a una albuminuria transitoria<sup>(11, 27)</sup>. Un diagnóstico positivo de albuminuria se obtendría con dos muestras, de tres, por encima del valor RAC urinario  $\geq 30 \text{ mg/g}$ , que es equivalente a una tasa de excreción urinaria de albúmina  $\geq 30 \text{ mg/24 horas}$ <sup>(1)</sup>.

### Conclusiones

La ERC puede ser diagnosticada y clasificada en estadios por medio de pruebas de laboratorio: TFGe y la albuminuria. En el caso de la albuminuria, se prefiere la primera muestra de orina del día en lugar de una muestra

de orina de 24 horas. Para la medición de la filtración glomerular, se prefiere estimar una TFG en lugar de su medición directa, mediante la utilización de ecuaciones que requieren la medición sanguínea de la creatinina sola o combinada con la de cistatina C.

## Referencias:

1. KDIGO.(2013). Definition and classification of CKD. *Kidney International Supplements*, 3, 19-62 doi:10.1038/kisup.2012.64
2. Montañés R. Sanjuan B. Samper O. Ballarín J. (2010). Valoración de la nueva ecuación CKD-EPI para la estimación del filtrado glomerular. *Nefrología*. 30(2), 185-194.
3. Sandilands E. Dhaun N. Dear J. Webb D. (2013). Measurement of renal function in patients with chronic kidney disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 76(4), 504-515.
4. Slee A. (2012). Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition & Metabolism*, 9(36), 1-16.
5. Harambat J. van Stralen K. Kim J. Tizard E. (2012). Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Peditr Nephrol*, 27, 363-373.
6. Florkowski C. Chew-Harris J. (2011). Methods of estimating GFR-Different equations including CKD-EPI. *Cli Biochem Rev*, 32, 75-78.
7. Redal-Baigorri B. Rasmussen K. Goya J. (2013). The use of absolute values improves performance of estimation formulae: a retrospective cross sectional study. *BMC nephrology*, 14, 271-278.
8. Samra M. Abcar A. (2012). False estimates of elevated creatinine. *Perm J*, 16(2), 51-52
9. Foley R. Wang C. Collins A. (2011). Cystatin C, mortality risk and clinical triage in US adults: threshold values and hierarchical importance. *Nephrol Dial Transplant*, 26, 1831-1837.
10. Lopes M. Araújo L. Passos M. Nishid S. Kirsztajn G. et al. (2013). Estimation of glomerular filtration rate from serum creatine and cystatin C in octogenarians and nonagenarians. *BMC nephrology*, 14, 265-274.
11. Selvin E. Juraschek S. Eckfeldt J. Levey A. Inker L. et al. (2013). Within-person variability in kidney measures. *Am J Kidney Dis*, 61(5), 716-722.
12. Kyung Y. Ra M. Eun J. Young M. Heon S. et al. (2011). Cystatin C as an early biomarker of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*, 26, 258-263.
13. Shlipak M. Matsushita K. Ärnlöv J. Inker L. Katz R. et al. (2013). Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. *N Engl J Med*, 369(10), 932-943.
14. Grubb A. Nyman U. Björk J. (2012). Improved estimation of glomerular filtration rate (GFR) by comparison of eGFRcystatin and eGFRcreatinine. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 72, 73-77.
15. Paragas N. Qiu A. Zhang Q. Samstein B. Deng SX. (2011). The Ngal Reporter Mouse Detects the Response of the Kidney to Injury in Real Time. *Nat Med*, 17(2), 216-222.
16. Haase-Fielitz A. Haase M. Devaraja P. (2014). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem*, 51(3), 335-351
17. Doi K. Urata M. Katagiri D. Inamori M. Murata S. et al. (2013). Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury superimposed on chronic kidney disease after cardiac surgery: a multicenter prospective study. *Critical Care*, 17, 1-12
18. Gómez M. Rodríguez E. Rodríguez R. Cantera M. Ramos R. et al. (2010). Diferencias de la ecuación CKD-EPI con la MDRD para la estimación del filtrado glomerular en pacientes hipertensos. *Nefrología*, 30(4), 458-462.
19. Inker L. Shaffi K. Levey A. (2012). Estimating GFR using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: better risk predictions. *Circ Herth Fail*, 5(3), 303-306.
20. Bevc S. Hojs R. Ekart R. Završnik M. Gorenjak M. et al. (2012). Simple cystatin C formula for estimation of glomerular filtration rate in overweight patients with diabetes mellitus type 2 and chronic kidney disease. *Experimental Diabetes Research*. 2012, 1-8.
21. Eun Y. Young-Mi L. Kyu C. Hyun C. Byung-Wan L. et al. (2013). Comparison of two creatinine-based equations for predicting decline in renal function in type 2 diabetic patients with nephropathy in a Korean population. *International Journal of Endocrinology*, 22. Rosa-Diez G. Varela F. Cruceleui S. Algranati S. Greloni G. (2011). Comparación entre las ecuaciones CKD-EPI y MDRD para la estimación del filtrado glomerular en pacientes con enfermedad renal crónica. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 71, 323-330.
23. O'Callaghan C. Shine B. Lasserson D. (2011). Chronic kidney disease: a large-scale population-based study of effects of introducing the CKD-EPI formula for eGFR reporting. *BMJ Open*, 1, 1-10.
24. Silveiro S. Araujo G. Ferreira M. Souza F. Yamaguchi H. Camargo E. (2011). Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation pronouncedly underestimates glomerular filtration rate in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 34, 2353-2355.
25. Inker L. Schmid C. Tighiouart H. Eckfeldt J. Feldman H. (2012). Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med*, 367(1), 20-29.
26. Liu X. Ma H. Huang H. Wang C. Tang H. et al. (2013). Is the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration creatinine-cystatin C equation useful for glomerular filtration rate estimation in the elderly? *Clinical Interventions in aging*, 8, 1387-1391.
27. Fraser S. Roderick P. McIntyre N. Harris S. McIntyre C. et al. (2014). Assessment of proteinuria in patients with chronic kidney stage 3: albuminuria and non-albumin proteinuria. *PLOS ONE*, 9(5), 1-12.
28. Viswanathan G. Sarnak M. Tighiouart H. Muntner P. Inker L. The association of chronic kidney complications by glomerular filtration rate and albuminuria: a cross-sectional analysis. *ClinNephrol*. 2013; 80(1): 29-39.
29. Chavan V. Durgawalw P. Sayyed A. Sontakke A. Attar N. et al. A comparative study of clinical utility of spot urine samples with 24-h urine albumin excretion for screening of microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Ind J ClinBiochem*. 2011; 26(3): 283-289. 

Cartas al editor

## Primer aislamiento e identificación molecular de *Naegleria fowleri* en Costa Rica

Elizabeth Abrahams-Sandí<sup>1</sup>, Lissette Retana-Moreira<sup>1</sup>

La meningoencefalitis amebiana primaria es un cuadro agudo y fulminante causado por *Naegleria fowleri*, una ameba de vida libre (AVL) de amplia distribución a nivel mundial. Conocida como PAM, por sus siglas en inglés, esta patología tiene una alta mortalidad (cerca del 95%), en la mayoría de los casos diagnosticados en los Estados Unidos y en zonas templadas del planeta.

Según se informó en una publicación previa<sup>(1)</sup>, la Sección de Protozoología Médica de la Facultad de Microbiología fue contactada por el Ministerio de Salud para el estudio epidemiológico de AVL en las aguas termales de un hotel de la zona de San Carlos, Alajuela. Dicha solicitud fue realizada luego de la muerte de un niño norteamericano diagnosticado con PAM en un hospital de Florida, Estados Unidos, cuyos antecedentes indicaron la visita a las aguas termales de un hotel en la zona turística mencionada.

Para el estudio referido, se utilizaron muestras de aguas termales de piscinas y fuentes naturales. Con instrucciones precisas de la Sección de Protozoología, el personal del Laboratorio de Microbiología del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados procedió a la obtención de las muestras, las cuales fueron procesadas dentro de las 12-24 horas posteriores a la colecta. La metodología incluyó la filtración por vacío de todas las muestras, el cultivo para AVL, el análisis morfológico de los especímenes obtenidos y pruebas de exflagelación, osmo y termotolerancia. Los análisis

preliminares permitieron el aislamiento de una ameba con características semejantes a *N. fowleri*, por lo que se llevó a cabo una PCR confirmatoria de especie. El empleo de cebadores para la amplificación del gen 18S ADNr, la utilización de cebadores específicos para *N. fowleri* y la secuenciación de los productos obtenidos permitieron la confirmación de especie. La secuencia obtenida está depositada en el GenBank bajo el número KM658156. Información más detallada sobre este caso fue publicada recientemente por nuestro grupo en la revista *Emerging Infectious Disease* del CDC<sup>(2)</sup>.

Este hallazgo de *N. fowleri* corresponde al primero reportado en el país, el cual podría, además, estar relacionado con el primer caso de PAM adquirido en un sitio turístico de Costa Rica, específicamente en la zona de San Carlos. Desde el punto de vista epidemiológico, la presencia de *N. fowleri* en zonas tropicales y subtropicales es un hecho bastante conocido. La temperatura normal de las aguas termales, así como el calentamiento de ríos y lagos provocado por el sol en la estación de verano, hacen de estos sitios nichos ideales para la presencia de una ameba termotolerante como ésta.

El reporte de este hallazgo, más que causar alarma en los usuarios de sitios turísticos de este tipo, debe alertar a las autoridades de salud sobre la presencia de estos agentes y el cuadro clínico que podrían provocar, especialmente en las poblaciones consideradas de riesgo: niños y adultos jóvenes. Según De Jonckheere, la posibilidad de que exista un subregistro de casos de PAM para las zonas tropicales y subtropicales es alto; la principal causa de este subregistro es el desconocimiento del cuadro clínico por

1. Departamento Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. elizabeth.abrahams@ucr.ac.cr

parte del médico y la poca información epidemiológica que se tiene sobre el agente en estas zonas geográficas<sup>(3)</sup>. Reportes como el referido en esta nota son, por lo tanto, de notificación obligatoria, máxime que existen algunas medidas bastante simples que pueden disminuir el riesgo de infección con esta ameba, tales como el uso de tapones para la nariz, evitar la inmersión y llevar a cabo la remoción de sedimentos cuando se realizan actividades acuáticas en sitios de riesgo.

En la actualidad, el laboratorio de la Sección de Protozoología Médica cuenta con las metodologías de trabajo para determinar la presencia de AVL potencialmente patógenas, que incluyen los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y la especie *Balamuthia mandrillaris*. En colaboración con el Dr. Jacob Lorenzo Morales de la Universidad de la Laguna, Tenerife, hemos generado un proyecto de investigación (UCR, VI #803-B4-050), cuyo objetivo es actualizar el conocimiento en este campo y ofrecer la posibilidad de diagnóstico de estos agentes tanto en muestras clínicas como ambientales.

## Referencias

1. Abrahams-Sandí E, Retana-Moreira E. (2014). Primer. Amebas de vida libre como agentes de encefalitis en el ser humano. *Rev. Colegio de Microb. Quim. Clin. Costa Rica*, 20(3), 4-8
2. Abrahams-Sandí E., Retana-Moreira L., Castro-Castillo A., Reyes-Batlle M., Lorenzo-Morales J. (2015). Fatal meningoencephalitis in child and Isolation of *Naegleria fowleri* from Hot Springs in Costa Rica. *Emerging Infectious Disease*, 21(2), 382-384.
3. De Jonckheere JF. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeba flagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetic and Evolution*, 1520-1528

---

# La gran estafa de la próstata

Walter Cartín Sánchez<sup>1</sup>

**L**a gran estafa de la próstata es el título del libro recientemente publicado por Richard J. Ablin (*The Great Prostate Hoax*, Palgrave MacMillan, 2014), descubridor del antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés) en el año 1970. Para ese entonces, el Dr. Ablin y colaboradores trataban de identificar un antígeno que fuera específico para cáncer de próstata. Pasaron casi dos décadas para que, en 1986, la FDA (*US Food and Drug Administration*) aprobara el uso del PSA, exclusivamente, para los casos de recaída de cáncer prostático. Fue hasta 1994 cuando el FDA aprobó su uso como prueba de tamizaje para cáncer de próstata en pacientes sanos; sin embargo, la comunidad médica ya lo había empezado a utilizar desde 1986 con ese fin.

Los estudios clínicos proveen la base de la decisión médica y del avance del conocimiento científico, en tanto que la opinión pública confía en que los datos generados por dichas investigaciones sean precisos y

libres de sesgos. Recientemente, la comunidad médica aceptó los resultados de un estudio multicéntrico europeo, el cual midió el impacto del uso del antígeno prostático específico como herramienta de tamizaje en el diagnóstico de cáncer de próstata. Dicho estudio permitió concluir que el uso del PSA redujo la muerte por este tipo de cáncer en un 20%. En Suecia, otro estudio encontró una reducción del 44% en las muertes por esta patología, al utilizar el PSA de la misma forma.

Recientemente, se han hecho públicos algunos problemas en ambos estudios clínicos. En marzo del 2014, los autores del estudio sueco anunciaron que los datos no estarían disponibles para el escrutinio por otros investigadores. El hecho de que investigadores bloqueen el acceso a los datos es ya de por sí deplorable. Si los datos de ambos estudios eran lo suficientemente robustos como para llegar a esas conclusiones y fueron publicados en revistas de gran prestigio como el *New England Journal of Medicine* (2009;360:1320-1328) y la revista *Lancet Oncology* (2010 Aug;11(8):725-

1. Laboratorio de Estudios Especializados e Investigación Clínica. Hospital Nacional de Niños. CCSS. walter.cartin@gmail.com

32), es inaceptable el hecho de que los datos no estén disponibles para el escrutinio independiente.

La denuncia la realizaron dos investigadores australianos, Ian E. Haines y George L. Miklos, quienes cuestionaron la metodología y los resultados de ambos estudios. Ellos notaron que parte de los datos del estudio europeo provenía de un estudio finlandés, en el cual se encontró que no había una diferencia significativa en la supervivencia de pacientes en los que se había utilizado, o no, la prueba de PSA como herramienta de tamizaje y que posteriormente desarrollaron cáncer de próstata. Además, encontraron que muchos de los hombres que habían desarrollado cáncer de próstata habían recibido cantidades excesivas de un tratamiento de monoterapia hormonal, el cual algunos investigadores consideran que puede acelerar el cáncer. Cuando Haines y Miklos pidieron tener acceso completo a los datos, los autores de los estudios se negaron a compartirlos.

Aún más problemático es el hecho de que al estudio europeo se le transfirió el 60% de los datos del estudio Sueco. Ese sobrepeso de datos, obviamente, favoreció la balanza hacia la conclusión de que el tamizaje realizado utilizando PSA salva vidas. Aquí se da el primer problema ético, ya que sin esa transferencia de datos sesgados desaparece la mayor conclusión del estudio, en el sentido de que el uso del PSA como

prueba de tamizaje disminuye la mortalidad por cáncer de próstata.

Para complicar el panorama, y como segundo problema ético, recientemente se ha hecho público que algunos de los autores y otros investigadores norteamericanos que los apoyan tienen potenciales conflictos de interés en relación con pagos realizados por compañías involucradas con el mercadeo y manejo de patentes del PSA.

Para evitar que situaciones como las anteriormente descritas sucedan en Costa Rica, es importante, en primer lugar, desarrollar una declaración de principios acerca de la transparencia y el acceso a los datos y segundo, asegurarse que todo investigador realice una declaración de los potenciales conflictos de interés y lo haga según lo establece el *International Committee of Medical Journal Editors*, y que, en caso de ser necesario, sean de acceso público.

El acaparamiento de datos, especialmente de datos erróneos, es inaceptable cuando hay vidas en juego. Queda esperar cuál será la recomendación última para el uso real que deba dársele al PSA, “hasta tanto que se aclaren los nubados del día”.



## AVISOS DEL COLEGIO

### Estimad@s colegiados

Le recordamos que en forma continua se debe de actualizar la base de datos de nuestro Colegio. Por tal razón les solicitamos realizar la actualización en la fórmula que se ha elaborado para ese fin, que puede solicitarse al correo del Colegio [colmq@racsa.co.cr](mailto:colmq@racsa.co.cr) o a través del fax 2225-5138 ☎

### AVISO DE MOROSIDAD

**Se les recuerda a todos los microbiólogos del país la obligatoriedad del pago puntual de la Colegiatura, según el artículo 15 de la Ley Constitutiva del CMQC-Ley 771.**

**El incumplimiento de este artículo lleva al estado de morosidad y suspensión de la licencia de trabajo. ☎**



## Instrucciones a los autores

La Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica (RCMQCCR) es publicada trimestralmente en español y se dedica a la divulgación de trabajos científicos en las diferentes disciplinas de la microbiología, inmunología, parasitología y la química clínica en humanos y en veterinaria, así como de las áreas de microbiología de aguas, industrial y de alimentos

Los artículos enviados a la RCMQCCR deben cumplir con las siguientes normas de acuerdo a las recomendaciones del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas ([www.icmje.org/recommendations/](http://www.icmje.org/recommendations/)) y de las características editoriales para revistas impresas del Catálogo Latindex ([www.latindex.com](http://www.latindex.com)).

Aceptará para su consideración trabajos que serán clasificados en categorías de acuerdo a su naturaleza como “trabajos de investigación”, “casos clínicos”, “aspectos legales de la profesión”, “artículos de educación continua”, “cartas al editor” y “artículos especiales”. Las revisiones bibliográficas serán solicitadas al autor por el editor de la revista. Las cartas al editor se publicarán de acuerdo al criterio del Editor Jefe.

El autor principal debe presentar una carta solicitando la revisión del artículo para su publicación. En la misma se debe consignar el nombre del artículo, el nombre del autor principal y coautores, título profesional y/o grado académico, el sitio o institución donde se realizó la investigación y su lugar de trabajo actual, el puesto profesional que ocupa en el momento del sometimiento, dirección electrónica y número de teléfono, el cual servirá de vínculo con la revista pero no será publicado en caso de ser aceptado el trabajo. Esta carta debe venir firmada por el autor y los coautores.

Al someter el original del artículo, el autor y los coautores asumen la responsabilidad de que el manuscrito no ha sido previamente publicado y que no está siendo analizado simultáneamente por otra revista. Todos los autores deben firmar la Declaración de Responsabilidad y Conflicto de Intereses, asumiendo formalmente la autoría del artículo y que, en el caso de trabajos de investigación, observacionales o descriptivos, cumple con los requisitos de la Ley Reguladora de Investigación Biomédica, Ley 9234 publicada en La Gaceta Nº 79 del 25 de Abril de 2014, y en caso necesario, con la Normativa para la aprobación de estudios observacionales en los Centros Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social. El texto completo de esta normativa se encuentra en la dirección <http://www.cendeiss.sa.cr/etica/MODIFICACION-Y-ADICIONNORMATIVA.PDF>. Este documento se enviará por correo electrónico después de haber presentado la solicitud de revisión del artículo y debe ser devuelto a las oficinas del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica. El mismo debe ser escaneado y enviado a la dirección [revistacmqc@gmail.com](mailto:revistacmqc@gmail.com).

Las opiniones, información y conclusiones emitidas en los artículos publicados, así como la veracidad de los resultados y citas bibliográficas, son responsabilidad exclusiva del autor y coautores.

Todos los artículos deben ser presentados en forma digital en formato de Word.doc, letra Times New Roman 12, interlineado a 2 líneas, justificado, a la dirección [revistacmqc@gmail.com](mailto:revistacmqc@gmail.com)

La extensión de los artículos no debe sobrepasar de cuatro páginas, excepto las revisiones bibliográficas que pueden ser de

seis páginas. Las cartas al editor no deben ser mayores de dos páginas. Las tablas, cuadros y fotografías deben presentarse correctamente identificados.

Los artículos de investigación deben presentarse respetando la siguiente estructura: Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión. Los artículos especiales, casos clínicos y otros, pueden adaptarse a otros formatos que serán aprobados por el Comité Editorial. Todos los artículos deben ir precedidos por un resumen en español e inglés de no más de 250 palabras y las palabras clave.

1. El título del artículo debe ser conciso pero informativo, y debe despertar el interés del lector. En el título no se debe emplear abreviaturas.
2. El resumen debe incluir el propósito de la investigación, el material y métodos, los resultados y las conclusiones más importantes. Las Cartas al Editor no llevan resumen ni palabras clave.
3. La Introducción debe resumir los antecedentes del estudio y explicar la hipótesis que se pretende analizar. Si usa abreviaturas debe explicar su significado la primera vez que las mencione.
4. Al describir el material y método, debe explicar correctamente los equipos empleados, métodos y reactivos usados en la investigación. En el caso de estudios con población humana, deben explicarse las características de la misma así como el procedimiento de la obtención del consentimiento informado para la participación en el estudio. La explicación detallada es fundamental para que los resultados puedan ser reproducibles por otro investigador.
5. Los resultados deben ser presentados de una forma cuidadosa y congruente con el texto escrito. Se puede usar gráficos, cuadros o fotografías para explicarlos.
6. La discusión debe ser referida al trabajo realizado, destacando los hallazgos encontrados y comparándolos con otros estudios revisados.
7. Si se incluyen conclusiones, estas deben ser breves y precisas.
8. Las referencias se citarán siguiendo el formato de normas APA American Psychological Association, [www.normasapa.com](http://www.normasapa.com)

El Comité Editorial se reserva el derecho de aceptar, solicitar modificaciones o rechazar los artículos sometidos a su consideración y su fallo es inapelable.

Los artículos aceptados serán enviados de forma anónima a dos revisores especialistas en el tema, quienes, si es del caso, harán las sugerencias necesarias para que se corrija y se publique. El mismo será devuelto al autor principal y se volverá a someter a revisión.

La revista garantiza la confidencialidad en el proceso de revisión de los artículos y contará con un plazo máximo de 60 días para dar su veredicto.

Los artículos aceptados para su publicación, pasarán a ser propiedad intelectual de la revista. Los artículos rechazados se destruyen y no se conservará copia de los mismos. 

## Próximos eventos



### The 10th International Society for Apheresis Congress (ISFA 2015)

13 al 16 de mayo de 2015

Cancún, México

• [www.ifsacongress.com](http://www.ifsacongress.com)

### XIX Congreso Nacional EIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica,

28 al 30 de Mayo de 2015,

Sevilla España

• [www.seimc2015.org](http://www.seimc2015.org)

### 115th General Meeting American Society for Microbiology,

30 de Mayo al 2 de Junio de 2015,

New Orleans, Louisiana, USA

• [www.asm.org](http://www.asm.org)

### Simpósio Internacional de Epidemiologia Molecular de Hepatitis B y C en Latinoamérica

8 al 10 de junio de 2015

Buenos Aires, Argentina

• [www.aam.org.ar](http://www.aam.org.ar)

### XII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical

12 al 14 de Junio de 2015.

Bavaro, República Dominicana

• [www.congreso-acacpmt2015.weebly.com](http://www.congreso-acacpmt2015.weebly.com)

### ISTH 2015 Congress International Society on Thrombosis and Haemostasis

20 al 25 de Junio de 2015,

Toronto Canadá

• [www.isth.org](http://www.isth.org)

### EuroMedLab Paris 2015, 21 IFCC-EFLMEuropean Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

21 a 25 de junio de 2015,

Paris, Francia • [www.paris2015.org](http://www.paris2015.org)

### XI Congreso Argentino de Virología, II Congreso Latinoamericano de Virología

23 al 26 de Junio de 2015, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

• <http://www.cav2015.com.ar/>

### 2015 AACC American Association of Clinical Chemistry Annual Meeting & Clinical Lab Expo

26 al 30 de Julio de 2015,

Atlanta Georgia, USA

• [www.aacc.org](http://www.aacc.org)

### XIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Alergia, Asma e Inmunología,

19 al 21 de Agosto de 2015,

Ciudad de Panamá

• [www.congreso-2015.jindo.com](http://www.congreso-2015.jindo.com)

### XXIV Congreso Internacional del Grupo CLAHT 27 al 29 de Agosto de 2015

Sao Paulo, Brasil

• [www.claht2015.com](http://www.claht2015.com)

### XXII Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica y Ciencias de Laboratorio Colabiobli 2015,

24 al 26 de setiembre de 2015,

Quito, Ecuador

• [www.sebiocli-ec.org](http://www.sebiocli-ec.org)

### 28º Congreso Brasileiro de Microbiología, 18 al 22 de Octubre de 2015, Florianópolis,

Santa Catarina, Brasil

• <http://www.sbmicrobiologia.org.br/>

### XXII Congreso Argentino de Hematología II Simposio conjunto Asociación Hematológica Europea (EHA),

28 de Octubre a 1 de Noviembre de 2015,

Mar del Plata, Argentina

• [www.sah.org.ar](http://www.sah.org.ar)

## Junta Directiva del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos 2015– 2016



De izquierda a derecha: Dr. Dennis León, Dra. Joselyn Quirós, Dra. Ana Cristina Monge, Dra. Carolina Loría, Dra. Lidiette Salazar, Dra. Laura Hernández, Dr. Rolando Leiva.

**E**l día sábado 14 de marzo se llevó a cabo la Asamblea General Ordinaria del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, en la que se juramentó la **Junta Directiva** para el período 2015 – 2016, la cual quedó integrada por los siguientes miembros:

Presidenta: Dra. Lidiette Salazar Palma.  
Secretaria: Dra. Ana Cristina Monge Montero.  
Tesorera: Dra. Carolina Loría Acosta.  
Fiscal: Dr. Dennis León Alán.  
Vocal I: Dra. Joselyn Quirós Montero.  
Vocal II: Dra. Laura Hernández Alvarado.  
Vocal III: Dr. Rolando Leiva Escalante.

También durante esta asamblea se eligió a los nuevos miembros del **Tribunal de Honor**. Este quedó formado por:

Dr. Dennis León Alán, Presidente.  
Dra. Pilar Salas.  
Dra. Berta Valverde.  
Dra. Sileny Luna.  
Dr. Marco Rodríguez.  
Dr. Alejandro Quesada Carboni.  
Dra. Guiselle Bartels, suplente.  
Dr. Walter Cartín, suplente

# EL ANALIZADOR HEMATOLÓGICO

**\$5.000**

- Diferenciación de tres poblaciones de WBC, 19 parámetros y tres histogramas
- Dos modos de recuento: sangre completa y prediluida
- Volumen de muestra: 20 ul
- Rendimiento: 30 muestras por hora
- Funciones automáticas de desobstrucción y de recuento
- Almacenamiento de hasta 10.000 resultados de muestras (incluidos los histogramas)
- Gran pantalla LCD en color



**Cuotas desde \$225 al mes**

Prima de 50% y 12 pagos mensuales por un año.



**MAGLUMI 600**

## QUIMIOLUMINISCENCIA A SU ALCANCE

**Cuotas desde \$398 al mes**

- Resultados en 17 minutos
- Menú de 104 pruebas disponibles
- Cartuchos integrados (reactivos, calibradores y controles)
- Tubo primario



**mindray**  
healthcare within reach



Tel. (506) 2272-3700  
(506) 2272-0460  
info@biocientifica.net



# NOBILIS

El software de gestión para laboratorios de Wiener lab.



## CONECTIVIDAD

Analizadores WL y otras marcas  
Integración con sistemas Hospitalarios



IN VITRO DIAGNOSTICS CENTROAMERICANA S.A.

Pavas-Rohrmoser de la Embajada Americana,  
550 mts. Norte. Edificio # 17  
Apdo.612-1005 B<sup>o</sup> México, San José-Costa Rica  
Tel: (506) 2231-3270 . Fax: 2231-2949

[www.wiener-lab.co.cr](http://www.wiener-lab.co.cr)  
[wiener.lab@racsa.co.cr](mailto:wiener.lab@racsa.co.cr)



Haciendo  
**posible**  
EL FUTURO 