

III CONGRESO IBEROAMERICANO XIII CONGRESO NACIONAL DEL LABORATORIO CLÍNICO

LIBRO DE PONENCIAS Y COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

AEFA
IX CONGRESO NACIONAL



AE:M
LI CONGRESO NACIONAL



SEVILLA

13, 14 y 15 de Mayo de 2004

Hotel Alcora

SUMARIO

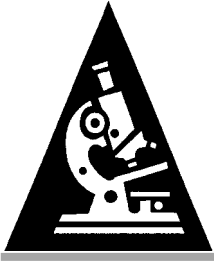
RESÚMENES DE LAS PONENCIAS

Mesa Redonda	El papel del laboratorio clínico en las enfermedades cardiovasculares <i>Dra. Teresa Casas Pina</i>	7
Conferencia	Técnicas de negociación y trato con proveedores <i>Dra. Belén Fernández Puntero</i>	8
Mesa Redonda	Nuevos enfoques en análisis de orina. Estudio de proteinurias <i>M.ª Dolores Albaladejo Otón</i>	9
Grupo espontáneo de discusión	El laboratorio clínico de Microbiología en la práctica ambulatoria <i>Santiago García Carbajosa</i>	10
Simposium	Aportaciones del laboratorio en el estudio de la patología alérgica y autoinmunidad Utilidad de los marcadores biológicos en el proceso diagnóstico de las alergopatías <i>Dra. M. Luisa Casas Losada</i>	12
	Nuevas perspectivas en inmunoensayos para la detección de anticuerpos en el laboratorio de alergia y autoinmunidad <i>Francisco Javier Fernández Sánchez</i>	13
Conferencias	Técnicas para la detección de enfermedades genéticas mitocondriales <i>Juan Cabezas Herrera</i>	15
	Micosis profundas/Deep mycoses <i>Graciete Freitas</i>	16

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

Autoinmunidad	17	Hematología	50
Diagnóstico prenatal y gestacional	19	Hepatitis	56
Diabetes y metabolismo lipídico	23	Hormonas	57
Drogas de abuso	23	Inmunología	58
Enfermedad cardiovascular	24	Marcadores tumorales	59
Evaluación y comparación de métodos	27	Metabolismo mineral	60
Genética	40	Microbiología y parasitología	61
Gestión y calidad en el laboratorio	44	Miscelánea	71
		Semen	80

Índice de autores de las Comunidades Científicas	81
---	----



MESA REDONDA

EL PAPEL DEL LABORATORIO CLÍNICO EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) ha llegado a ser uno de los principales motivos de ingreso hospitalario durante las últimas dos décadas, constituyendo uno de los principales problemas de salud. Clásicamente, se entiende por **INSUFICIENCIA CARDÍACA** la situación en la que el corazón no es capaz de mantener un volumen/minuto adecuado en relación con el retorno venoso y las necesidades tisulares de cada momento.

El diagnóstico de IC es clínico, basado en síntomas o signos (los dominantes son la disnea y la fatigabilidad), radiografías de tórax, electrocardiograma y respuesta a la terapia. La ecocardiografía se utiliza para caracterizar las anomalías funcionales y estructurales específicas asociadas con el síndrome pero no determinan el diagnóstico de fallo cardíaco. La determinación de la concentración de los péptidos natriuréticos tipo B se ha revelado como una sencilla prueba eficaz y efectiva que puede afinar el diagnóstico e iniciar una terapia precisa y precoz.

A comienzos de los años 80 se descubrió un péptido circulante al que por su origen se llamó péptido natriurético atrial (ANP), que poseía propiedades natriuréticas y vasodilatadoras. Investigaciones posteriores llevaron al descubrimiento de nuevas moléculas peptídicas y actualmente sabemos que el corazón de los mamíferos sintetiza y secreta una familia de hormonas peptídicas relacionadas (hormonas natriuréticas cardíacas), con potentes efectos diuréticos, natriuréticos y relajantes del músculo liso vascular, así como complejas interacciones con los sistemas nervioso y hormonal.

En los humanos, esta familia de péptidos incluye el péptido natriurético atrial (ANP, de 28 aminoácidos); péptido natriurético cerebral (BNP, de 32 aminoácidos) y otros péptidos derivados de la porción N-terminal de las cadenas peptídicas proANP y proBNP. Sin embargo, otros péptidos natriuréticos, tales como el péptido natriurético tipo-C (CNP) y urodilatina (una forma renal de ANP) y el dendroapsis (DNP), que se libera en la aurícula en respuesta a estímulos no muy bien conocidos, no son producidos ni secretados por cardiomiocitos, sino por otros tejidos. Los más relevantes son el BNP y ANP y derivados.

La hormona BNP es más estable y tiene una mayor $t_{1/2}$ que la ANP, ya que la BNP tiene menor afinidad por los receptores NPR-Cs. Respecto a la estabilidad de los péptidos inactivos Nt-pro-ANP1-98 y Nt-pro-BNP1-76, sus aclaramientos son mucho más lentos que el de las hormonas activas, por lo que sus concentraciones en plasma son siempre de 10 a 50 veces mayores (12). La estrecha asociación de la NT-proBNP con la función renal sugiere que la excreción renal es la principal ruta de eliminación de NT-proBNP.

Se han propuesto varios ensayos para evaluar la actividad de un sistema de hormonas cardíacas natriuréticas, aunque solamente deberían usarse inmunoensayos que empleasen anticuerpos específicos para la porción activa de la hormona. De momento no está claro qué ensayo proporciona la mejor información clínica o fisiopatológica.

Diversos autores han estudiado los niveles de diferentes péptidos natriuréticos. Todos ellos coinciden en que las mujeres tuvieron niveles marcadamente más altos que los hombres, y en que se produjo un incremento en las medias de NT-proBNP, BNP y NT-ANP con la edad en ambos sexos.

Las principales utilidades clínicas de la BNP, y especialmente de la NT-proBNP, se describen en numerosos trabajos científicos, pudiendo sintetizar las siguientes:

1.º Diagnóstico

1.1. Gran utilidad como **screening o diagnóstico** en la población general. Puede detectar, tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos, fallos en la función del ventrículo izquierdo, aumento de presión en capilares pulmonares y está inversamente relacionado con la fracción de eyección cardíaca, siendo un **poderoso marcador de las dimensiones del ventrículo izquierdo y de la función sistólica** en pacientes con fallo cardíaco, discriminando bien entre sujetos sanos y sujetos con función sistólica del VI dañada o dimensiones del VI aumentadas.

1.2. La medida de NT-proBNP proporciona una herramienta diagnóstica útil diferenciando fallo cardíaco de otras causas en pacientes que presentan síntomas sugestivos de fallo cardíaco. Este péptido **diferencia disnea** debido a fallo cardíaco de la debida a obstrucción crónica de vía aérea.

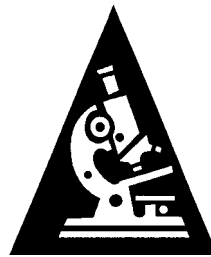
2.º Pronóstico

PNT-BNP es un importante indicador de mortalidad en pacientes con disfunción ventricular izquierda isquémica establecida y en pacientes con síndromes coronarios agudos, proporcionando más información pronóstica que los marcadores de riesgo convencionales.

3.º Monitorización y guía de la terapia de fallo cardíaco

El NT-proBNP se considera un marcador de evolución de patologías cardíacas, en donde la concentración de BNP va disminuyendo si el tratamiento es satisfactorio, pudiendo ayudar en la predicción de beneficio del tratamiento. Este hallazgo ha sido la razón de la comercialización del BNP para el tratamiento de los pacientes con IC aguda o crónica descompensada. El péptido natriurético ventricular sintetizado por técnicas de recombinación genética se conoce con el nombre genérico de Neseitiride.

Dra. Teresa Casas Pina



CONFERENCIAS

TÉCNICAS DE NEGOCIACIÓN Y TRATO CON PROVEEDORES

Entre las distintas funciones (asistencial, investigadora, organizativa) que ha de desarrollar el Analista Clínico, la Función de Gestión cobra cada vez mayor importancia, por lo que es preciso reforzar nuestra base científica con conocimientos sobre Herramientas de Gestión.

El laboratorio de Análisis Clínicos representa siempre una unidad de negocio que precisa de un importante número de “materias primas” (reactivos) y “utillaje” (equipos, accesorios, materiales, técnicas...) necesarios, es más, imprescindibles, para la producción de su servicio final, y ha de ser el Analista Clínico quien decide, evalúa y adecua los métodos analíticos; para lo cual es precisa una relación permanente y eficaz con los proveedores de dichas materias primas que proporcione un fluido devenir de la producción del servicio.

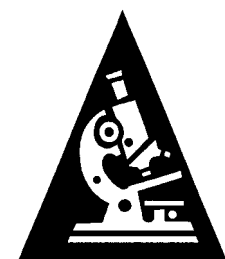
El modelo de relación que mantengamos con los proveedores deberá venir marcado por nuestra política de compras y de financiación y gestión de pagos, interviniendo así mismo en esta relación otros aspectos fundamentales como pueden ser la dimensión del almacén, nuestras necesidades de stock y las condiciones de la cadena de suministros de las materias primas y utillaje.

De una correcta negociación con nuestros proveedores depende en gran medida el resultado del servicio a prestar, tanto en calidad y tiempo de respuesta, como en costes y en consecuencia en precio y beneficio, propio y comunitario.

Para todo ello, siempre es conveniente disponer de algunos conceptos básicos de la negociación, para diferenciar posiciones e intereses, definir correctamente los objetivos y las alternativas, y así, finalmente, poder planificar una negociación, desarrollando todos los aspectos que debemos tratar con nuestros proveedores, o quién sabe, quizá la negociación no tenga por qué ser sólo con los proveedores, en algunos casos es posible que con quien tengamos que negociar sea con un gerente, una compañía aseguradora...

Belén Fernández Puntero

Dra. en Farmacia, Especialista en Análisis Clínicos



MESA REDONDA

NUEVOS ENFOQUES EN ANÁLISIS DE ORINAS. ESTUDIO DE PROTEINURIAS

Estrategias del laboratorio para el diagnóstico diferencial de la proteinuria

La cuantificación de proteínas en orina es una de las pruebas más comúnmente utilizadas para el diagnóstico clínico. Con frecuencia, la presentación de una enfermedad renal se acompaña del hallazgo ocasional de proteinuria en un análisis sistemático de orina, lo que puede preceder

incluso en años a otros signos de enfermedad renal, como la elevación de creatinina plasmática. Sin embargo, la presencia de proteinuria no siempre indica un estado patológico, por lo que su hallazgo debe ir seguido de un diagnóstico diferencial para determinar su origen: prerrenal, glomerular, tubular o postrenal.

Esto es posible mediante la cuantificación de proteínas de distinto peso molecular. Analizando albúmina, alfa-1-microglobulina, inmunoglobulina G y alfa-2-macroglobulina, junto con las proteínas totales en la orina, podemos detectar el origen de la proteinuria y diferenciarlo según patrones proteicos específicos. Las proteinurias prerrenales se caracterizan por un índice albúmina/proteínas totales inferior a 0.4, siendo necesario en este caso cuantificar cadenas ligeras libres kappa y lambda. Las enfermedades tubulointersticiales se detectan mediante la elevación del índice alfa-1-microglobulina/albumina. La albúmina, como parámetro independiente, es un marcador proteico de lesión glomerular, y junto con la excreción de IgG nos permite diferenciar las proteinurias glomerulares selectivas y no selectivas. Por último, en la proteinuria postrenal, alfa-2-macroglobulina es un marcador útil, con índices frente a la albúmina superiores a los de la proteinuria renal.

El desarrollo de programas informáticos que combinan estos perfiles proteicos junto con otros parámetros del paciente, con representaciones gráficas y el cálculo de cocientes y fórmulas, aporta sugerencias útiles para la interpretación clínica de los resultados y puede ayudar a una correcta evaluación del paciente.

Una estrategia diagnóstica para diferenciar las proteínas urinarias se basa en el análisis mediante tira reactiva de la orina (eritrocitos, leucocitos, proteínas, glucosa, pH y nitritos) y la cuantificación de hasta siete proteínas específicas. Como parámetros básicos son necesarios la determinación de albúmina, como marcador proteico de lesión glomerular, alfa-1-microglobulina, indicador de disfunción tubulointersticial, proteínas totales, control del proceso y parámetro para detectar una proteinuria de origen prerrenal, y creatinina, indicador de la concentración de la orina. La alfa-2-macroglobulina y la IgG nos permiten interpretar el origen y la selectividad de la proteinuria.

Al desarrollar sistemas expertos basados en patrones proteicos surgidos de la práctica clínica diaria, podemos establecer estrategias diagnósticas como la siguiente: tras el hallazgo de una proteinuria superior o igual a 30 mg/dl, se cuantifican albúmina y alfa-1-microglobulina, como marca-

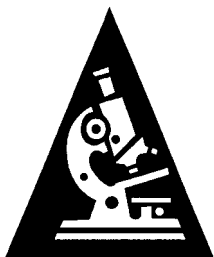
MESA REDONDA

dores glomerular y tubular, respectivamente. El índice albúmina/proteínas totales nos informa sobre el origen prerrenal, como la proteinuria de Bence-Jones. Además, la esterasa leucocitaria y la pseudoperoxidasa de la hemoglobina de la tira reactiva indican la existencia de inflamación y hematuria. En estos casos es necesario medir la excreción de IgG y alfa-2-macroglobulina.

Aplicando estas estrategias diagnósticas, la información obtenida a partir de un análisis de orina aumenta notablemente, mejorando la calidad ofrecida por el laboratorio. Podemos concluir que la aplicación de estas nuevas herramientas sensibles y no invasivas ayuda a diagnosticar y diferenciar enfermedades renales, permitiendo la detección precoz de procesos inflamatorios y nefrotóxicos, todo ello a partir de una única muestra de orina.

M.^a Dolores Albaladejo Otón

Servicio de Análisis Clínicos. H. U. Virgen de la Arrixaca, Murcia



GRUPO ESPONTÁNEO DE DISCUSIÓN

EL LABORATORIO CLÍNICO DE MICROBIOLOGÍA EN LA PRÁCTICA AMBULATORIA

La intención de esta ponencia es aportar a los pequeños laboratorios de Análisis Clínicos que trabajan en la

práctica privada la experiencia extrahospitalaria, de más de 20 años, en la Atención Primaria de un laboratorio de Microbiología de un servicio hospitalario público, con una revisión, discusión y puesta al día de los problemas que puede presentar el procesamiento de las muestras que suponemos más frecuentes. La idea surge de conversaciones tenidas con profesionales de nuestra provincia, representativos de ese sector, que consideran necesaria una mejora de la calidad asistencial en ese sentido, adaptándola a patrones fácilmente comprensibles por los médicos clínicos, sus usuarios.

En 2003 procesamos en nuestro laboratorio 42.418 muestras divididas en bloques de actividad. El 88% de la actividad de Microbiología de Atención Primaria en Segovia capital lo constituyeron: el urocultivo (52%), el coprocultivo (10%), el frotis vaginal (10%), el frotis faríngeo (9%) y los parásitos en heces (7%). Inferimos de ello que éstas son las muestras cuyos problemas debemos plantear ambulatoriamente, y que son: la microbiología costoeficiente, las orinas “mal recogidas”, en las heces el aislamiento de enteropatógenos y el reconocimiento de huevos, quistes y artefactos, la “flora habitual” de la vagina y los estreptococos betahemolíticos.

Los principios más importantes de las pruebas microbiológicas costo-efectivas y clínicamente importantes son, entre otros, procesar sólo las muestras adecuadas y rechazar las inadecuadas, procesar e interpretar las pruebas con métodos estandarizados, reducir el tiempo de respuesta en lo posible e informar las pruebas de acuerdo con su importancia (1).

La mayoría de las muestras de orina que se procesan a diario en el laboratorio clínico son para confirmar o descartar infecciones urinarias. Pese a lo que mucha gente cree, la forma en que el laboratorio debe encarar el proceso de las muestras urinarias de manera que sea útil a la clínica no está ni mucho menos resuelta, sino sometida a revisiones periódicas que intentan abordar adecuadamente los complejos y múltiples problemas que plantea conseguir este objetivo. Los laboratorios clínicos tienen que discernir qué análisis deben ser utilizados para apoyar el diagnóstico provisional de ITU, que permita instaurar un tratamiento empírico, y qué pruebas se deben utilizar para el cribaje de orinas para cultivo (2).

Los principales problemas infecciosos urinarios son el síndrome uretral agudo y la cistitis de la mujer, las

GRUPO ESPONTÁNEO DE DISCUSIÓN

pielonefritis, la bacteriuria asintomática, las prostatitis y las bacteriurias asociadas a catéter. La prueba discriminadora de ITU de vías bajas en el urianálisis rutinario es la presencia de leucocitos en la orina. La bacteriuria “significativa” se valora e interpreta mediante el urocultivo. Hay puntos críticos en el urocultivo que casi nunca se tienen en cuenta: saber el tipo de muestra que se ha de sembrar, la recogida, el transporte y el almacenamiento de la orina, si existe un catéter urinario, si hay una enfermedad de base y si hay puesto un antibiótico previo. Las muestras más corrientes son de micción espontánea, bolsa pediátrica, sondaje directo y de sondas y colectores. En la definición cuantitativa de la bacteriuria intervienen el tipo de infección urinaria, la cantidad de orina sembrada (1 y 10 microlitros) y la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro contadas (100, 1.000, 10.000 y 100.000). Es muy importante definir el término “orina contaminada” (3). Los gérmenes que nosotros aislamos más frecuentemente en la orina son *Escherichia coli* (75%), *Proteus mirabilis* (4%) y *Klebsiella pneumoniae* (4%).

Las diarreas han sido la segunda causa de mortalidad infantil en todo el mundo en el año 2003 (4). En los países desarrollados la mayoría de las diarreas se autolimitan sin tratamiento antibiótico, sólo con dieta y rehidratación oral (5). El coprocultivo y el examen parasitológico no son por tanto preceptivos. Se recomienda coprocultivo en aquellas diarreas que además presentan fiebre o sangre en las heces. Si el coprocultivo es negativo y la diarrea persiste 7 a 10 días, se recomienda el estudio parasitológico (6).

Los medios mínimos recomendados para el coprocultivo son caldo de enriquecimiento en selenito, agar diferencial eosina azul de metileno, agar selectivo para *Salmonella-Shigella* y agar selectivo para *Campylobacter* (7). *Salmonella* spp (38%) y *Campylobacter* spp (22%) son los gérmenes que aislamos con mayor frecuencia en las heces.

El examen parasitológico básico es la concentración y sedimentación de las heces para ver huevos y quistes; se necesita adquirir experiencia en el examen microscópico para descartar los artefactos en las heces y los quistes de protozoos comensales. En los niños es importante el test de Graham para oxiuros; la recolección adecuada de las muestras en cinta transparente adhesiva para este test exige la correcta comprensión de la técnica y la información de los fundamentos. *Giardia lamblia* (53%) y

Enterobius vermicularis (19%) son, con mucha distancia, los parásitos intestinales observados con más frecuencia (8). ¿Qué es la flora vaginal normal? En la vagina viven habitualmente muchas bacterias diferentes; hay un delicado equilibrio entre los dos microorganismos más normales en la vagina durante los años fértiles. Estos microorganismos son *Candida albicans* (una levadura) y *Lactobacillus* sp, unas bacterias que excretan peróxido de hidrógeno creando un medio ácido que es un desinfectante natural que actúa manteniendo el equilibrio normal de organismos en la vagina contrario a las bacterias patógenas. Otros gérmenes habituales en la vagina normal son enterobacterias, anaerobios y cocos grampositivos. Cualquier condición que cambie la acidez vaginal o altere la flora normal de la vagina predispone a una infección.

Los tipos más frecuentes de infección vaginal son la vaginosis bacteriana por *Gardnerella vaginalis* y las vulvovaginitis por *Candida albicans* y *Trichomonas vaginalis*, y es sobre todo a estos tres gérmenes a los que no se debe perder de vista en el exudado vaginal. Algunos factores de riesgo corrientes en las vulvovaginitis por levaduras son el embarazo, la diabetes, los anticonceptivos, los antibióticos, los corticoides, las duchas vaginales, los tampones vaginales y los dispositivos intrauterinos. La vulvovaginitis tricomoniasis suele presentar una historia de promiscuidad sexual y la vaginosis bacteriana se relaciona con la sexualidad temprana (9).

Los signos de las infecciones vulvovaginales son la irritación vulvar y la disuria y los cambios en el aspecto, color y olor del flujo vaginal. El diagnóstico bacteriológico incluye la microscopía, con examen en fresco con potasa caliente y suero salino y la tinción de Gram, y el cultivo. En el cultivo ponemos básicamente dos medios generales (agar sangre y agar chocolate), caldo especial para *Trichomonas vaginalis* y *Candida especies* y agar selectivo para *Gardnerella vaginalis* (10). El porcentaje de aislamientos en nuestro laboratorio es *Candida especies* (86%), *Trichomonas vaginalis* (5%) y *Gardnerella vaginalis* (1%).

Los puntos positivos en el diagnóstico clínico de las faringitis son la edad, la estación, la fiebre de 38° C, el dolor de garganta, la faringe anormal, los ganglios cervicales, el dolor de cabeza y la ausencia de catarro. Los virus (rinovirus, influenza A y B, coxsackie, coronavirus, virus Epstein-Barr, adenovirus, virus parainfluen-

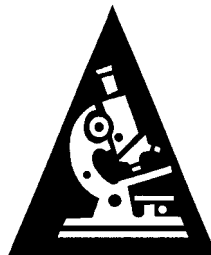
GRUPO ESPONTÁNEO DE DISCUSIÓN

zae, echovirus, herpes simple y citomegalovirus) constituyen el 50% de los casos de faringitis. Dado que estas infecciones víricas no son tratables, el diagnóstico microbiológico de rutina de las faringitis se centra en el *Streptococo beta hemolítico del grupo A*, que constituye casi el 25% de los casos y del que hay que evitar sus complicaciones graves cardíacas, nefríticas y reumáticas (11) (12) (13). El *Streptococo beta hemolítico del grupo A* constituye el 4% de todos nuestros aislamientos bacterianos. La sensibilidad de las pruebas en la microbiología de las faringoamigdalitis es del 80% para el antígeno faríngeo y del 95% para el cultivo faríngeo. Para el cultivo es importante la toma adecuada de la muestra, que debe hacerse por "hisopado" vigoroso de las dos amígdalas y la fosa amigdalara. No se necesitan muestras de lengua, boca o paladar duro. No se precisa una muestra de cada amígdala (14). Las muestras se cultivan en agar sangre, agar chocolate y agar selectivo para estreptococo A.

BIBLIOGRAFÍA

1. Am J Pathol 1997; 107:154-67.
2. Med Clin North Am 1991 Mar; 75(2):313-325.
3. Clin Infec Dis 1992. 15 (suppl 1) 216-227
4. www.who.int/whr/2003.
5. N Engl J Med 1991; 325:327-340.
6. Montgomery & Scoville. J Fam Pract. 2002 Jun; 51(6):575.
7. Procedimientos en Microbiología Clínica. 1994. Editor J. J. Picazo.
8. www.isciii.es 24/01/2004.
9. www.geocities.com/mmhennawy. (www.obgyn.net).
10. Mandell Douglas & Bennett 5.ª ed. esp 2000. Ed Panamericana: Pag. 1480.
11. Pediatrics 1971; 48:573.
12. JAMA 1985; 254:925.
13. Ann Inter Med 1989; 110:612.
14. Kurtz J Clin Micro 2000; 38:279.

Santiago García Carbajosa
Jefe de Sección de Microbiología
Complejo Hospitalario del SACYL
Segovia (España)



SIMPOSIUM

Aportaciones del laboratorio en el estudio de la patología alérgica y autoinmunidad

UTILIDAD DE LOS MARCADORES BIOLÓGICOS EN EL PROCESO DIAGNÓSTICO DE LAS ALERGOPATÍAS

El objetivo final del diagnóstico *in vitro* de la patología alérgica es averiguar el alérgeno o alérgenos implicados en la reacción de hipersensibilidad a fin de poner en marcha las medidas terapéuticas, inmunoterapia o de evitación pertinentes.

Para alcanzar dicha meta es preciso:

- Establecer una sospecha diagnóstica basada en la historia clínica.
- Enfrentar en un inmunoensayo el anticuerpo del paciente con el alérgeno que lo indujo.
- Garantizar la calidad analítica de las técnicas seleccionadas para conseguir objetivar la relación de causalidad.

La determinación de IgE específica (SIgE) es un parámetro crucial en el estudio bioquímico de las alergopatías, ya que nos

va a permitir confirmar nuestra sospecha diagnóstica y establecer un apoyo a la implementación de medidas terapéuticas (alergenos recombinantes).

Existen además otros marcadores biológicos que posibilitan chequear desde el laboratorio la respuesta hipersensible:

- Marcadores de activación de las células diana; test de liberación de histamina (útil también en la identificación del alérgeno) y determinación de triptasa sérica en la anafilaxia.
- Monitorización de la respuesta inflamatoria mediante los marcadores biológicos de la inflamación en suero y órgano diana; citoquinas (IL4, IL6, etc.), moléculas de adhesión, ECP del eosinófilo, que es un célula con un papel relevante en la producción de inflamación.
- Estudio de la eosinofilia en órganos de choque, secreción nasal, esputo.

En el predominio de respuesta TH2 (IL4, etc.), desencadena en las células B como consecuencia de la agresión por el alérgeno un cambio de síntesis de isotipo de cadenas pesadas de IgM por IgE.

La determinación de IgE total, no obstante, sólo tiene un valor de apoyo en el contexto de una sospecha de atopía. En estos pacientes interesa determinar la SIgE frente al alérgeno para el que están sensibilizados.

La rentabilidad clínica del inmunoensayo está, entre otros factores, fuertemente condicionada por la complejidad alérgica que exige una elevada calidad y estandarización del extracto de alergenos que debe incluir todos los componentes biológicamente activos (proteínas alérgicas mayores y menores) y en la cantidad necesaria para permitir su unión a la SIgE en el inmunoensayo.

En los test de cribado y de multialergenos el suero del paciente se enfrenta a una mezcla de extractos alérgicos con la finalidad de discriminar si existe o no sensibilización atópica, sin identificar en este primer nivel el alérgeno causal. El despistaje de patología alérgica obviamente siempre depende de la historia clínica.

La indicación del estudio de SIgE es pareja a la de los tests cutáneos como herramienta diagnóstica en hipersensibilidad IgE mediada, ya que ambos detectan sensibilización.

En relación a éstos presenta la ventaja de su independencia respecto al estado de la piel y la terapia farmacológica.

La elaboración de alergenos sin partir de las fuentes naturales sino a través de tecnología recombinante, y manteniendo similares características inmunológicas, ha supuesto un enorme avance en el diagnóstico *in vitro* de la alergia, al posibilitar un mayor conocimiento sobre la naturaleza molecular de los alergenos.

El desarrollo de alergenos recombinantes permite identificar las fuentes alérgicas y establecer estrategias diagnósticas por “separación de componentes” en la que desempeñan un papel preponderante los llamados “alergenos marcadores”, y diferenciar cosensibilizaciones de reactividades cruzadas.

La monitorización de la respuesta inflamatoria presente en la enfermedad alérgica constituye el otro gran capítulo de la contribución del laboratorio al estudio de estas patologías. La evaluación de los marcadores de actividad de las células proinflamatorias, entre las que destaca por su importante papel el eosinófilo, la determinación de citocinas y moléculas de adhesión mediante tecnología sencilla y asequible ha otorgado al Diagnóstico Biológico de la Alergia un papel de primera línea.

Dra. M. Luisa Casas Losada

NUEVAS PERSPECTIVAS EN INMUNOENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN EL LABORATORIO DE ALERGIA Y AUTOINMUNIDAD

Tras la reciente elucidación del genoma humano, las técnicas de biología molecular (como la PCR a tiempo real, los microchips, etc.) están revolucionando el diagnóstico de laboratorio en áreas como las enfermedades infecciosas, los trastornos metabólicos hereditarios y el cáncer.

Las técnicas empleadas en el laboratorio para el estudio de las patologías autoinmune y alérgica son de las técnicas con mayor componente manual, y aunque en los últimos años también se están automatizando (dispensación automática de portas para fluorescencia, equipos para inmunoanálisis totalmente automatizados con capacidad para altas

cargas de trabajo incluidos en grandes cadenas robotizadas) es la incorporación de la **citometría de flujo en las técnicas inmunológicas** (basadas en la reacción entre un antígeno o alérgeno y su anticuerpo correspondiente) la que contribuirá en mayor medida a una revolución espectacular en este campo, ya que hasta ahora sólo se podía cuantificar en cada ensayo un solo parámetro, pero la tecnología multiplex permite cuantificar múltiples parámetros en un solo ensayo, permitiendo un ahorro de muestra, de material, de mano de obra y sobre todo de tiempo de respuesta (que repercutirá en menos consultas y/o en menor hospitalización).

La citometría de flujo es una técnica que analiza células o partículas en suspensión, a las que se les hace pasar a través de un flujo laminar y se hace incidir individualmente sobre cada partícula un haz de luz monocromática (láser) causando señales de dispersión y fluorescencia (tras marcaje previo con distintos fluorocromos), permitiendo la diferenciación de poblaciones celulares complejas.

La tecnología multiplex utiliza pequeñas esferas de poliestireno (de un tamaño aproximado a la mitad de un hematíe) teñidas con distintas concentraciones de **dos fluorocromos** (rojo y naranja), lo que permite que sean encuadradas (**clasifica**) hasta 100 espectros distintos de la mezcla rojo-naranja. A cada color de microesfera se le recubre con un antígeno o alérgeno específico, de tal forma que las esferas actúan de soporte del inmunoensayo, en lugar del fondo del pocillo de las placas microtiter clásicas; esto proporciona una mayor superficie de contacto Ag-Ac (la IgG o la IgE que se encuentra en la muestra del paciente). El que haya tenido lugar dicha interacción se revela con un conjugado (anti-IgG o anti-IgE) marcado con **otro fluorocromo**, pudiendo ser **cuantificada la intensidad de su señal**.

Las microesferas son interceptadas por dos fuentes láser de distinta longitud de onda, una permite clasificar la microesfera por su espectro rojo-naranja, que se recoge en los fotomultiplicadores 1 y 2, mientras que el otro láser permite la cuantificación de la señal de fluorescencia del conjugado marcado en el detector fotomultiplicador 3. No existe solapamiento en los espectros de emisión de los fluorocromos empleados (en la clasificación y en la cuantificación), de tal forma que no se requiere compensación de la señal. La detección de fluorescencia es directa, mientras que en un ELISA convencional es indirecta tras la adición de un sustrato cromogénico.

Esta técnica permite el análisis de gran número de partículas en poco tiempo; realizando múltiples microinmunoensayos **simultáneamente**, en un mismo pocillo de reacción encontramos múltiples esferas de cada una de las

especificidades que lleva el kit de reactivo, pudiendo analizar **hasta 100 especificidades distintas en un solo ensayo** utilizando una cantidad de muestra mínima (algunos trabajos se han realizado en neonatos sobre las gotas de sangre recogidas en papel, empleando un volumen de muestra mínimo).

Esta tecnología presenta **menores coeficientes de variación** que los ELISA convencionales: en el mismo ensayo se analizan 50-200 esferas idénticas, que portan el mismo antígeno o alérgeno (otras 50-200 de otra especificidad, etc.), cada esfera proporciona una señal, obteniendo al final un promedio de todas: múltiples microensayos (alrededor de 100.000 lecturas/minuto).

También presenta un **mayor rango dinámico de medida** que el ELISA: no requiere posteriores diluciones de las muestras muy positivas (sin mencionar el interminable arrastre para obtener el título de inmunofluorescencia en algunas muestras).

Frente a las curvas patrón con cinco o seis puntos, con sus respectivos controles para cada parámetro en cada ensayo ELISA, aquí se emplea **un único calibrador** para todos los parámetros incluidos en ese ensayo, con un solo control positivo y otro negativo: ahorro de material desechable, de reactivo, de mano técnica, de tiempo, lo que **se traduce en menor coste y en una homogeneización** de los resultados de las distintas técnicas.

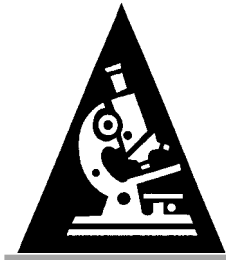
Tanto en autoinmunidad como en alergia se suelen emplear técnicas de cribado, y a las muestras con resultado positivo se les generan nuevos ensayos que se realizarán posteriormente. Con la incorporación de esta nueva tecnología, este **abordaje en cascada desaparece o se simplifica, disminuyendo drásticamente el tiempo de respuesta** del informe final completo (en menos de 2 horas); en algunos equipos ya comercializados el ensayo es homogéneo, no requiere lavado para separar el conjugado no unido, sólo se cuantifica la fluorescencia que portan las esferas (algunos resultados en sólo 30 minutos).

Quiero volver a resaltar, finalmente, que la sensibilidad y especificidad que se van obteniendo con los equipos de las distintas casas comerciales van a estar en función principalmente de la pureza del alérgeno o antígeno empleado y de la afinidad de los anticuerpos monoclonales utilizados en cada ensayo (de la propia pareja Ag-Ac), pero **el diseño de esta tecnología en sí mismo es prometedor**, pudiendo aplicarse a cualquier analito que se determine mediante técnicas de inmunoanálisis: serología, hormonas, marcadores tumorales, monitorización de fármacos, aunque el campo con el que más fuerza ha comenzado es el de la inmunología, con la detección múltiple de hasta 15 citoquinas simultáneamente y de paneles de autoinmunidad con los 10

principales autoanticuerpos encontrados en las conectivo-patías, panel tiroideo, panel de enfermedad celíaca, panel de vasculitis, panel de trombosis, etc.

Sin duda, supone un gran paso en la automatización en estas áreas del laboratorio, afectando enormemente a la filosofía y organización del trabajo al que estamos acostumbrados: se realizan perfiles completos a todos los pacientes.

Francisco Javier Fernández Sánchez
 Área de Laboratorio
 Fundación Hospital Alcorcón



CONFERENCIA

TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES GENÉTICAS MITOCONDRIALES

Las enfermedades mitocondriales (EM) se pueden definir como disfunciones de la cadena de transporte respiratoria mitocondrial encargada de la producción de ATP. La expresión de una alteración mitocondrial puede alcanzar a cualquier órgano o tejido, aunque los sistemas afectados con mayor frecuencia son aquellos cuya demanda energética es mayor. Por ello, la clásica denominación de miopatías o encefalomiopatías mitocondriales (en referencia a la afectación de los sistemas muscular y nervioso) ha sido sustituida por el nombre genérico de “citopatías mitocondriales”.

La gran complejidad de la cadena respiratoria mitocondrial, formada por unas 85 proteínas —unas codificadas por

el ADN mitocondrial (ADNmt) y otras por el genoma nuclear (ADNn)—, explica la variedad de fenotipos clínicos. Son enfermedades heterogéneas, tanto desde el punto de vista clínico como bioquímico y genético, y por tanto difíciles de diagnosticar. Los motivos son varios y entre ellos: a) la variabilidad de la presentación clínica ya que, con alta frecuencia, cursan como asociaciones de síntomas que afectan a órganos no relacionados entre sí; b) el doble control genético condiciona el tipo de herencia, siendo mendeliana cuando la alteración acontece en el genoma nuclear y materna no mendeliana cuando lo hace en el genoma mitocondrial; c) además, aunque sean enfermedades genéticas, no siempre debutan en el neonato ni en la primera infancia; d) finalmente, las pruebas diagnósticas de laboratorio necesarias para confirmar estas enfermedades son complejas. La adquisición de biopsias titulares resulta especialmente traumática en poblaciones infantiles y condiciona a un segundo término la sospecha de una enfermedad mitocondrial.

La estrategia diagnóstica consta de una exploración clínica, una exploración metabólica y un diagnóstico de confirmación. Alteraciones del estado de oxidorreducción plasmática valorando los niveles de lactato (cuadro de acidosis), la relación lactato/piruvato y la relación hidroxibutirato/acetoacetato ayudan a reafirmar el diagnóstico clínico. Otro índice que se ha de valorar es la concentración plasmática de carnitina libre y su forma esterificada. El siguiente paso que se seguirá es la búsqueda de deficiencias enzimáticas, lo que implica la práctica de una biopsia. La presencia de fibras rojo-rotas en biopsias es la indicación histológica más común, aunque no exclusiva de citopatologías mitocondriales.

Para estudiar las alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial se requieren estudios bioquímicos de espectrometría para valorar las actividades enzimáticas de los distintos complejos de la cadena respiratoria y métodos polarográficos capaces de medir el consumo de oxígeno mitocondrial. La espectrometría tiene como fin conocer si existen deficiencias en las actividades enzimáticas de algún o algunos de los complejos de la cadena respiratoria y puede realizarse en mitocondrias aisladas o en homogenados del tejido biopsiado. El ensayo sobre mitocondrias aisladas tiene una fiabilidad diagnóstica superior, pero a su favor tiene la practicidad, ya que el tejido puede conservarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la fecha del ensayo, mientras que el aislamiento de mitocondrias se lleva a cabo con tejido fresco. El estudio del metabolismo energético *in vivo* del músculo y cerebro, por resonancia magnética, es otra prueba que puede ser utilizada para diagnosticar las alteraciones de la cadena respiratoria.

CONFERENCIA

El estudio genético requiere el análisis de los genomas nuclear y mitocondrial. Conocer el tipo de herencia permite un consejo genético o un diagnóstico prenatal. La estrategia para la identificación de la alteración genética causante de la enfermedad viene determinada por el tipo de herencia. Así, casos esporádicos se asocian a deleciones o duplicaciones del ADNmt y una transmisión materna nos suele indicar mutaciones puntuales del ADNmt. Una herencia autosómica dominante suele cursar con deleciones múltiples y una herencia autosómica recesiva con depleciones del DNAm.

Las técnicas moleculares permiten la identificación precisa de enfermedades mitocondriales en individuos afectados o sospechosos de padecerla. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida por corte de los productos con enzimas de restricción (RPLC), extensión de cebadores (primer extensión) o más recientemente tecnologías como DHPLC (HPLC desnaturalizante) o electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TTGE) son los métodos más empleados para detectar mutaciones del ADNmt. La confirmación requiere en ocasiones la secuenciación del fragmento del ADNmt donde se presume la alteración genética. Enfermedades como KSS/CPEO (Kearns-Sayre síndrome/Chronic progressive external ophthalmoplegia) requieren la técnica del Southern (electroforesis del ADN en gel de agarosa seguido de transferencia e hibridación molecular). Las técnicas de transferencia de mitocondrias con mutaciones en su ADN a células desprovistas de ADNmt (células rho⁻) generalmente aisladas de plaquetas nos permiten confirmar si dicha alteración es patogénica o bien si hay que considerarla como un polimorfismo.

Juan Cabezas Herrera

fungi of known geographic areas, such as *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. The second group, besides *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) and *Candida albicans* (*C. albicans*), recognized as human pathogens for a long time, consists of many other genus and species, identified as commensal or saprophytic organisms, which have been emerging as responsible for serious and life-threatening infections in immunocompromised patients. Among them are included *Candida non-albicans*, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Scedosporium apiospermum*, *Pseudallescheria boydii*, *Malassezia furfur* e *Trichosporon* spp.

Reducing the high rate of mortality, particularly in immunosuppressed patients, requires an accurate diagnosis and correct treatment in time. Besides all the advances in the medical field, mycological diagnosis still depends on direct observation of the fungus in biological samples, isolation in adequate medium, and detection of antibodies and/or antigens for the fungi. The interpretation of these laboratory test results isn't always easy, and has to be related to other factors such as the immunological status, clinical symptoms, and location of the infection.

In order to simplify the diagnostic of systemic fungal infections, several methods have been developed, so fungi nucleic acids in blood, cerebrospinal and pleural fluids can be detected, as well as other biological samples. Most of them are based on PCR (polymerase chain reaction) technology with high specificity and sensitivity. The most recent ones, by using real-time PCR, can detect and quantify fungal nucleic acids in the specimens. In spite of all these improvements, most of molecular techniques have been used only for application "inhouse", and an effort has to be made to standardize them, so they can be employed by other specialized laboratories.

Graciete Freitas

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

MICOSIS PROFUNDAS DEEP MYCOSES

Etiologic agents of deep mycoses can be pathogenic or opportunistic fungi. The first group includes the endemic