INFORME ALAC

Ciencia y Etica

Año XI N° 2 2006

INFORME ALAC , Ciencia y Etica es el órgano de difusión científica de la Asociación de Laboratorios de Alta Complejidad (ALAC).
Av. Córdoba 890 3° "B" (1054) Bs. As. , Argentina.
Tel: (54) (011) 4322-0555
e-mail: alac@pccp.com.ar
web: alac.com.ar

ISSN: 0328-7637

Director
Dr. Diego E. Turner

Autoridades de A.L.A.C. (2006-2008)
Presidente: Dra. Edith Merea
Secretario: Dr. Jorge Ambrosio
Tesorero: Dr. Carlos Beleme
Vocales: Dr. Andrés Albrecht
Dr. Luis Lugo

Autoridades de Fundación A.L.A.C.
Presidente: Dra. Silvia Quiroga
Vice-Presidente: Dr. Ricardo Petrazzini
Secretaria: Dr. FranciscoArca
Tesorero: Dr. Carlos Beleme
Vocales: Dra. Liliana Wargon
Dr. Diego E. Turner

Diseño Gráfico y Diagramación
Lic. Eduardo Pablo Shearer

El contenido de las notas firmadas no representa la opinión del editor, siendo de exclusiva responsabilidad de los autores. El contenido de los avisos publicitarios es responsabilidad única de los anunciantes.

SUMARIO

EDITORIAL.....2
Calidad en salud
Dr. Horacio Denari

INMUNOLOGIA.....3
Anticuerpos Antiperoxidasa
Bioq. María R. Armayor

INFECCIOSAS.....11
Gripe aviaria
Dres. Silvina Benetti - Fabián Fay - Oscar Fay

Rotavirus en materia fecal
V. Cuffia - N. Guerra - M. Díaz Ariza -
X. Maldonado - P. Córdoba

CITOMETRIA.....19
Aplicaciones
Dra. Evangelina Agriello

NUTRICION.....22
Las Cactáceas
M. Nazareno - M. Ochoa - M. Targa -
C. Loto - C. Ríos

Laboratorios Integrantes de ALAC.....26

Editorial

La calidad en salud es un Derecho .... nuestra obligación es decirlo

Desde su fundación ALAC agrupa a Laboratorios de todas las provincias cuyo objetivo es la mejora continua de los servicios bioquímicos a los pacientes: el desarrollo de nuevas metodologías analíticas, el cuidado y predisposición de la mejor atención del paciente, el crecimiento constante de la calidad del laboratorio. Este último punto es al que más énfasis se le ha dado. Los laboratorios que desean ingresar deben estar acreditados por alguna entidad nacional o internacional y deben someterse a la auditoria de calidad cumpliendo con diversos controles de calidad analítica.

Pero esta tarea se ha realizado en forma silenciosa, podríamos decir, "puertas adentro" de cada laboratorio, "puertas adentro" de la Asociación.

Teniendo en cuenta cada uno de sus principios, a pesar del vacío que el Estado ha dejado en la salud y las numerosas crisis de nuestro país, ALAC logró constituir una Red Nacional integrada actualmente por 57 laboratorios, que trabajan en forma dinámica, informatizada y eficientemente comunicada, permitiendo solucionar los problemas de los pacientes en todo el territorio nacional. En forma asociativa, la red cuenta con la tecnología y el know-how que se necesitan para realizar todo tipo de análisis clínicos; superando cada día con ética, visión y compromiso las demandas actuales del mercado, adaptándose a las nuevas tecnologías y al desafío de la "salud" de una sociedad en constante cambio y evolución.

Desde sus inicios en la década del 70, ALAC fue regida por el objetivo de lograr mejor calidad en el servicio a los pacientes, pero este nivel de calidad no puede ser reconocida por ellos. Es en este punto donde decidimos dar a conocer y poner a disposición de los mismos elementos que lo ayuden a ver aquello que no se ve, y que sin embargo tiene un peso fundamental en su vida.

Para el paciente, la calidad es invisible a los ojos

Actualmente el paciente elige el laboratorio por cartilla o por indicación médica. En la elección influye la imagen de sus profesionales, la promoción de marketing o la estética del lugar; también la cercanía, o el hábito. El paciente da por hecho que el laboratorio le brindará resultados confiables, por eso influyen los factores antes mencionados, y no se piensa que puede haber una calidad distinta entre un laboratorio y otro.

El paciente que va a un laboratorio a hacerse un análisis clínico está en contacto con el personal administrativo y el extraccionista. Después vuelve a buscar el informe en un sobre cerrado que será leído por el médico.

Si bien el personal de administración y el extraccionista también reflejan la calidad del laboratorio, el procesamiento del análisis se realiza en un espacio al que el paciente no tiene acceso. Si lo tuviera, de todas formas estaría limitado para evaluarlo, por el nivel de especialización, que implica un know-how técnico muy específico. La única forma de enterarse sobre la calidad de los procesos es con las certificaciones y acreditaciones que puede mostrar ese laboratorio.

Desde ALAC consideramos fundamental que el paciente tenga mecanismos que lo ayuden a reconocer la calidad del Laboratorio.

La calidad en un laboratorio implica costos y tiempo

El laboratorio logra calidad mediante controles dentro del laboratorio, entre laboratorios, con gestión de calidad en los procesos, y con acreditaciones y certificaciones de entidades nacionales e internacionales que aseguran su competencia técnica.

Todos los laboratorios de ALAC cuentan, como mínimo, con una acreditación o certificación externa. Además, deben cumplir en forma obligatoria con:

- El Programa Buenos Aires de Control de Calidad CIRHE (Centro de Investigación en Reproducción Humana y Experimental).
- Controles de Calidad en Química Clínica, Hematología y un ítem de especialidad (inmunoensayo).
- Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología del Instituto MALBRÁN.

La salud del paciente depende de la calidad del laboratorio

Si el resultado de un análisis es el correcto, el médico podrá realizar un diagnóstico adecuado, controlar un cuadro clínico o hacer la indicación o el seguimiento que corresponden para el tratamiento o la medicación. Para que un resultado sea correcto, el laboratorio de análisis clínicos debe trabajar con calidad.

Los estándares de calidad para los análisis son internacionales, y en base a ellos, es posible definir la salud o la enfermedad, la medicación a suministrar, niveles de drogas ante ciertas patologías. Cuando el laboratorio trabaja con estándares de calidad, el resultado del análisis puede ser comparado con los valores de referencia de cualquier parte del mundo.

Muchas veces un resultado equivocado puede pasar inadvertido, y sus consecuencias nunca sufrirse. Otras veces las consecuencias pueden aparecer años después, y ni se recuerda ese análisis que pudo prever una enfermedad. También el resultado dudoso puede ser la causa de repetición de análisis, de cambio de médico, de segundas consultas, que hacen perder tiempo y dinero.

La falta de referencia a la calidad, como valor fundamental del laboratorio, vuelve a aparecer cuando llega al momento de definir valores de contratación. Allí tampoco se toma en cuenta la calidad que ofrece el laboratorio de análisis clínicos.

Aunque parezca una obviedad indicarlo, brindar calidad tiene su precio. Precio que no es retribuido.

Si la calidad no puede ser diferenciada, no puede ser valorada. Si no es valorada, no puede ser retribuida. Si no es retribuida, no se podrá sostener el servicio de calidad para el paciente.

Hoy ALAC ha sumado a su trabajo de búsqueda de calidad «puertas adentro» del laboratorio, el de difundir a la población que la calidad debe ser reconocida y valorada. Para que la gente pueda saber exigir calidad en análisis clínicos. Y para que siga habiendo calidad ALAC.

Porque la calidad en salud es un derecho y nuestra obligación hoy es comunicarlo.

Dr. Horacio Denari

Anticuerpos Antitiroperoxidasa

su relación con sexo, edad y TSH. Importancia de su screening

María Rosa Armayor
Bioquímica - Laboratorio SUSANA BONATTI.

RESUMEN

Los mecanismos autoinmunitarios son la base de muchas enfermedades, algunas de las cuales son específicas de órgano como por ejemplo las que afectan a la glándula tiroides; éstas presentan diferentes cuadros clínicos, algunas son insidiosas, otras no tienen síntomas específicos en los estadíos iniciales de su desarrollo. Por eso es importante detectar la autoinmunidad a través de la respuesta humoral, los autoanticuerpos.

Los autoanticuerpos antitiroideos más significativos son: antitiroglobulina, antimicrosomal o antiperoxidasa tiroidea y anticuerpo contra el receptor de TSH.

El objetivo de este trabajo es verificar la relación que tienen los anticuerpos anti tiroperoxidasa (anti TPO) con el sexo y la edad y la posible correlación de los mismos con el valor de la TSH (hormona estimulante de la tiroides), con los datos obtenidos en un laboratorio de análisis clínicos privado de la ciudad de San Miguel de Tucumán, durante el año 2000.

Se seleccionaron 222 pacientes (169 mujeres (76 %) y 53 hombres (24 %)) que acudieron a un laboratorio privado a realizarse análisis de anticuerpo anti TPO y TSH.

Los resultados mostraron una alta prevalencia de dichos anticuerpos en las mujeres respecto a los hombres y dentro de aquéllas el mayor porcentaje correspondió a las mayores de 35 años de edad. También se observó que existe una relación entre anti TPO y TSH, pero hay otros factores que afectan a los anticuerpos aunque éstos no fueron analizados en este trabajo.

INTRODUCCION

Los desórdenes tiroideos autoinmunes están asociados con la presencia de anticuerpos circulantes que reaccionan con el antígeno tiroideo microsomal, una proteína de membrana principalmente localizada en el citoplasma apical y en la membrana plasmática de las células foliculares tiroideas (1).

Hay evidencias que indican que la peroxidasa tiroidea (TPO) es el principal componente del antígeno microsomal reconocido por autoanticuerpos (2, 3, 4).

El anti TPO es un anticuerpo dirigido contra la enzima peroxidasa tiroidea. Esta enzima cataliza la yodación de la tirosina durante la biosíntesis de las hormonas tiroideas T_3 y T_4 (5). Los anticuerpos anti TPO bloquean a la peroxidasa tiroidea y producen serias alteraciones en la producción de las hormonas correspondientes. Este bloqueo puede ser de mayor o menor grado, pero mientras existan los anticuerpos anti TPO, existe la alteración en la biosíntesis hormonal. Es la causa más frecuente de hipotiroidismo

Históricamente, estos anticuerpos se llamaban anticuerpos anti microsomales (AM), porque ellos se unen a la porción microsomal de la célula tiroidea.

El anti TPO está presente en el suero de casi todos los pacientes con tiroiditis de Hashimoto, en éste el mandante es el anticuerpo anti TPO éste es citotóxico y va llevando a la destrucción de la glándula tiroidea. La tiroiditis de Hashimoto se considera que es el resultado de la respuesta inmune que lleva a una infiltración aberrante de células linfoideas, autoantígenos específicos y destrucción de los folículos tiroideos. Los linfocitos intratiroideos son tanto T y B, con predominio del subtipo Th_1, aunque las células Th_2 y también están presentes (6, 7, 8) en más del 70 % de pacientes con enfermedad de Graves; el mandante en el Graves es el anticuerpo contra el receptor de TSH; y en grado variable en pacientes con enfermedades autoinmunes no tiroideas y en sujetos normales. La enfermedad tiroidea autoinmune es un desorden común especialmente en las mujeres, y factores ambientales y genéticos están involucrados en su patogénesis (9,10) Las enfermedades tiroideas autoinmunes se caracterizan por la infiltración leucocitaria de la glándula tiroides acompañada por la detección de autoanticuerpos séricos contra los antígenos tiroideos, entre los que se encuentran los anticuerpos anti TPO (11). Estos anticuerpos fueron independientemente identificados por diversos autores y con diferentes técnicas (12, 13, 14). Hay una buena correlación entre el grado de infiltración leucocitaria y el título de anti TPO (15).

Las enfermedades tiroideas autoinmunes más comunes son: la tiroiditis crónica linfocítica (tiroiditis de Hashimoto) y la enfermedad de Graves. El término tiroiditis designa un grupo heterogéneo de enfermedades tiroideas con etiología y cuadro clínico diferente, que presentan como característica común la inflamación de la glándula tiroidea por células inflamatorias.

Para diagnosticar la tiroiditis crónica, la detección del anti TPO es más sensible que la determinación de los otros anticuerpos anti tiroideos; el 80 – 90 % de los pacientes con tiroiditis crónica presentan anticuerpos anti TPO (16); es decir que este anticuerpo es el sello de la respuesta humoral en la tiroiditis de Hashimoto.

Se pensó que factores ambientales y genéticos (9, 10) están involucrados en la patogénesis de estas enfermedades tiroideas autoinmunes y un estudio familiar mostró una alta prevalencia de autoanticuerpos antitiroideos tanto en adultos como en niños afectados por las enfermedades tiroideas autoinmunes (17).

En un trabajo realizado por los griegos Stelios Fountaulakis y Agathocles Tsatsoulis (9) ellos formularon una hipótesis modificada de la patogénesis de la enfermedad autoinmune, que observamos en el diagrama I.

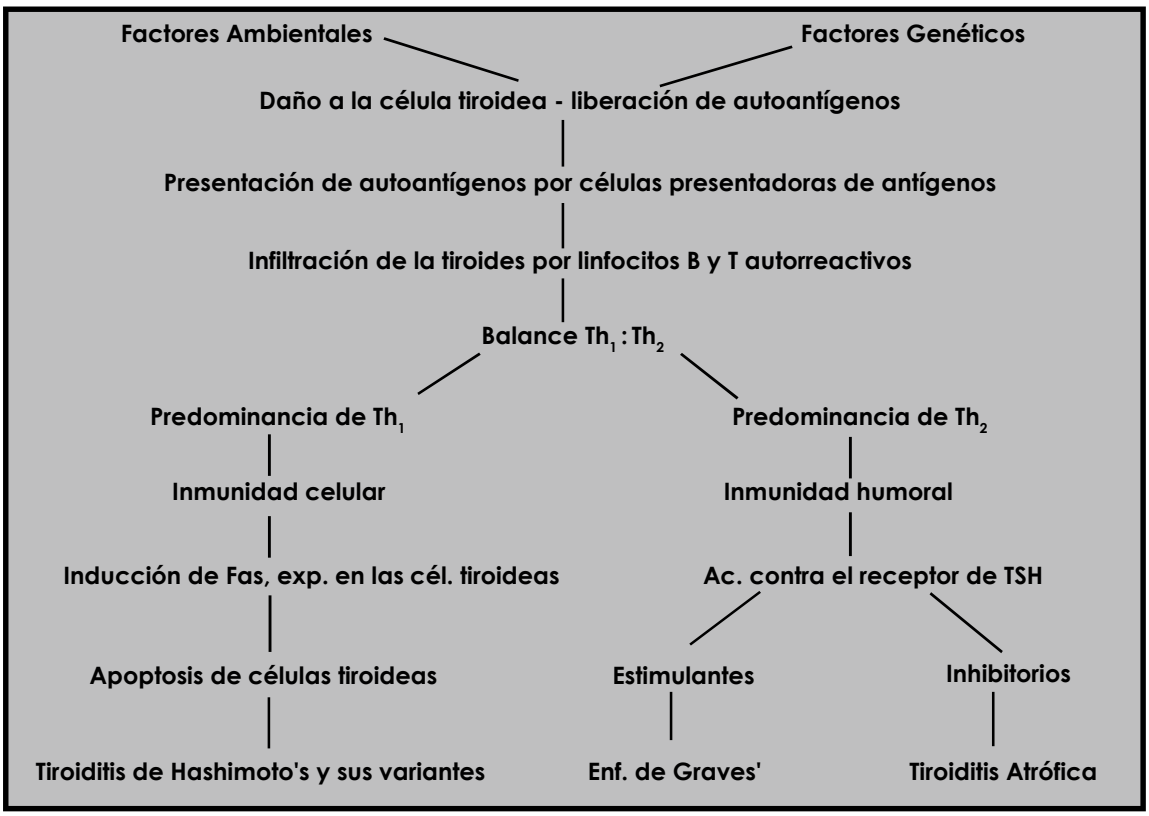


Diagrama I - Fuente: Clin Endocrinol 2004, 60 (4): 397-409, Blackwell Publishing

Los factores ambientales incluyendo el exceso de yodo y los factores genéticos causan el daño de la célula tiroides y la liberación de autoantígenos. Las células presentadoras de antígeno son llamadas, y presentan los autoantígenos a las células inmunes. Se produce una respuesta inmune aberrante que lleva a una reacción inmune inapropiada y excesiva en lugar de reforzar la tolerancia inmune hacia los autoantígenos. Consecuentemente, los linfocitos T y B autorreactivos acumulados en gran número infiltran el parénquima tiroideo, entonces la glándula tiroides se convierte en un campo de batalla, con invasión de linfocitos por un lado y la defensa de las células tiroideas por el otro, luchando por sobrevivir. El resultado de esta batalla determina la expresión fenotípica de la enfermedad que es enormemente dependiente del balance entre Th_1 y Th_2 y el diferente perfil de citoquinas inflamatorias liberadas en el microambiente local.

Una respuesta predominante de Th_1 favorece la inmunidad celular facilitando un ambiente proapoptótico para las células tiroides. Los caminos dependientes de Fas y/o TRAIL son activados por las citoquinas inflamatorias tipo Th_1 y la célula tiroides sufre apoptosis llevando al Hashimoto o sus variantes (silente).

Un fenotipo predominantemente Th_2 que favorece la inmunidad humoral, induce a los linfocitos B a producir anticuerpos contra el receptor de la TSH y crear un potencial antiapoptótico para las células tiroides en un medio proapoptótico para los linfocitos intratiroideos. Si prevalecen los anticuerpos estimulatorios contra el receptor de TSH sobreviene hiperplasia, hiperfunción de las células tiroideas llevando al hipertiroidismo del Graves.

Si predominan los anticuerpos inhibitorios contra el receptor de TSH, las células tiroideas se atrofian, se desarrolla hipofunción, llevando a la tiroiditis atrófica.

Un viejo estudio del año 1962 mostró que los padres pueden transmitir la predisposición para producir autoanticuerpos antitiroideos (18). Un estudio posterior indicó que se heredaba en forma autosómica de las madres afectadas pero no de los padres afectados (19).

Un trabajo sobre susceptibilidad específica de sexo demostró que el sello materno o paterno puede modular el riesgo genético de un individuo para contraer enfermedades tiroideas autoinmunes. Badenhoop y col., demostraron que la región DQ del antígeno leucocitario humano (HLA) confiere susceptibilidad para las enfermedades tiroideas autoinmunes (20). La asociación de HLA DR – DQ no es específica para la autoinmunidad tiroidea; ciertos alelos también afectan el riesgo para otras enfermedades autoinmunes tales como diabetes tipo1, artritis reumatoidea, enfermedad celíaca y enfermedad de Addison.

Recientemente (21) se demostró el alto riesgo para enfermedades tiroideas autoinmunes juveniles, en hijos de padres con anticuerpos anti TPO positivos y que transmitían un haplotipo HLA DR3 DQ2 a sus hijos con enfermedades tiroideas autoinmunes. Es decir que la combinación del perfil inmunogenético y del estado de los anticuerpos antitiroideos en los padres, aumentaría el riesgo de enfermedades tiroideas autoinmunes en la descendencia.

La capacidad de un individuo para desarrollar autoanticuerpos anti TPO pareciera que se transmite verticalmente (22) y es compatible con la transmisión autosómica dominante de un gen principal dentro de un soporte poligénico.

Con respecto a los factores ambientales postulados para inducir las enfermedades autoinmunes incluyen: Iodo, drogas (amiodarona, IFNa) y organismos infecciosos. Se ha sugerido que los anticuerpos en repuesta a ciertos agentes infecciosos, por ejemplo la Yersinia enterocolítica puede también reaccionar con las células proteicas humanas debido a su parecido estructural (mecanismo de imitación molecular) (23, 24 y 25).

En contraste con el Hashimoto, que se caracteriza por la destrucción celular tiroidea e hipotiroidismo, la enfermedad de Graves se manifiesta por una hiperplasia celular tiroidea e hipertiroidismo, no obstante la evidencia clara de autoinmunidad. Histológicamente en el Graves la infiltración linfocitaria de la tiroides es mediana y el número de células apoptóticas es bajo, esto a su vez puede deberse al perfil diferente de las citoquinas secretadas en el micro ambiente local por diferentes subgrupos de linfocitos infiltrantes. En el Graves, parece haber una producción dominante de citoquinas inflamatorias Th_2, en contraste a la Th_1 que predominan en el Hashimoto; probablemente como resultado de una coestimulación de linfocitos infiltrantes B7-2 (26, 6, 27 y 28). En el Hashimoto se secreta IL-2, TNFa, IFNg; y en el Graves se secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10.

En la tiroiditis atrófica autoinmune también hay anticuerpos contra el receptor de TSH pero a diferencia del Graves que son estimulantes, son anticuerpos inhibitorios del receptor de TSH (29, 30), la atrofia se debería entonces, a la falta del efecto trófico de la TSH (31).

Finalmente, las otras formas de tiroiditis crónica autoinmune silente (posparto o esporádica) se parece al Hashimoto pero el grado de infiltración linfocitaria es mediano. (32)

Parece que ocurre una fase inicial con destrucción de las células tiroideas debido a apoptosis o necrosis, llevando a tirotoxicosis mediana, pero esta fase destructiva es transitoria y no persistente como en el Hashimoto. La fase destructiva generalmente es seguida por una fase de recuperación durante la cual puede ocurrir un hipotiroidismo temporario. Sin embargo, la función tiroidea vuelve a la normalidad en la mayoría de los pacientes, aunque un pequeño número puede desarrollar un Hashimoto.

El objetivo del presente trabajo es verificar la relación que tienen los anticuerpos antiperoxidasa tiroidea con el sexo y la edad y la posible correlación de los mismos con el valor de la TSH.

La investigación consiste en la medición de los anticuerpos anti TPO y de la TSH, y se usan herramientas de estadística para inferir relaciones.

MATERIALES Y METODOS

El estudio incluyó 222 pacientes, 169 mujeres (76 %) y 53 hombres (24 %). Los pacientes fueron agrupados por edad. La distribución de la población en estudio se detalla en las Tabla I y II

	n	%
Hipotiroideos	105	47
Hipertirpideos	15	7
Eutiroideos	10	46
TOTAL	222	100

Tabla I - Distribución de la población en estudio de acuerdo al estado tiroideo

	Hipotiroideos	Hipertiroideos	Eutiroideos	Total
Mujer	**97** (92 %)	**15** (100 %)	**57** (56 %)	**169** (76 %)
Varones	**8** (8 %)	**0** (0 %)	**45** (44 %)	**53** (24 %)
TOTAL	**105** (100 %)	**15** (100 %)	**102** (100 %)	**222** (100 %)

Tabla II - Distribución de la población en estudio referido al sexo

Todos los casos fueron diagnosticados por médicos endocrinólogos. Los 102 pacientes eutiroideos manifestaron al interrogatorio en el Laboratorio, no presentar antecedentes de enfermedad tiroidea alguna; y concurrieron al mismo para efectuar por primera vez un dosaje de anti TPO y TSH enviados por sus médicos especialistas, quienes sospecharon la existencia de enfermedad tiroidea autoinmune.

Los pacientes Hipo e Hipertiroideos acudieron al Laboratorio para controlar el estado de su función tiroidea.

A todos los pacientes se les extrajo muestras de sangre para determinar en el suero anticuerpos anti TPO y TSH. En todos los casos se usó suero fresco.

Determinación de anticuerpo anti TPO

Para la determinación de anticuerpo anti TPO se utilizó un equipo comercial marca BYOCODE. Es un ensayo en fase sólida. El principio se basa en la competición entre un anticuerpo monoclonal anti TPO pegado al tubo y el autoanticuerpo anti TPO presente en el suero del paciente, por el TPO marcado con ^{125}I. La cantidad de radioactividad unida al tubo es inversamente proporcional (RIA) a la concentración de autoanticuerpo anti TPO presente en la muestra del paciente. Los resultados se expresan en UI/ml.

Técnica

- Pipetear 25 ml de standard, control y muestra en el tubo correspondiente.
- Agregar a cada tubo 200 ml de **^{125}I.**
- En el tubo de las totales pipetear solamente 200 ml del trazador y no participa de los pasos siguientes.
- Incubar una hora a temperatura ambiente en agitador horizontal.
- Aspirar cuidadosamente la solución de los tubos.
- Agregar 2 ml de solución de lavado a cada tubo.
- Aspirar inmediatamente la solución de lavado.
- Contar la radioactividad pegada en cada tubo en un contador Gamma.
- Graficar B/B_0 % vs concentración de anticuerpo anti TPO en UI/ml.
- La concentración de las muestras se saca de una curva que se construye con los diferentes standards.

Sensibilidad analítica

2 UI/ml; indicada por el fabricante del equipo de análisis.

Sensibilidad funcional

14,6 UI/ml , con un CV = 20 %; indicada por el fabricante del equipo de análisis.

Valores de referencia

Hasta 20 UI/ml; indicada por el fabricante del equipo de análisis. Esta concentración de anticuerpos que tienen los individuos normales constituiría el nido inmunológico que se necesita para mantener la vigilancia inmunológica y esto es coincidente con los criterios modernos de inmunidad que postulan que permanentemente nuestro sistema inmunológico está fabricando anticuerpos contra las estructuras propias y ajenas, y los procesos contra lo propio se frenan.

Determinación de TSH sérica

La TSH sérica se determinó por quimioluminiscencia usando un equipo ACCESS (Sanofi Pasteur). El ensayo es enzimoinmunométrico de 2 lugares (sandwich). La emisión de fotones es proporcional a la cantidad de conjugado enzimático fijado al soporte sólido. La concentración del analito en la muestra se determina con una curva de calibración.

Sensibilidad analítica

0,003 mUI/ml; indicada por el fabricante del equipo de análisis.

Sensibilidad funcional

0,01- 0,02 mUI/ml, con un CV = 20%; indicada por el fabricante del equipo de análisis.

Valores de referencia

Se considera Normal hasta un valor = 4mUI/ml; indicada por el fabricante del equipo de análisis.
En este estudio se consideró hipertiroidismo cuando el valor de la TSH fue menor a 0,1mUI/ml.
El hipotiroidismo fue definido cuando el valor de la TSH fue mayor a 4 mUI/ml.
El anticuerpo anti TPO se consideró positivo cuando el valor del mismo superó las 20 UI/ml.
Los valores medidos en este estudio se observan en la Tabla III
El valor medio de TPO en los Eutiroideos está ligeramente elevado por que hubo 6 casos de autoinmunidad pura, como se explica en la discusión

Estudios estadísticos realizados

Se calculó la media con su correspondiente desviación standard; se hizo la clasificación múltiple de los casos estudiados. Se realizó un análisis de regresión múltiple con el software Econométrico Eviews 4.1 entre las variables anti TPO, TSH, sexo y edad. La variable sexo es dicotómica, toma el valor 1 para el sexo masculino y 0 para el sexo femenino. La edad se mide en años completos.

Tabla III - Valores medidos en este estudio. 222 mediciones para cada parámetro.

		TSH		TPO	
	n	x	(DS)	x	(DS)
Hipotiroideos	105	24,209	(12,77)	648,362	(668,273)
Hipertiroideos	15	0,015	(0,017)	1.718,000	(1.611,990)
Eutiroideos	102	1,648	(0,546)	38,156	(82,472)

RESULTADOS

En la Tabla IV observamos una prevalencia de anti TPO alto de 14 % en mujeres de 10 a 34 años de edad y de 7,7 % en varones de la misma edad. El porcentaje para las mujeres es significativamente mayor que para los hombres.

Para los comprendidos entre 35 a 50 años, la prevalencia de anti TPO mayor a 20 UI/ml fue de 28,6 % en las mujeres y 11,8 % en los varones (Tabla V). Esta diferencia también es muy significativa.

La correspondiente prevalencia de anti TPO mayor a 20 UI/ml, para mayores a 50 años fue de 28,6 % en las mujeres y 26,7 % en los varones (Tabla VI). Aquí no encontramos diferencias en el TPO entre los sexos, probablemente debido a que cuando aumenta la edad aumenta el número de TPO positivos en los hombres.

Al analizar la prevalencia de toda la población eutiroidea, clasificada por sexo, en las mujeres fue de17,5 % y en los varones de 15,6 % (Tabla VII).

De todos los casos observados surge que la mayor prevalencia de anticuerpos anti TPO positivos, correspondió a mujeres y dentro de éstas a las que sobrepasaron los 35 años, lo cual es coincidente con la bibliografía (18, 20).

En ambos sexos la prevalencia de anti TPO mayor a 20 UI/ml, aumenta con la edad.

Se puede realizar una regresión múltiple entre anti TPO, TSH, EDAD y SEXO de los pacientes eutiroideos, para verificar la relación entre estas variables. Los resultados los observamos en la Tabla VIII (valores de **t** entre paréntesis).

TPO	Mujeres		Varones	
en UI/ml	≤ 20	> 20	≤ 20	> 20
Casos	37	6	12	1
Porcentaje	86,0 %	14,0 %	92,3 %	7,7 %
Desv.Est. DS	3,8 %	3,8 %	6,9 %	6,9 %

Tabla IV - Pacientes eutiroideos, entre 10 y 34 años de edad clasificados según anti TPO y sexo

TPO	Mujeres		Varones	
en UI/ml	≤ 20	> 20	≤ 20	> 20
Casos	5	2	15	2
Porcentaje	71,4 %	28,6 %	88,2 %	11,8 %
Desv.Est. DS	9,4 %	9,4 %	6,1 %	6,1 %

Tabla V - Pacientes eutiroideos, entre 35 y 50 años de edad clasificados según anti TPO y sexo

TPO	Mujeres		Varones	
en UI/ml	≤ 20	> 20	≤ 20	> 20
Casos	5	2	11	4
Porcentaje	71,4 %	28,6 %	73,3 %	26,7 %
Desv.Est. DS	9,4 %	9,4 %	6,5 %	6,5 %

Tabla VI - Pacientes eutiroideos, mayores de 50 años de edad clasificados según anti TPO y sexo

TPO	Mujeres		Varones	
en UI/ml	≤ 20	> 20	≤ 20	> 20
Casos	47	10	38	7
Porcentaje	82,5 %	17,5 %	8,2 %	11,8 %
Desv.Est. DS	3,3 %	3,3 %	3,7 %	3,7 %

Tabla VII - Pacientes eutiroideos, clasificados según anti TPO y sexo (sobre un total de 57 mujeres y 45 hombres, todoseutiroideos)

Anti TPO =	-12,22	+ 39,30 * TSH	-34,88 * EXO	+0,11 * EDAD
	(-0,45)	(5,30)	(-1,72)	(0,15)
				R^2 = 0,25
				G.L. = 98

Tabla VIII - Regresión múltiple entre anti TPO, TSH, edad y sexo

Se aprecia una relación positiva muy significativa con la variable TSH; las mujeres tienen un valor medio de anti TPO mayor que los hombres y significativo (SEXO=0 para mujeres); con la EDAD la relación es positiva pero no significativa.

El coeficiente de determinación (R^2) bajo, indica que hay otras variables en juego que no fueron consideradas en este trabajo y son importantes para explicar los valores de anti TPO.

Al analizar los pacientes hiper e hipotiroideos la prevalencia de anti TPO mayor a 20 UI/ml, es del 100 %

En mujeres eutiroideas, el valor medio de la TSH fue de 1,68 μUI/ml y la DS= 0,61. En hombres eutiroideos, el valor medio de la TSH fue de 1,60 μUI/ml y la DS= 0,44. En los hipotiroideos el valor medio de la TSH fue de 23,90 μUI/ml y la DS= 12,92 para las mujeres, y para los varones el valor medio de la TSH fue de 27,88 μUI/ml y la DS= 10,16, con lo que se demuestra que no hubo diferencias entre sexos.

La prevalencia de valores patológicos para TSH según el sexo fue:

Mujeres

- TSH ≥ 10 μUI/ml: 52,07 % (88 casos)
- TSH = 4,1- 9,9 μUI/ml: 5,33 % (9 casos)
- TSH < 4 μUI/ml: 42,60 % (72 casos)

Hombres

- TSH ≥ 10 μUI/ml: 15,09 % (8 casos)
- TSH = 4,1- 9,9 μUI/ml: 0 % (0 casos)
- TSH < 4 μUI/ml: 84,91% (45 casos)

En la población femenina hubo 30 pacientes (17,75 %) con anti TPO > 1000 UI/ml. De estos pacientes 10 fueron diagnosticados como hipertiroideos (33,33 %) y los 20 restantes fueron hipotiroideos (66,67 %). En la población masculina hay un solo paciente cuyo anti TPO supera las 1000 UI/ml y fue diagnosticado como hipotiroideo.

En las mujeres el porcentaje más alto, el 52,07 % (88 casos sobre un total de 169) de anti TPO positivos, se vieron con valores de TSH > 10 μUI/ml. El porcentaje más bajo, el 5,33 % (9 casos sobre un total de 169) de anti TPO positivos correspondieron a pacientes con TSH entre 4,1 – 9,9 μUI/ml. Con TSH < 4 μUI/ml se observó un porcentaje de 13,61 % (23casos sobre un total de 169). El 29 % restante (49 casos sobre un total de 169), presentó un anti TPO ≤ 20 UI/ml.

En el caso de los hombres, el porcentaje de anti TPO positivos, fue de 15 % (8 casos sobre un total de 53) y siempre se dio con TSH > 10 μUI/ml.

DISCUSION

Los resultados presentados muestran una mayor prevalencia de anticuerpos anti TPO positivos en las mujeres respecto a los varones, lo que está de acuerdo con la bibliografía.

En las mujeres eutiroideas (57 casos) hemos observado que 6 de ellas presentaron la situación llamada por Niepomniszcze, H (33)), autoinmunidad pura, que se caracteriza por presentar anticuerpos circulantes pero que no tiene evidencia clínica o bioquímica de alteración tiroidea. Las 51 mujeres restantes presentaron valores de anti TPO ≤ 20 UI/ml y no mostraron alteración alguna en la función tiroidea, o sea que realmente no tenían antecedentes de enfermedad.

En el caso de los hombres en estudio, todos los que mostraron normalidad en la función tiroidea no tuvieron anticuerpos circulantes.

En el caso de las mujeres hipotiroideas (97 casos, 92 %), hubo 9 con TSH levemente aumentada (menor de 10 mUI/ml) y allí obtuvimos valores de anti TPO hasta 600 UI/ml como máximo.

Las mujeres que presentaron una clínica florida de insuficiencia tiroidea, en general mostraron títulos de anti TPO mayores a 300 UI/ml.

Hubo 20 mujeres con un valor de anti TPO francamente alto (mayor a 1000 UI/ml), que presentaron un hipotiroidismo severo; es posible pensar que la glándula claudicó y entró en proceso de atrofia.

De las 15 mujeres diagnosticadas como hipertiroideas, 10 presentaron valores de anti TPO muy alto (mayor a 1000 UI/ml).

El anticuerpo anti TPO es el componente humoral en la tiroiditis de Hashimoto, pero este anticuerpo también se encuentra presente en la enfermedad de Graves (32, 11, 14, 15, 21, 34) y en la tiroiditis crónica asintomática (35).

Por otro lado la diabetes mellitus tipo 1 se asocia frecuentemente con enfermedades tiroideas autoinmunes: Chang y col. (36), investigaron la prevalencia de anticuerpos anti TPO en pacientes diabéticos tipo 1 encontrando un 21,8 % de positividad.

Maugendre y col. (37) encontraron un 17 % de pacientes con anticuerpos anti TPO positivos en una población de 258 personas diabéticas, sugiriendo que la determinación de anticuerpos anti TPO por un método altamente sensible permite identificar a los pacientes diabéticos con autoinmunidad tiroidea y con riesgo de un daño posterior en la función de la glándula tiroides. Otros autores (38) demostraron que los pacientes con anticuerpos anti TPO positivos tenían anticuerpos anti islotes (ICA) positivos, lo que sugiere que la autoinmunidad tiroidea debe ser parte del screening inicial de la diabetes mellitus insulino dependiente, especialmente cuando el paciente es anciano y en el inicio de la enfermedad.

También se ha encontrado un 38 % de positividad para el anticuerpo anti TPO en niños con diabetes mellitus insulino dependiente (39), lo cual habla de la importancia de la detección precoz para la enfermedad tiroidea en pacientes con aquella endocrinopatía. Un estudio muy reciente (40) evalúa la prevalencia de anticuerpo anti TPO y enfermedad tiroidea en niños con diabetes tipo 1 recientemente diagnosticada, mostrando una positividad para el anticuerpo anti TPO del 29,4 %; este resultado justifica la necesidad de un amplio screening para desórdenes tiroideos en todos los niños con diabetes tipo 1 recientemente diagnosticada.

Asimismo en otro estudio realizado en mujeres embarazadas con diabetes mellitus insulino dependiente, que tenían un test positivo para anticuerpo anti TPO antes de la gestación (41), se vio que tenían una alta prevalencia de hipotiroidismo y un control metabólico pobre durante el embarazo, por lo cual se recomendaba hacer la determinación del anticuerpo anti TPO antes del embarazo, y aquellas que tenían un resultado positivo debían ser estrictamente controladas durante el embarazo y aún en el período post parto.

La tiroiditis post parto es una disfunción tiroidea que es causada por una tiroiditis destructiva autoinmune, que afecta alrededor del 5 % de las mujeres durante el primer año post parto (42) y que se caracteriza entre otras manifestaciones, por la elevación de los anticuerpos anti TPO (43). Hay autores que demostraron que el 50 % de las mujeres con anticuerpos anti TPO positivos durante el embarazo, desarrollaron tiroiditis post parto (44). Aunque las anormalidades clínicas y bioquímicas son pasajeras, un número importante de mujeres (25 – 30 %) desarrollan hipotiroidismo tempranamente, y un porcentaje similar lo hace más tardíamente.

Según otros autores (45), sólo se volvían hipotiroideas aquellas mujeres que tenían anticuerpos anti TPO positivos y desarrollaban tiroiditis post parto. Es claro que el efecto de este tipo de tiroiditis no sólo se refiere al período post parto inmediato, y subraya la necesidad de vigilar durante un tiempo prolongado a las pacientes que tenían anticuerpos anti TPO positivos y desarrollaban tiroiditis post parto. También existe el riesgo de desarrollar tiroiditis post parto después de sucesivos embarazos.

Bonds y col. (46), demostraron la utilidad, en términos de costo-beneficio, de determinar antes del embarazo la presencia de anticuerpos anti TPO para predecir la tiroiditis post parto. También se ha estudiado la presencia de estos anticuerpos en mujeres con pérdidas recurrentes de embarazo (47), haciendo pensar que estos anticuerpos serían

marcadores de activación autoinmune y estarían asociados con riesgo aumentado de pérdida de embarazo. En el trabajo de Mecacci y col. (48), se confirma la asociación entre autoinmunidad tiroidea y complicaciones obstétricas.

Aunque la tiroiditis post parto generalmente es transitoria, esta condición y los anticuerpos anti TPO positivos, podrían asociarse con una sintomatología significativa. Por ello el screening de los anticuerpos antes del embarazo contribuiría a un mejor manejo de la mujer en el período post parto (49).

Smyth y col. (50), describieron que un 34 % de pacientes con cáncer de mama tenían anticuerpos anti TPO positivos vs. 18 % del grupo control, o sea que existía una enfermedad tiroidea autoinmune subclínica en una proporción de mujeres con cáncer de mama. Estos autores demostraron en un análisis de supervivencia que la positividad del anticuerpo anti TPO estaba asociada con mejor resultado en lo que respecta al cáncer; esto indirectamente indicaría que las pacientes con cáncer de mama y coincidentemente con enfermedad tiroidea podían tener buen pronóstico. Aunque no hay una explicación definitiva para esto hallazgos, esto evidenciaría un vínculo biológico entre cáncer de mama y enfermedad tiroidea.

También se observó que en zonas con serias deficiencias en selenio, hay una alta incidencia de tiroiditis, debido a la disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa selenio dependiente, en el interior de la glándula tiroidea (51). Las enzimas selenio dependientes ejercen efectos modificadores sobre el sistema inmune. Así la sustitución con selenio a los individuos con tiroiditis autoinmune, les produce una reducción importante en la positividad de los anticuerpos anti TPO (de 100 % de positividad disminuye al 63,6 %). O sea que esta sustitución con selenio tiene un impacto significativo sobre la actividad inflamatoria en la enfermedad tiroidea autoinmune.

De todo lo expuesto podemos inferir la importancia que tiene el screening de anticuerpos anti TPO, no sólo en la enfermedad tiroidea sino también en otras patologías. Cuando hay anticuerpos anti TPO, el yodo no puede unirse a la tirosina, por lo tanto no hay síntesis de T_3 ni T_4 y una vez que se agota la tiroglobulina almacenada en el organismo, la T_3 y T_4 no salen a la circulación, por consiguiente se eleva la TSH, se sobre estimula la glándula tiroides y tenemos un hipotiroidismo.

Por otra parte los anticuerpos anti tiroideos producen una autoagresión y hay una reacción defensiva del organismo a nivel de la glándula tiroides; hay un aumento de linfocitos y eosinófilos (reacción inflamatoria), fibrosis y lesiones en la glándula tiroides.

Finalmente de este trabajo surge como conclusión la importancia de los anticuerpos anti TPO como un marcador de la insuficiencia tiroidea futura, considerando la correlación positiva entre los valores de TSH y el título de anticuerpos anti TPO en personas eutiroideas.

Agradecimientos

A la Dra. María Eugenia Bibas Bonet por su esmerada dirección, al Dr. Juan Mario Jorrat por su aporte en el manejo estadístico de los datos y la Bioquímica Especialista en Endocrinología Paula Parnás por su invalorable ayuda.

Bibliografia

1. KHOURY E. L., BOTTAZZO G. F., ROITT I. M. The thyroid "microsomal" antibody revisited. Its paradoxical binding in vivo to the apical surface of the follicular epithelium J. Exp. Med. (1984), Vol.159: 577-591.
2. MARIOTTI S., ANELLI S., RUF J., BECHI. R., CZARNOCKA B., LOMBARDI A., CARAYON P., PINCHERA A. Comparison of serum thyroid microsomal and thyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases J. Clin. Endocrinol. Metab. (1987) ,Vol. 65, Nº 5: 987 – 993
3. NAKAJIMA Y., HOWELLS R. D., PEGG C., DAVIES JONES E., REES SMITH B. Structure -activity analysis of microsomal antigen/thyroid peroxidase. Molecular and Cellular Endocrinology. (1987) ,53:15
4. PINCHERA A., MARIOTTI S., CHIOVATO L., VITTI P., LOPEZ G., LOMBARDI A., ANELLI S., BECHI R., CARAYON P. Cellular localization of the microsomal antigen and the thyroid peroxidase antigen. Acta Endocrinol (Copenh) (1987) , Vol 281:57 -62
5. CZARNOCKA B., RUF J., FERRAND M., et al. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyrois diseases. FEBS lett. (1985), Vol. 190:147-152.
6. ROURA-MIR C., CATALFANO M., SOSPEDRA M., ALCALDE L., PUJOL-BORREL R., JARAQUEMADA D. Single cell analysis of intrathyroidal limphocytes shows differential citokine expression in Hashimoto's and Graves's disease. European Journal of Immunology. (1997), Vol. 27:3290-3302l.
7. BATTIFORA M., PESCE G., PAOLIERI F., FIORINO N., GIORDANO C., RICCIO A. M., TORRE G., OLIVE D., BAGNASCO M. B7-1 co-stimulatory molecule is expressed on thyroid follicular cells in Hashimoto's thyroiditis, but not in Graves' disease. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, (1998).Vol. 83, (11) : 4130-4139.
8. BLÜHER M., KROHN K., WALLASCHOFSKI H., BRAVERMAN L. E., PASSCHKE R., Cytokine gene expression in autoimmune thyroiditis in BioBreeding/ Worcester rats. Thyroid, (1999). Vol. 9:1049-1055.
9. FOUNTOULAKIS S., TSATSOULIS A., On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. Clin. Endocrinol. (2004).Vol. 60 (4): 397- 409.
10. STRIEDER T. G. A., PRUMMEL M. F., TIJSSEN J. G. P., ENDERT E., WIERSINGA W. M. Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. Clinical Endocrinology. (2003),Vol. 59: 396-401.
11. RAPOPORT B., MC LACHLAN S. M., Thyroid autoimmunity, J. Clin. Invest. (2001), Vol.108:1253-1259.
12. PORTMAN L., HAMADA N., HEINRICH G., DE GROOT L. J. Anti – thyroid peroxidase antibody in patients with autoimmune thyroid disease: possible identity with anti-microsomal antibody. J. Clin. Endocrinol. Metab., (1985),Vol. 61:1001-1003
13. KOTANI T., UMEKI K., MATSUNAGA S., KATO E., OHTAKI S., Detection of autoantibodies to thyroid peroxidase in autoimmune thyroid diseases by micro - ELISA and immunoblotting. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1986), Vol. 62:928-933.
14. D'HERBOMEZ M., SAPIN R., GASSER F., SCHLIENGER J. L., WARMEAU J. L., Two-center evaluation of eight kits for antithyroid peroxidase autoantibodies determinations. Ann. Biol. Clin. (Paris). (2000), Vol. 58 (4):445-451.
15. INUKAI T., TAKEMURA Y., Anti-thyroid peroxidase antibody. Nippon Rinsho. (1999) ,Vol. 57 (8):1819-1823
16. KOTANI T. Anti-TPO autoantibodies. Rinsho Byori, (1998),Vol. 46 (4):324-330.
17. PAULS D. L., ZAKARIJA M., MCKENZIE J. M., EGELAND J. AComplex segregation analysis of antibodies to thyoroid peroxidase in Old Order Amish families. Am. J. Med. Genet. , (1993), Vol.47: 375-379.
18. HALL R., SAXENA K. M., OWEN S. GA. Study of the parents of patients with Hashimoto's disease. Lancet. (1962), Vol. 2: 1291-1292.
19. PHILLIPS D., PRENTICE L., UPADHYAYA M., LUNT P., CHAMBERLAIN S., ROBERTS D. F., MC LACHLAN S., SMITH B. R. Autosomal dominant inheritance of autoantibodies to thyroid peroxidase and thyroglobulin-studies in families not selected for autoimmune thyroid disease. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1991), Vol. 72: 973-975.

20. BADENHOOP K., WALFISH P. G., RAU H., FISCHER S., NICOLAY A., BOGNER U., SCHLEUSENER H., USADEL K.H Susceptibility and resistance alleles of human leukocyte antigen (HLA) DQA1 and HLA DQB1 are shared in endocrine autoimmune disease. J. Clin. Endocrinol. Metab (1995), Vol. 80: 2112-2117.
21. SEGNI M., PANI M. A., PASQUINO A. M., BADENHOOP K. Familial clustering of juvenile thyroid autoimmunity: higher risk is conferred by human leukocyte antigen DR3-DQ2 and thyroid peroxidase antibody status in fathers. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2002) ,Vol. 87:3779-3782
22. PHILLIPS D. I. W., SHIELDS D. C., DUGOUJON J. M., PRENTICE L., MC GUFFIN P., REES SMITH B. Complex segregation analysis of thyroid autoantibodies: are they inherited as an autosomal dominant trait? Hum. Hered. (1993), Vol. 43:141-146.
23. BAKER J.R. Jr. Autoimmune endocrine disease. Journal of the American Medical Association. (1997), Vol. 278: 1931-19937.
24. CORAPCIOGLU D., TONYUKUK V., KIYAN M., YILMAZ A. E., EMRAL R., KAMEL N., ERDOGAN G. Relationship between thyroid autoimmunity and yersinia enterocolitica antibodies. Thyroid, (2002),Vol. 12: 613-617
25. STRIEDER T. G., WENZEL B. E., PRUMMEL M. F., TIJSSEN J. G., WIERSINGA W. M.. Increased prevalence of antibodies to enteropathogenic Yersinia enterocolitica virulence proteins in relatives of patients with autoimmune thyroid disease. Clinical and Experimental Immunology, (2003), Vol. 132:278-282.
26. DI MATOLA T., MUELLER F., FENZI G., ROSSI G., BIFULCO M., MARZANO L. A., VITALE M. Serum withdrawal- induced apoptosis in thyroid cells is caused by loss of fibronectin – integrin interaction. Journal off Clinical Endocrinology and Metabolism. (2000), Vol. 85: 1188- 1193.
27. BRETZ J. D., ARSCOTT P. L., MIC A., BAKER Jr. Inflammatory cytokine regulation of Fas- mediated apoptosis in thyroid follicular cells. Journal of Biological Chemistry. (1999 a) , Vol. 274: 25433 – 25438.
28. STASSI G., DI LIBERTO D., TODARO M., ZEUNER A., RICCI- VITIANI L., STOPPACCIARA A., RUCO L., FARINA F., ZUMMO G., DE MARÍA R. Control of target cell survival in thyroid autoinmmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. Nature Immunology. (2000), Vol. 1: 483 – 488.
29. REES SMITH B., MC LACHLAN S. M., FURMANIAK J. Auto- antibodies to the thyrotropin receptor. Endocrine Reviews. (1988), Vol.9: 106 – 121.
30. RAPOPORT B., CHAZENBALK G. D., JAUME J. C., MC LACHLAN SM .The Thyrotropin (TSH) receptor: Interaction with TSH and auto-antibodies. Endocrine Reviews. . (1998), Vol. 19: 673 – 716.
31. KAWAKAMI A., EGUCHI K., MATSUOKA N., TSUBOI M., URAYAMA S., KAWABE Y., TAHARA K., ISHIKAWA N., ITO K & NAGATAKI S. Modulation of Fas – Mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by Ig G from patients with Graves' disease (G D) and idiopathic myxoedema. Clinical and Experimental Immunology. (1997), Vol. 110: 434 – 439
32. PEARCE E. N., FARWELL A. P. , BRAVERMAN L. E. Current Concepts: Thyroiditis. New England Journal of Medicine. (2003), Vol. 348: 2646 – 2655.
33. NIEPOMNISZCZE H. Espectro clínico de la tiroiditis autoinmune. Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo (1994), Vol. 31:22-28.
34. GILMOUR J, BROWNLEE Y, FOSTER P, GEEKIE C, KELLY P, ROBERTSON S, WADE E, BRAUN H B, STAUB U, MICHEL G, LAZARUS J H, PARKES A B. The quantitative measurement of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase by automated microparticle based immunoassays in Hashimoto's disease, Graves' disease and follow-up study on postpartum thyroid disease. Clin. Lab. (2000), Vol. 46 (1-2):57-61.
35. RUBELLO D., GASPARONI P., ROTA G., BORSATO N., ZANCO P., CHIERICHETTI F., FERLIN G. Functional meaning of scintigraphic and echographic patterns, and of circulating anti-peroxidase antibodies in asymptomatic chronic thyroiditis. Q. J. Nucl. Med. (1996), Vol. 40 (4): 359- 364.
36. CHANG C. C., HUANG C. N., CHUANG L. M. Autoantibodies to thyroid peroxidase in patients with type1 diabetes in Taiwan. Eur. J. Endocrinol. (1998), Vol. 139 (1): 44- 48.
37. MAUGENDRE D., GUILHEM I., KARACATSANIS C., POIRIER J. Y., LEGUERRIER A. M., LORCY Y., DERRIEN C., SONNET E., MASSART C. Anti-TPO antibodies and screening of thyroid dysfunction in type 1 diabetic patients. Ann. Endocrinol. (Paris). (2000), Vol. 61 (6): 524-530.
38. ABRAMS P., DE LEEUW I., VERTOMMEN J. In new-onset insulin-dependent diabetic patients the presence of anti-thyroid peroxidase antibodies is associated with islet cell autoimmunity and the high risk haplotype HLA DQA1*0301-DQB1* 0302. Belgian Diabetes Registry. Diabet Med. (1996),Vol. 13 (5): 415 –419.
39. LINDBERG B., ERICSSON U. B., LJUNG R., IVARSSON S. AHigh prevalence of thyroid autoantibodies at diagnosisof insulin-dependent diabetes mellitus in Swedish children. J. Lab. Clin. Med. (1997) , Vol. 130 (6): 585- 589.
40. KALICKA-KASPERCZYK A., DZIATKOWIAK H., BARTNIK-MIKUTA A., PITUCH-NOWOROLSKA A., KASPERCZYK K., NAZIM J., SZTEFKO K., STARZYK J. Thyroid peroxidase antibodies and thyroid diseases in children and adolescents with newly diagnosed type 1diabetes. Przegl. LEK. (2002), Vol. 59 (7): 509- 513.
41. FERNANDEZ- SOTO L., GONZALEZ A., LOBÓN J. A., LOPEZ J. A., PETERSON C. M., ESCOBAR JIMENEZ F. Thyroid peroxidase autoantibodies predict poor metabolic control and need for thyroid treatment in pregnant IDDM women. Diabetes Care (1997), Vol.20 (10): 1524-1528.
42. GERSTEIN H. C. How common is postpartum thyroiditis? Arch. Int. Med. (1990),Vol. 150: 1387- 1400.
43. AMINO N, MORI H., IWATANI Y .et al. High prevalence of transient postpartum thyrotoxicosis and hypothyroidism. N. Engl. J. Med. (1982), Vol.306: 849- 852.
44. HARRIS B., OTHMAN S., DAVIES J.A., et al. Association between postpartum thyroid dysfunction and thyroid antibodies and depression. Br. Med. J. (1992) , Vol. 305: 152- 156.
45. PREMAWARDHANA L. D. K. E., PARKES A. B., AMMARI F., JOHN R., DARKE C., ADAMS H., LAZARUS J. H. Postpartum thyroiditis and long-term thyroid status: prognostic influence of thyroid peroxidase antibodies and ultrasound echogenicity. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2000), Vol. 85 (1): 71- 75.
46. BONDS D.E., FREEDBERG K.A. Cost-effectiveness of prenatal screening for postpartum thyroiditis. J. Womens Health Gend Based Med. (2001),Vol. 10 (7): 649- 658.
47. KUTTEH W. H., YETMAN D. L., CARR A. C., BECK L A, SCOTT R. T. Jr. Increased prevalence of antithyroid antibodies identified in women with recurrent pregnancy loss but not in wOMEN UNDERGOING ASSISTED REPRODUCTION. FERTIL. STERIL. (1999), VOL. 71 (5): 843-848.
48. MECACCI F., PARRETTI E., CIONI R., LUCCHETTI R., MAGRINI A., LA TORRE P., MIGNOSA M, ACÁNFORA L., MELLO G. Tthyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. J. Reprod. Immunol. (2000),Vol. 46 (1): 39- 50.
49. LAZARUS J. H., HALL R., OTHMAN S., PARKES A. B., RICHARDS C. J., MC CULLOCH B., HARRIS B. The clinical spectrum of postpartum thyroid disease. Q. J. M. (1996) , Vol. 89 (6): 429- 435
50. SMYTH P. P., SHERING S. G., KILBANE M. T., MURRAY M. J., MC DERMOTT E. W., SMITH D. F., O'HIGGINS N. J. Serum thyroid peroxidase autoantibodies, thyroid volume, and outcome in breast carcinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1998), Vol. 83 (8): 2711- 2716.
51. GÄRTNER R., GASNIER B. C. H., DIETRICH J. W., KREBS B., ANGSTWURM M. W. A. Selenium suplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2002), Vol. 87: 1687- 1691.

Gripe aviar:

el rol del bioquimico frente a una potencial pandemia

Silvina Benetti - Fabián Fay - Oscar Fay
CIBIC Centro de Diagnóstico Médico de Alta Complejidad

Dada la posibilidad de una pandemia de gripe aviar, frente a la cual la probabilidad de que ocurra puede ubicarse entre remota y aceptablemente factible, dependiendo de los parámetros con que se la evalúe, es necesario que los bioquímicos tengamos información referida a como actuar ante la necesidad de tener que realizar el diagnóstico de laboratorio.

Al respecto las autoridades sanitarias argentinas hay alertado y entrenado debidamente a las distintas jurisdicciones de cómo proceder en caso de un posible caso índice. Los laboratorios bioquímicos del sector privado tienen tanta probabilidad como los del sector público de enfrentar ésta circunstancia ante un posible caso de gripe aviar en humanos.

EL VIRUS INFLUENZA

Los virus de influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae y se clasifican en 3 tipos: A, B y C, de acuerdo a diferencias antigénicas en las proteínas estructurales.

El tipo A es el más común. Tiene un extenso rango de huéspedes, incluyendo humanos, cerdos, aves y algunos mamíferos marinos. Estos han sido los responsables de la mayoría de las pandemias.

Los tipos B y C infectan solamente seres humanos (Figura 1). El tipo B provoca epidemias cada 2 o 3 años. El tipo C produce una enfermedad leve similar a un resfrío.

Características del Virus Influenza Orthomyxoviridae

Según sus características antigénicas se dividen en tres tipos A, B, C

Influenza B

solo en humanos

asociados a brotes

Influenza C

solo en humanos

no es importante en salud pública

Figura 1 - Clasificación antigénica de los virus influenza

Virus Influenza

Los virus Influenza A se diferencian en subtipos por las características antigénicas de

- HA 16 subtipos (H1, H2, H3)
- NA 9 subtipos (N1, N2)

Neuraminidase with Sialic acid inhibitor (spacefill) in the proteins active site [9]

Figura 2 - Subtipos de virus de influenza A

Son generalmente redondeados, pero pueden ser largos y filamentosos (Figura 3). El genoma viral consiste de una cadena simple de RNA que está asociada a una nucleoproteína helicoidal (NP). El genoma está dentro de un envoltorio de lipoproteína recubierto por una proteína antigénica M. El envoltorio tiene dos proteínas, la neuraminidasa (NA), que tiene las propiedades enzimáticas que su nombre indica y posee 9 subtipos antigénicos (N1-N9) y la hemaglutinina (HA) que es una glicoproteína que posee 16 subtipos antigénicos. Las variaciones de los antigenos principales HA y NA son las causas de los cambios en la epidemiología de la influenza tipo A. El antígeno H es el responsable de la habilidad del virus para unirse a las células e ingresar y por lo tanto es epidemiológicamente más importante. Del hombre, sólo se han aislado virus con HA (H1, H2 y H3) y NA (N1 y N2), y recientemente, en forma limitada, cepas de origen aviar (H5N1, H9N2) (Figura 2).

Los virus de influenza carecen de mecanismos de corrección y reparación de errores y experimentan continuamente pequeños cambios (drift). Estos cambios antigénicos drift, frecuentes y permanentes, hace necesario el monitoreo constante de la situación global de la influenza. El virus de influenza presenta una segunda característica de gran importancia para Salud Pública: periódicamente pueden intercambiar o readjudicar material genético y fusionarse (shift), incluso con virus de diferentes especies. Influenza A presenta los 2 tipos de cambios antigénicos mientras que el tipo B presenta cambios antigénicos tipo drift y en forma más gradual. EN el caso de los virus influenza tipo A el cambio antigénico tipo shift resulta en un nuevo subtipo, diferente en H o H y N al de los dos virus progenitores y con potencial pandémico.

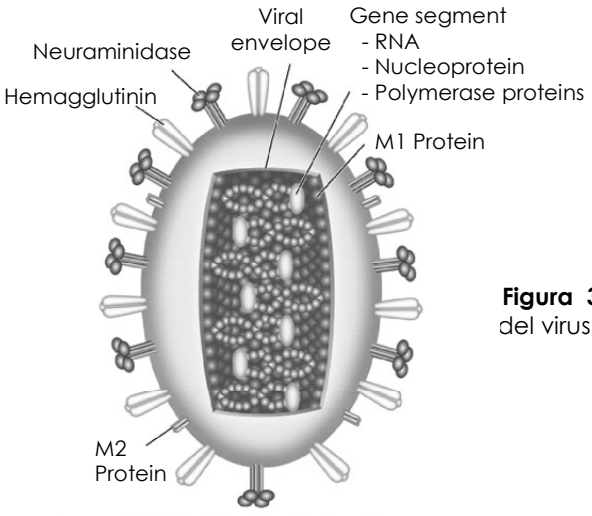


Figura 3 - Estructura del virus de influenza

INFLUENZA AVIAR

La influenza aviar se refiere a un gran grupo de diferentes virus de influenza A que afectan principalmente pájaros. Las aves salvajes constituyen el reservorio del virus de influenza, habitualmente en su forma de baja patogenicidad. Un rasgo característico de las aves es que el virus se multiplica tanto en el tracto respiratorio como en el intestino y, una vez eliminado por las heces, el agente contamina el medio ambiente.

Las aves acuáticas, en especial patos domésticos y silvestres, han generado especial interés debido a que se puede aislar virus de las cloacas de estas aves y de las lagunas donde nadan.

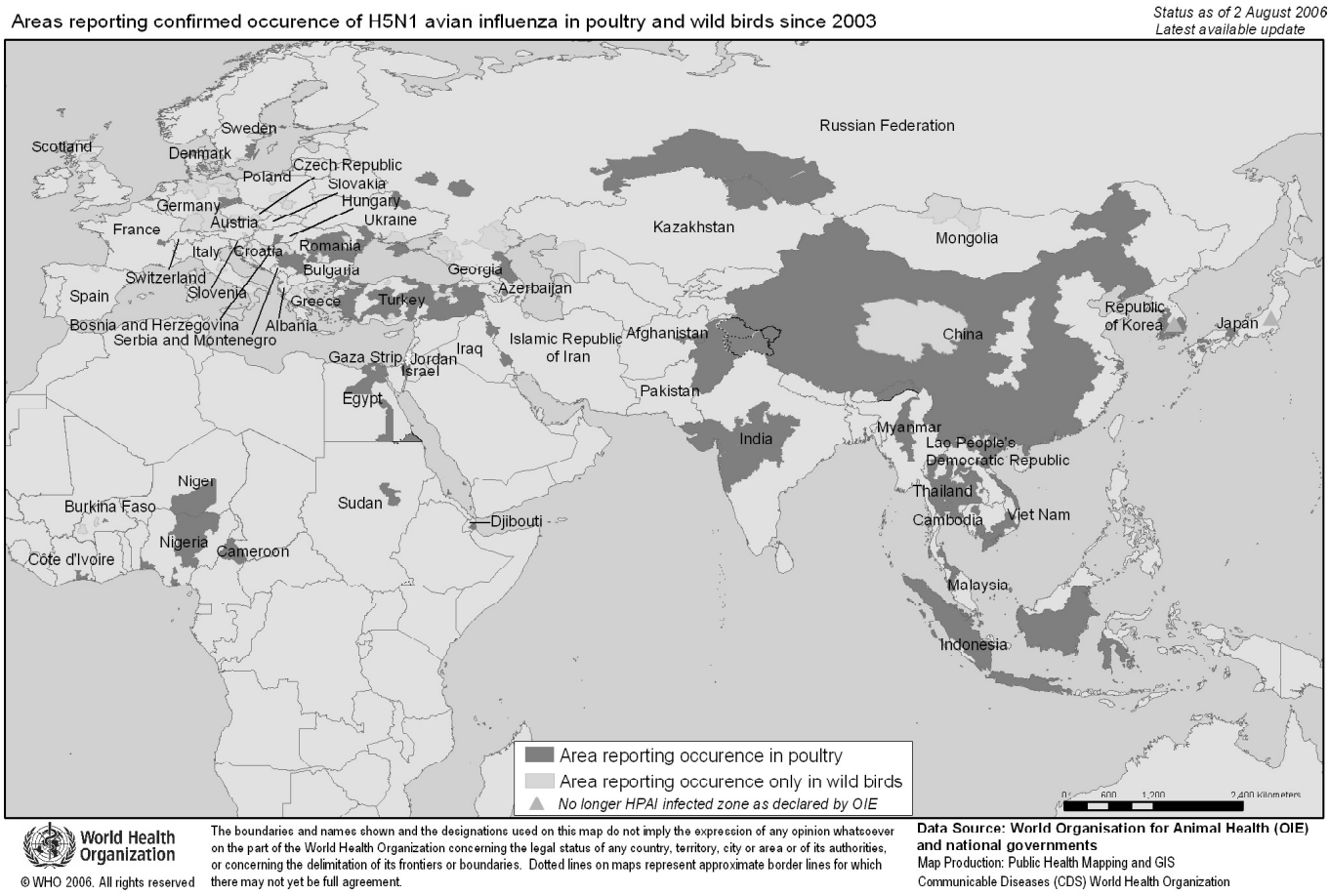


Figura 4 - Areas que reportaron presencia de H5N1 Influenza aviar en aves domésticas y en pájaros silvestres desde el año 2003

Las aves silvestres en general no se enferman (salvo con algunas cepas) y las aves domésticas, principalmente gallinas y pavos pueden enfermar gravemente y morir.

La transmisión es por contacto directo con secreciones (respiratorias y heces) de aves infectadas (incluyendo aves migratorias en contacto con aves de granja), pudiendo transportarse a través del agua, equipos, vehículos, jaulas y ropas contaminadas. La gripe aviar puede causar en aves de corral dos formas de enfermedad: de baja patogenicidad y o de alta patogenicidad. Los primeros están presentes en todo el mundo, son causas de brotes periódicos y solo ocasionan síntomas leves como plumas rizadas y menor producción de huevos.

Las de alta patogenicidad se presentan rara vez y hasta ahora solo son causadas por subtipos H5 y H7, la mortalidad asociada alcanza al 90 - 100%. Investigaciones recientes han demostrado que después de circular en una población de aves durante períodos, en ocasiones cortos, los virus de baja patogenicidad pueden mutar a virus altamente patógenos y virulentos.

Desde mediados de diciembre de 2003 el mundo experimenta una epizootia de gripe aviar altamente patógena (H5N1) sin precedentes que, comenzando en el sudeste asiático se ha expandido geográficamente hacia el noroeste. Hasta marzo de 2006 se han notificado más de 4000 focos en países asiáticos y europeos con tres olas sucesivas del brote que no parece detenerse. La sospecha es que las aves migratorias están diseminando virus hiperpatógenos a lo largo de sus rutas migratorias.

ENFERMEDAD EN HUMANOS – RIESGO DE PANDEMIA

La gripe aviar es transmitida de aves a humanos. La cepa aviar A (H5N1) ha infectado a humanos en aquellos casos de personas que estuvieron en contacto directo con las heces o secreciones de aves enfermas. Hay importantes sospechas de que el H5N1 pueda transformarse hasta lograr saltar de humano a humano y transmitirse con la misma facilidad de una gripe común. Una vez que esta adaptación ocurre, el virus deja de ser un virus que afecta a los pájaros y pasa a ser un virus de influenza humano. Esto es lo que puede dar paso a una pandemia.

Una pandemia de influenza es un acontecimiento raro, pero recurrente, ya que se deben presentar las siguientes condiciones al mismo tiempo: introducción de un nuevo subtipo de influenza A en la población humana, que el virus cause una enfermedad seria y que se pueda transmitir fácilmente de persona a persona. Tres pandemias ocurrieron en el siglo previo: "la influenza española" en 1918, "la influenza asiática" en 1957, y "la influenza de Hong-Kong" en 1968. El 1918 murieron 40–50 millones de personas en todo el mundo y fue considerada uno de los acontecimientos más importantes de esta enfermedad en la historia humana. Debido a que el virus es nuevo, el sistema inmunológico humano no poseerá inmunidad previa, por lo tanto, personas que contraigan la influenza pandémica experimentarán formas mucho más severas que las causadas por la influenza normal.

Por casi 9 años, expertos en salud han estado monitoreando la cepa aviar A (H5N1), esta cepa infectó los primeros humanos en Hong-Kong en 1997, causando 18 casos, inclusive seis muertes. El brote de mayor importancia por tener potencial pandémico comenzó en diciembre de 2003, cuando se informaron casos de influenza aviar H5N1, altamente patógena, en Corea. A partir de enero de 2004 se extiende a 7 países de Asia (Vietnam, Japón, Tailandia, Camboya, China, Laos e Indonesia). Como consecuencia, entre enero y marzo de 2004 se confirmaron 34 casos en humanos en Vietnam y Tailandia, de los cuales murieron 23 (Figura 5).

País	2003		2004		2005		2006		Total	
	Casos	muertes	Casos	muertes	Casos	muertes	Casos	muertes	Casos	muertes
Azerbaijan	0	0	0	0	0	0	8	5	8	5
Cambodia	0	0	0	0	4	4	2	2	6	6
China	1	1	0	0	8	5	12	8	21	14
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Egypt	0	0	0	0	0	0	14	6	14	6
Indonesia	0	0	0	0	17	11	40	33	57	44
Iraq	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
Thailand	0	0	17	12	5	2	2	2	24	16
Turkey	0	0	0	0	0	0	12	4	12	4
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	93	42
Total	4	4	46	32	95	41	93	62	238	139

Figura 5 - Número acumulativo de casos humanos confirmados de Influenza aviar A /H5N1 reportados por la OMS.

Los virus Influenza son inestables por naturaleza, la evolución de los mismos es impredecible y es imposible saber cuando puede adquirir la capacidad de transmitirse fácil y sostenidamente entre humanos. Una vez que un virus contagioso surge completamente, su extensión global se considera inevitable.

La diseminación de la infección entre las aves aumenta las oportunidades de infección directa de los humanos. Si más personas adquieren la infección, con el paso del tiempo también aumenta el riesgo de que los humanos, si están infectados conjuntamente por cepas de influenza aviar y de influenza humana, también podrían servir de "recipientes de mezcla" para la aparición de un nuevo subtipo con capacidad de ser transmitido fácilmente de persona a persona.

OMS utiliza una serie de seis fases de alarma pandémica como sistema para informar al mundo la seriedad de la amenaza y la necesidad de lanzar las actividades de preparación progresivamente más intensas. La designación de fases, incluyendo las decisiones de cuando moverse de una fase a otra, es llevada a cabo por el Director General de la OMS.

Cada fase de la alarma coincide con una serie de actividades recomendadas para ser emprendido por OMS, por la comunidad internacional, por los gobiernos, y por la industria. Los cambios de una fase a otro son provocados por varios factores, que incluyen el comportamiento epidemiológico de la enfermedad y las características de virus circulantes. El mundo está actualmente en fase 3: un nuevo subtipo de virus de influenza causa la enfermedad en humanos, pero no es transmitido eficiente y sustancialmente entre humanos (Figura 6).

Inter-pandemic phase	Low risk of human cases	1
New virus in animals, no human cases	Higher risk of human cases	2
Pandemic alert	No or very limited human-to-human transmission	3
New virus causes human cases	Evidence of increased human-to-human transmission	4
	Evidence of significant huyman-to-human transmission	5
Pandemic	Efficient and sustained human-to-human transmission	6

Figura 6 - Fases de pandemia establecidas por la OMS.

Los datos actuales para la infección H5N1 en humanos indican un período de incubación que va de dos a ocho días. Los síntomas iniciales incluyen una fiebre alta, tos y dificultad respiratoria. Los síntomas de infección respiratoria inferior se hacen evidentes desde el comienzo del cuadro. Diarrea, vómitos, dolor abdominal, dolor de pecho, y sangrando de la nariz han sido informado también como síntomas tempranos en algunos pacientes. El espectro de síntomas clínicos puede, sin embargo, ser más amplio, y no todos pacientes confirmados se han presentado con síntomas respiratorios. Casi todos pacientes desarrollan pulmonía. Durante el estallido de Hong-Kong, todos pacientes severamente enfermos tuvieron la pulmonía vírica primaria, que no respondió a antibióticos.

La infección es de progreso rápido y suele producir fallo respiratorio a la semana posterior de comienzo de los síntomas clínicos.

Los hallazgos de laboratorio son: leucopenia (principalmente linfopenia), moderada trombocitopenia, elevación de las aminotransferasa, y en alguna instancia coagulación intravascular diseminada.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La OMS ha remarcado la necesidad de implementar técnicas de diagnostico rápido para este tipo de infecciones atípicas.

Dentro de los test recomendados por la OMS para la identificación del virus de influenza aviar A, a partir de muestras de seres humanos, encontramos los siguientes:

Métodos Directos:

1. Detección de Antígenos por Inmunofluorescencia (IFA) o ELISA
2. Cultivo Viral
3. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Métodos Indirectos (serológicos):

1. Inhibición de la hemaglutinación
2. ELISA
3. Neutralización viral.

La muestra ideal para la detección del virus de influenza aviar A es el aspirado nasofaringeo obtenido dentro de los 3 días de comenzado los síntomas. Otras muestras respiratorias como hisopados nasofaringeos también pueden ser testeadas. Se recomienda un tiempo de entrega de resultados no mayor a las 24 hs.

En el ensayo de IFA los resultados pueden ser obtenidos rápidamente (30 minutos), pero en algunas ocasiones este ensayo carece de la sensibilidad suficiente y es necesario precultivar la muestra para amplificar el virus lo que retrasa en varios días la obtención de resultados. Además los anticuerpos monoclonales de los test comerciales han mostrado reacción cruzada con los subtipos de influenza, por lo tanto, ante un resultado positivo es necesario realizar ensayos confirmatorios utilizando los anticuerpos monoclonales provistos por la OMS.

El cultivo viral es un método muy sensible y especifico pero tiene la desventaja de ser lento, ya que para la obtención de un resultado hay que esperar entre 5 a 10 días.

La detección del ARN (Ácido ribonucleico) del virus de influenza aviar A por PCR, es un poderosa técnica diagnostica debido a su alta sensibilidad y especificidad. Además permite detectar diferentes subtipos del virus y es

de realización rápida, dado que los resultados pueden ser obtenidos de 24 hs. de recibida la muestra.De los ensayos serológicos el de Neutralización viral es el recomendado por la OMS, teniendo este como desventaja la necesidad de trabajar con el virus de influenza aviar A en su forma viable, y por lo tanto para este tipo de ensayos se requieren laboratorios con altos niveles de Bioseguridad (Nivel 3).

Toda manipulación de muestras t técnicas de diagnóstico debe ser llevada a cabo bajo las guías de Bioseguridad definidas en: http://www.who.int/csr/disease/avian_infuenza/guidelines/handlingspecimens/en/index/html

DIAGNOSTICO MOLECULAR

La técnica recomendada por la OMS es la detección mediante 2 RT-PCR en forma individual para los genes H5 y N1. La técnica utilizada consta de una retrotranscripcion inicial con cebadores específicos y luego una reacción de PCR simple.

Los primers utilizados son los siguientes:

Para el gen Hemaglutinina(H5):
H5-1 gCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC
H5-2 CTC CCC TgC TCA TTg CTA Tg
AMPLICON: 219bp.

Para el gen Neuraminidasa (N1)
N1-1: TTg CTT ggT Cgg CAA gTg C
N1-2: CCA gTC CAC CCA TTT ggA TCC
Amplicon 616pb

Los productos son visualizados en gel de agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio mediante transiluminaciòn en el UV.

DATOS IMPORTANTES PARA LA TOMA, RECOLECCION, CONSERVACION Y ENVÍO DE MUESTRAS

Criterios de la OMS para recolección y transporte de muestras clínicas para la detección de Influenza aviar

El diagnóstico depende de la calidad de la muestra obtenida, su transporte rápido al laboratorio y su almacenamiento adecuado y deben ser tomadas preferiblemente durante los primeros 3 días después del comienzo de síntomas clínicos.

Tipos de muestras humanas para diagnóstico de laboratorio:

Tracto respiratorio superior:

a) Hisopado Nasal
b) Hisopado Nasofaringeo
c) Aspirado Nasofaringeo
d) Lavado Nasal
e) Hisopado de garganta

Tracto respiratorio inferior (procedimientos invasivos)

a) Aspirado transtraqueal
b) Lavado Bronqueoalveolar
c) Biopsia de pulmón

Procedimiento para la recolección de muestras:

Todas las muestras deben ser recolectadas en tubos o recipientes estériles.

Conservación de la muestra:

Las muestras deben conservarse a 4 a 8°C hasta 48-72hs, luego de este tiempo debe conservarse a -70°C.

Transporte de las muestras:

El embalaje debe ser triple. Las muestras deben ser colocadas en los tubos estériles antes mencionados siendo éstos los recipientes primarios (contenedores de las muestras). Los recipientes primarios deben ser envueltos en material absorbente (algodón o papel) y colocados en otro recipiente herméticamente cerrado, recipiente secundario. Por último este recipiente secundario debe ser colocado dentro de una caja de tergopol con refrigerante (recipiente terciario).

Bibliografía

- WHO home page for influenza.
  http://www.who.int/csr/disease/infuenza
  http://www.who.int/csr/disease/avian_infuenza/guidelines/labtests/en/
  http://www.who.int/csr/disease/avian_infuenza/guidelines/humanspecimens/en/index/html
- Biosefty in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), 4th ed.
- Boletín electrónico editado por la Comisión de Emergentes y Reemergentes. Edición especial "Gripe Aviar". S.A.D.I.

Comparación de tres métodos para detectar antígenos de Rotavirus en materia fecal

Valeria Cuffia - Natalia Guerra - María Díaz Ariza
Ximena Maldonado - Patricia Córdoba
Laboratorio 1, Departamento de Investigación. IUCS Fundación Barceló. Sede La Rioja

INTRODUCCION

Las gastroenteritis virales agudas, son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en todo el mundo (1). Los principales agentes virales son Rotavirus, Calicivirus (Virus tipo Norwalk y tipo Sapporo), Astrovirus y Adenovirus entericos (serotipos 40 y 41), y con menor trascendencia epidemiológica Coronavirus, Torovirus, Picobirnavirus y Picornavirus (virus Aichi) (2).

Rotavirus es el mayor agente causal de gastroenteritis en niños, produciendo por año aproximadamente 111 millones de episodios, de los cuales 25 millones requieren vistas clínicas, 2 millones de hospitalizaciones y alrededor de 400.000 muertes anuales en el mundo (3). En la Argentina se ha estimado que las diarreas virales infantiles provocan 21.000 hospitalizaciones, 85.000 atenciones ambulatorias y un costo mayor a los 27 millones de dólares (4). En la provincia de La Rioja, la diarrea es una de las principales causas de consulta y el diagnóstico de las diarreas virales no se realiza en los laboratorios públicos ni privados. Nuestro grupo de trabajo determinó que el 13,17 % de las consultas por diarreas y el 23,13 % de las diarreas en hospitalizados son producidas por virus. De las diarreas virales, las producidas por Rotavirus son 81,2 % en niños ambulatorios y el 82 % en hospitalizados (5).

Rotavirus fue observado por primera vez en 1973 en la mucosa duodenal de niños con gastroenteritis. Es un virus de la familia Reoviridae y las partículas maduras son icosahedricas, no envueltas y de 70 nm de diámetro. La cápside contiene una doble capa proteica. La capa externa esta compuesta por dos proteínas estructurales, VP 7 y VP 4 y la capa interna esta formada principalmente por VP6. El genoma viral comprende 11 segmentos de ARN de doble cadena y cada segmento genómico codifica para proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas estructurales son VP1, VP2, VP3, VP4, (VP5 + VP8), VP6 y VP7 y las no estructurales NSP1, NSP2, NSP3, y NSP5 (1).

Los Rotavirus son clasificados en grupos, subgrupos y serotipos de acuerdo a la reacción antigénica de las proteínas de la capside. La proteína VP6 es responsable de la existencia de 7 grupos (A-G). El grupo A se divide en 2 subgrupos (I, II) en función de su especificidad. Las infecciones humanas son producidas principalmente por el grupo A, y en menor medida por los grupos B y C. La proteína VP 4 que constituye las espiculas del virion y la glucoproteina VP7 de la capside externa determinan la existencia de serotipos o genotipos P y G respectivamente (2). Los serotipos o genotipos se determinan de acuerdo al método usado para la tipificación con un panel de anticuerpos para serotipos por RT-PCR para genotipos. Se han identificado hasta el momento 15 genotipos G y 20 genotipos P (6).

Rotavirus puede ser detectado en materia fecal por diversos métodos. Originalmente el microscopio electrónico y la inmunomicroscopía electrónica fueron usados para la detección morfológica e inmunológica de las partículas virales (2). El diagnóstico de la infección por Rotavirus se realiza detectando la presencia de Antígeno vírico por métodos inmunológicos en muestras de materia fecal. Estos métodos detectan Rotavirus del grupo A. Actualmente en el mercado se encuentran disponible equipos de Enzimoinmunoensayo (Elisa IVD Inc. Rotavirus antigen detection, Rotazyme II Abbott Laboratorios, Premier Rotaclone), ensayos de Inmunocromatografía (Rotascreen dipstick, VIKIA Rota-Adeno) y pruebas de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas (Slidex Rota Kit 2, Biomerieux), este último estuvo disponible en el mercado hasta el 2004. Los métodos moleculares detectan la presencia del ARN vírico. Uno de estos métodos es el PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) que pone de manifiesto los segmentos de ARN bicatenario y es la técnica patrón para la detección de Rotavirus. Otro de estos métodos es RT- PCR (reversa transcriptasa, reacción en cadena de la polimerasa), pero su uso, aun no es recomendado para el diagnóstico (2).

Cada una de estas técnicas tiene perfiles de utilidades diferentes por lo que es importante contar con una marcha diagnóstica para detectar Rotavirus en las diarreas infantiles, que son relevantes en nuestra región. El presente trabajo tiene como objetivo comparar tres métodos diagnósticos disponibles comercialmente para detectar infección por Rotavirus en materia fecal y establecer la utilidad diagnóstica de las mismas.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron 83 muestras de materia fecal de niños menores de 5 años con diarrea aguda, que consultaron en el servicio externo de pediatría del Hospital Vera Barros, en el Centro primario Puerta de La Quebrada y en el Centro primario San José de la Capital de la provincia de La Rioja. Las muestras fueron recolectadas en recipientes limpios y secos sin conservante, dentro de las 48 horas de aparición de los síntomas y conservadas a -20° C hasta el momento de procesarlas.

Procesamiento de las muestras

Las muestras de materia fecal fueron procesadas por el método Enzimoinmunoensayo (ELISA) sandwich que utiliza anticuerpos monoclonales contra rotavirus del grupo A (ELISA IVD Ir Rotavirus antigen detection), por Inmunocromatografia (IC) (Roascreen Dipstick) que también detecta rotavirus del Grupo A, utilizando un anticuerpo monoclonal diferente al del ELISA y por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), previa extracción del acido nucleico por el método de Pindall, con tinción de nitrato de plata para visualizar los segmentos del ARN viral (perfiles electroforeticos) (7).

RESULTADOS

De las 83 muestras procesadas, 4 fueron positivas y 68 negativas por los tres métodos, con un índice de concordancia del 83,7 %. La tabla 1 muestra la sensibilidad y especificidad del ELISA y la IC utilizando el PAGE como técnica patrón. La sensibilidad determinada para el ELISA fue del 100 % y la especificidad del 91 %. La IC tuvo una sensibilidad del 91 % y una especificidad del 100 %. Cabe destacar que procesando en serie a las muestras ELISA negativo por este método IC, se obtiene una sensibilidad y especificidad del 100 % optimizando el diagnóstico de Rotavirus en materia fecal de niños. El índice de concordancia encontrado entre ELISA e IC fue del 90,36 % con un valor predictivo negativo para el ELISA del 89,6 %, estos datos se observan en la tabla 2.

N: 83	PAGE (+)	PAGE (-)	Total
Elisa (+)	VP n:4	FP n: 7	11
Elisa (-)	FN n: 0	VN n: 72	72
Total	4	79	83
Inmunocromatografía (+)	VP n: 4	FP n: 2	6
Inmunocromatografía (-)	FN n: 0	VN n: 77	77
Total	4	79	83

VP: verdaderos positivos - FP: falsos positivos
VN: verdaderos negativos - FN: falsos negativos

Tabla 1 - Sensibilidad y Especificidad del ELISA y la IC, utilizando la técnica PAGE como patrón

N: 83	ELISA +	ELISA -	Total
IC +	6	0	6
IC -	8	69	77
Total	14	69	83

Tabla 2 - Indice de concordncia entre ELISA e IC

DISCUSION

Rotavirus humano es considerado el mayor agente etiológico de diarreas agudas en niños en todo el mundo. Nosotros determinamos en estudios anteriores que en la provincia de La Rioja es el principal virus causante de diarreas agudas. Un diagnóstico rápido fácil, y certero, es esencial para un efectivo tratamiento de los pacientes. La implementación del diagnóstico de rutina para Rotavirus en los hospitales públicos y laboratorios privados permitiría optimizar la asignación de los recursos económicos, por el uso indebido de antibióticos y por la infección intrahospitalaria ocasionado por este virus.

En el laboratorio clínico, los métodos inmunológicos son de gran utilidad para la resolución de un diagnóstico de diarrea por Rotavirus, debido a su simpleza en relación a las técnicas moleculares que requieren un laboratorio de alta complejidad.

Nosotros obtuvimos, utilizando ELISA como técnica diagnóstica un 100 % de sensibilidad y un 91 % de especificidad. Estos resultados muestran que esta técnica es muy sensible para determinar Rotavirus en materia fecal, aunque requiere un mayor tiempo de procesamiento de la muestra, un laboratorio más equipado y un personal más entrenado. El ELISA es un método muy usado para el diagnóstico de Rotavirus y fue comparado con diferentes métodos como RT-PCR (8,9) Microscopía Electrónica (10), látex (11, 12, 13, 14, 15), Inmunocromatografía (8, 13, 16) y por PAGE (10, 11, 12) obteniendo resultados similares a los nuestros.

Utilizando la IC como método diagnóstico obtuvimos una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 91 %, que aumenta al 100 % procesando las muestras en serie con ELISA sandwich. Estos resultados nos indican que la IC tiene una alta sensibilidad y especificidad, es rápida, fácil de realizar e interpretar, constituyendo una técnica accesible para los laboratorios clínicos de todo tipo de complejidad. Actualmente la IC es un método tan utilizado como el ELISA, confirmado a través de estudios comparativos realizados por otros autores (13, 16, 17, 18, 19) donde obtienen una buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico con resultados similares a los nuestros.

En conclusión este trabajo muestra que para establecer un diagnóstico de Rotavirus a un costo accesible se puede usar la IC por su buena sensibilidad y especificidad, por la simpleza del procedimiento e interpretación de los resultados.

Bibliografía

1. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. Review.2003 Apr; 9(4):247-62.
2. Buesa Gomez J. The new diagnostic technologies. An Esp Pediatr. 1989 Sep;31 Suppl 38:139-44.
3. Robert F. Ramig. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection Journal of Virology, October 2004, p. 10213-10220, Vol. 78, No. 19.
4. Bok K,Castagnaro NC, Diaz NE, Borsa A, Cagnoli MR, Nates , Yudowsky S, Espul C, Cuello H, Fay O, Brunet B, Ues OC, Santoro R, Grinstein S, Gonzalez F, Miceli I, Gomez JA. Rotavirus laboratory network: results after one year of observation. Rev Argent Microbiol. 1999 Jan-Mar; 31(1):1-12.
5. Guerra N M, cuffia V, Maldonado X, Diaz Ariza M, Cordoba P. caracterizacion de diarreas virales en La Rioja. VIII Congreso Argentino de Virologia 2005. Revista Argentina de Microbiologia p 67; vol 37 supl 1 2005.
6. Cláudia Regina N. E. da Luz; Joana D'Arc P. Mascarenhas; Yvone B. Gabbay; Ana Regina B. Motta; Telma Vitorina Ribeiro Lima; Luana da S. Soares; Alexandre C. Lindares. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo vol.47 no.5 São Paulo Sept. /Oct. 2005.
7. Giordano M O, Basnec S N, Nates S V, Bennum F, Depetris A R. rapid techniques for diagnostic and epidemiological studies of rotavirus infection. J of Virol Meth. Vol 35. 1991. p 59-63.
8. Gunson RN, Miller J, Leonard A, Carman WF. Importance of PCR in the diagnosis and understanding of rotavirus illness in the community. Commun Dis Public Health. 2003 Apr;6(1):63-5.
9. Roman E, Martinez I. Detection of rotavirus in stool samples of gastroenteritis patients. P R Health Sci J. 2005 Sep;24(3):179-84
10. Chen Y, Zhao J, Yan L. Comparison of three methods in detection of rotavirus infection in neonates. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 1999 Jun 30;13(2):180-2.
11. Paul SK, Tabassum S, Islam MN, Ahmed MU, Haq JU, Shamsuzzaman AK. Diagnosis of human rotavirus in stool specimens: comparison of different methods.Mymensingh Med J. 2006 Jul;15(2):183-7.
12. Altindis M, Yavru S, Simsek A, Ozkul A, Ceri A, Koc H. Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination, ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis. Indian Pediatr. 2004 Jun;41(6):590-4.
13. Wilhelmi I, Colomina J, Martin-Rodrigo D, Roman E, Sanchez-Fauquier A. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001 Oct; 20(10):741-3.
14. Raboni SM, Nogueira MB, Hakim VM, Torrecilha VT, Lerner H, Tsuchiya LR. Comparison of latex agglutination with enzyme immunoassay for detection of rotavirus in fecal specimens. Am J Clin Pathol. 2002 Mar;117(3):392-4.
15. Pazdiora P, Svecova M, Jelinkova H, Taborska J. Diagnosis of rotavirus infections—comparison of various methods Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2002 Aug; 51(3):95-7.
16. Regagnon C,Chambon M, Archimbaud C, Charbonne F, Demeocq F, Labbe A, Aumaitre O, Ughetto S, Peigue-Lafeuille H, Henquell C. Rapid diagnosis of rotavirus infections: comparative prospective study of two techniques for antigen detection in stool. Pathol Biol (Paris). 2006 Jul;54(6):343-6. Epub 2006 Feb 14.
17. Kurokawa M, Ono K, Ishiyama S, Rai SK. Evaluation of rapid diagnostic methods for pediatric viral diarrhea using samples collected in Nepal and Japan. Nepal Med Coll J. 2004 Dec; 6(2):78-82
18. Shimizu H, Li L, Mitamura K, Okuyama K, Hirai Y, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography based rapid detection kit of rotavirus and adenovirus. Kansenshogaku Zasshi. 2001 Dec; 75(12):1040-6.
19. Kojima T, Arai M, Sadamoto S, Ikedo M, Yui I. Evaluation of the diagnostic reagents which detect group A Streptococcus with the immunochromatographical method. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi. 2002; 12(2):91-5.

Agradecimiento

Este proyecto fue realizado con un subsidio otorgado por la Fundación Barcelo H. A. de Sede La Rioja. Se agradece la valiosa colaboración a todos los Bioquímicos y técnicos de laboratorio del Hospital Vera Barros, a los residentes de Pediatría, a las autoridades del Hospital Vera Barros, a las autoridades de Salud Pública de la Provincia.

Citometría de flujo: Aplicaciones en el laboratorio clínico

Dra. Evangelina Agriello

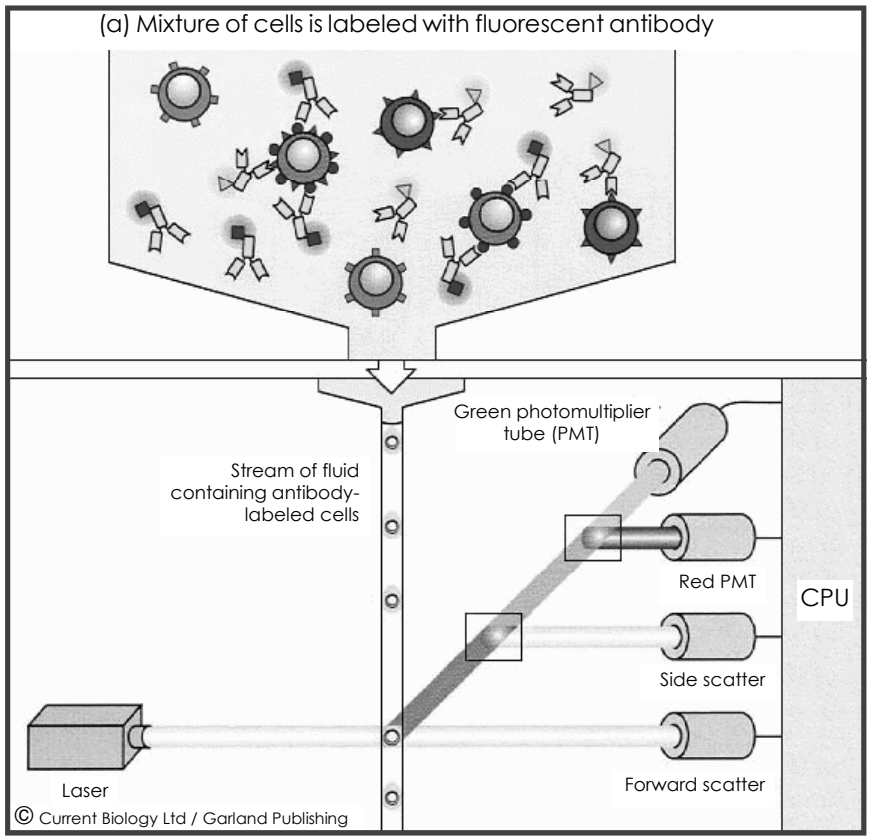
En los últimos años, el diagnóstico clínico ha sufrido profundos impactos debido, en gran medida, a los avances ocurridos en diferentes áreas de la Biomedicina, entre las que se destacan la **Biología Celular** y la **Genética Molecular**. Tales avances científicos han contribuido al mejor conocimiento de la etiopatogenia y de la fisiopatología de muchas enfermedades. La **citometría de flujo** es una valiosa tecnología que complementa las técnicas clásicas usadas como la morfología, los ensayos funcionales y los cultivos celulares entre otras. Precisamente, el carácter multidisciplinario de esta herramienta ha extendido su uso desde la investigación básica hasta los laboratorios clínicos de alta complejidad.

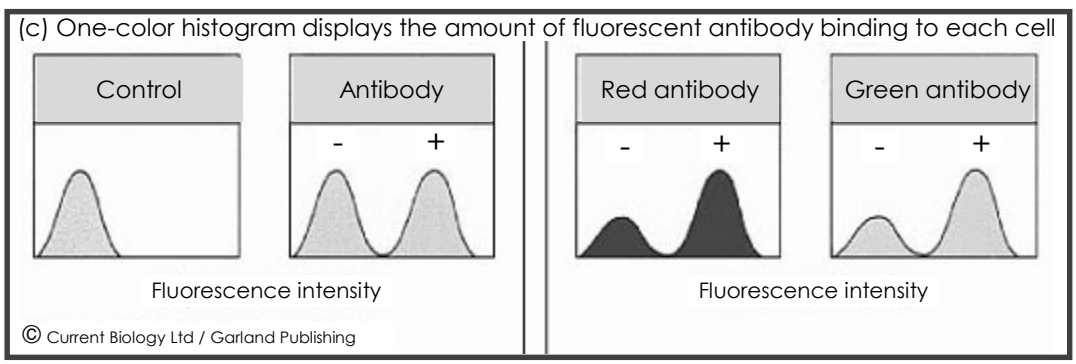
Fundamento técnico

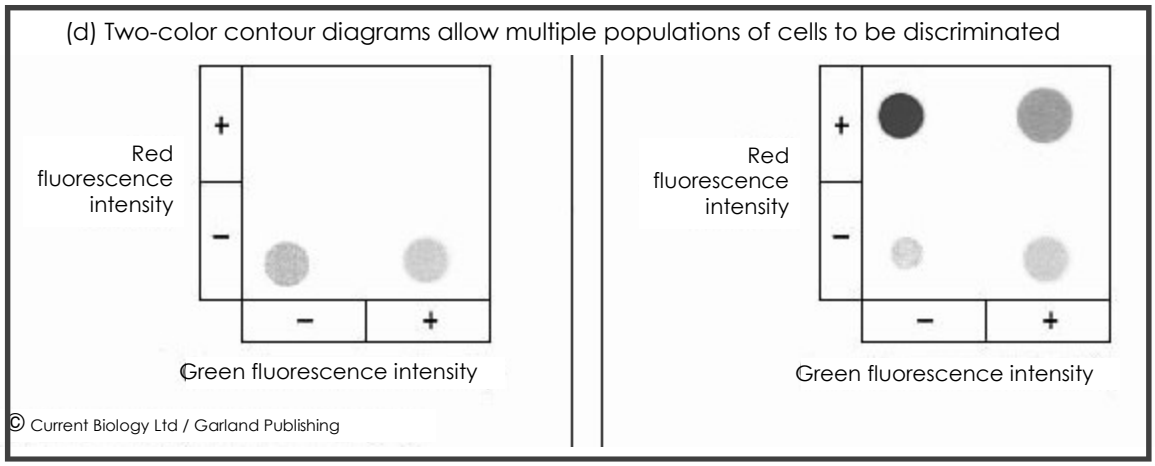
El principio en el que se fundamenta esta tecnología es simple: se hacen pasar células u otras partículas en suspensión, alineadas y de una en una por delante de una fuente de luz. Simultáneamente se evalúa el tamaño, la complejidad citoplasmática, y emisión de luz (FL1, FL2, FL3, etc.) correspondiente a los distintos anticuerpos fluoresceinados.

La citometría de flujo proporciona una información cualitativa y cuantitativa sobre cada célula en particular, permitiendo en una muestra la identificación de subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando estas están escasamente representadas.

Desde el punto de vista práctico, además de la separación de células, permite el análisis de estructuras subcelulares (núcleos, cromosomas, mitocondrias, gránulos de zimógeno) con gran **objetividad**, **sensibilidad** y **rapidez,** analizando de forma simultánea varias características sobre un gran número de partículas. Por ejemplo la expresión y coexpresión de proteínas marcadas con anticuerpos monoclonales fluoresceinados sobre una suspensión celular.







Aplicaciones

De las diferentes aplicaciones de la citometría de flujo, la determinación de antígenos celulares y la cuantificación de ADN impactaron en el diagnostico clínico hematológico rápidamente.

Aplicaciones clínicas

Oncohematología

- Identificación de células neoplásicas.
- Diagnóstico de leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos cronicos.
- Detección de Enfermedad Mínima Residual en neoplasias hematológicas.
- Análisis del ciclo celular

Inmunología y hematología general

- Cuantificación de linfocitos T CD4 en pacientes portadores de VIH.
- Estudio de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con diagnóstico presuntivo de inmunodeficiencias.
- Estudio de la función granulocítica (capacidad fagocítica, quimiotaxis, etc.).
- Recuento de reticulocitos.
- Monitorización de la quimioterapia (CD3 en pacientes transplantados renales tratados con anticuerpos monoclonales)

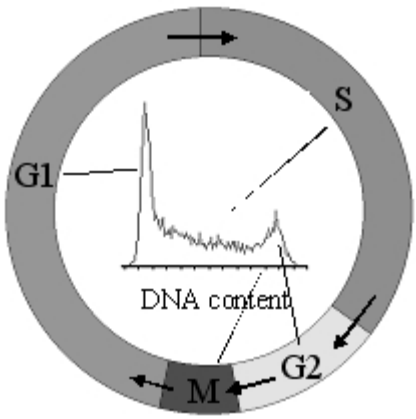
Hemoterapia

- Cuantificación de progenitores hematopoyéticos CD34+.
- Evaluación de la calidad plaquetaria.
- Cuantificación de linfocitos contaminantes en productos de aféresis plaquetarias.

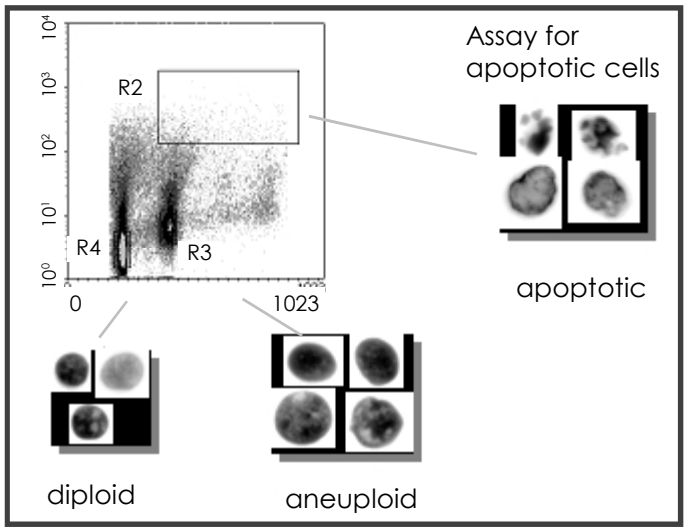
Análisis del ciclo celular

Es importante destacar la valiosa información que brinda acerca del ciclo celular en una suspensión celular, por ejemplo un tumor sólido, pudiendo cuantificar la cantidad de ADN en células tumorales.

Una de las maneras más simples de evaluar el ciclo celular es por medio de una tinción estequeométrica con un fluorocromo que se entrelaza en las cadenas de ADN como el ioduro de propidio. Los picos de emisión de luz indican los distintos estadios del ciclo celular. Así se puede estimar la cantidad de células que se dirigen hacia una vía apoptótica, cuantas están ciclando y replicando su ADN para entrar en mitosis.



Otra aplicación que posibilita la citometría de flujo es la separación magnética de cromosomas. Así se puede conocer el cariotipo de un paciente y evaluarlo respecto a un normal. Ante una anomalía citogenética se puede enriquecer una fracción para luego determinar su secuencia aminoacídica. El conocimiento de la aberrancia molecular específica que porta un sujeto es sumamente importante como sonda especifica de esa neoplasia. Este análisis podría ser el blanco para una futura búsqueda de enfermedad mínima residual molecular o para usar en la inmunoterapia específica para ese determinado paciente.

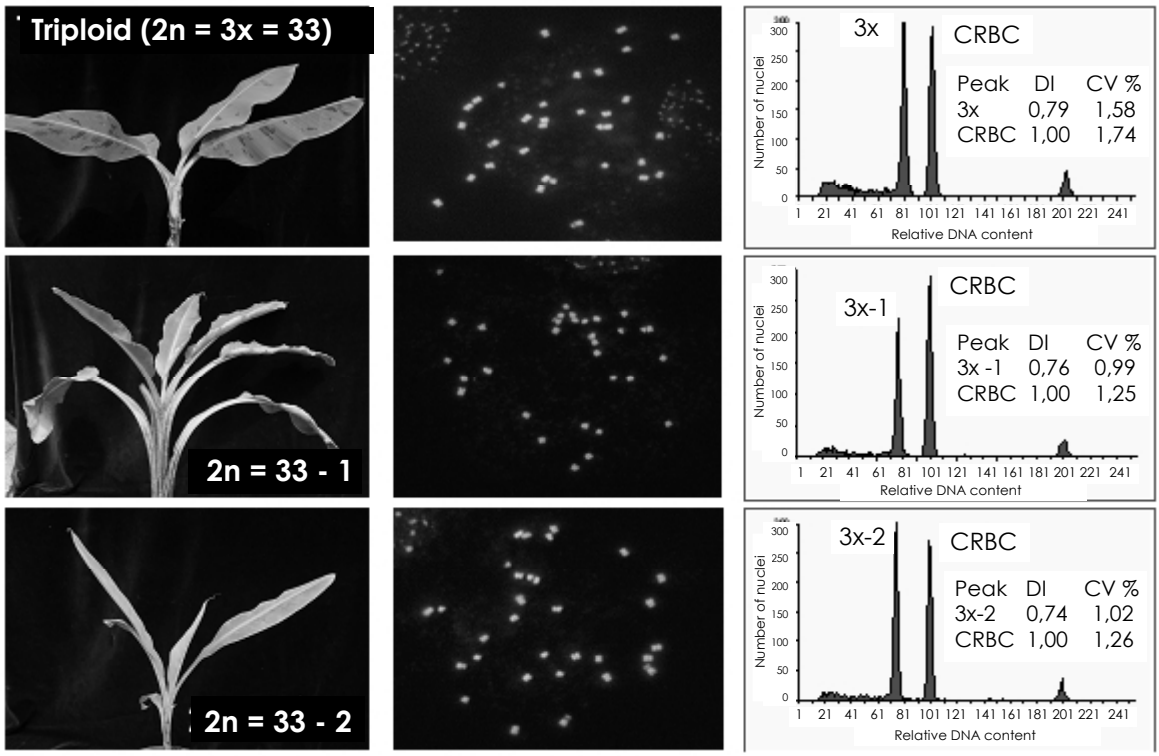


Otra aplicación que hoy llega a otras áreas del laboratorio es el estudio del ciclo celular en agronomía. Al ser una técnica rápida posibilita la determinación del ciclo celular en núcleos vegetales permitiendo conocer las ploidías y estimar la pureza de una muestra.

ANEUPLOIDIA EN BANANA (MUSA)

Dr. Jaroslav Doležel

Head, Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic



Está demostrada la amplia difusión que esta técnica rápidamente ha adquirido y que hoy sostiene en el campo de la investigación para continuar su aporte a nuevas aplicaciones clínicas.

Es evidente que el abanico de posibilidades continuará abriéndose y que los grupos de investigación seguirán forzando su versatilidad en busca de nuevas aplicaciones.

Bibliografía

1. Ormerod MG.Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry.J Immunol Methods. 2002 Jul 1;265(1-2):73-80. Review.
2. Roux, N., Toloza, A., Radecki, Z., Zapata-Arias, F.J., Doležel, J.: Rapid detection of aneuploidy in Musa using flow cytometry. – Plant Cell Rep. 21: 483-490, 2003
3. Giorgi JV, Hurtubise PE, Cram LS, Parker JW, La Via MF.Clinical applications of cytometry: 6th annual meeting.Cytometry. 1992;13(4):445-7.

Las Cactáceas:
múltiples usos agronómicos y medicinales

Mónica Nazareno - M. Judith Ochoa - M. Gabriela Targa
Celia Y. Loto - Clara Rios

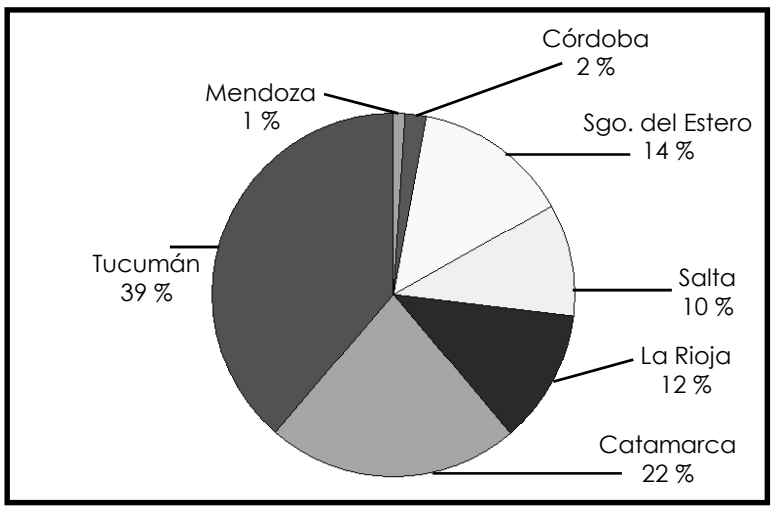
Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago el Estero. Santiago del Estero. Argentina.

INTRODUCCION

Existen hierbas, alimentos y preparados cuyos efectos benéficos para la salud y para la cura de distintos tipos de dolencias han sido conocidos durante siglos por los habitantes de la región. Desde los indígenas, pasando por los colonizadores y evangelizadores, hasta las actuales generaciones, los conocimientos de las propiedades medicinales y terapéuticas de ciertos cultivos o especies del monte nativo se han difundido meramente por tradición oral y con escasos respaldos científicos. A pesar de la gran potencialidad de estas fuentes naturales, sus aplicaciones no han trascendido en productos de valor mayor que simplemente como hierbas secas para la preparación de infusiones.

El cultivo y el consumo de la tuna fueron comunes entre los nativos del altiplano de México durante la época prehispánica. Después que los españoles conquistaron México y el resto de América, el fruto mantuvo su función básica en la dieta local, sin embargo existen antecedentes históricos de los múltiples usos entre los que se encuentran las aplicaciones medicinales (calma la tos, cura heridas y úlceras estomacales y es preventivo del cáncer de próstata), además como hospedero de un insecto del cual se extrae un colorante muy estable con una gran gama de tonos rojos.

Más recientemente esta especie se difundió como cultivo frutal en Argentina, Estados Unidos, Chile, Israel y Sudáfrica con cien mil hectáreas cultivadas en todo el mundo. En Argentina existen 2000 has tecnificadas en las provincias de Santiago del Estero, Catamarca, La Rioja, Tucumán, Salta, Jujuy (Cuadro 1).



Cuadro I - Distribución de la superficie de tunales en Argentina

COMPOSICION Y CARACTERISTICAS NUTRICIONALES DEL FRUTO MADURO

El fruto de la tuna es una baya ovalada o alargada multiseminada cuyo peso ronda entre 100 y 200 g. La cáscara gruesa y carnosa constituye el 30 - 40% del peso total del fruto y rodea a la pulpa jugosa que representa el 60 – 70 % del peso total del fruto. Esta contiene muchas semillas con una cubierta dura y representa el 5 – 10 %. La proporción entre cáscara y la pulpa es variable y depende de la especie, las condiciones ambientales y el manejo cultural al que se somete el cultivo. Los principales componentes de la pulpa son agua (85 %), carbohidratos (10 – 15 %), con cantidades importantes de Vitamina C (25 - 35 mg/100g). El contenido de Vitamina C en frutos maduros varía desde menos de 10 a más de 40 mg 100 g de pulpa. Las semillas contienen grandes cantidades de proteínas y lípidos, los últimos compuestos por cerca de 75 % de ácido linoleico. En frutos de diferentes especies de *Opuntia* el contenido de proteína de las semillas varía de 3 a 10 % de peso seco, y el contenido de lípidos varía de 6 a 13 % de peso seco (Tabla 1).

Componente	Pulpa de fruta (en base a peso fresco)	Semilla (en base a peso seco)
Agua (%)	85,60	5,3
Proteína (N x 6,25) (%)	0,21	16,6
Lípido (%)	0,12	17,2
Fibra (%)	0,02	49,6
Pectina (%)	0,19	-
Vitamina C (mg/100ml)	22,00	-
β-caroteno (UI)	trazas	-
Ceniza (%)	0,44	3,0
Ca (mg/100ml)	28,00	16,0
Mg (mg/100ml)	28,00	75,0
K (mg/100ml)	161,00	163,0
Na (mg/100ml)	0,80	68,0
P (mg/100ml)	15,40	152,0
Fe (mg/100ml)	1,50	9,0

Tabla 1 - Composición química de la pulpa y semillas de frutas de *O. ficus-indica*

Numerosos estudios revelan cada vez más enfermedades que involucran radicales libres. Estas especies perjudiciales pueden ocasionar daños severos en moléculas biológicas, especialmente al ADN, a lípidos y proteínas. Se ha vinculado esta acción con el origen y avance de serias enfermedades tales como el cáncer, arteriosclerosis, dolencias cardiovasculares e incluso con el SIDA. Otras enfermedades que han sido relacionadas con los radicales libres son los males de Alzheimer y de Parkinson y las cataratas. Más aún, en ciertas adicciones como el tabaquismo y el alcoholismo se sospecha de la participación de radicales libres. El humo de tabaco, ciertos contaminantes, solventes orgánicos, anestésicos y pesticidas son fuentes de radicales libres. En los sistemas biológicos estas especies atacan a lípidos componentes de las membranas de las células dañándolas como resultado de este proceso. Si se trata de un alimento, la consecuencia de esta oxidación es la rancidez, un proceso de deterioro oxidativo de los lípidos, que afecta su calidad nutricional y propiedades organolépticas como color, sabor y aroma. Por otra parte si hablamos de un organismo vivo, la oxidación está relacionada con el envejecimiento de las células.

Existen algunas sustancias que previenen o retardan estos daños oxidativos ya que actúan atrapando los radicales libres inhibiendo su acción o previniendo su formación. Estas sustancias se denominan **antioxidantes** y ejercen una acción de protección contra el ataque de estas especies oxidantes.

En los últimos años se ha registrado gran interés por los antioxidantes y el papel que cumplen en los sistemas biológicos. Existen estudios que relacionan el consumo de estas sustancias con menores incidencias de dolencias cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Es conocido como la "paradoja francesa" el comentario de que, a pesar de la dieta rica en alimentos grasos de los franceses, se observa una baja incidencia de enfermedades coronarias en ese país y este efecto es atribuido al regular consumo de vino rico en sustancias antioxidantes. También similar efecto es atribuido al consumo de té verde en países de Oriente. El té y el vino tinto son excelentes fuentes de sustancias antioxidantes denominadas polifenoles.

Existen evidencias científicas que indican que dietas ricas en frutas y verduras disminuyen el riesgo de contraer enfermedades cardíacas y cáncer relacionando estos efectos a la presencia de antioxidantes.

Las frutas son alimentos que tienen alta aceptabilidad incluso entre los niños. Uno de los aportes más valiosos de las frutas es la vitamina C o ácido ascórbico. La dosis diaria recomendada de vitamina C para adultos está entre 40 y 60 mg y los requerimientos son mayores en casos de embarazo o lactancia. También están presentes en estos alimentos otros poderosos antioxidantes como polifenoles y carotenoides.

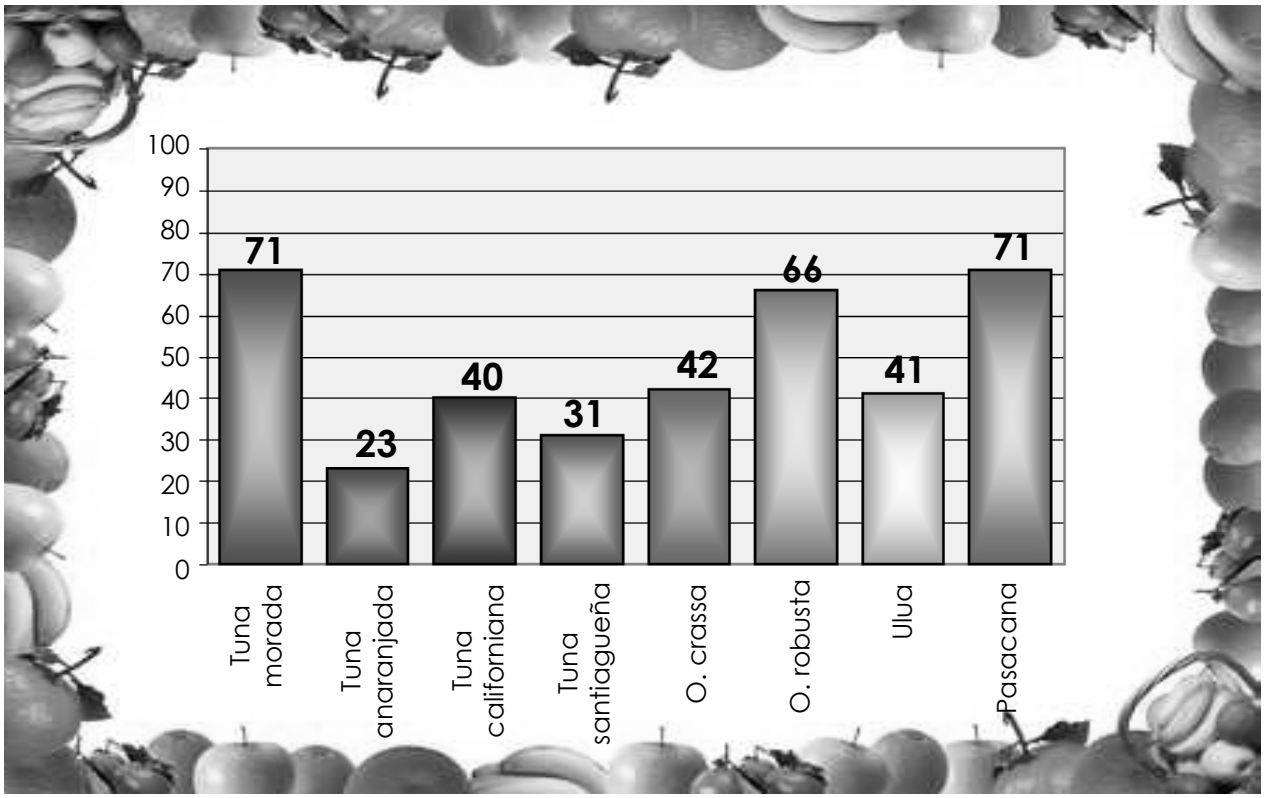
Hay un renovado interés en productos alimenticios que promueven la salud y es creciente la preocupación del consumidor en relación con la dieta y la salud. Esta es una tendencia que debe estimular a los productores locales para conocer las propiedades de los alimentos que se obtienen de nuestra región.

Existen numerosos estudios especialmente de países extranjeros que describen el contenido de sustancias antioxidantes de frutas, verduras y otros alimentos naturales. Sin embargo, los datos provenientes de alimentos de otros países generalmente no son aplicables a nuestros alimentos ya que son muy diferentes las condiciones climáticas, la variedad del cultivo y más aún la forma de procesar o cocinar el alimento afectando el contenido de vitaminas y de otras sustancias activas que llega al consumidor.

Por este motivo en el Instituto de Química de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero comenzamos a estudiar las propiedades antioxidantes de nuestros alimentos regionales tal como la población los consume. Se estudiaron hasta el momento más de 30 frutas, las más frecuentemente consumidas en nuestro país. Algunas fueron adquiridas en supermercados o verdulerías de la ciudad. En el caso de los frutos de cactáceas analizadas estas fueron gentilmente escogidas y provistas por el grupo de investigación de la Cátedra de Fruticultura del INDEAS (Instituto de Desarrollo del Semiárido), también de la FAyA. Las determinaciones fueron realizadas por, estudiantes avanzadas de la carrera de Licenciatura en Química, quienes integran el proyecto de investigación "Aprovechamiento de Fuentes Naturales regionales para la extracción de Sustancias bioactivas". El objetivo de este proyecto es revalorizar los frutos de nuestro monte nativo o bien cultivado en nuestra región y poder informar a la sociedad cuáles son los que aportan antioxidantes. Como muchas de éstos sólo están disponibles por períodos muy cortos en el año surgió el interés de estudiar también los productos elaborados con frutas tales como mermeladas, jaleas y arrope que tienen un plazo de conservación mucho más extenso y de fácil elaboración en forma doméstica. Las mermeladas fueron elaboradas usando nuestras frutas y sin ningún agregado de conservantes.

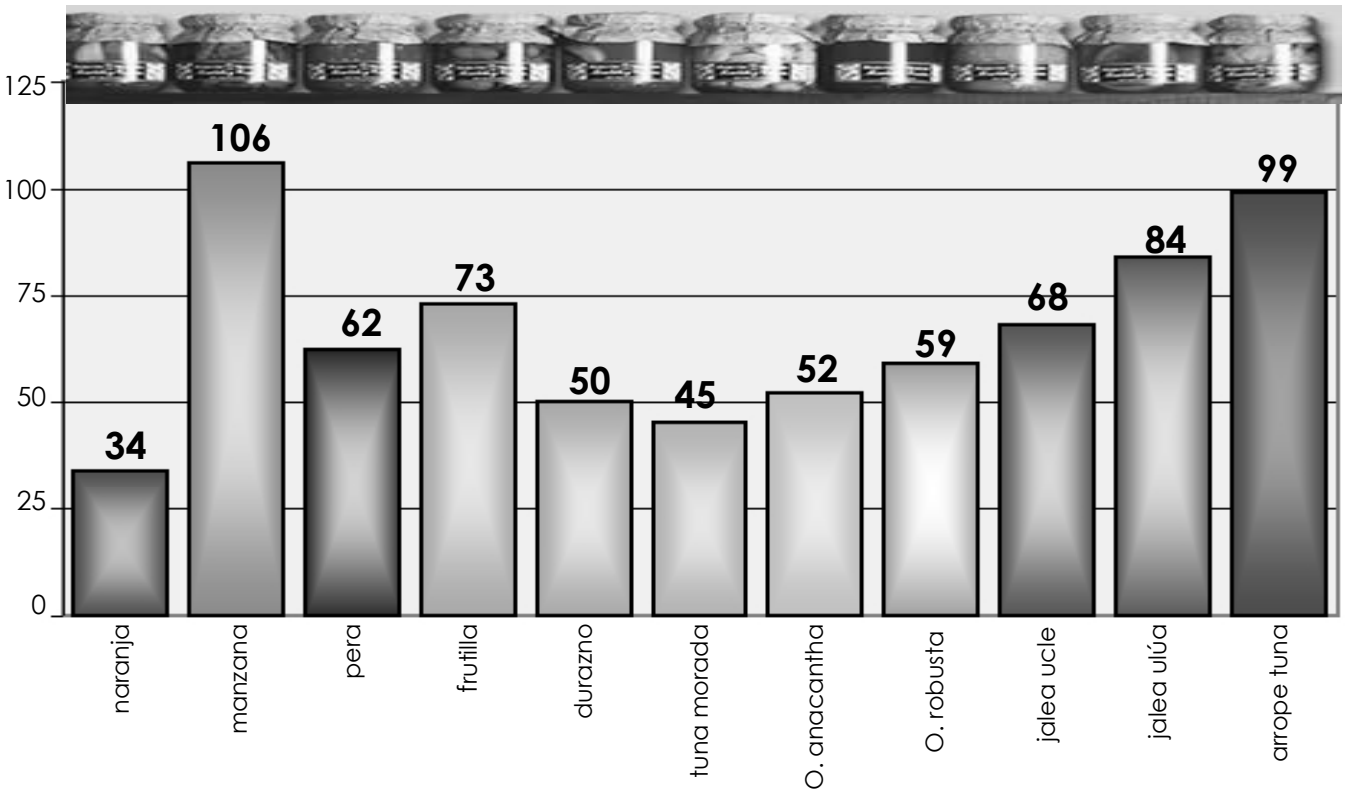
Para establecer una escala de la efectividad relativa frente a radicales libres para las frutas y los productos elaborados a partir de éstas, se expresaron los resultados de su actividad antioxidante como su equivalente en vitamina C.

Las determinaciones realizadas a partir de frutos frescos muestran valores de actividad antioxidante equivalente a 71 mg de ácido ascórbico cada 100 g de *O. ficus-indica* (tuna morada) y también un valor similar para la pasacana, mientras que les sigue *O. robusta* con 66 mg cada 100 g. Estos valores corresponden a frutos de moderada acción desactivante de radicales libres comparables con la actividad de frutas cítricas (equivalente a 66, 42 y 33 mg de ácido ascórbico por cada 100 g para naranja, mandarina y pomelo, respectivamente), aunque menores que los valores observados en frutilla y kiwi, equivalentes a 193 y 167 mg cada 100 g de fruto fresco.



Actividad Antioxidante equivalente mg vitamina C c/100 g de fruta

En el caso de los productos estudiados elaborados en base a frutos, tales como mermeladas, jaleas y arrope, se observó una buena actividad atrapadora de radicales libres, presentando un valor equivalente a 99 mg de ácido ascórbico por 100 g de arrope de tuna, seguido por la jalea de ulúa (*Harrisia pomanensis*) y la de ucle (*Cereus validus*) con 84 y 68 mg / 100 g, respectivamente. Estos valores son similares a los determinados para mermeladas tradicionales tales como pera, manzana y frutilla donde, con la misma metodología, los valores de actividad determinados fueron equivalentes a 62, 106, y 73 mg de ácido ascórbico 100 g de producto, respectivamente. En relación al efecto de la cocción, se observó una mayor retención de la capacidad antioxidante en los frutos de cactáceas que la observada para frutos que en fresco tienen alta actividad. Las mermeladas (especialmente las de *O. robusta* y O. *ficus-indica*) mostraron un colorido brillante mucho más atractivo que los observados en productos de frutas ricas en antocianinas tales como la frutilla. Esto está relacionado con la mayor estabilidad de las betalaínas, pigmentos responsables del color morado de estas *Opuntias*, en comparación con las antocianinas a los tratamientos térmicos. Esta es una observación de gran importancia puesto que el color es una de los factores que tiene mayor influencia en la aceptación de los alimentos por parte de los consumidores, y representa una característica muy positiva de los frutos de estas cactáceas.



Actividad Antioxidante equivalente mg vitamina C c/100 g de mermelada

Cuando se habla de antioxidantes es inmediata la asociación con las pastillas, comprimidos o tabletas que se promocionan como "fuente de la juventud" y suministro inagotable de energías para el organismo a precios exageradamente elevados justificados por estos grandes beneficios. Es importante recordar que un alimento como una fruta o una verdura es una fuente natural de vitaminas, antioxidantes y fibras.

Bibliografía

Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *Am J Clin Nutr* **2002**, *76,* 93-99.

Cook, N. C. and Samman, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary source. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*,66-76.

Davey, M.W.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Sanmartin, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, I.J.J.; Strain, J.J.; Farell, D.; Fletcher, J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric*. **2000,** *80*, 825-860.

Diplock, A. T. Antioxidants and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine* **1994**, *15*, 293-376.

Edenharder, R.; Keller, G.; Platt, K.L.; Unger, K.K. Isolation and Characterization of structurally novel antimutagenic flavonoids from spinach (*Spinacia oleracea*). *J. Agric. Food Chem.* **2001,** *49*, 2767-2773.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E. Free Radicals, Antioxidants and human diseases, Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, 119, 598-620.

Hertog, G. L.; Kromhout, D.; Aravanis C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza F. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven country study. Arch. Intern. Med. **1995**, *155*, 381-386.

Kim, D. O.; Lee, K. W.; Lee, H. J.; L.; C. Y. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity of Phenolic Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3713-3717.

Nakayama, T.; Nagata, C.; Kodama, M.; Kaneko, M. K. Cigarette-smoke induced DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*, **1985**, *314*, 462-464.

Ochoa. M. J. **2003**. Principales características de las distintas variedades de Tuna (*Opuntia spp*.) de la República Argentina. Cactusnet Newsletter FAO Internacional Technical Coorporation Network on Cactus. 31 p.

Ruiz Moreno, A. **1948**. La medicina en el "Paraguay Natural" (1771-1776) del P.J. Sánchez Labrador. Universidad Nacional de Tucumán.

Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity using different *in vitro* methods *Free Radical Res.* **2002**, *36*, 177-187.

Sies, H.; Stahl, W. Vitamins E and C, beta-carotene and carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1315-1321.

Tibble, D.L. Further evidence of the cardiovascular benefits of diets enriched in carotenoids. *Am. J. Clin. Nutr*. **1998**, *68*, 521-522.

Trush, M. A.; Kensler, T. W. Role of free radicals in carcinogen activation. In *Oxidative stress*. *Oxidants and antioxidants* **1991**, 277-318; Helmut Sies, Ed.; Academic Press; San Diego, CA.

Vinson, J.A.; Dabbagh, Y. A.; Serry M. M.; Jang, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for hearth disease. *J. Agric. Food Chem.* **1995,** *43*, 2800-2802.

Laboratorios integrantes de ALAC

1 - IACA – Laboratorios
Dres. Gentili R. - Gentili A. - Gentili R. (h)
San Martín 68 Gal. Plaza (8000) Bahía Blanca - Buenos Aires
Teledisc: (0291) - Tel/Fax: 4599999
e-mail: agentili@iaca.com.ar
rgentili@iaca.com.ar
web: www.iaca.com.ar

2 - Biomedicina Roca S.R.L.
Dres. Lebrun J. - Lebrun F. - Reyes S.
El Patagónico 761 (9000) Comodoro Rivadavia - Chubut
Teledisc: (0297) - Tel: 4467156 / 4476811 - Fax: 4476811
e-mail: flebrun@satlink.com

3 - IBTA - Inst. Bioquímico Tres Arroyos
Dres. Podestá J.J. - Santa María R.L. - Pagniez N.G. - Cervini M.E. - Cervini J.A.
Rivadavia 183 (7500) Tres Arroyos - Buenos Aires
Teledisc: (02983) - Tel/Fax: 431347 / 431348
e-mail: laboratorio@ibta.com.ar

4 - Fares Taie Instituto de Análisis
Dres. Fares Taie F. - Fares Taie H. - Sibechi N.
Rivadavia 3331 (7600) Mar del Plata - Buenos Aires
Teledisc: (0223) - Tel/Fax: 4753855 al 58
e-mail: aclinicos@farestaie.com.ar
laboratorio@farestaie.com.ar
web: www.farestaie.com.ar

5 - Instituto de Análisis Clínicos Dr. Héctor A. Milani
Dres. Milani H. - Milani C.
Rivadavia 150 (6000) Junín - Buenos Aires
Teledisc: (02362) - Tel: 446300 / 424236 / 444060 / 424230 - Fax: 430594
e-mail: info_iac@speedy.com.ar
web: www.labonet.com.ar

7 - IBC - Instituto de Bioq. Clínica de Scrigna y otros
Dres. Scrigna J. - Solari M. - Pugliessi H.
San Juan 1768 (2000) Rosario - Santa Fe
Teledisc: (0341) - Tel/Fax: 4219127 / 4260423 / 4405772
e-mail: gscrigna@elsitio.net

8 - IPAC - Laboratorio Privado de Análisis Clínicos S.R.L.
Dres. Pierángeli H. - Merea E. - de Uribarri I.G.
M.T. de Alvear 1771 PB (1060) Capital Federal
Teledisc: (011) - Tel: 4812-9919 / 4813-5175 - Fax: 4812-9919
e-mail: laboratorio_ipac@fibertel.com.ar

9 - Pérez Cambet - Mauco Laboratorios S.R.L.
Dra. Mauco de Pérez Cambet M.L.
Mitre 785 (7000) Tandil - Buenos Aires
Teledisc: (02293) - Tel: 426028 / 424342 - Fax: 424342
e-mail: labperezcambet@ciudadtandil.com.ar

11 - DIBAC S.R.L.
Dres. Bensimón M. - Fernández C.
Moreno 326 / San Martín 856 (9100) Trelew - Chubut
Teledisc: (02965) - Tel: 420814 / 425500 - Fax: 421426 / 421396
e-mail: dibac@speedy.com
cebio@speedy.com.ar

12 - Laboratorio Dres. Pessacq
Dr. Pessacq V.
Calle 7 N° 1557 (1900) La Plata - Buenos Aires
Teledisc: (0221) - Tel/Fax: 4214479
e-mail: labpessacq@speedy.com.ar
pessacqalac@speedy.com.ar

13 - Laboratorio de Análisis Clínicos Dres. Petrazzini
Dres. Petrazzini R. - Míguez V.
Gral. Roca 542 (5800) Río Cuarto - Córdoba
Teledisc: (0358) - Tel/Fax: 4625303
e-mail: labpetra@ciudad.com.ar
petrazzini@gmail.com
web: www.petrazzini.com.ar

14 - Laboratorio Montani
Dr. Montani J.C.
Rodríguez 922 (7000) Tandil - Buenos Aires
Teledisc: (02293) - Tel/Fax: 443430 al 31
e-mail: info@labmontani.com.ar

15 - Laboratorios Pergamino
Dres. Conti O. - Furnari C. - Furnari H. -
Dr. Alem 374 (2700) Pergamino - Buenos Aires
Teledisc: (02477) - Tel/Fax: 425358 / 424014
e-mail: labperg@bbt11.com.ar

17 - Laboratorio Dr. Pérez Elizalde
Dres. Pérez Elizalde R. - Pérez Elizalde R. (h)
25 de Mayo 576 (5500) Mendoza - Mendoza
Teledisc: (0261) - Tel: 4233063 / 4299350 - Fax: 4299350
e-mail: labpereze@lanet.com.ar

18 - Laboratorio Dres. Lejtman
Dr. Lejtman R. - Lejtman N.
Tucumán 762 (4700) Catamarca - Catamarca
Teledisc: (03833) - Tel: 424509 / 431150 - Fax: 427007
e-mail: laboratorio@laboratoriolejtman.com.ar
web: www.laboratoriolejtman.com.ar

19 - Inst. Bioquímico Concepción del Uruguay
Dres. Gadea F. - Arca M. - Gabioud J. – Bochatay N. - Chappuiss L. - Gadea F. (h)
Alberdi 871 (3260) C. del Uruguay - Entre Ríos
Teledisc: (03442) - Tel: 427799 / 425742 - Fax: 425742
e-mail: inbicu@ciudad.com.ar

20 - Lab. Análisis Clínicos Dr. Domingo Nanni
Dres. Nanni M.A. - Sandoz de Nanni S.
Colón 122/128 (3100) Paraná - Entre Ríos
Teledisc: (0343) - Tel/Fax: 4310783 / 4310564 / 4318506
e-mail: laboratorio@labnanni.com.ar
web: www.labnanni.com.ar

22 - Laboratorio Siufi
Dres. Siufi R. - Siufi C.
Belgrano 1165 (4600) S.S. de Jujuy - Jujuy
Teledisc: (0388) - Tel/Fax: 4227225
e-mail: labsiufi@imagine.com.ar

23 - IDAC - Instituto de Análisis Clínicos
Dr. Kossman A.J.
Mengelle 801 (8324) Cipoletti - Río Negro
Teledisc: (0299) - Tel/Fax: 4774488
e-mail: idackoss@idac-laboratorios.com.ar
web: www.idackoss.com.ar

24 - Laboratorio Riesco S.R.L.
Dr. Riesco F.
Av. San Martín 318 (6360) Gral. Pico - La Pampa
Teledisc: (02302) - Tel: 423333 / 430878 - Fax: 430878
e-mail: laboratorio@labriescosrl.com.ar

25 - Laboratorio Hidalgo S.A.
Dr. Hidalgo A.
Ladislao Matrínez 43 (1640) Martínez - Buenos Aires
Teledisc: (011) - Tel: 4792-6446 - Fax: 4792-5735
e-mail: alberto.hidalgo@laboratoriohidalgo.com
web: www.laboratoriohidalgo.com

27 - BIOLAB S.R.L.
Dres. Marín R. - Fernández M. - Gau M. - López M. - Lambert O.
Moreno 449 (6300) Santa Rosa - La Pampa
Teledisc: (02954) - Tel/Fax: 427081 / 423777
e-mail: biolab@ar.inter.net

28 - Laboratorio de Análisis Clínicos y Bacteriológicos
Dr. Sleibe Rahe E.
Lamadrid 546 (4600) S.S. de Jujuy - Jujuy
Teledisc: (0388) - Tel/Fax: 4228004
e-mail: esleibe@imagine.com.ar

29 - Centro de Análisis Clínicos
Dr. Marcomini R.
San Martín 1764 (3400) Corrientes - Corrientes
Teledisc: (03783) - Tel/Fax: 463702 / 431473
e-mail: rmarco@arnet.com.ar
web: www.marcominilab.com.ar

30 - Centro de Diagnóstico Bioquímico
Dres. Hellmers C. - Raspo de Hellmers L.
San Martín 538 (3280) Colón - Entre Ríos
Teledisc: (03447) - Tel/Fax: 421686
e-mail: cdbcolon@ciudad.com.ar

31 - CIBIC - Centro Diag. Médico Alta Complejidad S.A.
Dr. Fay O.
Pte. Roca 740 (2000) Rosario - Santa Fe
Teledisc: (0341)
Tel: 425-3376 / 425-5343 / 426-3999 - Fax: 426-2937
e-mail: ffay@cibic.com.ar
web: www.cibic.com.ar

37 - Laboratorio de Análisis Dres. Turner S.R.L.
Dres. Turner D. - de Turner E.
Balcarce 622 (2000) Rosario - Santa Fe
Teledisc: (0341) - Tel: 425-8250 / 425-8270 - Fax: 425-9745
e-mail: dturner@labturner.com.ar
web: www.labturner.com.ar

38 - CEMIC - Laboratorio - Departamento Análisis Clínicos
Dres. Smayevsky J. - Quiroga S. - Farinati Z.
Galván 4102 (1431) Capital Federal
Teledisc: (011) - Tel: 4546-8262 / 4546-8243 - Fax: 4546-8294
e-mail: progba@cemic.edu.ar
squiroga@cemic.edu.ar
web: www.cemic.edu.ar

40 - Laboratorio de Análisis Güemes
Dr. Lugo L.
Güemes 680 (3500) Resistencia - Chaco
Teledisc: (03722) - Tel/Fax: 428751
e-mail: lacguem@infovia.com.ar
web: www.labguemes.com.ar

41 - Laboratorio Biomédico Dr. Rapela S.A.
Dr. Rapela J.C.
Ramón Falcón 2534 (1406) Capital Federal
Teledisc: (011) - Tel: 4611-8479 - Fax: 4611-8907
e-mail: jcrapela@lab-rapela.com.ar
web: www.lab-rapela.com.ar

42 - Instituto Químico Privado
Dres. Tyberg R. - Bonsignore H.
Alvaro Barros 3192 (7400) Olavarría - Buenos Aires
Teledisc: (02284) - Tel: 421325 / 446565 - Fax: 446565
e-mail: iqpola@speedy.com.ar

43 - CEBAC S.R.L.
Dr. Insaurralde C.F.
Córdoba 1393 PB (3300) Posadas - Misiones
Teledisc: (03752) - Tel/Fax: 422353 / 439878
e-mail: cebacsrl@arnet.com.ar

44 - Laboratorio de Análisis Clínicos Gerosa
Dres. Parra I. - Moreno V. - Gerosa P. - Nazar J. - Gerosa L.
25 de Mayo 498 (9200) Esquel - Chubut
Teledisc: (02945) - Tel/Fax: 452050
e-mail: iparralac@ar.inter.net

46 - LADIAC S.A.
Dr. Denari J.H.
Lincoln 3872/6 (1650) San Martín - Buenos Aires
Teledisc: (011) - Tel/Fax: 4754-2808
e-mail: ladiac@arnet.com.ar
web: www.ladiac.com.ar

47 - Centro de Análisis Clínicos y Especializados
Dra. Chaila de Simesen de Bielke M.Z.
Monteagudo 368 (4000) S.M. de Tucumán - Tucumán
Teledisc: (0381) - Tel/Fax: 4303438
e-mail: zchaila@arnet.com.ar
cace-tuc@argentina.com

48 - Laboratorio de Alta Complejidad Dres. Castagnino
Dres. Castagnino J.M. - Castagnino P. - Castagnino M.
Sarmiento 65 1° (1870) Avellaneda - Buenos Aires
Teledisc: (011) - Tel/Fax: 4201-7825 / 8907
e-mail: jcasta@ar.inter.net

49 - Laboratorio de Análisis Clínicos Río Gallegos
Dres. Mordacci A. - Grosso O. - Irazoqui H. - Anglesio C.
Salta 246 (9400) Río Gallegos - Santa Cruz
Teledisc: (02966) - Tel/Fax: 421947
e-mail: labriogallegos@speedy.com.ar

50 - I.B.A.C. S.R.L.
Dr. Abutti G. A.
Salta 312 (4200) Sgo. del Estero - Santiago del Estero
Teledisc: (0385) - Tel/Fax: 4218058
e-mail: ibac@arnet.com.ar

52 - Instituto Bioquímico Cortés – Viñes
Dr. Albrieu H.
Dalmacio Vélez Sardfield 667 (5300) La Rioja - La Rioja
Teledisc: (03822) - Tel/Fax: 426134 / 427300
e-mail: ibcv@arnet.com.ar

53 - INDABI - Instituto de Análisis Bioquímicos
Dres. Goldaracena C. - García F. - Taus R. - Piaggio R. - Raffo O. - Piaggio O.
Urquiza 934 (2820) Gualeguaychú - Entre Ríos
Teledisc: (03446) - Tel/Fax: 424777
e-mail: indabi@indabi.com.ar
web: www.indabi.com.ar

54 - Laboratorio de Análisis Bioquímico-Clínicos
Dres. Nellem J. - Molinari L.
Arenales 1511 1° "A-B-C" (1638) Vte. López - Buenos Aires
Teledisc: (011) - Tel: 4797-7482 - Fax: 4791-3051
e-mail: info@lababc.com.ar
web: www.lababc.com.ar

55 - Laboratorio de Análisis Clínicos Gobernador Paz
Dres. Valencia Ru A. - Ru de Valencia M.
Gob. Paz 1523 (9410) Ushuaia - Tierra del Fuego
Teledisc: (02901) - Tel/Fax: 422387
e-mail: valenciam@speedy.com.ar

56 - Benelbaz y Asociados Laboratorios
Dres. Benelbaz G. - Benelbaz D.S.
9 de Julio 12 (oeste) (5400) San Juan - San Juan
Teledisc: (0264) - Tel/Fax: 4220143
e-mail: benelbaz.laboratorios@speedy.com.ar

58 - Laboratorio Viniegra – Zanuso
Dres. Viniegra G. - Zanuso E.
Almafuerte 3545 (1754) San Justo - Buenos Aires
Teledisc: (011) - Tel/Fax: 4441-0885 / 4651-3157 / 4484-8823
e-mail: laboratorios@viniegra-zanuso.com.ar
web: www.viniegra-zanuso.com.ar

60 - LES - Laboratorio Especializado del Sur
Dra. Balsamo N.
20 de Febrero 612 (8400) Bariloche - Río Negro
Teledisc: (02944) - Tel: 428834 - Fax: 428848
e-mail: les@leslaboratorio.com.ar

61 - Laboratorio Bioquímico Dr. Félix Bendersky
Dres. Zeitune I. - Medrano F.
20 de Febrero 149 (4400) Salta - Salta
Teledisc: (0387) - Tel/Fax: 4215308
e-mail: felix@salnet.com.ar

62 - Laboratorio LER S.A.
Dr. Calamera J.
Av. Córdoba 2077 1° "E" (1120) Capital Federal
Teledisc: (011) - Tel: 4961-7848 / 4962-8481 - Fax: 4962-3581
e-mail: ler@szinfonet.com.ar

63 - Lab. Bioanalítica - Análisis Clínicos y Hormonales
Dr. Damilano S.
Junín 933 1° (1113) Capital Federal
Teledisc: (011) - Tel: 4961-8312 / 4962-5320 - Fax: 4961-5868
e-mail: endolab@ciudad.com.ar

64 - L.A.C.E.R. S.R.L.
Dr. Ambrosio J.
Vidt 2065 PB "A y B" (1425) Capital Federal
Teledisc: (011) - Tel/Fax: 4826-7559 / 4826-5079
e-mail: ambrosiolab@lacersrl.com.ar

65 - Beleme Laboratorio
Dres. Beleme C. - Beleme M. - Beleme A.
Bolívar 248 (2900) San Nicolás - Buenos Aires
Teledisc: (03461) - Tel/Fax: 420020
e-mail: laboratoriobeleme@intercom.com.ar

67 - Mega Laboratorios
Dres. Albrecht A. - Curmona A. - Delponte M. - Scarafia L. - Soldano V.
Maipú 535 (2300) Rafaela - Santa Fe
Teledisc: (03492) - Tel/Fax: 505011 / 505012
e-mail: direccionteconica@laboratoriomega.com.ar

68 - TCba Salguero - Centro de Diagnóstico
Dres. Schonfeld C. - Aranda C. - Oneto A.
Salguero 560 (1177) Capital Federal
Teledisc: (011) - Tel: 4865-4591 / 9471 / 4601 / 4866-0470 - Fax: int. 126
e-mail: lacbainfo@szinfonet.com.ar
web: www.tcba.com.ar

69 - Laboratorio Dr. Raymundo Motter
Dr. Motter R. (h)
Maipú 243 (3600) Formosa - Formosa
Teledisc: (03717) - Tel/Fax: 422822
e-mail: moterlab@arnet.com.ar
web: www.raymundomotter.com.ar

70 - IBCI - Instituto Bioquímico Clínico Integral
Dres. Coniglio R. - Otero J.C. - Salgueiro A.M.
Saavedra 372 (8500) Viedma - Río Negro
Teledisc: (02920) - Tel/Fax: 421418
e-mail: ibci@rnonline.com.ar

71 - Laboratorio Bioquímica Clínica
Dras. Bearzi Wargon L. - Gamba P.
25 de Mayo 125 1° (9120) Puerto Madryn - Chubut
Teledisc: (02965) - Tel/Fax: 454505 / 471116
e-mail: lab@biomadryn.com.ar

72 - LACE - Lab. de Análisis Clínicos Especializados
Dres. Fernández E. - Elbarcha O.
Vélez Sardfield 562 (5000) Córdoba - Córdoba
Teledisc: (0351) - Tel: 4246666 / Fax: 4218013 - 4299540
e-mail: info@laboratoriolace.com.ar
web: www.laboratoriolace.com.ar

73 - Centro de Especialidades Bioquímicas
Dr. Lencina L.A.
Chacabuco 433 (5700) San Luis - San Luis
Teledisc: (02652) - Tel/Fax: 427793 / 427102
e-mail: ceb-sanluis@speedy.com.ar

Miembros Honorarios Permanentes

Dr. Adolfo Petraglia
Dr. Enrique Chernoff