



## El laboratorio práctico

- **Etapa crítica de la hemostasia: Procedimientos preanalíticos**

Pag. 5

## Artículos de investigación

- **Evaluación de un nuevo Elisa para la detección de anticuerpos contra el virus HTLV**

Pag. 6

## Novedades y Agenda

- Hallazgos de un estudio soportan la posición de la necesidad de seguimiento sobre posible infección por HCV en individuos HIV positivos.
- Niveles de glucosa sérica para predecir mortalidad intrahospitalaria en individuos de edad avanzada.

Pag. 8

## Revisiones

### Diabetes Mellitus Tipo II y Aterosclerosis

Dr. Enzo E, Peralta (\*)

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), ha sido catalogada como la epidemia del siglo XXI, tanto por su creciente magnitud, como por su impacto en la enfermedad cardiovascular (ECV). La prevalencia mundial en el año 2000 fue de 170.000.000 de casos y proyecciones sobre ésta enfermedad estiman para el año 2025, la duplicación de los casos (340.000.000).

En América Latina, según datos de la OPS hay 18.000.000 de personas con DMT2, representando el 6,3% de la población adulta. En Argentina, se estima que el 8% de la población es diabética, aproximadamente 3.050.000 casos, de los cuales solo el 50% están diagnosticados.

Entre el 75 y 85%, de las muertes en pacientes diabéticos se dá por ECV.

El factor que determina el incremento del riesgo para enfermedad cardiovascular es el proceso aterogénico, caracterizado por cambios en el endotelio vascular, en la formación de placas grasas, en la inestabilidad de esas placas y en la obstrucción del flujo sanguíneo. Los factores que contribuyan a alguno de estos procesos, son considerados factores de riesgo para ECV. Dentro de éstos, existen los llamados factores de riesgo clásicos, que incluyen los no modificables como: edad, sexo, etnia e historia familiar, y los denominados modificables como: hipertensión, dislipidemia, tabaquismo, sedentarismo, sobrepeso/obesidad, dieta inadecuada, inflamación,

hipercoagulabilidad, diabetes. También existen los factores de riesgo denominados emergentes, como la hiperhomocisteinemia, la microalbuminuria, la cistatina C (estas últimas relacionados con la disminución del filtrado glomerular y enfermedad renal crónica) y también los factores genéticos.

La DMT2, constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis. Su sólo presencia aumenta el riesgo de eventos cardiovasculares en la misma magnitud que en pacientes que ya han tenido un evento cardiovascular, por lo que es considerada un factor de riesgo coronario por el ATPIII. Diversas alteraciones metabólicas propias de la DMT2 están involucradas en forma directa o indirecta en la lesión de los grandes vasos. Entre estos trastornos deben mencionarse la hiperglicemia, y la hiperinsulinemia por su efecto lipogénico y estimulante de la proliferación de células musculares lisas arteriales. Así, en la DMT2 las alteraciones metabólicas resultantes de la insulinoresistencia tales como la dislipidemia, la hipertensión, la inflamación sistémica y un estado protrombótico, contribuyen a aumentar riesgo de ECV.

Por todo esto, la ADA ha definido a la DMT2 como una **"Enfermedad cardiovascular de origen metabólico, donde la hiperglicemia es la característica bioquímica predominante"**.

El evento patogénico clave que determina que una arteria normal se desvíe hacia un camino metabólico aterogénico es la retención extracelular de lipoproteínas ricas en colesterol en el espacio subendotelial de la pared arterial. Una vez retenidas, dichas lipoproteínas sufren una serie de modificaciones principalmente oxidativas que generan productos biológicamente activos que determinan su potencial aterogénico.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria, crónica y evolutiva que comienza a edades muy tempranas de la vida. El valor promedio de colesterol en un neonato es de 60 mg/dl, mientras que para un adulto mayor de 50 años, el promedio es de 220 – 230 mg/dl., un 85% de los mayores de 50 años tiene placas de ateroma. Actualmente se considera que el término aterosclerosis, debería ser reemplazado por el término Ateroscleritis, (atero: papilas, sclerosis: endurecimiento e itis: inflamación), ya que hoy se sabe que este proceso patológico es una forma específica de proceso inflamatorio de carácter crónico resultante de la interacción entre lipoproteínas plasmáticas (partículas con dominio APO B), componentes celulares (monocitos/macrófagos, linfocitos T, células endoteliales, células musculares lisas) y la matriz extracelular de la pared arterial.

A continuación se analizarán las distintas

fases y los mecanismos de la inflamación, que intervienen en el proceso patológico relacionado con la lesión aterosclerótica.

**Disfunción endotelial:** la acumulación de LDL en la íntima arterial es uno de los primeros eventos. Esta acumulación se ve favorecida por la hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, diabetes, etc., que incrementan la penetración, retención y oxidación de las LDL en la íntima arterial. Las LDL oxidadas inducen una alteración endotelial que consiste principalmente en la interrupción de la producción de óxido nítrico (ON) y la muerte apoptótica de células endoteliales. La producción normal de ON se origina en el endotelio como respuesta a factores neurohumorales y dependientes del flujo sanguíneo. Este óxido nítrico es responsable de mantener la homeostasis del endotelio vascular, a través de sus propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas, y debido, también, a sus características de inhibidor de la agregación plaquetaria, su actividad vasodilatadora, y su función antiinflamatoria. Además impide la expresión de receptores de adhesividad celular en la superficie endotelial y dificulta el paso de células inflamatorias circulantes a través del propio endotelio. Cuando disminuye la producción de ON aumenta la adhesividad, la migración celular a través del endotelio y se facilita la aparición de "huecos" en la superficie interna vascular a causa de la apoptosis de las células endoteliales. Las plaquetas que se adhieren alrededor de la lesión endotelial liberan factor de crecimiento (PDGF), que intenta reparar el daño causado. El endotelio disfuncionante induce la aparición de moléculas de adhesión en su superficie. La aparición de Selectinas E y P, favorecen la adhesión primera de los monocitos a su superficie y la presencia de las moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y adhesión intercelular-1 (ICAM-1), median en el proceso de adhesión firme y la trans migración de los monocitos a través del endotelio.

El endotelio produce, a su vez: la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1) atrae monocitos a la pared dañada y el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) los dota funcionalmente. Se produce entonces la diferenciación de monocitos en macrófagos, que al internalizar las LDL oxidadas se transforman en células espumosas, cargadas de lípidos, y factor nuclear Kapa-Beta (NF-KB), implicado en la transcripción de un importante número de genes funcionales en el proce-

so inflamatorio.

**Producción de Citoquinas:** como consecuencia de la presencia subendotelial los macrófagos y de moléculas como el NF-KB, estimuladoras de la transcripción de genes implicados en la producción de sustancias pro-inflamatorias, se producen potentes citoquinas en las paredes arteriales. Entre ellas la interleuquina 1b (IL-1b), y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), que amplifican los fenómenos inflamatorios locales, activando a otras células, como linfocitos, que generan la IL-6. El efecto conjunto es la estimulación de la respuesta inmune local y la manifestación de efectos a distancia, como la producción de proteínas de fase aguda en el hígado, fundamentalmente proteína C reactiva. Tanto el TNF alfa como las IL-6 e IL-1b son potentes inductores de NF-KB, con lo que se cierra el círculo de lesión inflamatoria automantenida.

Las macrófagos activados producen además unas enzimas conocidas como metaloproteinasas (MMP), que destruyen la matriz extracelular del tejido conectivo, y al disminuir la cantidad de colágeno, hacen a la placa de ateroma más frágil, con la consiguiente aparición de la clínica isquémica.

Por otra parte, en el proceso de formación de la placa aterosclerótica, hay proliferación de tejido fibroso. A medida que crece la placa aterosclerótica, hace profusión hacia la luz de la arteria y se va estrechando la luz de la misma (angina estable). En algún momento, posiblemente por acen-

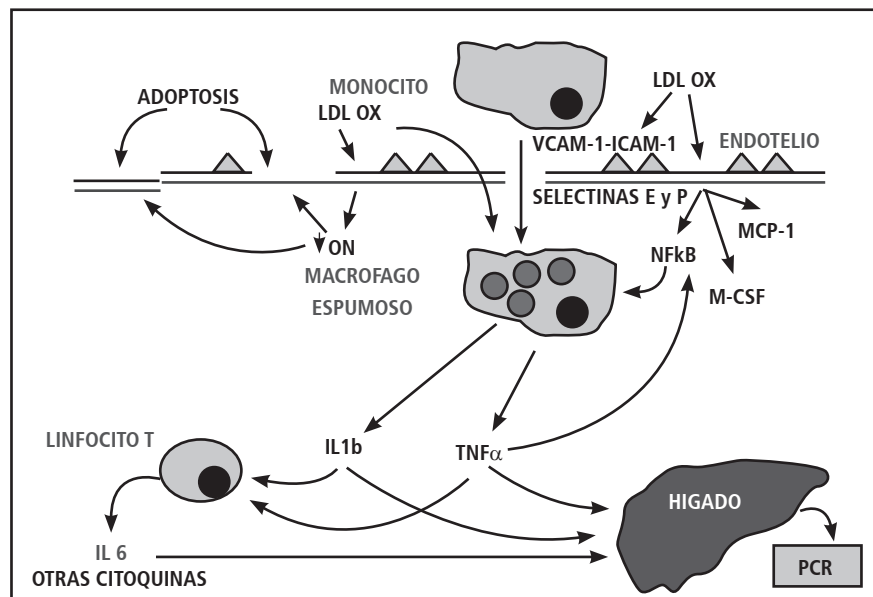
tuación del proceso inflamatorio, o probablemente por acción de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas A2 (FLA2-LP) se produce una inestabilidad de la placa que finalmente llega a la ruptura del endotelio y liberación de factores inductores de la coagulación presentes en el subendotelio, como fibras de colágeno (angina inestable). La ruptura de la placa atrae plaquetas que forman el denominado coágulo blanco. Rápidamente, la agregación de las plaquetas precipita la activación de la cascada de la coagulación y la incorporación de glóbulos rojos, formándose entonces el trombo conocido como trombo ocluyente o coágulo rojo. Este al desprenderse y dependiendo del tamaño de las arterias puede producir la oclusión completa de la misma, lo que conduce a la isquemia del área y por ende el infarto. Cuando se afectan las arterias coronarias estamos en presencia de un infarto de miocardio.

La fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (FLA2-LP), también conocida como Acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, es una serina lipasa, perteneciente a la superfamilia de las fosfolipasas A2. El 80% circula unida al LDL-C, con cuyos niveles plasmáticos se correlaciona positivamente. La FLA2-LP, es producida por los macrófagos y se expresa en mayores concentraciones en las lesiones ateroscleróticas.

Existe evidencia que sugiere que la oxidación de las LDL, constituye un paso crítico en el desarrollo y progresión de la

Figura 1

Producción de los principales marcadores y moléculas involucradas en la fisiopatología del proceso inflamatorio



aterosclerosis. La FLA2-LP, juega un papel importante en la modificación de las LDL oxidadas, ya que su función es hidrolizar los fosfolípidos unidos al colesterol, generando lisofosfatidilcolina y ácidos grasos libres. Estos, además de ser productos pro-inflamatorios, que contribuyen a la formación de la placa aterosclerótica, tienen un rol fundamental en la desestabilización de la misma. En la actualidad se están desarrollando protocolos con fármacos que inhiben la acción de esta Fosfolipasa. La figura 1 esquematiza los procesos descriptos.

La figura 2 muestra los principales factores de riesgo para ECV, y la relación de los mismos en los pacientes diabéticos, debido a las alteraciones metabólicas propias de esta patología.

### Factores de riesgos para ECV, potenciados en pacientes diabéticos

#### Edad / Sexo / Historia familiar:

- **Sexo**, el riesgo en el hombre es mayor que en la mujer (efecto cardio-protector de los estrógenos). En mujeres diabéticas el riesgo se equipara al del hombre.
- **Edad**, - Hombre > 45 años.

- Mujer > 55 años (o menopausia)

- **Historia Familiar**: ECV en familiar de primer grado antes de los 60 años.

**Dieta inadecuada**: se ha comprobado que el consumo de ácidos grasos TRANS, eleva los niveles de LDL, reduce los niveles de HDL, aumentando también los niveles sanguíneos de triglicéridos, reduciendo el tamaño de las partículas de LDL, haciéndolas más aterogénicas. Estudios recientes han demostrado asociación entre consumo de ácidos grasos trans y activación de la respuesta inflamatoria sistémica, incluyendo aumento sustancial de IL-6, TNFalfa y PCR, que aumentan el riesgo de ECV.

**Hipertensión arterial**: Se considera factor de riesgo para ECV:

- Paciente No Diabético:

- presión arterial sistólica  $\geq 140$  mm Hg.

- presión arterial diastólica  $\geq 90$  mm Hg.

- Paciente Diabético:

- presión arterial sistólica  $\geq 130$  mm Hg.

- presión arterial diastólica  $\geq 80$  mm Hg.

**Sobrepeso / Obesidad**: Se considera factor de riesgo para ECV:

- Diámetro de Cintura:

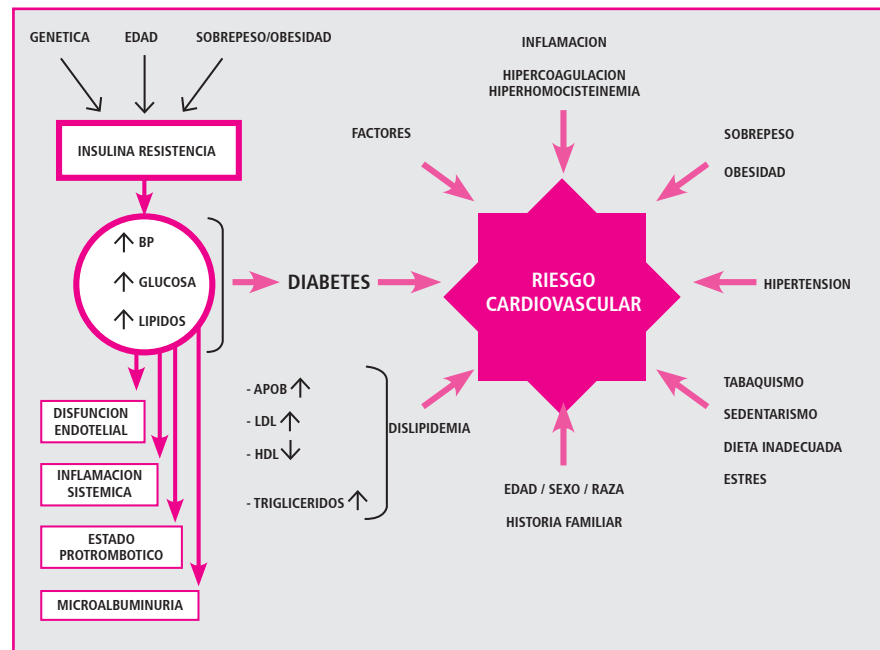
- Hombre  $\geq 102$  cm

- Mujer  $\geq 80$  cm.

- Obesidad según el % de Tejido Adiposo:

- Hombre  $\geq 25\%$  del peso corporal.

Figura 2



Mujer  $\geq 30\%$  del peso corporal.-

- Índice de masa Corporal (IMC): Sobrepeso:  $IMC \geq 25$  Kg/m<sup>2</sup>.

- Obesidad:  $IMC \geq 30$  Kg/m<sup>2</sup>.

**Inflamación**: múltiples factores se han considerado pronosticadores de riesgo de ECV, entre ellos, el más antiguo es la hipercolesterolemia, y los más recientes son los marcadores de inflamación, como conteo de neutrófilos, citoquinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión celular, velocidad de sedimentación globular y reactantes de fase aguda como: fibrinógeno, amiloide A sérico y proteína C reactiva, por ser indicadores potenciales de la inflamación asociada a aterogénesis y a sus complicaciones. Al comparar estos diferentes marcadores de inflamación, desde el punto de vista químico y epidemiológico se observa que la PCR ultrasensible (PCRus), es el más útil en la actualidad y se utiliza en la práctica clínica como pronosticador de riesgo cardiovascular.

PCRus: sensibilidad: 0,1 mg/L (0.01 mg/dl).

V.R.: < 1.0 mg/L  $\rightarrow$  bajo riesgo de eventos cardiovasculares.

(1.0 – 3.0) mg/L  $\rightarrow$  mediano riesgo de eventos cardiovasculares.

> 3.0 mg/L  $\rightarrow$  alto riesgo de eventos cardiovasculares.

> 10 mg/L  $\rightarrow$  considerar la presencia de otros procesos inflamatorios.

**Homocisteinemia**: La homocisteina es un alfa-aminoácido que se forma como intermediario en el metabolismo de la metionina, aminoácido esencial aportado

por las proteínas de la dieta. El metabolismo de la homocisteina depende fundamentalmente de las concentraciones de Ac. Fólico, de Vitamina B12 y B6. Una alteración en alguna vía de ese metabolismo puede conducir a la acumulación de homocisteina en plasma, constituyendo un factor de riesgo independiente para ECV. Este efecto se potencia cuando coexisten otros factores de riesgo tradicionales, entre ellos diabetes. Las causas de hiperhomocisteinemia son: ingesta elevada de proteínas, déficit de ácido Fólico y/o Vitamina B6 y/o B12 y deficiencia congénita de MTHFR (Metiltetrahidrofolato Reductasa).

Los niveles elevados de homocisteina, están asociados a una mayor incidencia de desarrollo de aterosclerosis y trombosis, ya que la homocisteina autooxidada genera:

- Procesos aterogénicos: peroxidación lipídica, daño de la matriz vascular y proliferación de células del músculo liso.

- Procesos trombogénicos: injuria endotelial, daño en la regulación vasomotora y superficie protrombótica.

Se consideran valores de referencia:

- Valor Deseable: < 9 umol/L.

- Valor Normal: < 12 umol/L.

**Factores genéticos**: además de los factores de riesgo convencionales para ECV, se pueden asociar componentes genéticos de riesgo. Tanto la ECV como la DMT2, son enfermedades poligénicas multifactoriales, que aparecen como consecuencia de una compleja combinación de alteraciones de múltiples genes y de factores am-

bientales. Una vez conocida la frecuencia de aparición de un alelo genético en una determinada población con ECV, se compara su frecuencia en la población sana. Si el alelo en cuestión es significativamente más frecuente en el grupo con ECV, se está ante un marcador genético, que se considera factor de riesgo de ECV.

La presencia de este marcador, junto con la presencia de un marco ambiental propicio, facilita la aparición y desarrollo de la enfermedad. Los polimorfismos son variaciones genéticas provocadas por mutaciones que resultan de un cambio en la secuencia de ADN. Varios polimorfismos tales como los de la Apolipoproteína E (apoE), Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), Oxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) y Paraoxonasa (PON), están todos asociados a ECV.

**apoE:** Es una glicoproteína componente de las lipoproteínas que interviene en el catabolismo de las proteínas transportadoras de triglicéridos y en la homeostasis del colesterol.

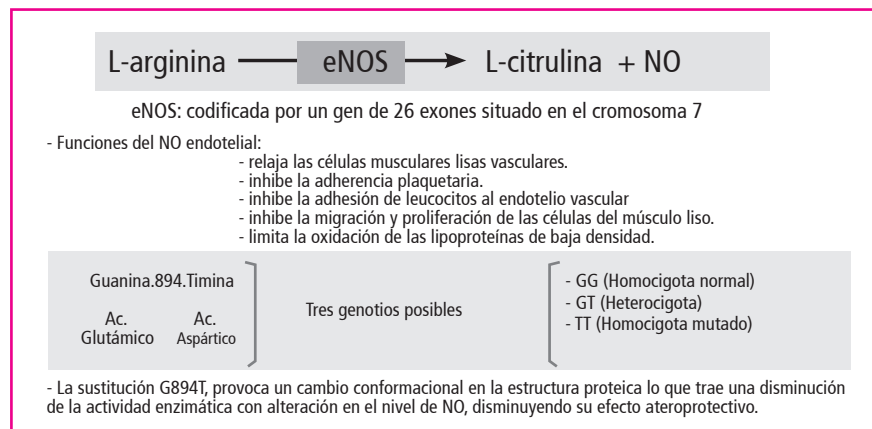
El Gen de la apoE es polimorfo, se localiza en el cromosoma 29. Existen tres isoformas, como resultado de la sustitución de un solo aminoácido en la estructura proteica producida por tres alelos: e2, e3, e4.

Los distintos alelos de la apoE se heredan en forma mendeliana codominante dando origen a 6 distintos genotipos, E2/E2, E3/E2, E3/E3, E4/E2, E4/E3 y E4/E4.

La presencia de los alelos e2 y e4 afectan negativamente en el metabolismo de las lipoproteínas por lo que se asocian a ECV. Los portadores de este alelo E4, tienen un riesgo coronario 40% superior al de los alelos E3 o E2, y una mayor tasa de infarto de miocardio.

**MTHFR:** La enzima metiltetrahidrofolato reductasa, tiene un rol central en el ciclo del ácido fólico y contribuye al metabolismo del aminoácido homocisteína. Cataliza la reducción de 5,10-metiltetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, generando así la forma activa de folato, requerida para la remetilación de homocisteína a metionina. La deficiencia de MTHFR, esta asociada a un incremento de homocisteína en plasma la cual esta asociada con un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular. La sustitución C677T, da origen a tres genotipos posibles, y provoca un cambio conformacional en la proteína que se traduce en una disminución de la actividad enzimática con niveles de

Figura 3



homocisteína elevados para concentraciones de folato reducidas. El cambio en la secuencia del gen produce una variante que mantiene tan sólo el 50% de actividad. El genotipo homocigoto para esta variante está asociado a la probabilidad de desarrollar ECV, con una predisposición tres veces superior a los no portadores. Esta susceptibilidad se incrementa si el paciente padece DMT2.

**eNOS:** El Oxido Nítrico (ON), se sintetiza a partir de L-arginina y Oxígeno molecular, en la célula endotelial, por la Oxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS). EL ON formado cumple varias funciones en la homeostasis del endotelio vascular, constituyendo uno de los principales componentes ateroprotectores, más allá de su efecto sobre el tono vascular y la presión arterial. En la posición 894, una mutación puntual provoca la sustitución de una guanina (G), por una timina (T), que resulta en la sustitución de un ácido glutámico, por un ácido aspártico en la proteína. Esto da origen a tres genotipos posibles: homocigota normal, heterocigota y homocigota mutado. El cambio conformacional en la estructura proteica, trae una disminución de la actividad enzimática, con alteración en el nivel de ON, disminuyendo su efecto ateroprotectivo. Figura 3

**Paraoxonasas:** Las Paraoxonasas (PON), son proteínas asociadas a HDL, con propiedades antioxidantes, que intervienen en la prevención de la peroxidación de los lípidos de las LDL, y en la destrucción de las moléculas pro-inflamatorias producidas por la oxidación de las LDL. Como estas modificaciones oxidativas de las LDL se dan en las paredes endoteliales de las arterias, estas enzimas intervienen en la patogénesis de la aterosclerosis, como factor protector. Los polimorfismos PON1 55, PON1 192 y Pon2 311, producirían

cambios conformacionales en la estructura de la proteína, que modificarían las propiedades enzimáticas, transformándose en factores determinantes de la predisposición a desarrollar complicaciones de la DMT2, como ECV. ■

**Próximo Número: Diabetes Mellitus Tipo II y Aterosclerosis - Parte II - Dislipidemias**

**Bibliografía:**

- 1- American Heart Association - Heart Disease and Stroke Statistics– American Stroke Association. (2008).
- 2- Philip Barter. European Heart Journal Supplements (2005), F4-F8.
- 3- Anatol Kontush y cols. Pharmacol Rev 58: (2006).
- 4- Palma Gámiz JL., y cols. Rev Esp Cardiol Supl. 2004; 4: F6-13.-20.
- 5- American Diabetes Association. Report of the Expert Comité On The Diagnosis And Classification Of Diabetes mellitus. Diabetes Care, (2001); 24: s5-20.
- 6- Rafael Carmena (2008). Rev Esp Cardiol Supl (2008); 8: 19c-26c.
- 7- Factores genéticos en enfermedad cardiovascular. Estudio descriptivo en dos poblaciones de Rosario-Argentina. Gerrard, G.; Ensínck, M.; Lioi, S. ; Zumoffen, C.; Corbera, M.; Turco, M. ; Beloscar, J.; D'Arrigo, M.

(\*) Director Técnico del Instituto de Bioquímica Clínica y Laboratorio Central del Hospital Italiano de Rosario.  
-Director del Departamento de Endocrinología del Instituto de Bioquímica Clínica y Laboratorio Central del Hospital Italiano de Rosario-  
-Miembro de la Sociedad de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición de Rosario.  
-Profesor adjunto de la Cátedra de Química Biológica, del Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR).  
Tel-Fax: 4405772 - 4219127  
e-mail: ibclab@ibcrosario.com.ar

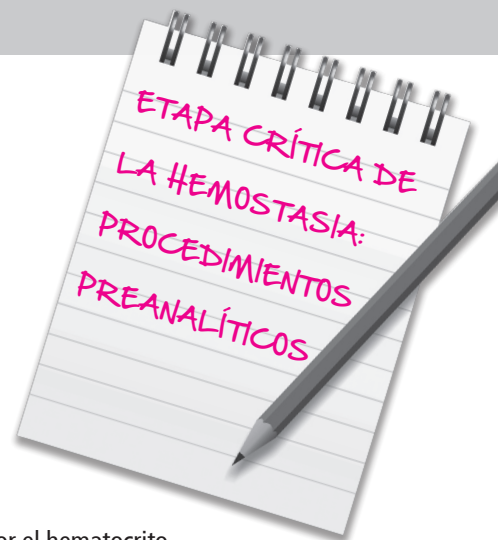
# Etapa crítica de la hemostasia: Procedimientos preanalíticos

El sistema hemostático presenta una gran **variación** desde la venopuntura hasta el análisis, dichos cambios generan la necesidad de **estandarizar** todo el procedimiento preanalítico.

### Requerimientos para el paciente

Es aconsejable que concurra al servicio:

- En ayunas de lácteos y grasas, ya que los plasmas y sueros lipémicos son una de las interferencias reconocidas en los coagulómetros que utilizan sistemas ópticos de detección y por ende los resultados no son confiables.
- Luego que el paciente haya descansado al menos 30 min para evitar las variaciones por el hematocrito y el efecto de la activación del endotelio.
- Las muestras para el estudio del sistema fibrinolítico deben tomarse entre las 8 y las 10 a.m. Debido al ritmo circadiano que muestran el t-PA y el PAI.



### Identificación del paciente

Es importante poseer un formato de petición específico, y asegurarse de un correcto ingreso del pedido en caso de disponer de códigos de barras.

### Toma de la muestra

- Muestra ideal: Sangre venosa. Pues ciertamente sería un error hacer un diagnóstico firme de un trastorno hemorrágico congénito, tal como la hemofilia, a menos que se pueda obtener una muestra satisfactoria de sangre venosa.
- En niños y recién nacidos: por lo gral. solo puede obtenerse sangre capilar, de ésta puede realizarse: recuento de plaquetas, microhematocrito, extensiones de sangre y, con el plasma citratado, TP, factores VIII y IX, y estimación semicuantitativa de Fibrinógeno. La sangre obtenida de una punción de talón o dedo debe manar libremente y en abundancia.
- En lo posible no deben utilizarse muestras extraídas de catéter por la probabilidad de contaminación con heparina.
- La utilización de la cánula butterfly no es aconsejable, en caso de no tener otra opción utilizar una de calibre grande. Un calibre mayor evita la posible activación del sistema por contacto.
- La punción debe ser "limpia" y la aguja no debe moverse excesivamente para no remover tejidos subendoteliales que actuarían como una tromboplastina. A su vez, una punción difícil eleva la posibilidad de obtener muestras hemolizadas que interfieren con los sistemas ópticos de detección.

### Procesamiento de la muestra

- Los tubos destinados a las pruebas de coagulación deben llenarse antes que los destinados a otras pruebas. De esta manera se evita que se coagule la muestra antes de poder cargar el tubo para coagulación y, por otro lado, también se evita el contacto de la jeringa con los anticoagulantes de los otros tubos a cargar.
- El anticoagulante es el citrato de sodio. El National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y el comité de expertos de la ISTH recomiendan la utilización de citrato trisódico dihidratado a una concentración de 0.105 o 0.109 mol/l. El European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS) recomienda la utilización a una concentración entre 0.100 a 0.120 mol/l.
- Para evitar activación del sistema, al colocar la sangre se debe dejar resbalar por las paredes del tubo, evitando hacer espuma y debe invertirse al menos 5 veces tratando de no hacer burbujas.
- La proporción sangre: anticoagulante debe ser 9:1 (4.5ml sangre+0.5ml citrato). En caso de extracciones escasas, disponer de tubos preparados con la mitad de anticoagulante, esto permitirá poder realizar la determinación a pesar de la poca cantidad de muestra.

#### Rechazar aquellos tubos que:

Contengan menos de 90 % de la sangre requerida, se pueden producir alargamientos de los tiempos.

Estén llenados por exceso (proporción > 12:1), se podría producir activación del sistema.

#### • Hematocrito del paciente

La proporción sangre: anticoagulante es diferente en enfermos hemoconcentrados (los recién nacidos y pacientes con efisema pulmonar), como también los es en los hemodiluidos (embarazadas). Por lo tanto, para hematocritos que varían entre 25 a 55 % no hay que modificar la proporción de citrato de sodio. Si el hematocrito es mayor que 55% o menor que 25 % se debe corregir la proporción sangre: anticoagulante, de acuerdo a la Tabla 1.

### Centrifugación y almacenamiento

- Para pruebas cuyos reactivos contienen un exceso de fosfolípidos como el TP o el KPTT: centrifugar a 1.000 g durante 10 minutos.
- Para la determinación del factor VIII : centrifugar a 2.500 g durante 15 minutos.
- Los tubos destinados a la investigación del anticoagulante lúpico y la mezcla de plasmas normales destinada a esta misma

## El laboratorio práctico

prueba: doble centrifugación a 3.000 g durante 30 minutos.

- Si las muestras van a ser congeladas es recomendable una doble centrifugación.

- **Estabilidad:**

Entre la obtención de las muestras y la realización de las pruebas:

2 horas a 22-24 °C (TA)

4 horas a 4 °C

2 semanas a -20 °C

6 meses a -70 °C.

- Las muestras deben descongelarse a 37°C y las determinaciones deben realizarse antes de las 2hs. No deben utilizarse muestras congeladas y descongeladas más de una vez.

- Actualmente se considera preferible la conservación a TA, especialmente para determinaciones de TP y del factor VII, con lo cual se evita la progresiva activación del factor VII.

- El tiempo de conservación, no debe ser superior a 2 horas para la determinación del factor VIII, pero se puede prolongar a 6 horas para el TP y el KPTT, siempre que el tubo se conserve tapado hasta su valoración analítica (incluido el tiempo de la centrifugación), para evitar la pérdida de CO<sub>2</sub> y la elevación del pH.

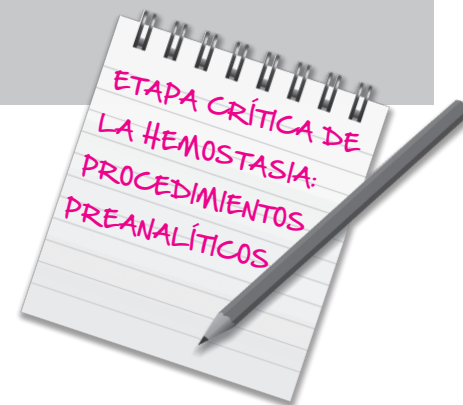


Tabla 1

Volumen de citrato de sodio de acuerdo al hematocrito		
Hematocrito %	Sangre (mL)	Citrato de Sodio (mL)
10	5	0.75
20	5	0.70
25-55	5	0.50
56	5	0.40
65	5	0.35
75	5	0.25

Bioq. Ma. Gabriela Alegre  
Marketing  
Wiener lab.

## Artículos de investigación

### Evaluación de un nuevo ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus HTLV

D.C. Zelus y M. Torruella.  
Centro de Investigación y Biotecnología, Wiener lab.

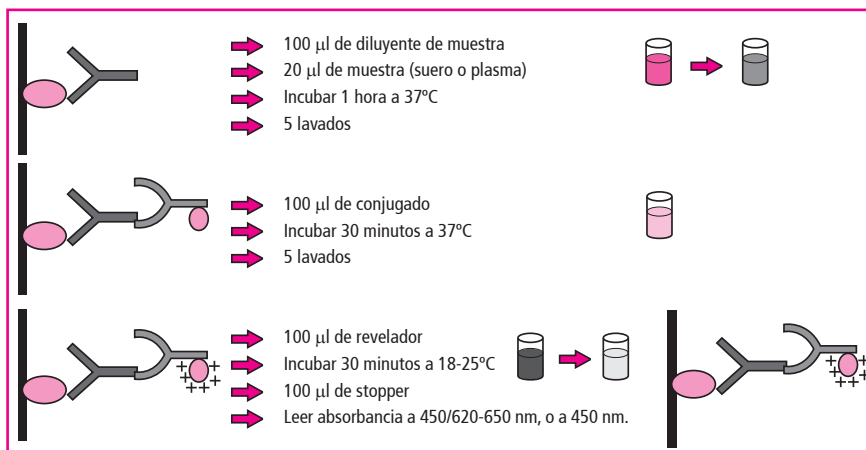
#### Introducción

Los virus linfotrópicos de células T humanas tipo HTLV pertenecen a la familia de los retrovirus, se dividen en dos tipos: HTLV-I y HTLV-II. Están asociados a enfermedades malignas de las células T y a procesos neurológicos degenerativos.

El virus linfotrófico T humano tipo I (HTLV-I) es el causante etiológico de dos tipos de patologías: la leucemia de células T del adulto (ATL) y la mielopatía asociada al HTLV-I o paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), además de haber sido asociado a uveítis, dermatitis seborreicas y otras afecciones del tejido conectivo. El HTLV-I es endémico en Japón, Caribe, África tropical, algunos países de América y Melanesia, mientras que el HTLV-II lo es en poblaciones de aborígenes americanos y tribus de África Central. El HTLV-II ha sido asociado a síndromes neurológicos similares a la HAM/TSP, aun cuando no se dispone de evidencias suficientes para confirmar ese rol etiológico. Ambos virus se transmiten por vías sexual, vertical (principalmente por leche materna) y sanguínea (hemo-componentes o por uso de drogas).

En Argentina, la presencia de HTLV-I/II se describió por primera vez en 1989 en

#### Técnica



Pocillos recubiertos con antígenos recombinantes y péptidos de los virus HTLV I y II.

Anticuerpos anti-HTLV + TMB

Anticuerpo a-IgG humana conjugado con peroxidasa

usuarios de drogas inyectables en la ciudad de Buenos Aires. Posteriormente fue detectada en otros grupos con factores de riesgo, localizados en la misma ciudad. En los años siguientes, se comprobó que el HTLV-II era endémico en grupos aislados de tobas y wichis de la región chaqueña. Para 1994, se había confirmado la presencia tanto de HTLV-I como de HTLV-II en donantes de sangre de la ciudad de Buenos

Aires con prevalencias similares a las de áreas no endémicas. Estos datos permitirían inferir que Argentina era un país no endémico para infección por HTLV-I/II, a excepción del HTLV-II en aislados grupos de aborígenes. Sin embargo, en 1998 se detectó la existencia de altas prevalencias de infección por HTLV-I en nativos y donantes de sangre en la Provincia de Jujuy, donde luego se ha encontrado un

Evaluación de un nuevo ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus HTLV

foco endémico de TSP/HAM y casos de ATL. A pesar del riesgo de transmisión por transfusión sanguínea, sólo en algunas provincias de nuestro país es obligatorio realizar tamizaje para este virus a los donantes de sangre.

Los primeros inmunoensayos para el diagnóstico de la infección por HTLV I y II usaban lisados virales. Posteriormente comenzaron a utilizarse antígenos recombinantes y/o péptidos sintéticos, solos o combinados con lisado. Además, se agregaron antígenos específicos para HTLV-II. Actualmente, el diagnóstico inicial de la infección por HTLV se basa en la detección de anticuerpos por inmunoensayos. Las muestras repetidamente reactivas son confirmadas por Western-Blot y/o nested-PCR.

**Objetivo**

Evaluar la performance de un nuevo kit inmunoenzimático desarrollado por Wiener lab. para la detección de anticuerpos contra los virus HTLV I y/o II.

**Materiales y métodos**

Los reactivos son coloreados para permitir el monitoreo de la adición de muestras y control de procesos.

**Reactivos**

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removibles y recortables con 96 pocillos recubiertos con antígenos recombinantes y péptidos de los virus HTLV I y II  
Diluyente de Muestra: buffer salino con tensioactivo.

Conjugado Concentrado: anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (10x).

Diluyente de Conjugado: buffer salino con proteínas.

Revelador: solución de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. Listo para usar.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Buffer de Lavado Concentrado: buffer salino con tensioactivo (25x).

Control Positivo: suero humano inactivado conteniendo anticuerpos contra HTLV I y/o II.

Control Negativo: suero humano no reactivo inactivado.

**Interpretación de los resultados**

Muestras Reactivas: aquellas con absorbancias mayores o iguales al Cut-off.

Cut-off = 0,170+ CN (promedio de las absorbancias del control negativo).

**Resultados**

**Sensibilidad**

En un estudio realizado en 124 muestras con infección por HTLV, confirmada por diferentes métodos, se encontraron reactivas con el kit Wiener lab. HTLV I+II ELISA recombinante la totalidad de las muestras.

En un estudio realizado una serie de paneles internacionales, el kit Wiener lab. HTLV I+II ELISA recombinante presentó los siguientes resultados:

Paneles*	Muestras	HTLV reactivas
PRP205(M)	18	17
PRP206	14	14
PRP207	14	14

\* Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel Modified, Seracare-BBI®, USA

**Especificidad**

Población **	Muestras	Especificidad
Consultorio externo	1052	99,80 %
Banco de sangre	301	99,33 %
Centros de salud	985	99,79 %
Total	2338	99,74 %
Interferentes ***	209	99 %

**Población\*\***

Muestras provenientes de individuos con diferentes condiciones clínicas que podrían ser causantes de reacciones inespecíficas para el ensayo HTLV 1+2 ELISA recombinante. Este grupo incluía muestras:

- con anticuerpos contra HBV, HCV, HIV y otros virus.
- con diferentes autoanticuerpos (AGA, AMA, ATA, factor reumatoideo y otros).
- con anticuerpos contra Treponema pallidum, Mycoplasma pneumoniae, Trypanosoma cruzi, y otros microorganismos.

**Sustancias interferentes conocidas\*\*\***

No se ha observado interferencia con muestras que contienen hasta 30 mg/dl de bilirrubina, 50 mg/dl de ácido ascórbico, 1500 mg/dl de triglicéridos o 300 mg/dl de hemoglobina.

**Precisión**

Se evaluó siguiendo el protocolo EP5-A (CLSI).

Se realizaron 2 ensayos diarios evaluando cada muestra por duplicado y durante el transcurso de 20 días, observándose en promedio un coeficiente de variación intraensayo menor al 5% y un interensayo promedio del 10% para muestras positivas débiles.

	Media de absorbancia	Intra-ensayo		Total	
		S	CV	S	CV
Control positivo	1,410	0,061	4,30 %	0,121	8,61 %
Control negativo	0,010	0,001	12,21 %	0,002	16,81 %
Muestra 1	1,068	0,045	4,23 %	0,107	10,05 %
Muestra 2	0,739	0,034	4,55 %	0,078	10,56 %
Muestra 3	0,477	0,022	4,52 %	0,051	10,69 %

S: desviación estándar, CV: coeficiente de variación  
n= 80

**Conclusiones**

HTLV I+II Elisa recombinante presenta:

- sensibilidad, especificidad y precisión adecuadas para el diagnóstico de la infección por HTLV I y II, y en el control de unidades de donantes en bancos de sangre.
- seguridad operativa y elevada robustez en su técnica, basado fundamentalmente en la calidad y coloración de los reactivos.

**Novedades**

**Hallazgos de un estudio soportan la posición de la necesidad de seguimiento sobre posible infección por HCV en individuos HIV positivos.**

Un análisis de la incidencia de infección por virus de hepatitis C en pacientes infectados con HIV participantes de un estudio terapéutico en USA mostró que 0.51 casos cada 100 personas al año, muestran seroconversión luego de haber tenido test anti HCV inicial negativo. El resultado sugiere que los individuos infectados con HIV y en riesgo de contraer infección por HCV deberían tener acceso a controles y seguimiento. Esto tiene importantes implicancias en la salud pública ya que hasta hace muy poco los investigadores consideraban que las infecciones por HCV precedían a las de HIV en la mayoría de los casos. Consecuentemente, según los autores, los servicios de salud pública de USA apoyaban las recomendaciones de determinación de anticuerpos anti HCV en el momento del diagnóstico de HIV y raramente se hacía una determinación posterior.

Los investigadores obtuvieron datos de un estudio longitudinal denominado ALLRT, llevado a cabo por el AIDS Clinical Trial Group (ACTG). Esta organización es la más importante relacionada con estudios clínicos acerca de HIV a nivel mundial. El ALLRT es un estudio prospectivo de individuos seropositivos para HIV-1 que fueron seleccionados aleatoriamente de los estudios realizados por el ACTG.

De los 1.830 hombres estudiados, los cuales tenían resultados inicialmente negativos para HCV al realizar una prueba posterior, 36 resultaron en seroconversión. Entre ellos, el 75% informó no haber utilizado drogas intravenosas. A pesar de que estos individuos pueden haber ocultado su real hábito respecto al uso de drogas, los autores sostienen que a la luz de la evidencia acumulada, la transmisión sexual es probablemente la causa de la infección por HCV en la población en estudio. El desarrollo de anticuerpos anti HCV no estaba relacionado con el estado inmune sino con una inadecuada supresión del HIV.

Los investigadores sostienen que es necesario llevar a cabo estudios posteriores para entender los comportamientos específicos asociados con la transmisión de HCV y los predictores de seroconversión para la infección por este virus.

**Niveles de glucosa sérica para predecir mortalidad intrahospitalaria en individuos de edad avanzada.**

Un estudio realizado sobre ancianos no diabéticos hospitalizados por enfermedades agudas mostró que la concentración de glucosa es un factor predictivo importante e independiente de la mortalidad hospitalaria y también está asociada con el tiempo de sobrevivida a la hospitalización. A pesar de que estudios anteriores han explorado la relación entre la hiperglicemia y la mortalidad hospitalaria, pocos han abordado la asociación en pacientes de edad avanzada. Según los autores, los hallazgos podrían ser de utilidad para colaborar en la identificación de pacientes en riesgo de vida durante la hospitalización, a fin de implementar los procedimientos terapéuticos que mejoren el pronóstico. El estudio incluyó pacientes hospitalizados con una edad promedio de 61 años, a quienes los investigadores categorizaron en 3 grupos basados en los niveles de glucosa sérica obtenidos en la mañana siguiente a la admisión seguida de una noche de ayuno. Los grupos se dividieron de la siguiente forma: Grupo 1, <126 mg/dL, Grupo 2, 126–180 mg/dL, y Grupo 3, >180 mg/dL. La cuarta parte de los pacientes tenían historia de diabetes, mientras que el 55.9% pertenecía al Grupo 1, 15% se encontraba en el Grupo 2, and 3.5% en el Grupo 3. Las tasas de mortalidad fueron del 8.4%, 18% y 32.1% en los Grupos 1, 2 y 3, respectivamente. El tiempo promedio de sobrevivida en el hospital disminuyó de 40.5 días en el Grupo 1 a 28.5 días en el Grupo 3.

**Agenda**

Del 9 al 11 de junio de 2011  
Santa Fe - Argentina

**Primer Congreso Bioquímico del Litoral**

Lugar: Centro Cultural Casa España - Santa Fe - Santa Fe

**Más información:**

[informes@congresolitoral2011.com.ar](mailto:informes@congresolitoral2011.com.ar)  
[www.congresolitoral2011.com.ar](http://www.congresolitoral2011.com.ar)

Del 7 al 9 de septiembre de 2011  
Rosario, Santa Fe, Argentina

**VI Congreso y 10° Encuentro Bioquímico**

Organizado por: Departamentos de Bioquímica Clínica y Microbiología (Áreas Clínicas) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.  
Lugar: Sede de gobierno de la UNR - Rosario - Santa Fe

**Más información:**

[encuentrobioquimico@gmail.com](mailto:encuentrobioquimico@gmail.com)

Del 7 al 10 de octubre de 2011  
San Salvador de Jujuy, Argentina

**CUBRA XI - Congreso Nacional Bioquímico**

Sede: Complejo José Hernandez - San Salvador de Jujuy - Jujuy

**Más información:**

<http://www.congresocubraxi.org.ar/>



**Boletín del Servicio Bibliográfico de Wiener Laboratorios S.A.I.C.**

Número 152 - Año XLV - Junio de 2011

Director: Gustavo A. Capriotti

Redactor: Centro de Investigación y Biotecnología (CIBIO) - Marketing

Editor Responsable: Wiener Laboratorios S.A.I.C.

[www.wiener-lab.com.ar](http://www.wiener-lab.com.ar)



**Wiener Laboratorios S.A.I.C.**

Riobamba 2944,

S2003GSD Rosario, Argentina

Tel.: +54 341 4329191/6

Moreno 1850, 2° piso,

C1094ABB Buenos Aires, Argentina

Tel.: +54 11 43754151/4

[marketing@wiener-lab.com.ar](mailto:marketing@wiener-lab.com.ar) - [www.wiener-lab.com.ar](http://www.wiener-lab.com.ar)