

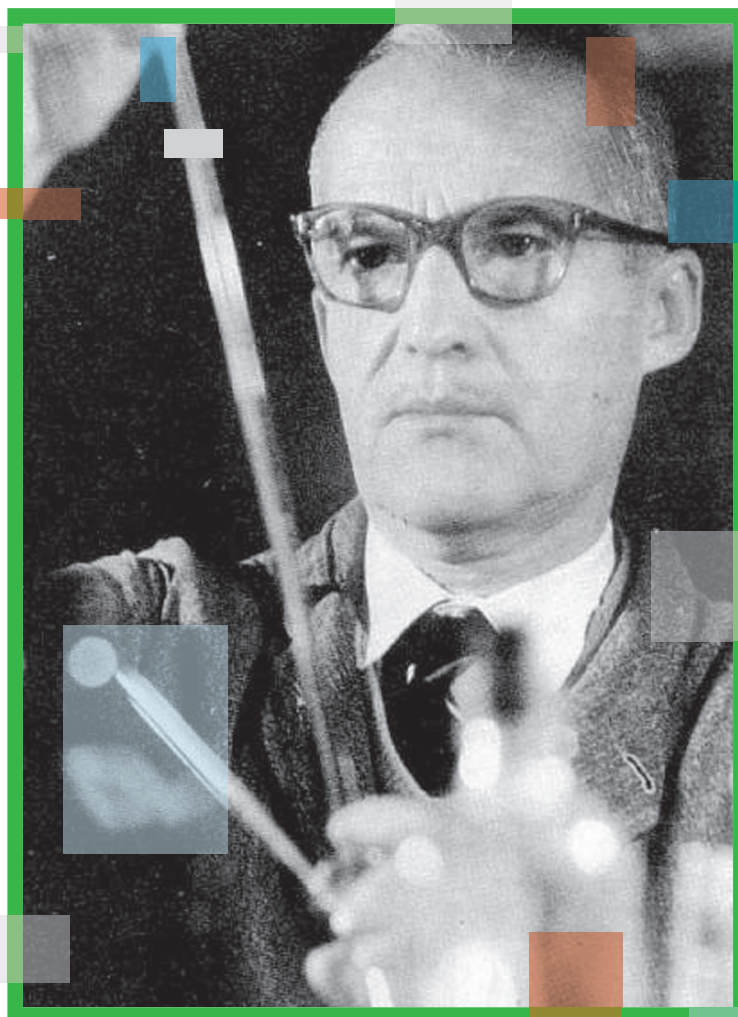
VOL 74 - Nº 3 - 2010

Ciudad de Bs. As. Argentina

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa

ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Bioquímica y Patología Clínica



Personajes destacados
Dr. Luis Federico Leloir

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de
América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)



Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina
y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

SUMARIO

- Pág. 9 **EDITORIAL: ¿Por qué aconsejamos leer?**
Dr. Orlando Gabriel Carballo - Profesora Inés Carozza
- Pág. 10 **Alteraciones morfofuncionales en riñón e hígado de ratas. Un tratamiento crónico con Ciclosporina A**
De la Cruz Rodríguez, L. C.; Araujo, C. R.; Rey, M. de R.; Oldano, A. V.; Posleman, S. E.
- Pág. 19 **Anticuerpo IgM contra virus rubéola en mujeres en edad reproductiva**
Picagua, E.; Rovira, C.; Gimenez, V.; Ferreira, L.; Carpinelli, M. M.; Granado, E.
- Pág. 23 **Diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas en embarazos de alto riesgo: experiencia de 20 años en el Centro Nacional de Genética Médica**
Rozental, S.; Furforo, L.; Zárate, C.; Cazayous, V.; Arroyo, M. V.; Pérez, M.; Márquez, M.; Canosa, I.; Aguirre, M. A.; Barbero, P.; Alba, L.; Móllica, M. E.
- Pág. 32 **Comparación de métodos de detección de *Salmonella spp* para la implementación de métodos alternativos en laboratorios bromatológicos (técnica iso6579 y pcr-Bax System q7)**
Sansogne, L. M.; Maekanehisa, V.; Tarditti, M. C.; Aramburu, M.; Rapela, A.
- Pág. 36 **Seroprevalencia de anticuerpos inmunoglobulina G frente a *Toxoplasma gondii* en pacientes ambulatorios**
Quintana, N.; Tabarez, E.; Lujan, S.; Jorda, G.
- Pág. 39 **CURSOS ABA 2012**

Bioquímica y Patología Clínica

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096) Buenos Aires - Argentina

Tel/ fax: 4384-7415 - Tel: 4381-2907 - e-mail: info@aba-online.org.ar - www.aba-online.org.ar

Registro Nacional de Derechos de Autor N° 034772 - Publicación cuatrimestral

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA - Fundada el 3 de septiembre de 1934

COMISIÓN DIRECTIVA

Presidente: Dr. Orlando Gabriel Carballo

Vicepresidente: Dra. Silvia González

Secretario: Dr. Gabriel Casal

Tesorero: Dra. Maria Ruggiero

1º Vocal Titular: Dr. Aníbal Bagnarelli

2º Vocal Titular: Dra. Patricia Sorroche

3º Vocal Titular: Dra. M. Laura D'ambrosio

1º Vocal Suplente: Dr. Alberto Villagra

2º Vocal Suplente: Dra. Isabel Desimone

3º Vocal Suplente: Dra. Viviana Osta

COMISIÓN REVISORA DE CUENTAS

Titular 1º: Dr. Mario Eposto

Titular 2º: Dr. Abel Pallares

Titular 3º: Dra. Graciela Peluffo

Suplente 1ª: Dra. Silvia Depardo

Suplente 1ª: Dra. Liliana Roquel

COMISIONES INTERNAS

Actividades Culturales

Presidente: Dra. Silvia Morilla

Secretario: Dr. Alberto Villagra

Vocal: Dr. Aníbal Bagnarelli

Prensa y Difusión

Presidente: Dra. Viviana Osta

Secretario: Dr. Gabriel Casal

Vocales:

Dra. Adriana Maritato

Dra. Amelia Morales

Dra. Alina Gómez

Acreditación de Laboratorios

Dr. Gabriel Migliarino

Dra. Silvia Depardo

Dra. Silvia Morilla.

Certificación Profesional

Presidente: Dr. Edgardo Poskus

Secretario: Dr. Aníbal Bagnarelli

Vocales:

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dr. Néstor Litwin

Dra. Patricia Otero

Cursos y Conferencias

Presidente: Dra. Silvia B. González

Secretaria: Dra. Claudia Ayuso

Miembros

Dra. Raquel Osatinsky

Dra. María Rial

Dra. Elena Yeyati

Dra. Liliana Roquel

Dra. Marysia Szeferner

Dra. Liliana Maggi

Dr. Alfredo Martínez

REVISTA

Director: Dr. Fernando Brites

Secretaria: Dra. María Laura D'Ambrosio

Comité Editorial

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Isabel Desimone

Dr. Jaime Kovensky

Dr. Eduardo Chaler

Relaciones Institucionales

Presidente: Dra. Silvia Morilla

Secretario: Dr. Néstor Litwin

Vocales:

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Raquel Osatinsky

COMITÉ ASESOR CIENTÍFICO

Dra. Mónica Aixala

Dra. Alicia Arechavala

Dra. Alicia Blanco

Dra. Ana María Blanco

Dr. Carballo Orlando Gabriel

Dra. Silvia Depardo

Dra. Silvia González

Dra. Raquel Osatinsky

Dr. José Oyhamburu

Dra. Juana Pasquini

Dra. Graciela Peluffo

Dr. Daniel Pirola

Dr. Edgardo Poskus

Dra. Patricia R. de Ferrer

Dr. Jorge Rey

Dra. María J. Rial

Dr. Otmario Roses

Dra. Sandra Rozenthal

Dra. Nora Slobodianik

Dra. Patricia Sorroche

PREMIOS

Dr. Edgardo Poskus

Dr. Nestor Litwin

Dr. Fernando Brites

Comparación de métodos de detección de *Salmonella spp* para la implementación de métodos alternativos en laboratorios bromatológicos (técnica ISO6579 y PCR-BAX System Q7)

Sansogne, L. M.¹, Maekanehisa, V.², Tarditti, Ma. C.³, Aramburu, M.⁴, Rapela, A.⁵

⁽¹⁾Técnico en Alimentos.

⁽²⁾Analista de Microbiología.

⁽³⁾Licenciada en Bioquímica.

⁽⁴⁾Licenciado en Bioquímica.

⁽⁵⁾Bioquímico.

Lugar de Trabajo: Laboratorio Biomédico Dr. Rapela. Buenos Aires, Argentina.

Contacto: Tec. Sansogne, Luis Marcelo, Ramón Falcón 2534 (Ciudad autónoma de Buenos Aires) Tel: 011-4610-9971, microbiologia2@rapela.com.ar

RESUMEN

Dada la demanda continua de resultados a corto plazo en la determinación de *Salmonella spp* se procederá a comparar los resultados obtenidos con la Técnica tradicional detección de *Salmonella spp* según ISO 6579 07/2002 4ª ed y el método alternativo Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Bax® System-Q7.

Objetivo. Establecer la concordancia entre la determinación de *Salmonella spp* según ISO 6579 07/2002 4ª ed. y la determinación por PCR BAX® System-Q7 (método alternativo) para evaluar la implementación de este último en laboratorios.

Procedimiento. Se procesaron y analizaron en paralelo muestras naturalmente contaminadas para la determinación de *Salmonella spp*.

Resultados. Se realizó un análisis estadístico de resultados obtenidos, calculándose el Índice de Concordancia KAPPA (0,81).

Conclusión. A partir de los datos obtenidos podemos concluir que el grado de concordancia entre ambas técnicas es muy buena (índice kappa=0,81 según criterio ISO16140), lo cual hace que la implementación del método PCR-BAX® System-Q7 por parte de los laboratorios sea una solución operativa para responder a la demanda de plazos cortos de la entrega de resultados.

Palabras clave: *Salmonella spp*, PCR-BAX® System-Q7, ISO6579, concordancia.

SUMMARY

Given the continued demand of short term results in the determination of *Salmonella spp* we will proceed to compare the results obtained with the Traditional *Salmonella spp* Detection Technique, ISO 6579 07/2002 4ª ed and the Polymerase's Chain Reaction alternative method (PCR) Bax® System-Q7.

Objective. To establish the concordance between the *Salmonella spp* determination according to ISO 6579 07/2002 and the determination by PCR BAX® System-Q7 (alternative method) to evaluate the implementation of the last one in laboratories.

Procedure. Naturally contaminated samples were processed and analyzed at the same time, to determine *Salmonella spp*.

Results. A statistic analysis of the obtained results was made, calculating the KAPPA Concordance Index (0.81).

Conclusion. Given the obtained results we can conclude that the degree of concordance between both techniques is VERY GOOD (kappa index=0.81 according to ISO16140 criteria), which makes the implementation of PCR BAX® System method by laboratories an operative solution to respond to the demand of short term results delivery.

Key words: *Salmonella spp*, PCR-BAX® System, ISO6579, concordance.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de intoxicación alimentaria es la manifestación clínica más común de infección por *Salmonella* spp.

Por lo general, los animales son solo portadores que eliminan *Salmonella* de forma regular pero en pequeña cantidad. El medio ambiente animal y humano se contaminan por excretores humanos y animales. A través de las aguas superficiales, de los insectos, las aves y los roedores, pueden contaminarse tanto los alimentos como los piensos, estableciéndose así ciclos de infección.

Una serie de factores tales como la práctica de cría de animales, los sistemas de reproducción animal, la producción centralizada de alimentos y de piensos y el comercio internacional de alimentos contribuyen a crear ciclos de perpetuación entre hombres y animales.

Prácticamente todos los alimentos de origen animal pueden ser vehículo de transmisión de *Salmonellas* al hombre. Los alimentos pueden contaminarse por excretores humanos en cualquier fase de los procesos de manipulación, desde las materias primas a la preparación de alimentos en la cocina. Las *Salmonellas* pueden a veces ser vehiculadas por los alimentos de origen vegetal, tales como los cereales y los frutos del cocotero. Se registraron brotes de salmonellosis por colorante de carmín y por productos farmacéuticos. Sin embargo, los vehículos dominantes son la carne (ternera, cerdo, aves, etcétera), los huevos y los productos industrializados que contienen estas materias primas básicas.

Debido a que el mercado nacional e internacional exige alimentos libres de microorganismos patógenos tales como *Salmonella* spp, es necesario implementar técnicas rápidas ya que las técnicas microbiológicas convencionales toman de 4 a 6 días para la detección e identificación de este microorganismo.

Acerca de la Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La PCR es una herramienta analítica para una rápida replicación de fragmentos de ADN específico. En una aplicación típica, el ADN de la muestra es combinada con el ADN polimerasa, nucleótidos y *primers* que son específicos para una determinada secuencia de nucleótidos. Esta mezcla es sometida a una serie de tiempos de calentamiento y enfriamiento. El calentamiento desnatura el ADN, separándolo en cadenas simples. A medida que la mezcla se enfría, los *primers* reconocen y enlazan la secuencia de ADN específico. La Taq polimerasa utiliza a continuación los nucleótidos para extender los *primers*, creando así dos copias del fragmento de ADN específico [amplificación]. Al repetir el ciclo de desnaturación, reconocimiento y extensión se produce un aumento exponencial en el número de fragmentos de ADN del microorganismo blanco, creando millones de copias en un corto tiempo. Si la secuencia del microorganismo blanco no está presente, una amplificación no detectable toma lugar.

El sistema BAX® de detección es un método automático molecular para detectar microorganismos en muestras de alimentos y medio ambiente.

El método BAX® combina velocidad y facilidad de uso con

un rendimiento sin precedente para dar resultados rápidos, precisos y fiables.

El método tradicional está basado en los rasgos o comportamientos bacterianos, tales como la respuesta a los anticuerpos, que pueden causar problemas con la reactividad cruzada de los organismos relacionados. El sistema BAX®, sin embargo, se centra en la propia estructura genética de las bacterias mediante la detección de un fragmento de ADN que sólo se encuentra en el organismo blanco.

El sistema BAX® fue el primer método de detección para alimentos que usó la tecnología de Reacción de cadena de polimerasa (PCR), que crea rápidamente millones de copias del fragmento de ADN específica, si está presente en la muestra. Por lo tanto, se obtiene claramente detectable "sí" o "no" a pocas horas de comenzar el ensayo, sin la necesidad de interpretación de los expertos.

Acerca del punto final de detección

Las tabletas de PCR del BAX® System en un análisis estándar contiene colorante fluorescente que se une con la doble cadena de ADN y emite una señal de fluorescencia que responde a la luz. Después de la amplificación, el BAX® System comienza la fase de detección donde las cadenas de ADN se separan [desnaturalización], revelando la coloración y la reducción de la señal. Este cambio en la fluorescencia puede registrarse en la temperatura para generar una curva de fusión, que es interpretada por el BAX® System software como resultado positivo o negativo.

OBJETIVO

Establecer el grado de concordancia entre los métodos de detección de *Salmonella* spp según ISO 6579 07/2002 y alternativo PCR BAX® System-Q7 para evaluar la implementación de este último en laboratorios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el trabajo, fueron procesadas y analizadas en paralelo muestras de productos terminados de alimentos balanceados, materias primas tales como harinas, grasas, aceites, polvos y líquidos, y también muestras ambientales [gasas]. Las dos técnicas parten del mismo enriquecimiento primario. Se pesó 25 g de muestra en bolsa Stomacher y se agregó 225 ml de agua de peptona bufferada. En el caso de gasas e hisopados se agregó 50 ml de agua peptonada bufferada. Se incubó a 37±1 °C por 18±2 h.

Procedimiento para el aislamiento de *Salmonella* spp según ISO 6579 07/2002 4° ed.

El subcultivo obtenido se inoculó en Rappaport Vassiliadis con Soya [caldo RVS] y Muller Kauffmann Tetrathionato con Novobiocina [caldo MKTTn]

Se transfirió 0.1 ml del cultivo obtenido a un tubo que contenía 10 ml de Caldo RVS, se incubó a 41.5±1 °C durante 24±3 h y 1 ml del cultivo obtenido a un tubo que contenía 10 ml de Caldo MKTTn, se incubó a 37±1 °C durante 24±3 h. De estos cultivos se inocularon 2 medios sólidos selectivos: Agar Xylo-

sa Lisina Desoxycolato (agar XLD) y Hecktoen. Las placas se incuban 37±1 °C durante 24±3 h. Confirmación: las colonias sospechosas de *Salmonella* spp fueron subcultivadas en agar nutritivo y confirmadas por medio de pruebas bioquímicas (TSI, LIA, kit comercial GN-A panel) y serológicas test somático test flagelar, se realizó investigación de antígenos “O” y antígenos “H”, test de Látex para *Salmonella*. Figura a) Diagrama de flujo.

Procedimiento para el aislamiento de *Salmonella* spp según manual de BAX® System-Q7. Se sembró 10 µl del homogenato inicial en 500 µl del caldo BHI (caldo cerebro-corazón) y se incubó durante 3 horas a 37 °C.

Se preparó el reactivo de la lisis, adicionando 150 µl de proteasa a un frasco que contiene 12 ml de *buffer*.

Se transfirió 5 µl de la muestra enriquecida a 200 µl del reactivo de lisis.

Se colocó los tubos *cluster* en el bloque de calentamiento que se encuentra precalentado a 35-39 °C durante 20 minutos luego se traspasó al bloque de calentamiento que se encuentra precalentado a 92-98 °C durante 10 minutos.

Después de que la lisis hubo sido completada, se enfriaron los tubos de lisis en un bloque de enfriamiento que debe estar entre 2-8 °C, durante 5 minutos.

Se colocaron los tubos de PCR en el bloque de enfriamiento [4 °C].

Se transfirieron 50 µl del lisado a los tubos de PCR.

Se procedió a la realización de la corrida y se efectuó la lectura e interpretación de resultados.

Con las muestras positivas se siguió la marcha de la técnica ISO 6579 07/2002 4º ed., desde el paso a RVS y MKTn.

Estadísticos utilizados

Desviación positiva: ocurre cuando el método que se pretende validar da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo.

Esta desviación se convierte en un resultado positivo falso cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo.

Desviación negativa: ocurre cuando el método que se pretende validar da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo.

Esta desviación se convierte en un resultado negativo falso cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo.

Falsos negativos: es la probabilidad de que el ensayo arroje un resultado negativo cuando la muestra contiene el analito.

Falsos positivos: es la probabilidad que el ensayo arroje un resultado positivo cuando la muestra no contiene el analito.

	Método referencia positivo	Método referencia negativo
Método alternativo positivo	+/+ (VP)	-/+ (DP)
Método alternativo negativo	+/- (DN)	-/- (VN)

Evaluación de concordancia Kappa

Criterio según ISO 16140

Menor a 0,1 No hay.

Entre 0,1-0,4 Débil.

Entre 0,41- 0,60 Moderada.

Entre 0,61-0,80 Buena.

Entre 0,81-1,0 Muy buena.

$$Kappa = \frac{2(VPXVN - FNXP)}{[(VP+FP) (FP+VN) + (VP+FN) (FN+VN)]}$$

Sensibilidad relativa: capacidad de un método alternativo de dar positivo cuando el método de referencia arroja resultados positivos.

SENSIBILIDAD RELATIVA= VP/ (FN + VP) x100

Especificidad relativa: capacidad de un método alternativo de dar negativo cuando el método de referencia arroja resultados negativos.

ESPECIFICIDAD RELATIVA= VN/ (FP + VN) x100

Exactitud relativa: grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido

EXACTITUD RELATIVA % = VP + VN/ (VP+ VN + FN + FP) x100

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Perfil de curva de *Salmonella* spp positiva

- Tres picos *target* se visualizan a 85, 88 y 90° C, aproximadamente.
- Hay una separación de 5 °C entre el primer y el tercer picos, aproximadamente.
- El rango del pico *target* es entre 84 a 92 °C.
- El rango del pico control es entre 76 a 80 °C.
- Cuando el nivel de *Salmonella* en la muestra es muy alta, los picos entre los 88-90 °C se pueden combinar, por lo que se visualizan dos picos característicos. En este caso, los picos combinados son muy altos y el pico control puede ser muy bajo o estar ausente.

Se consideraron para los resultados positivos:

- Señal alta: gráficos (Temperatura vs Fluorescencia) característicos de *Salmonella* spp, donde los picos sean mayores a 70.
- Señal media: gráficos (Temperatura vs Fluorescencia) característicos de *Salmonella* spp, donde los picos sean entre 30 y 70.
- Señal baja: gráficos (Temperatura vs Fluorescencia) característicos de *Salmonella* spp, donde los picos sean menores a 30.

La confirmación de *Salmonella* spp se realiza según la Técnica de detección de *Salmonella* spp ISO 6579 07/2002 4º ed.

Perfil de curva de *Salmonella* spp negativa

- No se visualizan los picos *target*, está presente un pico de control alto.
En algunos casos, se puede observar un pico muy pe-

queño no específico entre el rango de temperatura de 84 a 92 °C, pero no aparecerá para los resultados positivos, como se describió anteriormente.

MUESTRAS TOTALES	659
POSITIVOS -BAX	107
POSITIVOS -ISO	88
NEGATIVOS -BAX	547
NEGATIVOS -ISO	571
INDETERMINADOS	5

VP-positivos verdaderos	82
DP/FP-falsos positivos	25
VN-negativos verdaderos	541
DN/FN-falsos negativos	6

Los resultados fueron analizados estadísticamente, y se obtuvo:

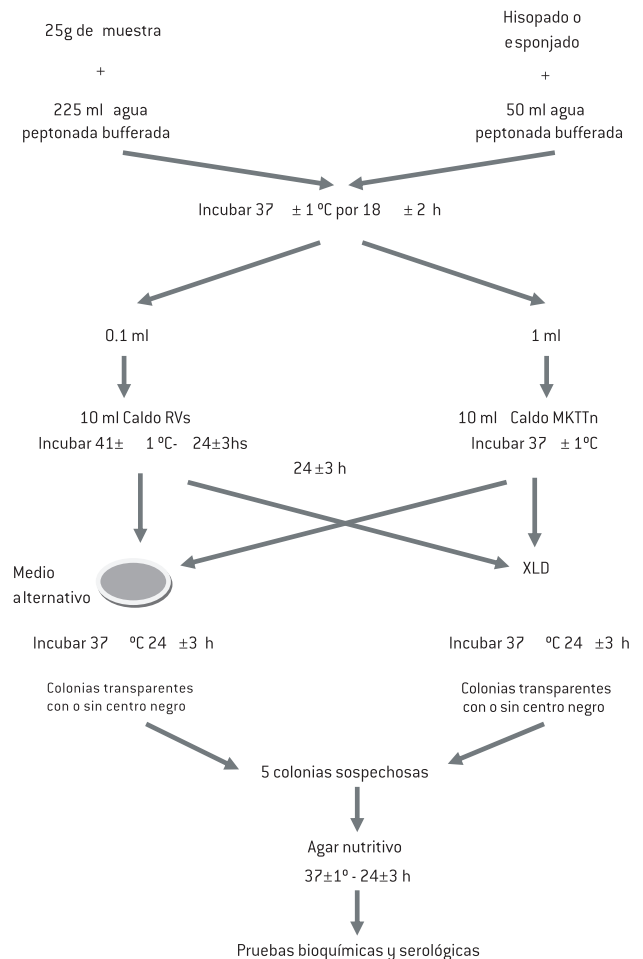
ESPECIFICIDAD RELATIVA	95,58 %
SENSIBILIDAD RELATIVA	93,18 %
EXACTITUD RELATIVA	94,54 %
CONCORDANCIA KAPPA	0,81

CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos podemos concluir:

1. La concordancia entre ambas técnicas es muy buena (Índice kappa=0,81 según criterio ISO16140), lo cual hace que la implementación de la técnica molecular *PCR-BAX® System-Q7* sea una valiosa alternativa para la detección de *Salmonella* spp en alimentos.
2. El método alternativo *PCR-BAX®* presenta una ventaja en cuanto al tiempo de informe de los resultados negativos (ausencia de *Salmonella*) ya que por Bax el resultado se informa en 36 h y por técnica tradicional (ISO 6579) en 72 h. Esto impacta de manera muy positiva en la satisfacción de los clientes en cuanto a la necesidad de tener los resultados en tiempos más cortos (por ejemplo, cuando el resultado es necesario para liberar un lote de alimentos balanceados); además de transformarse en una ventaja competitiva para el laboratorio.
3. Las posibles causas de los falsos positivos y los falsos negativos no se estudiaron en este trabajo debido a que la especificidad relativa, la sensibilidad relativa y la exactitud relativa obtenidas fueron mayores al 90 %, por tanto se consideraron despreciables.
No obstante, se plantea como desafío futuro realizar la investigación de estos para determinar las causas que los originan ya que no se encontró bibliografía que describa esta situación.
4. Todos los resultados positivos se deben confirmar por método tradicional.

Figura 1: Diagrama de flujo: Investigación de *Salmonella* spp según ISO 6579



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ICMSF Microorganismos de los Alimentos 1. Su significado y métodos de enumeración. 2ª edición. Editorial Acribia. S.A.
- International Standard ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- Guía de Usuario Dupont Qualicon BAX® System. International Standard ISO 16140, first edition: 01/05/2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio Bio-médico Dr. Rapela, en especial a la Gerente de Calidad, por haber brindado su apoyo y las facilidades para la realización del trabajo, así como a la empresa Bioartis por la asesoría técnica y a la Licenciada Patricia Ranea por incentivar a los autores a la realización de este trabajo.