



REVISTA

DEL COLEGIO DE MICROBIÓLOGOS Y QUÍMICOS CLÍNICOS DE COSTA RICA

Volumen 21, N° 4 • Octubre - diciembre, 2015 • ISSN: 2215-3713

Octubre-diciembre

CONTENIDO

Artículos

- Una metodología para medir activación de los receptores Fc γ humanos y sus aplicaciones.
- Estudios sobre la vía de tráfico intracelular y vías de señalización activadas por la fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*.
- Estudiando el papel de los neutrófilos polimorfonucleares en la brucelosis.
- Revisión de los métodos moleculares para la detección del virus del papiloma humano registrados en Costa Rica.
- La importancia de las estrategias de mercadeo social en la captación de donantes de sangre.

Caso clínico

- Endocarditis causada por *Granulicatella adiacens* en paciente adulto.

Carta al editor

- Descubra su relación con los microbios.



COLEGIO DE MICROBIÓLOGOS Y QUÍMICOS CLÍNICOS DE COSTA RICA

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

JUNTA DIRECTIVA 2015-2016:

Presidenta. Dra. Lidiette Salazar Palma
Secretaria. Dra. Rita Marín Naranjo.
Tesorerera. Dra. Carolina Loría Acosta.
Fiscal. Dra. Mercedes Hernández Guerrero.
Vocal 1. Dra. Joselyn Quirós Montero.
Vocal 2. Dra. Laura Hernández Alvarado.
Vocal 3. Dr. Rolando Leiva Escalante.

COMITÉ EDITORIAL:

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

Dr. César Cerdas Quesada
Hospital La Católica.

Dr. Rodrigo Cruz Jiménez
Hospital Clínica Bíblica

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

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

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

Revisión de texto en español:

Dr. Carlos Cerdas Chinchilla

Revisión de texto en inglés:

Rodolfo Gutiérrez Fernández

Diagramador:

Jorge Vargas González

ISSN: 2215-3713

Derechos reservados ©2015

JVDISENO

jdiseño1958@gmail.com / 8387+4343



La Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica es publicada trimestralmente por este colegio profesional. Constituye un medio de divulgación del quehacer científico de investigadores nacionales e internacionales y cumple con un propósito de responsabilidad social con nuestros colegiados y con los gremios profesionales afines.

Esta revista publica trabajos originales en español e inglés, es de acceso libre y sin costo de suscripción.

ÍNDICE

Nota del editor

94 Dr. Gabriel Muñoz-Cernadas, Editor jefe.

Artículos

95 Una metodología para medir activación de los receptores Fcγ de humanos y sus aplicaciones. *Eugenia Corrales-Aguilar*. Sección de Virología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

99 Estudios sobre la vía de tráfico intracelular y vías de señalización activadas por la fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*. *Laura Monturiol-Gross*. Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica.

103 Estudiando el papel de los neutrófilos polimorfonucleares en la brucelosis. *Elías Barquero-Calvo*. Laboratorio de Bacteriología, Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET), Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional.

109 Revisión de los métodos moleculares para la detección del virus del papiloma humano registrados en Costa Rica. *Michael Zúñiga-Rojas*. Proyecto Epidemiológico Guanacaste. *Ana Cecilia Rodríguez-Céspedes*. Instituto Costarricense de Investigaciones Clínicas

121 La importancia de las estrategias de Mercadeo Social en la captación de donantes de sangre. *Roger Soto Palma*. Banco de Sangre, Hospital CIMA San José.

Caso clínico

125 Endocarditis causada por *Granulicatella adiacens* en paciente adulto. *Óscar Roberto Quesada-Pacheco*, Laboratorio Clínico, Hospital San Rafael de Alajuela. *Sergio Calderón-Bejarano*, Servicio de Medicina, Hospital San Rafael de Alajuela.

Carta al editor

128 Descubra su relación con los microbios. *Rafael Jiménez-Bonilla*.

130 • Instrucciones para los autores

Nota del editor

El Premio Nacional de Ciencia y Tecnología “Clodomiro Picado Twilight” se otorga a los mejores trabajos de investigación original que realicen y den a conocer, individualmente o en forma colectiva, ciudadanos costarricenses en los campos de la investigación científica y de la investigación tecnológica.

El pasado mes de agosto este premio fue entregado a cuatro investigadores costarricenses: tres de ellos pertenecen al campo de la microbiología y decidieron compartir sus trabajos en este número de la revista; en ellos describen las investigaciones realizadas merecedoras del galardón.

La Dra. Eugenia Corrales Aguilar, coordinadora y profesora asociada de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica e investigadora del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIET), compartió el premio en Tecnología con la Dra. Tatiana Trejos Rodríguez, del Departamento de Química Analítica del Laboratorio de Ciencias Forenses de Costa Rica.

El artículo de la Dra. Corrales, además de describir una metodología para medir la activación de receptores FCgamma, como su título señala, «será sumamente útil para la definición de nuevos correlatos de protección inmune y en el diseño de anticuerpos IgG para el uso en la terapia clínica.»

La Dra. Laura Monturiol Gross, investigadora del Instituto Clodomiro Picado y docente de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, y el Dr. Elías Barquero Calvo, investigador del Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Nacional y profesor del CIET, compartieron el premio en Ciencia.

El trabajo realizado por la Dra. Monturiol describe el modo de acción de la fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*, principal factor de virulencia de esta bacteria que causa gangrena gaseosa. El conocimiento de estos mecanismos abre el campo a nuevas investigaciones orientadas a desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a reducir el daño en los tejidos de los pacientes afectados por la gangrena.

El trabajo del Dr. Elías Barquero aporta un gran conocimiento, no solo sobre *Brucella*, sino también acerca de la regulación del sistema inmune adaptativo por los neutrófilos durante la brucelosis y la cronicidad de esta infección en muchos casos.

Solicité personalmente la colaboración a la Dra. Monturiol y al Dr. Barquero. A la Dra. Corrales le escribí a Alemania, donde se encontraba investigando. Los tres inmediatamente aceptaron colaborar en este número y admiré el entusiasmo con que hablan de su trabajo y el uso de un lenguaje que se puede entender con facilidad. Todos han resaltado que ha sido un trabajo en equipo y reconocen el apoyo y colaboración de sus compañeros. Quiero agregar que conocí a tres personas especiales que en poco tiempo cada uno por su cuenta, me dió cátedra de calidad humana además de un gran conocimiento científico y enamoramiento por lo que hacen. Eso los hace doblemente ganadores y merecedores de ese premio.

El cuarto artículo fue realizado por dos grandes investigadores, el M. Sc. Michael Zúñiga y la Dra. Ana Cecilia Rodríguez, que presentan una revisión cuidadosa de los diferentes métodos moleculares para el estudio del virus del papiloma humano con que se cuenta en nuestro país.

El trabajo del Dr. Róger Soto Palma es uno de los primeros trabajos sobre mercadeo en Banco de Sangre que se ha publicado en Costa Rica; describe las herramientas y las estrategias convenientes para el reclutamiento de nuevos donantes de sangre y lograr la permanencia de los que ya han donado.

Por último, se presenta un caso clínico que describe el primer aislamiento de la bacteria *Granulicatella adiacens* en el Hospital San Rafael de Alajuela, los métodos de laboratorio utilizados y la evolución del paciente.

Creo que terminamos este año y cerramos este volumen con un aporte muy valioso para todos nuestros lectores, quienes como siempre recuerdo, son la razón de ser de esta revista. ☺

Dr. Gabriel Muñoz-Cernadas
Editor jefe

Una metodología para medir la activación de los receptores Fc gamma humanos y sus aplicaciones

Eugenia Corrales-Aguilar¹

Resumen:

La respuesta inmune mediada por IgG es crucial en la defensa antiviral y es utilizada para el diagnóstico serológico de las infecciones. Los receptores Fc gamma, que reconocen la región Fc de las IgG, se diferencian entre sí por sus distintas afinidades para unir IgG, su preferencia de unión a ciertas subclases de IgG, su patrón de expresión en las células inmunes y por la gran variedad de mecanismos de eliminación de patógenos. Determinar su activación *in vitro* es de suma importancia, pero técnicamente es muy difícil. Por lo tanto, se estableció una nueva metodología para medir los anticuerpos antivirales tipo IgG capaces de activar los receptores Fc gamma del hospedero de una forma individual. Esta metodología consiste en la cocultivación de células blanco infectadas decoradas con anticuerpos IgG inmunes junto con células del hibridoma murino BW5147 que expresan establemente en su superficie receptores quiméricos. Estos receptores quiméricos están formados por el dominio extracelular de los receptores Fc gamma humanos fusionados con los dominios transmembrana e intracelular de la cadena zeta del CD3 murino. Su activación por medio de complejos inmunes, formados en la superficie de células blanco, resulta en la secreción de IL-2 murina, que es cuantificada fácilmente con un ELISA. Se demostró una aplicación universal utilizando células blanco infectadas con diferentes virus: herpes simplex, Epstein-Barr, citomegalovirus humano, sarampión y el virus respiratorio sincicial o con células que expresan la gp120 del VIH-1. Concluyendo, se estableció una herramienta novedosa, confiable y simple para cuantificar la activación de los receptores Fc gamma por medio de anticuerpos IgG. Esta metodología será sumamente útil para la definición de nuevos correlatos de protección inmune y en el diseño de anticuerpos IgG para el uso en la terapia clínica.

Palabras clave: anticuerpos, receptores Fc gamma, virus.

Abstract:

IgG responses are crucial in antiviral defense and instrumental for the serodiagnosis of infections. Fc gamma receptors (Fc gammaRs), which recognize the Fc-part of IgG, differ regarding their IgG binding affinity, IgG subclass preference, cellular expression profile and pathogen elimination mechanisms elicited upon activation. Assessing their activation *in vitro* is of fundamental importance, but technically difficult. Therefore, a novel assay for measuring antiviral IgG antibodies triggering activation of individual host Fc gamma receptors was established. The assay comprises the co-cultivation of virus-infected target cells with immune IgG antibodies and mouse BW5147 hybridoma cells stably expressing chimeric Fc gammaR-CD3zeta chain molecules consisting of the extracellular domain of human Fc gamma receptors fused to the transmembrane and intracellular domains of the mouse CD3zeta chain. Triggering of the chimeric Fc gammaR receptors by immune complexes formed on the surface of IgG-opsonized virus-infected target cells resulted in Fc gammaR activation leading to IL-2 secretion by BW5147 cells, which was quantified as a surrogate marker in an ELISA. Target cells infected with various human pathogenic viruses including herpes simplex virus type 1 (HSV-1), Epstein-Barr virus (EBV), human cytomegalovirus (HCMV), measles virus (MV), and respiratory syncytial virus (RSV) or displaying human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) gp120 evoke dose-dependent IgG responses demonstrating the universal applicability of the assay. Taken together, a new reliable and simple tool for measuring antibodies triggering activation of Fc gamma receptors was established. This assay will be instrumental for defining novel correlates of IgG immunity and the design of new therapeutic IgGs

Key words: Antibodies, Fc gamma receptors, viral infections.

Artículo recibido el 26/10/2015, aceptado para su publicación el 28/10/2015
I. Sección de Virología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET),
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica
Correspondencia: eugenia.corrales@ucr.ac.cr

Los anticuerpos IgG son fundamentales para la defensa antiviral y son ampliamente utilizados para el diagnóstico serológico de las infecciones⁽¹⁾. Los anticuerpos IgG pueden ejercer distintas actividades antivirales: en forma directa al neutralizar las partículas virales, activar la cascada del complemento, iniciar la fagocitosis o al funcionar como complejo antígeno-anticuerpo que se unen a los receptores Fcγ para activar distintas células del sistema inmune^(2,3). Por lo tanto, los receptores Fcγ tienen un papel esencial, ya que conectan los mecanismos de defensa humoral con los mecanismos de la defensa celular.

En el ser humano se pueden encontrar tres diferentes receptores tipo Fcγ específicos para IgG: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16); estos receptores son expresados constitutivamente en células linfohematopoyéticas como células NK, monocitos, macrófagos y células dendríticas⁽⁴⁻⁶⁾. A través del reconocimiento del complejo antígeno-anticuerpo, se inician distintas funciones inmunes: fagocitosis, endocitosis, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), liberación de mediadores de inflamación, regulación de la activación de células B y activación o inhibición de distintas células del sistema inmune^(4,5). Debido a que la mayoría de las células inmunes que expresan receptores Fcγ son células difíciles de obtener directamente desde la sangre o de mantener en cultivo, que estas células además expresan generalmente más de un receptor Fcγ simultáneamente, que la expresión de los receptores se ve alterada por citoquinas y que medir esa activación es sumamente compleja y difícil de realizar⁽⁷⁻¹⁵⁾ and more than 30 mAbs are already approved and in the market place. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), se estableció una metodología para llevar a cabo la medición, individual y de una forma simple, de la activación de receptores tipo Fcγ *in vitro*⁽¹⁶⁾. Esta metodología es novedosa ya que permite el estudio de una forma sistemática, sencilla y confiable la activación individual de estos receptores por medio de anticuerpos dirigidos contra distintos antígenos virales o distintos patógenos.

La metodología consiste en la cocultivación de células infectadas por distintos virus opsonizadas con anticuerpos IgG respectivos junto con células del hibridoma murino BW5147 que fueron transfectadas para que expresaran establemente receptores quiméricos: receptores que en la parte extracelular están constituidos por el dominio proteico extracelular de los distintos receptores Fcγ humanos fusionados con el dominio intracelular de la cadena zeta del receptor CD3 murino^(17,18) (**Figuras 1A y 1B**). La activación del receptor quimérico por medio de

la región Fc del anticuerpo IgG, que a su vez está unida con su antígeno (**Figura 1C**), resulta en la secreción de IL-2 murina, esta es cuantificada en el sobrenadante como un marcador reportero de la activación del receptor Fcγ humano (**Figura 1D**)⁽¹⁶⁾ mediante un ELISA.

Esta metodología ya fue probada, en otras investigaciones, contra distintas células infectadas con los virus del herpes simplex 1 (VHS-1), el virus del Epstein Barr (VEB), el citomegalovirus humano (CMVH), el virus del sarampión, el virus respiratorio sincicial (VRS) y células que expresan la gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)⁽¹⁶⁾. Además, fue probada con la utilización de anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, suero humano o anticuerpos comercializados para el uso terapéutico contra una infección⁽¹⁶⁾. Por lo tanto, la metodología es aplicable universal y ampliamente siempre y cuando se tenga un anticuerpo tipo IgG y su blanco antigénico. Además, correlaciona con la medición de la activación mediada por células del sistema inmune (NK) por medio de anticuerpos, proceso denominado ADCC o citotoxicidad celular mediada por anticuerpos⁽¹⁶⁾.

La metodología establecida ya fue aplicada para diferentes investigaciones:

1. Se utilizó para estudiar sistemáticamente el papel de dos glicoproteínas codificadas por el citomegalovirus humano (HCMV), la gp68 y la gp34^(19,20), en la evasión de la activación de los receptores Fcγ del hospedero^(21,22) (**Figura 2**). Este artículo es la primera evidencia en el contexto del HCMV de evasión inmune de la respuesta contra los anticuerpos y sienta las bases para el estudio de dos glicoproteínas más que también unen Fcγ (Mercé-Maldonado, *et al.*, manuscrito en preparación y tesis de doctorado finalizada) y el estudio, además, en el contexto del citomegalovirus murino, para lo cual sí se pueden realizar estudios *in vivo* (Ehrhardt, *et al.*, manuscrito en preparación y tesis de doctorado en curso). La inhibición de la IgG antiviral se refleja en la clínica con la poca efectividad que tienen las preparaciones de anticuerpos terapéuticas utilizadas en mujeres embarazadas para prevenir la enfermedad congénita producida por este virus⁽²³⁾
2. Permitió el estudio en su respuesta antiviral mediada por anticuerpos contra el HCMV y el virus del sarampión de una cohorte de donantes sanos en el que se definieron los anticuerpos por medio de cualidades antivirales: aquellos que son detectados por ELISA (IgG total), aquellos que neutralizan el virión o aquellos que son capaces de activar individualmente algún receptor Fcγ en específico. Con esto

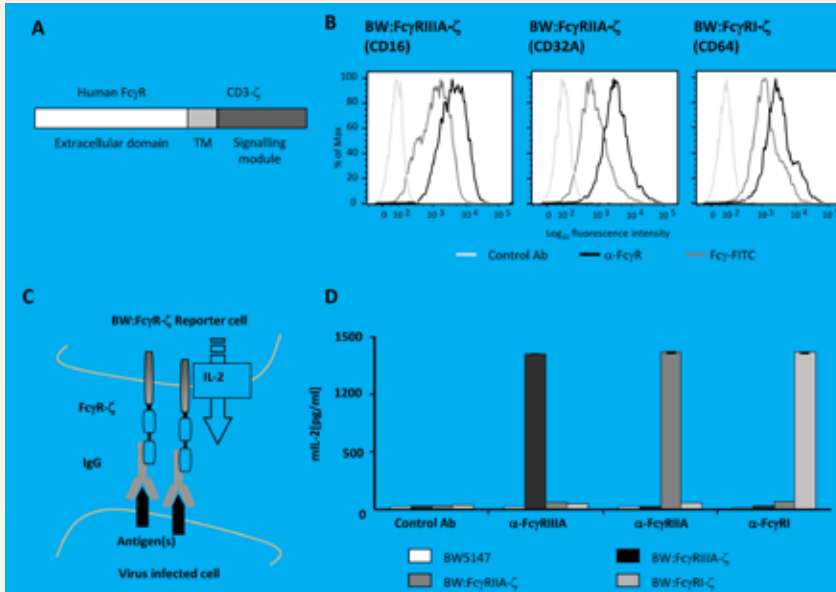


Figura 1: Metodología para medir la activación de los receptores Fcγ gamma humanos (A) Representación esquemática de los receptores Fcγ gamma-zeta quiméricos. El dominio extracelular de los receptores humanos Fcγ gamma (en blanco) fueron fusionados con el dominio de transmembrana (gris claro) y el módulo intracelular responsable de la señalización de la molécula CD3 zeta murina (gris oscuro). (B) Detección por medio de citometría de flujo de la expresión de los receptores gamma quiméricos en las células transfectantes reporteras. (C) Representación esquemática del principio de la metodología. Tras la unión del receptor Fcγ gamma quimérico por medio de complejos inmunes presentes en la superficie de la célula infectada, se produce una activación del receptor que resulta en la secreción de IL-2 murina, que es medida con un ELISA. (D) Experimentos de activación específica de los receptores Fcγ gamma quiméricos utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular de los receptores Fcγ gamma: comprobación de capacidad específica de señalización. El anticuerpo de cabra contra ratón fue adsorbido sobre la placa. Tras bloquear la superficie y lavar los anticuerpos no unidos, se agregaron anticuerpos de ratón monoclonales específicos contra el receptor Fcγ gamma humano CD16, CD32 y CD64. Como control negativo, se utilizó un anticuerpo contra CD99. Tras la incubación y el lavado de anticuerpos no unidos, 200 000 células transfectantes reporteras BW:Fcγ gammaR-zeta fueron agregadas a cada pocillo. La secreción de IL-2 murina fue medida por un ELISA 16 horas después de la incubación a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Tomado de Corrales-Aguilar *et al.* (16).

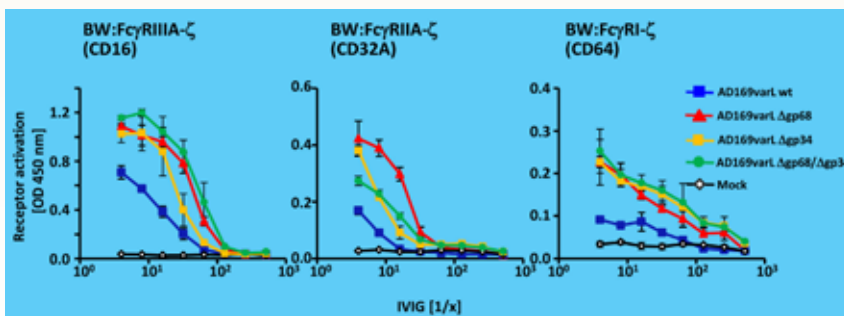


Figura 2: Los receptores virales Fcγ gamma gp68 y gp34 codificados por el citomegalovirus humano interfieren con la activación de los receptores humanos Fcγ gamma quiméricos. Fibroblastos humanos fueron infectados por 72 horas por el citomegalovirus humano AD169varL y por mutantes que carecen de cada uno de los receptores Fcγ gamma virales AD169varLΔgp68 o Dgp34 o por una mutante que no expresa ningún receptor Fcγ gamma viral. Los fibroblastos fueron opsonizados con una preparación de anticuerpos (IVIG). Tras un lavado para eliminar anticuerpos no unidos, las células transfectantes reporteras BW:Fcγ gammaR-zeta fueron agregadas y cocultivadas por 16 horas. La IL-2 murina fue medida con un ELISA (OD 450 nm). Tomado de Corrales-Aguilar *et al.* (21).

se definió un “perfil de respuesta IgG antiviral” o “inmunograma” que puede llegar a ser útil en la definición de nuevos parámetros inmunes que correlacionen protección contra patógenos (Corrales-Aguilar, *et al.*, enviado a publicación).

Entre las aplicaciones futuras de la metodología está en el estudio de la respuesta humoral ante los virus de la hepatitis B y C (Freiburg, Alemania) y en Costa Rica el estudio la respuesta mediada por anticuerpos contra el virus del dengue, uno de los más importantes en salud pública del país⁽²⁴⁾, para elucidar finalmente cuál receptor Fcγ puede estar involucrado en el riesgo de padecer formas graves o hemorrágicas de la enfermedad⁽²⁵⁻²⁸⁾.

Referencias

- Parren, P. W. & Burton, D. R. (2001). The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv. Immunol.* 77, 195–262.
- Burton, D. R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 706–13.
- Ravetch, J. V & Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275–90.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19–28.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. (2010). Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol. Rev.* 236, 265–75.
- Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A. & Schmidt, R. E. (1998). The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* 76, 231–48.
- Parekh, B. S. *et al.* (2012). Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay. *MAbs* 4.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* 96, 179–204.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310, 1510–2.
- Lewis, G. K. (2013). Qualitative and quantitative variables that affect the potency of Fc-mediated effector function in vitro and in vivo: considerations for passive immunization using non-neutralizing antibodies. *Curr. HIV Res.* 11, 354–64.
- Kantakamalakul, W. *et al.* (2006). A novel EGFP-CEM-NK cell flow cytometric method for measuring antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) activity in HIV-1 infected individuals. *J. Immunol. Methods* 315, 1–10.
- Gómez-Román, V. R. *et al.* (2006). A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 308, 53–67.
- Clémenceau, B. *et al.* (2006). Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood* 107, 4669–77.
- Bruhns, P. *et al.* (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716–25.
- Bournazos, S., DiLillo, D. J. & Ravetch, J. V. (2015). The role of Fc-FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization. *J. Exp. Med.* 212, 1361–9.
- Corrales-Aguilar, E. *et al.* (2013). A novel assay for detecting virus-specific antibodies triggering activation of Fcγ receptors. *J. Immunol. Methods* 387, 21–35.
- Wegener, A. M. *et al.* (1992). The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 68, 83–95.
- Mandelboim, O. *et al.* (1999). Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5640–4.
- Atalay, R. *et al.* (2002). Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J. Virol.* 76, 8596–608.
- Lilley, B. N., Ploegh, H. L. & Tirabassi, R. S. (2001). Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *J. Virol.* 75, 11218–21.
- Corrales-Aguilar, E. *et al.* (2014). Human Cytomegalovirus Fcγ Binding Proteins gp34 and gp68 Antagonize Fcγ Receptors I, II and III. *PLoS Pathog.* 10, e1004131.
- Corrales-Aguilar, E., Hoffmann, K. & Hengel, H. (2014). CMV-encoded Fcγ receptors: modulators at the interface of innate and adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.* 36, 627–40.
- Nigro, G. & Adler, S. P. (2013). Hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease. *Clin. Infect. Dis.* 57 Suppl 4, S193–5.
- Troyo, A., Porcelain, S. L., Calderón-Arguedas, O., Chadee, D. D. & Beier, J. C. (2006). Dengue in Costa Rica: the gap in local scientific research. *Rev. Panam. Salud Publica* 20, 350–60.
- Kyle, J. L., Balsitis, S. J., Zhang, L., Beatty, P. R. & Harris, E. (2008). Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology* 380, 296–303.
- Kurane, I. (2007). Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 329–40.
- Halstead, S. B., Heinz, F. X., Barrett, a D. T. & Roehrig, J. T. (2005). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine* 23, 849–56.
- Halstead, S. B. (2014). Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol. Spectr.* 2.

Estudios sobre la vía de tráfico intracelular y vías de señalización activadas por la fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*

Laura Monturiol-Gross¹

Resumen:

La fosfolipasa C de *Clostridium perfringens* (CpPLC), también llamada toxina- α , es el principal factor de virulencia de esta bacteria que produce la gangrena gaseosa, una grave infección asociada a heridas traumáticas o quirúrgicas. Los resultados, que fueron reconocidos mediante el Premio Nacional en Ciencia "Clodomiro Picado Twilight" 2014, demostraron que la CpPLC causa estrés oxidativo en un modelo de células en cultivo y evidenciaron que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están involucradas en su efecto citotóxico. El tratamiento con diferentes antioxidantes disminuye significativamente el daño celular ocasionado por la CpPLC. Además, se describieron las principales vías de señalización intracelular mediante las cuales la CpPLC genera las ROS que desencadenan la muerte celular. Previamente se asumía que la CpPLC actuaba solo a nivel de la membrana plasmática, sin embargo, se demostró que esta toxina bacteriana debe ser internalizada en las células para ejercer citotoxicidad. Se describió su vía de endocitosis y que la CpPLC activa vías de señalización involucradas en la generación de ROS desde el interior de la célula, así como que la CpPLC induce daño lisosomal. En conjunto, estos resultados aportaron nuevos conocimientos acerca del modo de acción de esta fosfolipasa C bacteriana, lo que podría llevar a desarrollar estrategias terapéuticas racionales dirigidas a reducir el daño en tejidos que se da en pacientes con gangrena gaseosa.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, toxina bacteriana, fosfolipasa C, gangrena gaseosa, especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo, señalización intracelular, tráfico intracelular.

Abstract:

Clostridium perfringens phospholipase C (CpPLC), also called α -toxin, is the main virulence factor of gas gangrene, a severe infection associated with traumatic or surgical wounds. Results that earned the national price of science "Clodomiro Picado Twilight" 2014 demonstrated that CpPLC causes oxidative stress in a cultured cell model and provided compelling evidence that reactive oxygen species (ROS) are involved in its cytotoxic effect. The data show that antioxidants reduce cell death caused by CpPLC. Furthermore; the main intracellular signalling pathways that lead towards CpPLC's ROS generation and cytotoxicity were described. Previously, CpPLC was considered to act only locally on cell membrane, however the results showed that CpPLC requires internalization by cells in order to generate cell damage. Its endocytic route was described, the results showed that CpPLC activates signalling pathways involved in ROS production from inside the cells, and that CpPLC causes lysosomal damage. Overall, results provide new insights about the mode of action of this bacterial phospholipase C, which could lead towards developing rational therapeutic strategies aimed to reduce tissue damage in gas gangrene patients.

Key words: *Clostridium perfringens*, bacterial toxin, Phospholipase C, gangrene gas, reactive species of oxygen, oxidative stress, intracellular signaling, intracellular trafficking

C*lostridium perfringens* es una bacteria gram positiva, anaerobia, no móvil y formadora de esporas, que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en el suelo y en aguas residuales, y forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y animales⁽¹⁾. Esta bacteria es la responsable de producir varias enfermedades, tanto en humanos como en animales, entre ellas gangrena gaseosa, intoxicaciones alimentarias, enteritis necrotizante y enterotoxemia^(2, 3). Las cepas de *C. perfringens* se clasifican en cinco biotipos (A-E), basándose en la producción de cuatro toxinas extracelulares: la fosfolipasa C (CpPLC) o toxina- α , la toxina- β , la toxina- ϵ y la toxina- ι . El toxintipo A de *C. perfringens* es el que está asociado a la gangrena gaseosa en humanos y es el que produce CpPLC en mayor cantidad^(2, 4).

La gangrena gaseosa o mionecrosis por *Clostridium* es una de las infecciones por gram positivos más fulminante de humanos⁽⁵⁾. Está asociada a la entrada de formas vegetativas o esporas de *C. perfringens* en heridas o traumas profundos, donde se generan las condiciones anaeróbicas ideales para el establecimiento de la bacteria, y donde puede secretar sus diferentes toxinas. El tratamiento actual para casos de gangrena gaseosa consiste en la remoción quirúrgica del tejido afectado, y la administración de penicilina y clindamicina vía intravenosa^(5, 6). Cuando los pacientes se tornan bacterémicos, la mortalidad excede el 50%⁽⁵⁾. A pesar de los avances en medicina, la amputación continúa siendo el tratamiento de elección para salvar la vida del paciente con una gangrena gaseosa ya establecida⁽⁷⁾. Existe amplia evidencia de que la CpPLC es el principal factor de virulencia de *Clostridium perfringens* en una gangrena gaseosa. Mutantes de *C. perfringens* en las cuales el gen estructural de la CpPLC, *plc* (o *cpa*), ha sido inactivado y no producen la CpPLC, son incapaces de causar mionecrosis en ratones⁽⁸⁾.

La CpPLC es capaz de degradar fosfolípidos presentes en la membrana plasmática de células de mamíferos, lo cual induce lisis celular^(9, 10). Sin embargo, a dosis bajas las células expuestas a la CpPLC no sufren disrupción de membrana. Al hidrolizar fosfatidilcolina, la CpPLC genera diacilglicerol, mientras que al ejercer su acción esfingomielinasa produce ceramida. La generación de estos segundos mensajeros podría ocasionar daño celular como consecuencia de la desregulación de procesos de transducción de señales^(9, 10). El trabajo reconocido mediante el Premio Nacional de Ciencia “Clodomiro Picado Twilight” 2014 consistió en estudiar el mecanismo de acción de la CpPLC, principal factor de virulencia de esta bacteria que produce gangrena gaseosa, a dosis sublétricas capaces de generar daño celular.

En primer lugar se demostró que la CpPLC causa estrés oxidativo en células en cultivo y que las especies reactivas de oxígeno (ROS) que genera están involucradas en su efecto citotóxico⁽¹¹⁾. A bajos niveles fisiológicos, las ROS funcionan como “mensajeros redox” de señalización y regulación celular⁽¹²⁻¹⁴⁾, mientras que un exceso de ROS induce modificación oxidativa de macromoléculas celulares, inhibe la función de las proteínas y promueve la muerte celular⁽¹⁴⁾. Los datos obtenidos demostraron que diferentes antioxidantes reducen la muerte celular causada por la CpPLC⁽¹¹⁾, lo cual sirvió de base para estudiar el uso de antioxidantes para el tratamiento de gangrena gaseosa experimental, el cual fue efectivo en reducir tanto el daño muscular como la mortalidad en un modelo murino⁽¹¹⁾.

Además, se estudiaron las vías de señalización intracelular mediante las cuales se estaba originando la producción de ROS en células tratadas con la CpPLC. Varias vías de señalización que controlan distintas respuestas celulares pueden ser influenciadas por ROS, entre ellas la vía de las MAPK, la vía de NF κ B y la vía de la PKC⁽¹⁵⁾, estas son importantes vías de señalización que regulan respuestas en las células que van desde proliferación, sobrevida o muerte celular. Se demostró que la CpPLC activa tanto la vía de la proteína quinasa C (PKC), como la vía de ERK 1/2 y del factor de transcripción NF κ B, y que, al inhibir cualquiera de estas vías, se previene la producción de ROS y la citotoxicidad causada por esta toxina bacteriana^(11, 16). Fue posible, entonces, elucidar las principales vías de señalización intracelular involucradas en el mecanismo de acción de la CpPLC para causar daño celular.

Existen diversas toxinas bacterianas que deben ser internalizadas por las células para ejercer su mecanismo de acción⁽¹⁷⁻²²⁾. Las células internalizan sustancias a través de varios mecanismos, uno de ellos es mediante endocitosis, la cual puede ser ampliamente definida como la invaginación de una porción de la membrana plasmática y la formación de vesículas intracelulares que contienen materiales que estaban en la membrana plasmática, o en el espacio extracelular^(23, 24).

Nuestro grupo de trabajo en el Instituto Clodomiro Picado exploró la posibilidad de que la CpPLC fuera endocitada por las células. Los resultados demostraron que la CpPLC es internalizada en células por un mecanismo endocítico dependiente de dinamina⁽²⁵⁾. La dinamina es una proteína que participa en la escisión o corte de las vesículas que se están formando en la membrana plasmática, para que sean internalizadas^(23, 26). Uno de los mecanismos de endocitosis que dependen de dinamina es a través de caveolas, las cuales son invaginaciones de

la membrana plasmática ricas en la proteína caveolina y que se encuentran enriquecidas en las llamadas “balsas lipídicas” que son microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol, glicosfingolípidos, esfingomiélin, fosfolípidos saturados y proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol^(27,28).

Las vías endocíticas parecen llevar su carga hacia la red endosómica, que incluye endosomas tempranos, vesículas distribuidoras, y los endosomas tardíos, los cuales se fusionan con los lisosomas para formar endolisosomas⁽²⁹⁾. Los resultados demostraron que la CpPLC colocaliza primero con caveolina tanto en la membrana plasmática como en vesículas; y luego, colocaliza con endosomas tempranos y endosomas tardíos/lisosomas⁽²⁵⁾. Aún más, si se perturba la endocitosis de la CpPLC, ya sea secuestrando colesterol de las balsas lipídicas, inhibiendo la polimerización de actina, o inhibiendo a la dinamina, se protege del efecto citotóxico de esta toxina bacteriana⁽²⁵⁾. En el caso de la CpPLC, la inhibición de la endocitosis también previno la activación de la vía de ERK 1/2⁽²⁵⁾, lo que involucra a la endocitosis en los eventos de señalización requeridos para el efecto citotóxico de la CpPLC a concentraciones subletales. La CpPLC es la primera fosfolipasa C bacteriana cuya endocitosis ha sido demostrada, ya que tradicionalmente se ha considerado que estas toxinas actúan sólo a nivel de la membrana plasmática.

Un resumen de las conclusiones generadas en la investigación “Vías de tráfico intracelular y de señalización activadas por la CpPLC” se puede observar en la figura 1. La generación de nuevo conocimiento sobre esta fosfolipasa C bacteriana, tal como la comprensión del papel que cumplen las vías de señalización involucradas en el daño celular que ocasiona la CpPLC, podría llevar a desarrollar estrategias terapéuticas racionales dirigidas a reducir el extenso daño celular que se da en pacientes con gangrena gaseosa.

Por último, es importante agradecer el aporte de muchas personas involucradas en la realización de este trabajo, ya que la ciencia solo se puede lograr en conjunto. En esta investigación participaron activamente los tutores de mi tesis doctoral, también microbiólogos: el Dr. Alberto Alape Girón, la Dra. Marietta Flores Díaz y el Dr. Rodrigo Mora Rodríguez. Asimismo, agradezco a la Universidad de Costa Rica, a mis estudiantes y a compañeros de la Facultad de Microbiología. En particular, también agradezco al Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas por facilitarme instalaciones y equipo; además, a todos mis compañeros del Instituto Clodomiro Picado por su importante apoyo y ejemplo de esfuerzo y dedicación.

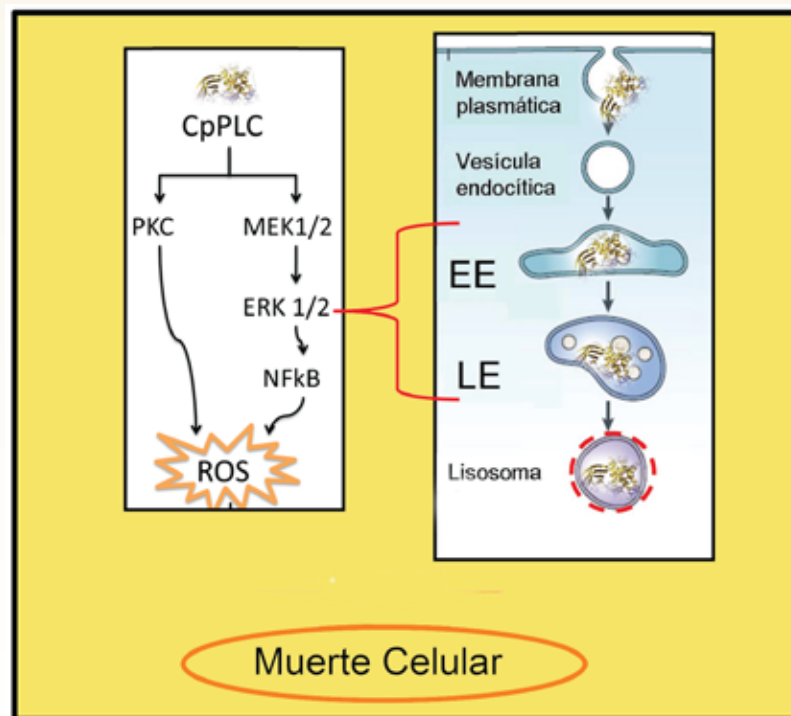



Figura 1. Modelo que describe el mecanismo de acción de la CpPLC en células Don Q para ejercer muerte celular a dosis subletales. Del lado izquierdo se muestran las vías de señalización intracelular activadas por la CpPLC, las cuales generan la producción de ROS, que detonan la muerte celular. Del lado derecho se muestra la vía de tráfico intracelular de esta toxina bacteriana y se observa que es dentro de las células donde la CpPLC activa la vía ERK1/2, y así induce daño lisosomal que participa en su efecto citotóxico. Abreviaciones: Especies reactivas de oxígeno (ROS), endosoma temprano (EE), endosoma tardío (LE), proteína kinasa C (PKC), proteína kinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2), factor de transcripción NFκB (NFκB).

Referencias

1. Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H. (2002). *Complete genome sequence of Clostridium perfringens, an anaerobic flesh-eater*. Proc Natl Acad Sci U S A 99:996–1001.
2. Petit L, Gibert M, Popoff MR. (1999). *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype*. Trends Microbiol 7:104–110.
3. Sawires YS, Songer JG. (2006). *Clostridium perfringens: insight into virulence evolution and population structure*. Anaerobe 12:23–43.
4. Titball RW. (2005). *Gas gangrene: an open and closed case*. Microbiology 151:2821–8.
5. Stevens DL, Aldape MJ, Bryant AE. (2012). *Life-threatening clostridial infections*. Anaerobe 18:254–9.
6. Torok E, Conlon C. (2005). *Skin and soft tissue infections*. Medicine 33:84–88.
7. Bryant AE, Stevens DL. (2012). *“Flesh-eating” necrotizing infections: must we amputate?* Expert Rev Anti Infect Ther 10:1–3.
8. Awad M, Bryant A, Stevens D, Rood J. (1995). *Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in Clostridium perfringens-mediated gas gangrene*. Mol Microbiol 15:191–202.
9. Sakurai J, Nagahama M, Oda M. (2004). *Clostridium perfringens alpha-toxin: characterization and mode of action*. J Biochem 136:569–74.
10. Flores-Díaz M, Thelestam M, Clark G, Titball R, Alape-Girón A. (2004). *Effects of Clostridium perfringens phospholipase C in mammalian cells*. Anaerobe 10:115–23.
11. Monturiol-Gross L, Flores-Díaz M, Araya-Castillo C, Pineda-Padilla MJ, Clark GC, Titball RW, Alape-Girón A. (2012). *Reactive Oxygen Species and the MEK/ERK Pathway Are Involved in the Toxicity of Clostridium perfringens α -Toxin, a Prototype Bacterial Phospholipase C*. J Infect Dis 206:1218–26.
12. Finkel T. (2011). *Signal transduction by reactive oxygen species*. J Cell Biol 194:7–15.
13. Dröge W. (2002). *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev 82:47–95.
14. Circu ML, Aw TY. (2010). *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis*. Free Radic Biol Med 48:749–62.
15. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo Y Do. (2011). *Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling*. Mol Cells 32:491–509.
16. Monturiol-Gross L, Flores-Díaz M, Pineda-Padilla MJ, Castro-Castro AC, Alape-Giron A. (2014). *Clostridium perfringens phospholipase C induced ROS production and cytotoxicity require PKC, MEK1 and NF κ B activation*. PLoS One 9:e86475.
17. Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K. (2001). *Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms*. J Cell Sci 114:3737–47.
18. Abrami L, Liu S, Cosson P, Leppla SH, van der Goot FG. (2003). *Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process*. J Cell Biol 160:321–8.
19. Sandvig K, van Deurs B. (2002). *Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin*. FEBS Lett 529:49–53.
20. Papatheodorou P, Zamboglou C, Genisyuerk S, Guttenberg G, Aktories K. (2010). *Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis*. PLoS One 5:e10673.
21. Gibert M, Monier M-N, Ruez R, Hale ML, Stiles BG, Benmerah A, Johannes L, Lamaze C, Popoff MR. (2011). *Endocytosis and toxicity of clostridial binary toxins depend on a clathrin-independent pathway regulated by Rho-GDI*. Cell Microbiol 13:154–70.
22. Nagahama M, Yamaguchi A, Hagiya T, Ohkubo N, Kobayashi K, Sakurai J. (2004). *Binding and Internalization of Clostridium perfringens Iota-Toxin in Lipid Rafts*. Infect Immun 72:3267–3275.
23. Mayor S, Pagano RE. (2007). *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol 8:603–12.
24. Doherty GJ, McMahon HT. (2009). *Mechanisms of endocytosis*. Annu Rev Biochem 78:857–902.
25. Monturiol-Gross L, Flores-Díaz M, Campos-Rodríguez D, Mora R, Rodríguez-Vega M, Marks DL, Alape-Girón A. (2014). *Internalization of Clostridium perfringens α -toxin leads to ERK activation and is involved on its cytotoxic effect*. Cell Microbiol 16:535–547.
26. Howes MT, Mayor S, Parton RG. (2010). *Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis*. Curr Opin Cell Biol 22:519–27.
27. Andersson ER. (2011). *The role of endocytosis in activating and regulating signal transduction*. Cell Mol Life Sci 69:1755–71.
28. Parton RG, Simons K. (2007). *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol 8:185–94.
29. Huotari J, Helenius A. (2011). *Endosome maturation*. EMBO J 30:3481–500. 

Estudiando el papel de los neutrófilos polimorfonucleares en la brucelosis

Elías Barquero-Calvo¹

Resumen:

Las enfermedades infecciosas pueden clasificarse en dos grandes grupos: las agudas y las crónicas. Las bacterias que inducen cuadros crónicos, son en general parásitos intracelulares que tienen tiempos de incubación largos y que no causan síntomas aparentes al inicio de la enfermedad. Dentro de este segundo grupo se encuentran las brucelas, bacterias que se replican durante largo tiempo dentro de las células de su hospedero y que causan abortos en los animales y brucelosis en los seres humanos. El principal hallazgo de nuestras investigaciones fue descubrir que las brucelas se comportan como patógenos furtivos, capaces de pasar desapercibidos por el sistema inmune innato. En este sentido, se descubrió que varias de las estructuras de la superficie de las brucelas están modificadas. Lo anterior hace que estos microorganismos sean "invisibles" para las células del sistema inmune innato y por tanto no sean reconocidas. Esto les permite instalarse, replicarse, expandirse y dispersarse antes de que el sistema inmune adaptativo las reconozca. Como los neutrófilos son la primera línea de defensa celular del organismo, estudiamos su papel durante la brucelosis. Uno de los hallazgos fundamentales, es que los neutrófilos no solo son incapaces de eliminar a las brucelas, sino que su intervención ocurre de manera inesperada en los momentos tardíos de la infección. Específicamente, descubrimos que los neutrófilos intervienen negativamente en la regulación del sistema inmune adaptativo y que las brucelas inducen la muerte prematura de estas células, mermando aún más la participación de la inmunidad innata en la brucelosis.

Palabras clave: *Brucella*, inmunidad innata, neutrófilos, muerte celular

Abstract:

Infectious diseases can be classified into two groups: acute and chronic. Bacteria causing chronic conditions are generally intracellular parasites with long incubation periods producing no apparent symptoms at the onset of infection. Within this second group are *Brucella* organisms. These bacteria replicate inside host cells and cause abortions in animals and brucellosis in humans. The main finding of our research was to discover that *Brucella* behave as a stealth pathogen, able to go unnoticed by the innate immune system. In this regard, we discovered that a number of surface structures are modified in *Brucella* organisms. This makes *Brucella* «invisible» to the cells of the innate immune system and therefore not fully recognized. This allows *Brucella* to colonize, replicate, and disperse throughout the organism before the adaptive immune system recognize them. Since neutrophils are the first line of cellular defense, we studied their role during brucellosis infection. The main findings are that neutrophils are not only unable to kill *Brucella*, but surprisingly they participate later times of infection. Specifically, we found that neutrophils are negatively involved in regulating the adaptive immune system and that they induce premature death of these cells, weakening the participation of innate immunity in brucellosis.

Key words: *Brucella*; innate immunity, neutrophils, cell death

Artículo recibido el 05/12/2015 / Aceptado para su publicación el 07/12/2015.

1. Coordinador Laboratorio de Bacteriología, Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET), Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional.

Correspondencia: elias.barquero.calvo@una.cr

Introducción

Brucella, principalmente *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella ovis* y *Brucella ceti*, son responsables de una enfermedad en todo el mundo conocida como brucelosis, que afecta a los seres humanos, así como los mamíferos domésticos y salvajes⁽¹⁾. El nicho replicativo de estas bacterias corresponde al medio intracelular de células animales⁽²⁾. Por esta razón, no es sorprendente que las especies de *Brucella* estén estrechamente relacionadas y compartan propiedades funcionales y estructurales con otros parásitos intracelulares como: *Bartonella*, *Rickettsia*, *Anaplasma* y *Wolbachia*. Asimismo, tienen una relación filogenética cercana con otros patógenos oportunistas como: *Ochrobactrum*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*, todas estas bacterias con afinidad por células eucariotas^(3,4). Las especies del género *Brucella* son patógenos primarios de mamíferos con capacidad para invadir y expandirse por el sistema reticuloendotelial del huésped (Figura 1). En animales domésticos gestantes, tales como bovinos, ovinos, porcinos, caprinos y caninos, los órganos diana son la placenta y la glándula mamaria, siendo el aborto el síntoma más evidente de la brucelosis. En consecuencia, es una enfermedad que tiene un importante impacto económico por el sacrificio de los animales infectados y las pérdidas de los animales abortados⁽⁵⁾. Los seres humanos adquieren la bacteria principalmente a través del contacto con animales infectados o por ingestión de productos lácteos no pasteurizados⁽¹⁾. La brucelosis en humanos se caracteriza principalmente por la fiebre ondulante, artralgia y mialgia, y si no se trata, la bacteria puede invadir además el corazón y el sistema nervioso central⁽⁶⁾. Las células huésped primarias en las cuales *Brucella* se replica son monocitos (Mo), macrófagos (Mφ) y las células dendríticas (CD) (Figura 1); y en animales gestantes, las células preferidas son los trofoblastos placentarios⁽²⁾. Durante el curso de la brucelosis estos leucocitos mononucleares fagocíticos son reclutados en el sitio de infección, y son los principales efectores contratados por la inmunidad adaptativa^(7,8). Otras células que fagocitan activamente a las brucelas son los neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Estos leucocitos son las primeras células en detectar e internalizar *Brucella* después de la invasión del huésped (Figura 1)^(9,10). Sin embargo, en contraste con lo que se ha observado en otras células hospedadoras, las especies de *Brucella* no son capaces de replicarse en PMNs⁽¹¹⁾. Los pacientes y los animales infectados por *Brucella* raramente muestran neutrofilia^(12,13). Este fenómeno está en armonía con la baja respuesta proinflamatoria observada en las etapas tempranas de la infección y la ausencia de signos de endotoxemia o coagulopatías en los pacientes y en los

animales infectados con *Brucella* (Figura 1)^(12,14,15). Por otra parte, se ha reportado un estado de neutropenia en aproximadamente un tercio de los pacientes, principalmente durante las fases crónicas de la brucelosis humana (16,17) 631 (69.2%, un hecho que se ha relacionado con la eliminación de PMNs infectados por *Brucella* por parte de las células del sistema reticuloendotelial (Figura 1)^(17,18). A pesar de estas características clínicas notables y el papel significativo de PMNs contra la mayoría de las infecciones bacterianas, la función de estos leucocitos en la brucelosis se mantuvo sin explorar durante muchos años. En este artículo se presenta parte de nuestro trabajo de investigación, el cual ha consistido en estudiar el papel de los PMNs en la brucelosis

La estrategia furtiva de *Brucella*

Una característica particular de las bacterias del género *Brucella*, es que los PAMPs (del inglés, pathogen-associated molecular patterns) se han modificado evolutivamente de manera que no son **fácilmente reconocidos por la mayoría de los PRRs** (del inglés, pattern recognition receptors), por ejemplo muchos de los receptores tipo Toll y receptores tipo NOD^(14,19,20,21). Al igual que en otras α -proteobacterias, la flagelina de *Brucella* tampoco es agonista de TLR5 (del inglés, Toll-like receptor 5)^(22,23). De igual manera, las brucelas muertas, los fragmentos de membrana externa (que contienen grandes cantidades de lipoproteínas), lípidos de ornitina, lipopolisacárido de *Brucella* (*Br*-LPS) y algunos polisacáridos relacionados, inducen respuestas proinflamatorias bajas⁽¹⁴⁾. Finalmente, el *Br*-LPS purificado de *Br*-LPS es un agonista muy pobre del TLR4; la estimulación de este receptor solamente ocurre en concentraciones muy altas (100 a 500 veces más que las requeridas por el lipopolisacárido de *Escherichia coli*)^(19,24). Todo esto indica que la mayoría de las moléculas de superficie de *Brucella* no son PAMP poderosos, y por lo tanto son activadores pobres de los PRRs.

Por otro lado, la membrana externa de *Brucella* funciona también como un escudo que le brinda resistencia contra diversas sustancias microbicidas^(25,26) y a la vez esconde algunos PAMPs por un período prolongado antes de que estos sean reconocidos por ciertos PRRs internos^(20,27,28). Todas estas propiedades le permiten a la bacteria evadir el reconocimiento temprano del sistema inmune innato, dando oportunidad para que la bacteria se pueda dispersar en el organismo hospedero antes de que la inmunidad adaptativa se active de forma copiosa. En este sentido, el comportamiento furtivo de *Brucella* funciona como una "ventana inmunológica" para que las bacterias puedan establecerse y "ocultarse" dentro

de los tejidos del hospedero, un requisito esencial para poder inducir infecciones crónicas de larga duración.

El papel de los PMNs como moduladores de la respuesta inmune adaptativa

Los PMNs son componentes esenciales del sistema inmune innato para controlar las infecciones microbianas y son los primeros leucocitos en ser reclutados en los sitios de invasión bacteriana ⁽²⁹⁾. Aunque a los PMNs se les reconoce principalmente por ser los efectores celulares primarios durante la respuesta inmune innata proinflamatoria, estos pueden desempeñar, además, un papel en el control y modulación de la inmunidad adaptativa ^(30,31).

En general, se han utilizado dos enfoques para estudiar el papel de los PMNs durante las infecciones bacterianas *in vivo*. La primera corresponde a modelos en los que se estudia el comportamiento biológico de PMNs *in situ* por microscopía, siguiendo los patrones de migración y perfil durante la respuesta proinflamatoria, así como su activación y la actividad bactericida. El segundo modelo corresponde a la utilización de los ratones neutropénicos utilizando productos químicos, anticuerpos específicos o mediante el uso de animales mutantes deficientes de PMNs. El uso de ratones neutropénicos ha puesto de manifiesto el papel fundamental que tienen los PMNs en el control de infecciones bacterianas agudas tales como las producidas por *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* y *Legionella pneumophila* ^(14,32,33,34,35,36), sólo para por mencionar algunos de ellos.

El papel de los PMNs en la respuesta inmune adaptativa durante la brucelosis se investigó en ratones depletados de PMNs utilizando anticuerpos monoclonales y en ratones neutropénicos por mutación ⁽³⁷⁾. Sorprendentemente, la ausencia de PMNs durante el curso de la respuesta inmune adaptativa en la infección por *Brucella* se caracterizó por la eliminación bacteriana más eficiente en los órganos diana. Además, los ratones neutropénicos infectados demostraron una reducción en la inflamación del bazo, una infiltración celular aumentada, un incremento en la cantidad de Mo, Mφ y CD y una mayor activación de los linfocitos B y T en la sangre y en los órganos infectados. Estos eventos fueron concomitantes con el aumento de los niveles de IFN-γ al inicio de la infección, lo cual indica una balanza positiva hacia la respuesta Th1 sobre la Th2 (Figura 1); esto explica la eliminación más eficiente de *Brucella* por parte de los ratones

neutropénicos ⁽³⁷⁾. Parece, por lo tanto, que además de su papel en la inmunidad innata en la infección bacteriana aguda, los PMNs son capaces de modular e interactuar con la inmunidad adaptativa durante las infecciones bacterianas crónicas como en la brucelosis.

Brucella induce la muerte prematura de los PMN

Anteriormente se describió que la presencia intracelular de *Brucella* prolonga la vida e inhibe la apoptosis de los Mo y los Mφ ^(38,39,40). No obstante, *Brucella* mata prematuramente los PMNs humanos de una manera dosis-dependiente (Figura 1). La muerte de los PMNs es concomitante con la liberación de *Br-LPS* dentro de las vacuolas fagocíticas. Esta molécula y su lípido A reproducen la muerte celular prematura de PMNs, un fenómeno asociado a la baja producción de citoquinas proinflamatorias ⁽⁴¹⁾. La muerte de los PMNs se aparta de la necrosis, apoptosis y NETosis clásica. El mecanismo de la muerte celular de los PMNs está ligado a la activación de la NADPH-oxidasa y a un modesto pero constante aumento de mediadores ROS (del inglés, reactive oxygen species) (Figura 1) ⁽⁴¹⁾. Sorprendentemente, este evento es producido por su *Br-LPS* que es poco endotóxico, específicamente por su lípido A. La muerte celular prematura de los PMNs infectados por *Brucella* parece ser iniciada después de la fagocitosis activa de la bacteria y la subsiguiente liberación intracelular de su *Br-LPS*. Una vez dentro de los PMNs, el *Br-LPS* podría ser transportado a los dominios de la membrana plasmática que contienen receptores CD14 o a vesículas intracelulares unidas a receptores CD14 ⁽⁴¹⁾. Estos hallazgos sugieren un mecanismo para explicar la neutropenia observada en la brucelosis crónica y revelan un nuevo mecanismo por el cual *Brucella* es capaz de obstaculizar la función innata de los PMNs. Además, podría ser que la muerte de los neutrófilos infectados por *Brucella* sirvan como vehículos o "caballos de Troya" para infectar otras células fagocíticas como los Mφ o células CD sin promover la activación de estas.

Principales hallazgos del papel de los PMNs en la brucelosis

El uso de modelos de ratones neutropénicos ha contribuido en gran medida a determinar el papel de los PMNs al inicio o durante la fase aguda de la infección por *Brucella*. En primer lugar, se ha demostrado que los PMNs no son esenciales en la lucha contra las brucelas, ya que los ratones neutropénicos no mueren

como consecuencia de la infección ⁽¹⁴⁾. En segundo lugar, se demostró que durante el curso de la enfermedad, los PMNs pueden disminuir la respuesta inmune adaptativa contra la brucelosis (Figura 1). De hecho, los ratones neutropénicos parecen eliminar la bacteria más fácilmente como resultado de una mayor activación de la respuesta Th1 ⁽³⁷⁾. En tercer lugar, el hecho de que los PMNs infectados con *Brucella* mueran sin causar una respuesta inflamatoria severa (Figura 1) ⁽⁴¹⁾, propone que estas células podrían funcionar como dispersoras de la enfermedad (Figura 1), algo que ha sido previamente descrito en otros patógenos microbianos ^(42,43).

Referencias

1. Moreno, E., & Moriyón, I. (2006). The genus *Brucella*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrand (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 315–456). New York: Springer.
2. Moreno, E., & Gorvel, J.-P. (2004). Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes. In I.

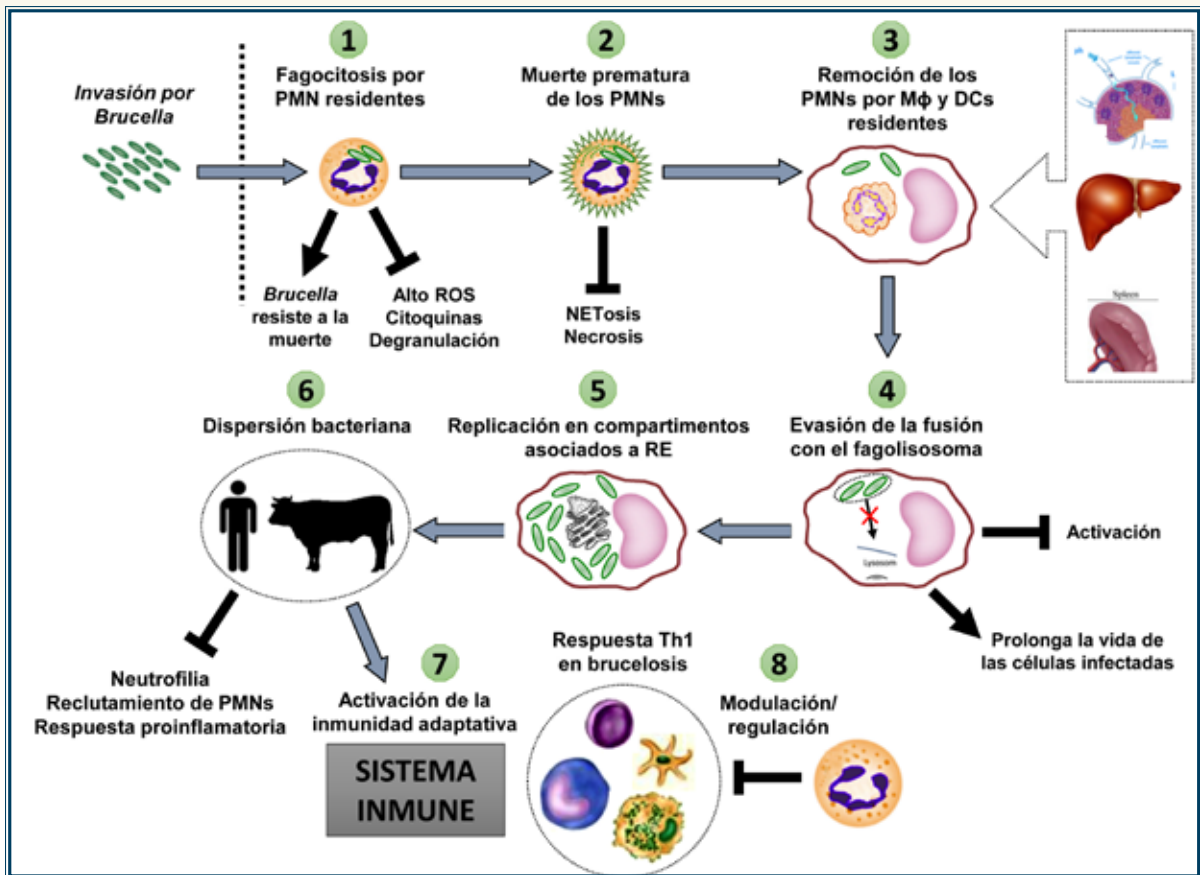



Figura 1. Papel de los PMNs durante la infección por *Brucella*. (1) Después de la invasión, *Brucella* es fagocitada por los PMNs residentes. Una vez dentro; la bacteria resiste la acción bactericida de los PMNs sin inducir la desgranulación, la activación o la liberación de cantidades significativas de citoquinas. (2) *Brucella* libera Br-LPS en los PMNs infectados e induce la muerte prematura en un proceso no inflamatorio. (3) Los PMNs infectados muertos pueden ser removidos por Mφ y CD residentes en nódulos linfáticos, el hígado y el bazo. (4) *Brucella* dentro de Mφ y CD puede evitar la fusión de los fagolisosomas sin inducir su activación y prolongando su vida. (5) Después de esto, las brucelas intracelulares pueden iniciar el tráfico al retículo endoplásmico (RE) para replicarse en compartimentos asociados a este. (6) La replicación bacteriana continúa durante un período prolongado y se dispersan por todo el organismo en ausencia de neutrofilia, del reclutamiento de PMNs o de una respuesta proinflamatoria significativa. (7) Finalmente, los Mφ, las CD y la respuesta inmune adaptativa Th1 se activa, lo que permite combatir las brucelas invasoras. (8) En esta etapa, sin embargo, los PMNs parecen amortiguar la respuesta inmune Th1 contra la brucelosis, favoreciendo la colonización de la bacteria en diferentes tejidos y la cronicidad de la enfermedad.

- López-Goñi & I. Moriyón (Eds.), *Brucella: Molecular and Cellular Biology* (pp. 287–312). United Kingdom: Horizon
3. Ettema, T. J. G., & Andersson, S. G. E. (2009). The alpha-proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. *Biology Letters*, 5(3), 429–32.
 4. Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3569–76.
 5. Moreno, E., & Moriyón, I. (2002). *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 1–3.
 6. Pedro-Pons, A., & Farreras, V. (1944). La brucelosis humana. In *La brucelosis humana* (pp. 19–29). Barcelona: Salvat Ed. S.A.
 7. Copin, R., Vitry, M.-A., Hanot Mambres, D., Machelart, A., De Trez, C., Vanderwinden, J.-M., ... Muraille, E. (2012). In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002575
 8. Grilló, M.-J., Blasco, J.-M., Gorvel, J.-P., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), 29.
 9. Ackermann, M. R., Cheville, N. F., & Deyoe, B. L. (1988). Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Veterinary Pathology*, 25(1), 28–35.
 10. Braude, A. (1951). Studies in the Pathology and Pathogenesis of Experimental Brucellosis. *Journal of Infectious Diseases*, 87–94.
 11. Kreutzer, D. L., Dreyfus, L. a, & Robertson, D. C. (1979). Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, 23(3), 737–42.
 12. Ariza, J. (1999). Brucellosis: an update. The perspective from the Mediterranean basin. *Reviews in Medical Microbiology*, 10, 125–135.
 13. Prouty, C. C. (1934). Studies on the leucocyte content of milk drawn from *Brucella abortus* infected udders. *Journal of Bacteriology*, 27(3), 293–301.
 14. Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., ... Moreno, E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*, 2(7), e631.
 15. Megid, J., Mathias, L., & Robles, C. (2010). Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *Open Veterinary Science*, 4, 119–126.
 16. Colmenero, J. D., Muñoz-Roca, N. L., Bermudez, P., Plata, A., Villalobos, A., & Reguera, J. M. (2007). Clinical findings, diagnostic approach, and outcome of *Brucella melitensis* epididymo-orchitis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(4), 367–72.
 17. Ruiz-Castañeda, M. (1986). *Brucelosis*. (Ediciones científicas, Ed.) (Tercera ed). Mexico, D.F.: La Prensa Médica Mexicana, S.A.
 18. Crosby, E., Llosa, L., Miro Quesada, M., Carrillo, C., & Gotuzzo, E. (1984). Hematologic changes in brucellosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 150(3), 419–24.
 19. Conde-Álvarez, R., Arce-Gorvel, V., Iriarte, M., Mansek-Keber, M., Barquero-Calvo, E., Palacios-Chaves, L., ... Gorvel, J.-P. (2012). The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002675.
 20. Martirosyan, A., Pérez-Gutierrez, C., Banchereau, R., Dutartre, H., Lecine, P., Dullaers, M., ... Gorvel, J.-P. (2012). *Brucella* β 1,2 cyclic glucan is an activator of human and mouse dendritic cells. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1002983.
 21. Oliveira, S. C., de Almeida, L. A., Carvalho, N. B., Oliveira, F. S., & Lacerda, T. L. S. (2012). Update on the role of innate immune receptors during *Brucella abortus* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1-2), 129–35.
 22. Lapaque, N., Takeuchi, O., Corrales, F., Akira, S., Moriyón, I., Howard, J. C., & Gorvel, J.-P. (2006). Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cellular Microbiology*, 8(3), 401–13.
 23. Terwagne, M., Ferooz, J., Rolán, H. G., Sun, Y.-H., Atluri, V., Xavier, M. N., ... Tsolis, R. M. (2013). Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *Brucella*. *Cellular Microbiology*, 15(6), 942–60.
 24. Barquero-Calvo, E., Conde-Alvarez, R., Chacón-Díaz, C., Quesada-Lobo, L., Martirosyan, A., Guzmán-Verri, C., ... Chaves-Olarte, E. (2009). The differential interaction of *Brucella* and *Ochrobactrum* with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens. *PLoS One*, 4(6), e5893.
 25. Freer, E., Moreno, E., Moriyón, I., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, a, & Gorvel, J. P. (1996). *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *Journal of Bacteriology*, 178(20), 5867–76.

26. Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., & Moriyón, I. (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and Immunity*, 63(8), 3054–61.
27. Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.-J., & Muraille, E. (2007). MyD88-dependent activation of b220-cd11b+ly-6c+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *Journal of Immunology*, 178(8), 5182–5191.
28. de Almeida, L. A., Macedo, G. C., Marinho, F. A. V., Gomes, M. T. R., Corsetti, P. P., Silva, A. M., ... Oliveira, S. C. (2013). TLR6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and Immunity*, 81(5), 1654–62
29. Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Burlak, C., & DeLeo, F. R. (2005). Neutrophils in the innate immune response. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 53(6), 505–17.
30. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(8), 519–531.
31. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., & Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 80(5), 617–53.
32. Bao, Y., & Cao, X. (2011). Revisiting the protective and pathogenic roles of neutrophils: Ly-6G is key! *European Journal of Immunology*, 41(9), 2535–8.
33. Breslow, J. M., Meissler, J. J., Hartzell, R. R., Spence, P. B., Truant, A., Gaughan, J., & Eisenstein, T. K. (2011). Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. *Infection and Immunity*, 79(8), 3317–27
34. Conlan, J. W. (1997). Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity*, 65(2), 630–5.
35. Robertson, C. M., Perrone, E. E., McConnell, K. W., Dunne, W. M., Boody, B., Brahmabhatt, T., ... Coopersmith, C. M. (2008). Neutrophil depletion causes a fatal defect in murine pulmonary *Staphylococcus aureus* clearance. *The Journal of Surgical Research*, 150(2),
36. Tateda, K., Moore, T. a, Deng, J. C., Newstead, M. W., Zeng, X., Matsukawa, A., ... Standiford, T. J. (2001). Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia. *Journal of Immunology*, 166(5), 3355–61.
37. Barquero-Calvo, E., Martirosyan, A., Ordoñez-Rueda, D., Arce-Gorvel, V., Alfaro-Alarcón, A., Lepidi, H., ... Moreno, E. (2013). Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen *Brucella abortus*. *PLoS Pathogens*, 9(2), e1003167.
38. Eskra, L., & Mathison, A. (2003). Microarray analysis of mRNA levels from RAW264. 7 macrophages infected with *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, 71(3), 1125–1133.
39. Galdiero, E., Romano Carratelli, C., Vitiello, M., Nuzzo, I., Del Vecchio, E., Bentivoglio, C., ... Galdiero, F. (2000). HSP and apoptosis in leukocytes from infected or vaccinated animals by *Brucella abortus*. *The New Microbiologica*, 23(3), 271.
40. Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J. P., & Dornand, J. (2000). *In vitro* *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infection and Immunity*, 68(1), 342–51.
41. Barquero-Calvo, E., Mora-Cartín, R., Arce-Gorvel, V., de Diego, J. L., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., ... Moreno, E. (2015). *Brucella abortus* induces the premature death of human neutrophils through the action of its lipopolysaccharide. *PLoS Pathogens*, 11(5), e1004853.
42. Laskay, T., van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, 11(5), 210–214.
43. Rupp, J., Pfliegerer, L., Jugert, C., Moeller, S., Klinger, M., Dalhoff, K., ... van Zandbergen, G. (2009). *Chlamydia pneumoniae* hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages. *PLoS One*, 4(6), e6020. 

Revisión de los métodos moleculares para la detección del virus del papiloma humano registrados en Costa Rica

Michael Zúñiga-Rojas^I, Ana Cecilia Rodríguez-Céspedes^{II}

Resumen:

El virus del papiloma humano (VPH) es causante del 5% del cáncer mundial; es el cuello uterino o cervical el sitio anatómico más afectado; la infección persistente con alguno de los tipos oncogénicos del VPH es necesaria para que se produzca el cáncer cervical. El VPH también se asocia con el cáncer de vulva, vagina, pene, ano y orofaringe. En Costa Rica, el cáncer de cuello uterino es el tercer cáncer de mayor incidencia y el cuarto en mortalidad. Los objetivos de este artículo son: proveer un resumen de los métodos moleculares para la detección del VPH autorizados en Costa Rica, realizar una separación según sus principios, describir algunos puntos importantes de cada prueba y mencionar ciertas aplicaciones clínicas. El uso de técnicas moleculares para la detección del VPH tiene el propósito de identificar a las mujeres con mayor riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino, con el fin de desarrollar nuevas estrategias de tamizaje para la población (independiente o en conjunto con la citología), y así reducir los resultados erróneos y gastos por procedimientos no necesarios. Dentro de los ensayos moleculares, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son el estándar de oro para la detección del VPH por su sensibilidad extremadamente alta, y por lo tanto requieren pequeñas cantidades de ADN viral.

Palabras clave: Virus del papiloma humano, técnicas moleculares, métodos de detección, genotipo, Costa Rica.

Abstract:

Human Papillomavirus (HPV) is the cause of 5% of global cancer, being the cervix the most affected anatomic site as persistent HPV infection with an oncogenic type of HPV is a necessary cause for cervical cancer. HPV is also associated with cancer of the vulva, vagina, penis, anus and oropharynx. In Costa Rica, cervical cancer is the third type of cancer in incidence and the fourth in mortality. The objectives of this article are to provide an overview of the molecular methods for detection of HPV authorized in Costa Rica classified according to their fundamentals, to describe relevant facts of each test and to mention certain clinical applications. The use of molecular techniques for the detection of HPV is intended to identify women at increased risk of developing cervical cancer, which aids the development of new strategies for screening (independently or together with cytology), reducing erroneous results and unnecessary expensive procedures. Within the molecular assays, nucleic acid amplification assays are the gold standard for HPV testing and due to their extremely high sensitivity they require only tiny amounts of viral DNA.

Key words: Human Papillomavirus, molecular test, detection methods, genotyping, Costa Rica.

Artículo recibido el 01/12/2015 / Aceptado para su publicación el 15/12/2015.

I. Proyecto Epidemiológico Guanacaste

II. Instituto Costarricense de Investigaciones Clínicas

Correspondencia: mzuniga@proyectoguanacaste.com

Introducción

Los virus de papiloma pertenecen a la familia Papillomaviridae, la cual está compuesta por 16 géneros diferentes y se han descrito más de 170 genotipos. Estos virus son específicos de especie, tienen un tamaño de 50 nm, una estructura icosaédrica compuesta por 72 capsómeros formados mayoritariamente por la proteína L1 y un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN). Los Virus del papiloma humano (VPH) están restringidos a ser hospederos en seres humanos e infectan, principalmente, los epitelios estratificados en mucosas o cutáneos y pertenecen a los géneros alfa y beta. De estos géneros, el alfa incluye los genotipos asociados con el desarrollo de tumores de la mucosa en los seres humanos; y el beta, aquellos asociados con el desarrollo de tumores cutáneos. Dentro de los VPH alfa, se encuentran genotipos considerados como de alto riesgo (VPH-AR) por su capacidad carcinogénica, especialmente en el cuello del útero, y otros que causan usualmente lesiones epiteliales no malignas (genotipos no carcinogénicos). Los VPH-AR comprenden 13 genotipos (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 51, 56, 58, 59, 68).⁽¹⁾

Se estima que el VPH es causante del 5.2% del cáncer a nivel mundial; es el cuello uterino el sitio anatómico más afectado. El cáncer de cuello del útero es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial y para que se produzca es necesaria la infección persistente con alguno de los genotipos de alto riesgo. En otros sitios anatómicos, la proporción atribuida al VPH es variable: cáncer de vulva (69% casos están relacionados con la infección de VPH-AR), cáncer de vagina (7.5 de cada 10 casos presentan VPH), cáncer de pene (6.3 de cada 10 casos detectados tienen presencia del virus), cáncer anal (responsable del 91% de los casos de este cáncer en células escamosas) y cáncer de orofaringe (este cáncer incluye la parte central de garganta, paladar blando, amígdalas y base de la lengua; el 72% de casos detectados representan el VPH).⁽²⁾

En Costa Rica, según estadísticas del 2012, el cáncer de cérvix es el tercer tipo de cáncer de mayor impacto con 26.6 casos nuevos por cada 100 000 mujeres, superado solamente por el cáncer de piel (45.9 por 100 000) y el de mama (44.1 por 100 000). Además, es el cuarto en mortalidad (5.3 por cada 100 000 mujeres), lo que conlleva a un estimado de un deceso cada dos días.⁽³⁾

El descubrimiento del rol fundamental de la infección por VPH-AR como factor etiológico del cáncer de cuello del útero ha generado, en las últimas dos décadas, un acelerado desarrollo de técnicas moleculares para la detección de material genético del virus que permiten

su identificación incluso por genotipo. Dada la imposibilidad de poder cultivar el virus en el laboratorio, el desarrollo de estas técnicas de detección ha permitido avanzar en el conocimiento sobre el comportamiento del virus y la historia natural de su infección en el ser humano. En la actualidad, la citología cervical continúa siendo el método más usado para el tamizaje del cáncer cervical. Sin embargo, la inclusión de estas técnicas moleculares como método de tamizaje para cáncer de cuello de útero permitirá solventar problemas crónicos de estos programas de tamizaje como son, entre otros: el alto porcentaje de falsos negativos, la alta variabilidad de resultados entre laboratorios para las citologías, problemas para la detección de adenocarcinomas, la poca especificidad para lesiones precancerosas en los resultados de ASC-US (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) y la poca frecuencia en el tamizaje por parte de las mujeres. Adicionalmente, algunas de estas pruebas logran la identificación del tipo o tipos del VPH presentes (genotipo) en una mujer en particular, lo que permite una estratificación mucho mejor del riesgo para desarrollar cáncer de esa mujer.^(4,5)

Muchas son las pruebas de detección del VPH que se han desarrollado a la fecha, y estas poseen distintas características y capacidades. Sin embargo, para que un sistema de salud obtenga el mayor beneficio posible de estas nuevas técnicas, la prueba que se seleccione como método primario de tamizaje debe contar con altos niveles de sensibilidad y especificidad, así como reproducibilidad^(4,6). Los objetivos de este artículo es proveer un resumen de los métodos moleculares para detección del VPH autorizados en Costa Rica, realizando una separación según sus principios, describir algunos puntos importantes de cada prueba y mencionar ciertas aplicaciones clínicas. Es de suma importancia, para los microbiólogos químicos clínicos y biotecnólogos, conocer las ventajas y limitaciones de cada prueba, con el fin de poder escoger la más apta para nuestro propósito de estudio y nuestra realidad como país.

Métodos moleculares para la detección del VPH

Debido a que el virus del papiloma humano no puede propagarse en cultivos de tejidos, su identificación se basa únicamente en técnicas moleculares, las cuales se fundamentan en el conocimiento de la doble cadena de ADN (7 900 pb), estructura de la cápside y la organización de sus genes⁽⁷⁾.

En Costa Rica, el registro de las diversas técnicas moleculares, para el uso clínico en la detección del VPH, se debe realizar por medio del Ministerio de Salud (información dada por la Dra. Gabriela Infante Herrera,

del Departamento de Equipo y Material Biomédico, correo electrónico, 28 junio 2015). Según el principio de la técnica molecular, estas se pueden separar en tres grupos (Figura 1):

1. Pruebas de hibridación de ácidos nucleicos o hibridación *in situ* (HIS)
2. Pruebas de amplificación de señal o de captura de híbrido (SHC)
3. Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos

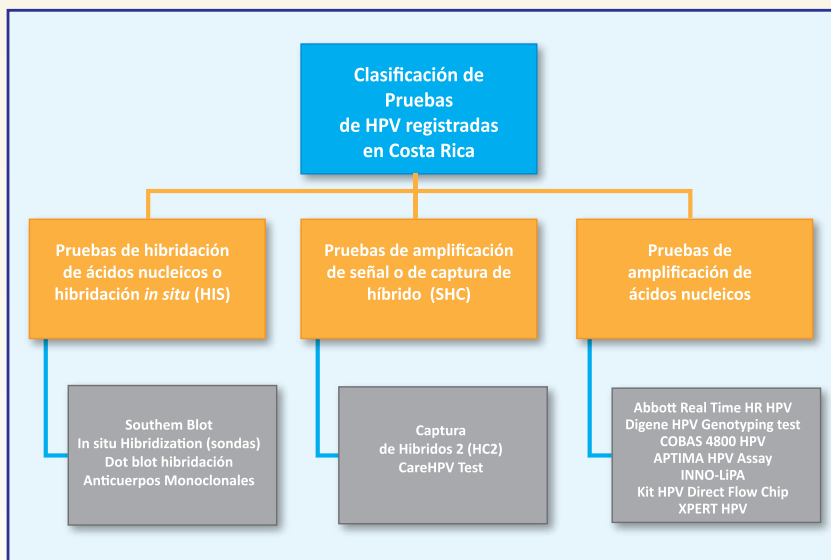


Figura 1. Diagrama de clasificación de pruebas para la detección del HPV registradas en Costa Rica

Pruebas de hibridación *in situ* (HIS)

Las pruebas de hibridación de ácidos nucleicos o hibridación *in situ* son ensayos basados en el uso de sondas radiomarcadas (isótopos) que hibridan específicamente con el ADN intracelular del VPH. Actualmente, a nivel mundial, no se comercializan kits para estas pruebas, más bien se utilizan protocolos y metodologías bien establecidas, por lo que se requieren laboratorios sofisticados con acceso a los reactivos necesarios y personal calificado en técnicas avanzadas de laboratorio. La sensibilidad es limitada, se ha reportado un 74-83% en biopsias con grado histológico de infección por VPH o mayor (como grupo) y de un 35-44% para diagnóstico normal o cambios metaplásicos⁽⁸⁾.

El resultado de las pruebas de HIS puede variar dependiendo del ciclo menstrual^(9, 10), debido a que la

fluctuación hormonal afecta la exfoliación de células del cuello y vagina, lo que tiene consecuencias para determinar la presencia/ausencia de ADN del virus e influir en la eficiencia de la detección del mismo, particularmente cuando varios genotipos del VPH están presentes en diferentes concentraciones.

Por otra parte, los anticuerpos monoclonales son utilizados para la localización microanatómica, lo que permite una correlación con los parámetros morfológicos, resultando un aumento en la sensibilidad y especificidad y la posible colocalización con otro tipo de marcadores. Cuenta con

la desventaja de presentar diversas tinciones con respecto al tipo de corte y la cantidad de cortes que se realizan en un tejido específico.^(11, 12)

Otra desventaja de las pruebas HIS es que requieren de grandes cantidades de ADN altamente purificado, por lo que es de suma importancia la estabilidad de la muestra durante el transporte y el almacenamiento, debido a que el ácido nucleico viral debe ser preservado para evitar resultados falsos negativos causados por la degradación de endonucleasas⁽¹³⁾. Además, se requieren idealmente moléculas de tamaño completo, por lo tanto no se puede hacer con cualquier espécimen biológico (idealmente en tejidos fijados en parafina).

Dado lo complejo de la prueba de HIS y la posible alteración de los resultados por factores externos a los del laboratorio es que se han desarrollado pruebas de amplificación de señal o amplificación de ácidos nucleicos que permitan aumentar la sensibilidad así como la especificidad de la detección de ADN del VPH y una alta reproducibilidad de los resultados.

Pruebas de amplificación de señal o de captura de híbridos (SHC)

Estas pruebas se basan en la hibridación de ADN-VPH con sondas de ARN marcadas en solución, las cuales emiten señales no radiactivas. Tienen la ventaja de poder incorporarse con mayor facilidad en los laboratorios y no precisar de personal altamente calificado. Dentro de las desventajas que presenta este tipo de pruebas es que no permite la identificación de genotipos específicos del VPH (genotipo) y el límite de detección es menos

sensible que el de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.

Captura de híbridos 2 DNA Test (HC2)

La captura de híbridos 2 DNA Test es una técnica que puede aplicarse con facilidad en los laboratorios, ya que no requiere instalaciones especiales ni personal con amplia experiencia en técnicas moleculares. Esta prueba se basa en la hibridación que utiliza sondas de ARN complementarias a una secuencia común de los trece virus considerados de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Luego se realiza una captura y detección del híbrido (ADN del VPH-ARN de la sonda) con un anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina y un sustrato, el cual reacciona con la fosfatasa para la producción de fotones que son medidos por un luminómetro en unidad relativa de luz (RLU).^(14,15)

Entre las limitantes principales de HC2 es su sensibilidad, ya que se ha reportado una de 93.75% para la detección de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grado 2 (NIC2) respecto a la prueba de COBAS⁽¹⁶⁾ y de 91.8% para NIC3 con respecto a la Abbott Real Time⁽¹⁷⁾, el resultado obtenido (positivo o negativo a VPH-AR) y la no distinción del tipo de virus detectado^(18,19). En estudios epidemiológicos es muy importante conocer la presencia de infecciones múltiples, para identificar las posibles asociaciones existentes entre una infección particular por VPH-AR y el riesgo de progresión hacia diferentes grados de severidad de las lesiones, lo que no puede demostrarse con esta prueba, ya que solamente indica la presencia del VPH (13 genotipos detectables), mas no así a cuál o cuáles corresponde (genotipo). Además, esta prueba no cuantifica la carga viral presente en la muestra, lo que impide realizar análisis de riesgo de progresión de lesiones según carga viral.

La HC2, además, con alguna frecuencia, puede presentar falsos negativos (afecta directamente la sensibilidad), entre un 1 y un 8%, debido a cifras bajas de carga viral del VPH (el umbral de detección es de 1 pg/ml que corresponde a 5 900 genomas del VPH)⁽²⁰⁾, a errores en la manipulación de la muestra o a la presencia de sustancias que puedan interferir con la técnica (cremas antifúngicas, gel anticonceptivo, entre otras).⁽²¹⁾

Por otro lado, algunos autores han demostrado reacción cruzada con genotipos del VPH no oncogénicos (6, 11, 26, 40, 42, 53, 66, 67, 71, 83, 84); aunque estos genotipos pueden causar anomalías celulares detectables por citología y llegar incluso a lesiones de alto grado (principalmente NIC2, aunque pueden llegar a NIC3), estas, escasamente, progresan a cáncer.^(22,23)

CareHPV

Debido al alto costo de la prueba de captura de híbridos 2, la Fundación Gates y Qiagen crean una empresa derivada entre los años 2003-2007. Los primeros estudios clínicos se llevaron a cabo en la India y China. El objetivo era desarrollar una prueba rápida y económica para la detección de infecciones de alto riesgo asociadas o no a lesiones precursoras del cáncer uterino en regiones de escasos recursos. Este método, llamado CareHPV, consta de un kit de detección (captura de híbrido quimioluminiscente) para ADN-VPH de alto riesgo, que tiene la ventaja de estar diseñada para ser utilizado por personas mínimamente entrenadas, se puede realizar en ambientes no estrictamente controlados, debido a que cuenta con un rango de temperaturas flexibles, no requiere equipo costoso y cuenta con su propia fuente de agua.^(24,25)

La prueba CareHPV consiste en la captura rápida y selectiva de ADN del VPH por medio de anticuerpos unidos a perlas magnéticas, estos son detectados utilizando una señal quimioluminiscente. Permite la detección de 14 genotipos del VPH, incluye los 13 de alto riesgo y uno considerado potencialmente carcinogénico (VPH-66).⁽²⁶⁾ Esta prueba se considera superior a su progenitora (HC2), tanto por el menor costo como por su robustez en ambientes no controlados. Su principal limitante es la sensibilidad, la cual es de 85.71% y de 91%, para NIC2+ y NIC3+, respectivamente, comparada contra HC2⁽²⁶⁾. Aunque la concordancia entre CareVPH y HC2 es de 94.6%, se considera una limitante, ya que en la actualidad las pruebas de concordancia son superiores al 96% (GP5+/5+ PCR-EIA, qPCR E6/E7, Aptima, Cobas 4800)⁽²⁷⁾.

La realización de la prueba CareHPV toma 2.5 horas hasta obtener el resultado y está automatizada solo parcialmente, por lo que se pueden dar falsos resultados positivos por errores de manipulación. Está diseñada para ejecutarse en modo de lotes (placa de 96 pozos con controles negativos y positivos), lo cual es un gran inconveniente para mantener los costos bajos si se requiere hacer corridas con un menor número de muestras. Finalmente, esta técnica no tiene controles de contaminación por arrastre, lo que puede generar falsos positivos.^(27,28)

Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos se basan en la multiplicación de fragmentos de ADN a partir de una secuencia diana de un gen, de este modo proporciona muestras concentradas de una secuencia genética específica. Estas técnicas se caracterizan por la alta sensibilidad y la posibilidad de conocer el genotipo

específico del VPH (genotipo), así como la detección de infecciones múltiples, lo que posibilita el seguimiento de la persistencia de una infección en particular. No obstante, también presentan desventajas como la necesidad de contar con espacios adecuados, personal con experiencia y alto costo de instalación, factores que limitan su incorporación en muchos laboratorios.

XPERT HPV

La detección temprana de los oncogenes virales de alto riesgo E6 y E7 es crítica, ya que expresan las oncoproteínas E6/E7 en las células cervicales, lo que conduce a modificaciones del ciclo celular. Esta expresión proteica propicia condiciones favorables para la replicación viral, lo cual se correlaciona con el posible desarrollo del cáncer cervical. XPERT HPV es una prueba de PCR tiempo real multiplexado que se dirige a los oncogenes E6 y E7 de 14 genotipos del VPH incluyendo los de alto riesgo (29,30). Se ha reportado una sensibilidad del 90.8% para NIC2 o mayor comparado con la prueba de HC2 y una mayor especificidad contra Cobas (42.6% XPERT vs. 39.6% Cobas), lo que reduce la aparición de falsos positivos. (31)

Esta prueba cuenta con la ventaja de obtener resultados cualitativos en un período corto (60 minutos), pero a la vez tiene la desventaja que no permite realizar genotipo. Otra ventaja comparativa es la posibilidad de correr pruebas individuales, así se eliminan retrasos asociados con las pruebas en lotes y es totalmente automatizado, lo que elimina los errores humanos (31). Sin embargo, el elevado costo del cartucho y los instrumentos necesarios para la realización de la prueba siguen siendo una limitación importante para su adopción generalizada. (29)

Cobas 4800 HPV

COBAS 4800 HPV es una prueba cualitativa multiplexada *in vitro* para la detección del VPH por medio de una amplificación del ADN diana por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación de ácido nucleico para la detección de 14 genotipos, que incluyen los VPH de alto riesgo en un único análisis. Esta prueba permite identificar de forma individual los tipos del VPH 16 y VPH 18, mientras que al resto de los genotipos (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) lo hace en forma conjunta(32,33). Una limitante de esta prueba es que las muestras por ser analizadas por este método tienen que ser conservadas en alguno de los siguientes medios: Cobas® PCR Celular Colección Media (Roche Molecular Systems, Inc.), PreservCyt® Solución (Cytoc Corp.) o SurePath® (no aprobado a la fecha en los EE. UU.) (BD Diagnostics-TriPath).

Esta prueba posee uno de los porcentajes de sensibilidad más altos, del 90.8% (vs GenXpert) (31) y del 98.3% (vs. HC2)(34) para NIC2 o mayor; además, de altos valores de reproducibilidad intra e interlaboratorios (mayores al 94%)(34,35). Dentro de las ventajas de esta prueba es que utiliza un cebador β -globina como control interno para evaluar la calidad del espécimen e identificar las muestras que contienen factores que inhiben el proceso de amplificación, lo que conlleva una disminución de falsos negativos por estas causas. Además, es fácil de usar, reduce los costos de mano de obra especializada y tiempo de entrenamiento; sus resultados se obtienen en 4 horas y se presentan como resultados positivos, negativos o no válidos sin existir zona de resultado indeterminado como en otras pruebas. Otra característica importante es que no tiene reactividad cruzada con VPH de bajo riesgo cancerígeno. (33,36)

Por otra parte, COBAS 4800 HPV es la primera prueba genética para detección del virus del papiloma humano aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) en mujeres mayores de 25 años, y a ser utilizada como método primario de tamizaje. La autorización se ha basado en datos del estudio estadounidense ATHENA, en el que participaron más de 47 000 mujeres; los resultados mostraron que una de cada 10 mujeres de 30 o más años que dieron positivo para los genotipos 16 o 18 en la prueba del VPH para COBAS presentaban lesiones de NIC2 o mayor a pesar de que los resultados de la citología eran normales.(32)

Digene HPV Genotyping LQ Test

Esta prueba fue registrada en el país por Capris S.A. como Digene HPV Genotyping LQ Test, aunque actualmente se conoce a nivel internacional como LMNX Genotyping Kit GP HR(37). Se basa en la hibridación inversa de los amplicones obtenidos por PCR del ADN extraído de muestras clínicas por medio de una ADN polimerasa (HotStarTaq Plus). Los amplicones biotinados desnaturalizados, resultantes de la amplificación de una parte de la región L1 con los cebadores GP5+/6+, se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicas, que se inmovilizan en microesferas (tecnología xMAP). Cada sonda de oligonucleótido se une a una microesfera de color específico, las cuales se detectan y se identifican en un sistema de detección automática de forma individual (LiquiChip). Esta técnica detecta 18 genotipos del VPH individualmente, por lo que es muy útil en casos de infecciones mixtas (VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82). Además cuenta con un control interno para la inhibición de la PCR por

medio de una beta-globina, con lo que se reducen los falsos positivos. ^(38,39)

Esta prueba tiene una sensibilidad del 96.1% y 98.2% para NIC2 y NIC3, respectivamente, con respecto a la prueba GP5+/6+ PCR-EIA (Diassay)⁽³⁷⁾. La especificidad de la prueba Digene HPV Genotyping es alta; esta se confirmó en un estudio en el cual se demuestra la presencia de microorganismos del tracto anogenital femenino en las muestras a pesar de lo cual no se redujo la sensibilidad para detectar el VPH-AR. Además, posee una reproducibilidad intra e interlaboratorio del 88% y un grado de robustez bastante aceptable ($\pm 1^\circ\text{C}$ para temperatura de Amplificación). ^(40,41) La presencia de sangre u otras sustancias potencialmente interferentes (lubricantes vaginales, cremas antifúngicas, talco, analgésicos hemorroidales) no producen resultados falsos positivos ni causa reducción de la sensibilidad de la prueba. ⁽⁴¹⁾

La principal limitación de esta prueba, al igual que las anteriores pruebas de amplificación de señal de Qiagen, es el alto costo de cada prueba individual, ya que está diseñada para ejecutarse en modo de lotes (placa de 96 pozos) y se obtienen resultados en 4 horas. Así mismo, el alto costo de diversos equipos especializados que se requieren para poder realizarse en el laboratorio es otra limitante (Thermomixer, LiquiChip, Microplato calentador, Termociclador, entre otros).

Abbott Real Time HIGH Risk HPV

El PCR Real Time es una herramienta de diagnóstico fiable, sensible y específica para la detección y genotipo del VPH específicos en muestras celulares. La prueba de Abbott RT-HR-HPV es una PCR RT (GP5+/6+) *in vitro* cualitativa, que se dirige a la región L1 de 14 genotipos del VPH entre los que están los de alto riesgo u oncogénicos, por medio de tecnología de detección de ADN viral en células cervicales recogidas en medios líquidos. Este ensayo detecta, de forma simultánea e individualmente, cada genotipo del VPH 16 y VPH 18 y de forma agrupada los otros 12 genotipos (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). ^(42,43)

Esta prueba puede utilizar el equipo RT-PCR m2000rt (totalmente automatizado) o se puede realizar la extracción de ADN de forma manual. En el proceso de RT-PCR se utiliza el cebador modificado GP5+/6+ que consta de tres cebadores directos y dos cebadores inversos diseñados para hibridar una región de 150 bases del VPH. Las sondas del VPH y de control interno (beta-globina humana) son oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla modificado con un resto fluorescente unido covalentemente a un extremo de la sonda y un extintor de fluorescencia en

el otro extremo, por lo cual solamente cuando se forma un híbrido con secuencia complementaria se emite luz, mientras que si no existe hibridación, el extintor va a suprimir la luz emitida por el extremo fluorescente. A través de las distintas señales, se puede reconocer el VPH16, VPH18, VPH-no-16/18 (incluye los otros 12 genotipos mencionados) y el control interno de forma simultánea en una sola reacción. ^(44,45)

Las ventajas de este método son la capacidad de detectar la carga viral incluso en concentraciones muy pequeñas y posee un alto porcentaje de reproducibilidad. Además, no muestra reactividad cruzada con otros tipos del VPH de bajo riesgo ni reactividad no específica con otros microorganismos comunes en el tracto anogenital femenino ^(43,46). La prueba se validó oficialmente para su uso con muestras cervicales recogidas en ThinPrep PreservCyt, SurePath y Abbott CerviCollect Specimen Collection Kit ^(44,45); sin embargo, las muestras cervicales recogidas en Qiagene Specimen Transport Media (STM) también fueron aprobadas ⁽⁴⁷⁾. Además de células exfoliadas de muestras cervicales, puede detectar de forma fiable e identificar los VPH específicos en el tejido fresco, el tejido fresco congelado, y tejidos fijados con formol y parafina o paraplast. ⁽⁴²⁾

Se ha reportado una sensibilidad del 95.6% y 93.3% para NIC2+ ^(45,46), contra la prueba GP5+/6+PCR -EIA y HC2, respectivamente; su reproducibilidad intra e interlaboratorio es superior al 98%⁽⁴⁵⁾; se asume que los errores humanos se minimizan al máximo al ser automatizada en su mayor parte.

Su principal desventaja es el diseño para correr la prueba, debido a que debe ser utilizada en lotes de 96 muestras y los resultados se obtienen en un lapso de 6 a 8 horas, y va a depender del método utilizado para la extracción de ADN. ^(44,46)

Kit HPV Direct Flow Chip

El Kit HPV Direct Flow Chip es un ensayo basado en una membrana de oligonucleótidos para la detección e identificación de genotipos del VPH en muestras cervicales. La prueba se basa en la amplificación de un fragmento de la región vírica L1 mediante PCR (amplicones biotinados), seguido de una hibridación en membrana con sondas específicas para el genotipo del VPH (dot blot inverso) mediante la tecnología DNA-FLOW. Esta permite diferenciar 36 genotipos del VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 81, 82, 84 y 89), por lo que lo convierte en un método de genotipo rápido y sensible para la detección de la infección por el VPH. ⁽⁴⁸⁾

Esta tecnología permite una unión muy rápida entre el producto de PCR y su sonda específica en un ambiente tridimensional poroso, en contraste con la hibridación en superficie convencional. Una vez producida la unión, entre los amplicones específicos y sus sondas correspondientes, la señal se visualiza mediante una reacción inmunoenzimática colorimétrica con estreptavidina-fosfatasa y un cromógeno (NBT-BCIP) que genera precipitados insolubles en la membrana en aquellas posiciones en las que ha habido hibridación. ^(48,49)

Dentro de sus principales ventajas se tiene que no requiere la extracción previa de ADN para el PCR y el corto tiempo para obtención de resultados (90 minutos); aunque tiene la limitante de trabajar en lotes de 15 muestras (lo que limita su uso a nivel macro o programático)⁽⁴⁹⁾. Esta prueba tiene la característica de estar certificada por el OMS HPV LabNet Panel Proficiency 2011, como prueba con una sensibilidad del 100% y especificidad para la detección de todos los genotipos incluidos en el estudio; además, no presenta reactividad cruzada entre los diversos tipos de virus. ⁽⁵⁰⁾

INNO-LiPA

Esta prueba se clasifica dentro de las técnicas *in vitro* de hibridación inversa y se basa en la coamplificación de la región de 65pb del gen L1 del VPH y el gen HLA-DP1 humano (270pb) utilizando cebadores biotinilado SPF10 para la hibridación con sondas de oligonucleótidos específicos. Todas las sondas se inmovilizan como líneas paralelas sobre tiras de membrana para la identificación de 28 genotipos diferentes del VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69/71, 70, 73, 74 y 82). ^(43,51)

Esta prueba presenta una sensibilidad del 92.1% para NIC2+ comparado con HC2 y una reproducibilidad inter e intralaboratorio del 99% ⁽⁵²⁾. Además, es una de las pocas pruebas que permite la toma de muestras con hisopos, cepillos, tampones y lavado. INNO-LiPA constituye, por ende, un método fiable para la identificación del VPH y la detección de múltiples infecciones. Dentro de sus ventajas está la posible automatización del procesamiento por medio del Auto-LiPA y la facilidad de la lectura visual. ^(53,54)

Dentro de sus desventajas está el que presenta una baja sensibilidad para algunos genotipos cancerígenos como el VPH 35, 39, 52, 56 y 59, y el posiblemente carcinogénico VPH 66. Por otra parte, debido a lo laborioso para la secuenciación de varios subclones de plásmido, es que no se recomienda en la práctica habitual o en grandes

estudios epidemiológicos, así como por su alto costo por muestra. ^(55,56,57)

Aptima HPV Assay

Aptima es una prueba que toma el ARN del VPH aislado de células por medio de una reacción en tubos AST (Assay Specimen Transfer) que captan y amplifican el ARN-VPH (oncogenes E6/E7). Esta reacción se detecta por la combinación con reactivos que producen quimioluminiscencia, por tanto, se mide con un luminómetro para determinar la presencia de 14 tipos del VPH en una muestra, incluidos los de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 66). Además, esta prueba tiene la opción de genotipo para los tipos VPH 16 y 18/45, proporcionando una ventaja de detección del VPH 45, ya que muchas pruebas aprobadas por la FDA no cuentan con esta genotipificación. ^(58,59)

Esta técnica es la primera aprobada por la FDA en la que se detecta el ARN mensajero de dos oncogenes virales del VPH (E6 y E7). Al infectar la célula, estas oncoproteínas interactúan con varias proteínas de la célula huésped (que pueden inhibir o degradar), lo que lleva a la incapacidad de la célula para inhibir la apoptosis y permitir la reparación del ADN. Por ejemplo, la proteína E6 provoca la degradación de la proteína p53 supresora de tumores, lo que conlleva a un aumento de la tasa de mutaciones aleatorias que pueden conducir a transformación. E7, por su parte, inhibe la función de la proteína Rb, que regula el ciclo celular, la cual al inhibirse, también puede conducir a la célula en un camino de transformación neoplásica. Estos hallazgos sugieren que los ARN mensajeros E6/E7 son excelentes marcadores para la detección de la enfermedad cervical subyacente y en desarrollo. ^(60,61,62)

La sensibilidad es de 96.3% para NIC2 con respecto a HC2⁽⁵⁸⁾ y cuenta con una mayor especificidad que HC2 para NIC2, por lo que se recomienda tanto como prueba de tamizaje primario o para clasificación de citologías anormales. Su reproducibilidad inter e intralaboratorio es aproximadamente del 96% ⁽⁶³⁾. Es importante reconocer que esta prueba logra reducir en un 25% los falsos positivos que se dan con pruebas de Citología de base líquida y de 8% con pruebas basadas en ADN. ⁽⁶⁴⁾

Esta prueba presenta ventajas en su procesamiento debido a que un 90% es automatizado, y se obtienen los resultados en 3.5 horas. Una desventaja que presenta es la no diferenciación entre el genotipo VPH18 y el VPH45, ya que su positividad puede darse por la presencia de uno o ambos, pero se desconoce cuál de los dos es el que está presente. Además, debe utilizarse alícuotas procesadas y

almacenadas en tubos AST de Hologic, los lubricantes personales que contienen polyquaternium 15 o medicamentos antifúngicos a concentraciones superiores a 0.025% y 0.075%, respectivamente, en la muestra, pueden interferir con el rendimiento del ensayo.^(59,63)

Cuadro 1. Resumen de métodos moleculares para la detección del VPH registrados en Costa Rica

Técnica molecular	Proveedor	Clasificación	Molécula blanco	Principio	Aprobado	Detección	Genotipo	Lotes / Tiempo Resultado	Limitación
Abbott Real Time HR HPV	Abbott	Prueba amplificación ácido nucleico	ADN	PCR Tiempo Real	CE	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	16, 18	96 muestras por lote/6-8 h	Tiempo para obtención resultado. La extracción manual ADN puede acarrear problemas de contaminación.
Aptima	Hologic	Prueba amplificación ácido nucleico	ARNm	PCR Reverso Transcripción	FDA	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	16, 18/45	1-250 muestras por lote/3.5 h	Afectada por sustancias interferentes, no distinción VPH18/45, solo usa AST para almacenamiento de células.
Captura de Híbridos 2	Qiagen	Prueba de amplificación de señal	ADN	Captura híbrido	FDA	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68	----	96 muestras por lote/2.5 h	Presenta falsos negativos, se afecta con sustancias interferentes, reacción cruzada con VPH no oncogénicos
CareHPV Test	Qiagen	Prueba de amplificación de señal	ADN	Captura híbrido	Diversas regiones	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	----	96 muestras por lote/2.5 h	Presenta falsos positivos, no presenta controles de contaminación por arrastre.
COBAS 4800	Roche	Prueba amplificación ácido nucleico	ADN	PCR Tiempo Real	FDA	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	16, 18	24-96 muestras por lote/4 h	Restringe medios de conservación de células para su análisis.
Digene HPV Genotyping LQ Test *	Qiagen	Prueba amplificación ácido nucleico	ADN	PCR	CE	----	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82	96 muestras por lote/4h	Alto costo de equipos especializados para realizar la prueba.
INNO-LiPA	Innogenetics	Prueba de amplificación de señal	ADN	Reversa line-blot	CE	----	6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69/71, 70, 73, 74, 82	20-48 muestras por lote/3h	Presenta una baja sensibilidad para genotipos cancerígenos (VPH 35, 39, 52, 56 y 59) y posiblemente carcinogénico (VPH66).
Kit HPV Direct Flow Chip	Master Diagnóstica	Prueba amplificación ácido nucleico	ADN	Microarray ADN	CE	----	6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 81, 82, 84, 89	15 muestras por lote/1.5 h	Necesita equipo especializado para realizar la prueba. Se deben correr 15 muestras por lote.
XPRT HPV	Cepheid	Prueba amplificación ácido nucleico	ADN	PCR Tiempo Real	CE	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	----	1-80 muestras/1h	Altos costos de cartuchos e instrumentos.

Utilidad de las técnicas moleculares de detección del VPH

Las técnicas moleculares descritas anteriormente son de gran utilidad a nivel clínico para la detección del VPH, en la prevención y el control del cáncer cervical. Es por ello que actualmente se utilizan, cada vez con mayor frecuencia, en los programas de tamizaje como método primario para la detección y tratamiento de las lesiones precursoras de cáncer cervical. En programas que aún usan la citología como método primario de detección, se utilizan las pruebas de detección de VPH-AR para la clasificación de mujeres con resultados citológicos equívocos (células escamosas atípicas de significado indeterminado [ASC-US]) o de baja calidad y en el seguimiento de mujeres con resultados anormales en la citología y en las que no se detecta lesión en la colposcopia/biopsia. Otro de los grandes usos, independiente del método de tamizaje primario, es en la predicción del resultado terapéutico después del tratamiento de NIC2+.

• **Método primario de tamizaje para los precursores de cáncer cervical**

Esta es, sin duda, la principal aplicación de las técnicas moleculares: la prevención y el control del cáncer cérvico-uterino; es una prioridad en salud pública por su alta incidencia y mortalidad. Las técnicas moleculares ofrecen enormes ventajas técnicas y de flexibilidad programática en comparación con la citología⁽⁷⁾. Sin embargo, aún falta trabajo por realizar para lograr obtener el mayor beneficio potencial de estas pruebas; es necesario encontrar el método/prueba secundaria que permita aumentar la especificidad programática (menor cantidad de mujeres referidas a especialistas), así como llegar a un consenso sobre el manejo de mujeres con prueba de VPH-AR positivas en las que no se logran visualizar lesiones que requieran tratamiento. Idealmente, para obtener el mayor beneficio de salud pública a nivel mundial, se debería poder diseñar un programa de tamizaje que utilice la determinación con VPH-AR como método primario, seguido de una prueba secundaria que le confiera una especificidad aceptable para realizar el tratamiento de forma inmediata.

• **Confirmación de citologías no concluyentes ASC-US y LIEBG**

En los programas de tamizaje que utilizan la citología como método primario, los resultados tipo células escamosas atípicas (ASC-US) corresponden a un resultado incierto que amerita revaloración, debido a que un porcentaje importante son positivos por VPH-AR y pueden corresponder a lesiones de alto grado. Por esta razón, las

pruebas moleculares son aliadas en el diagnóstico para confirmar y lograr una mejor clasificación del riesgo para NIC2+ en mujeres con citologías con resultado ASC-US. Por otra parte, la determinación y genotipo de los VPH de alto riesgo permite, en el caso de las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG), la identificación de mujeres con mayor posibilidad de desarrollar lesiones NIC2/NIC3.^(66,67)

• **Fallas en la detección de lesiones en colposcopia de citologías anormales**

La colposcopia es uno de los métodos secundarios más utilizados para la detección y tratamiento de lesiones precancerosas en las mujeres, aunque no es el más confiable. Esto debido a que al ser un método visual está sujeto a la variabilidad intra e interpersonal para la interpretación de posibles lesiones precursoras y errores a la hora de la toma de la biopsia. Además, solo puede detectar las lesiones que son visibles (tamaño suficiente y en el exocervix o área expuesta); es por ello que, en mujeres en la posmenopausia, son más frecuentes las interpretaciones erróneas por la atrofia epitelial y el desplazamiento de la unión escamocolumnar hacia el interior del canal endocervical. En las mujeres embarazadas se dificulta la interpretación colposcópica de las lesiones acetoblancas por el color violáceo de la mucosa.^(63,68)

Las técnicas moleculares nos ayudan a resolver cada una de las situaciones anteriores con la detección de VPH-AR, debido a que si la lesión fue erróneamente interpretada, se puede confirmar la presencia de algún VPH-AR e indicar algún otro procedimiento diagnóstico/terapéutico, aun en situaciones donde es difícil de observar la lesión.

• **Establecer la efectividad de los tratamientos colposcópicos**

Se considera como un éxito del programa de tamizaje cuando se logra la detección y tratamiento oportuno de las mujeres, es decir, cuando se detectan y tratan a nivel ambulatorio las lesiones precursoras (NIC2/NIC3), ya sea por escisión (LEEP) o por ablación (eliminación del tejido por frío o calor). Sin embargo, luego de estos tratamientos, se ha reportado una recurrencia de las lesiones luego de tratamiento del 5-15%. Estas recurrencias, de no ser detectadas y tratadas, conllevan a una alta probabilidad de avance a cáncer invasor. La determinación del VPH de alto riesgo confirma la erradicación o persistencia del VPH-HR postratamiento, el cual es necesario para el progreso de la lesión a cáncer.⁽⁶⁹⁾

Conclusiones

El uso de técnicas moleculares para la detección del VPH, como parte de los programas de tamizaje, tiene como objetivo identificar a las mujeres con mayor riesgo de desarrollar cáncer de cérvix, y así definir nuevas estrategias de tamizaje para la población (independiente o en conjunto con la citología), para reducir los resultados erróneos y gastos por procedimientos no necesarios. Por otra parte, estas técnicas son indispensables en ensayos de vacunación, epidemiología y estudios de historia natural, debido a que en estos son necesarias pruebas altamente sensibles y reproducibles con un amplio espectro de tipos del VPH.

Dentro de los ensayos moleculares, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son el estándar de oro para la prueba del VPH, por su elevada sensibilidad y porque requieren pequeñas cantidades de ADN. La posibilidad que brindan estas pruebas de identificar tipos específicos de VPH-AR, permiten hacer una mejor estratificación del riesgo para desarrollar cáncer en una persona en particular y así adecuar el seguimiento y tratamiento necesario, lo que conlleva a una mejora económica (rentabilidad) para los programas de salud pública. Así mismo, es importante no olvidar todas las otras alternativas en estas técnicas moleculares, que aunque mantienen sensibilidades inferiores o altos costos, han sido precursoras de las últimas pruebas desarrolladas.

Referencias

1. Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Coglian, V. (2009). A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10, 321-322
2. Oh, J., Weiderpass, E. (2014). Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. *Ann Glob Health.* 80(5): 384-392.
3. Ministerio de Salud, Costa Rica. (2012). Plan Nacional para la Prevención y Control del Cáncer 2011-2017. 1 ed. San José Costa Rica. 24-25
4. Cavazza, M., Correnti, M. (2004). Pruebas Moleculares para la detección del virus papiloma humano: Desafíos y posibilidades. *Dermatología Venezolana* 42 (3), 6-10.
5. Abreu, A., Souza, R., Gimenes, F., Consolaro, M. (2012). A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal* 262(9).
6. Arney, A., Bennett, K. (2010). Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus. *LabMedicine* 41(9), 523-530.

7. Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., van Doorn, L. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (VPH) infections. *Journal of Clinical Virology* 32, 43-51.
8. Chen, S., Fairley, C., Tabrizi, S., Quinn, M., Garland, S. (1993). Southern blot and dot blot hybridization compared to PCR for the detection of human papillomavirus DNA in biopsies of the uterine cervix from women with dysplasia. *Clin Diagn Virol.* 1(3), 187-194.
9. Harper, D., Longacre, M., Noll, W., Belloni, D., Cole, B. (2003) Factors affecting the detection rate of human papillomavirus. *Ann Fam Med* 1, 221-227.
10. van Ham, M., Melchers, W., Hanselaar, A., Bekkers, R., Boonstra, H., Massuger, L. (2002). Fluctuations in prevalence of cervical human papillomavirus in women frequently sampled during a single menstrual cycle. *Br J Cancer* 87:373-376.
11. Hubbard, R. (2003). Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med* 127, 940-945.
12. Garcia, M., Murillo, A. (1999). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico en dermatología. *Derm Per.* 9(1) ISSN versión electrónica : 1609-7203
13. Sherman, M., Schiffman, M., Lorincz, A., Herrero, R., Hutchinson, M., Bratti, C. (1997). Cervical specimens collected in liquid buffer are suitable for both cytologic screening and ancillary human papillomavirus testing. *Cancer* 81, 89-97.
14. Lorincz, A., Anthony, J. (2001) Advances in VPH detection by Hibrid Caprute R. *Pap Report* 12(6), 145-154.
15. Bozzetti, M., Nonnenmacher, B., Mielzinska, I., Villa, L., Lorincz, A., Breitenbach, V., et al. (2000). Comparison between Hybrid Capture II and polymerase chain reaction results among women at low-risk for cervical cancer. *Ann Epidemiol* 10,466-471
16. Chen, W., Yu, L., Wang, H., Fu, C., Chen, F., Cao, Y., Kang, L., Zhang, X., Zhao, F., Geng, L., Yu, L. (2012). Evaluation of cobas 4800 high-risk HPV test as a tool in cervical cancer screening and cytology triage. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 34(7):543-548. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2012.07.014.
17. Poljak, M., Kovanda, A., Kocjan, B., Seme, K., Jancar, N., Vrtacnik-Bokal, E. (2009). The Abbott RealTime High Risk HPV test: comparative evaluation of analytical specificity and clinical sensitivity for cervical carcinoma and CIN 3 lesions with the Hybrid Capture 2 HPV DNA test. *Acta Dermatoven APA.* 18(3), 94-103.
18. Ault, K. (2003). Human papilloma virus infections: diagnosis, treatment, and hope for a vaccine. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 30, 809-817.
19. Gravitt, P., Burk, R., Lorincz, A., Herrero, R. y col. (2003). A comparison between real-time polimerase chain reaction and

- hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol.* 12, 477-484.
20. Burd, E. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 16:1-17
21. Schiffman, M., Herrero, R., Hildesheim, A. y col. (2000). VPH DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *J Am Med Assoc* 283, 87–93.
22. Gravitt, P., Schiffman, M., Solomon, D. y col. (2008). A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(5), 1248–1254.
23. Terry, G., Ho, L., Londesborough, P. y col. (2001) Detection of high risk VPH types by the hybrid capture 2 test. *J Med Virol* 65, 155–162.
24. Lyamichev, V., Mast, A., Hall, J., et al.(1999). Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol.* 7, 292–296.
25. Gravitt, P. et al. (2008). New technologies in cervical cancer screening. *Vaccine.* 26(10), 42–52.
26. Ying, H., Jung, F., Fanghui, Z., Youlin, Q., Yali, H. (2014). High-risk VPH nucleid acid detection kit – the care VPH test- a new detection method for screening. *Scientific Reports* 4, 1-5.
27. Ngou, J., Magooa, M., Gilham, C., Djigma, F., Didelot, M., Kelly, H., Yonli, A., Sawadogo, B., Lewis, D., Moretlwe, S., Mayaud, P., Segondy, M.(2013).Comparison od CareVPH and Hybrid Capture 2 Assays for Detection of High-Risk Human Papillomavirus DNA in Cervical Samples from HIV-1-Infected African Women. *J Clin Microbiol.* 51(12), 4240–4242.
28. Qiao, Y., Jeronimo, J., Zhao, F., et al. (2014). Lower cost strategies for triage of human papillomavirus DNA-positive women. *Int. J. Cancer* 134(12), 2891–2901.
29. Meyer, G., Schnippel, K., Long, L., et al.(2012). The impact and cost of scaling up GeneXpert MTB/RIF in South Africa. *PLoS One.* 7(5), e36966
30. Cox, J., Castle, P., Behrens, C., et al. (2013). Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, VPH testing, and genotyping for VPH 16/18: results from the ATHENA VPH study. *Am J Obstet Gynecol.* 208(184), e1-11.
31. Einstein, M., Smith, K., Davis, T., Schmeler, K., Ferris, D., Savage, A., Gray, J., Stoler, M., Wright, T., Ferenczy, A., Castle, P. (2014). Clinical evaluation of the cartridge-based GeneXpert human papillomavirus assay in women referred for colposcopy. *J Clin Microbiol.* 52(6), 2089-2095
32. Stoler, M., Wright, T., Sharma, A., et al. (2001) High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA VPH study. *Am J Clin Pathol.* 135(3), 468-475.
33. Castle, P., Stoler, M., Wright, T., Sharma, A., Wright, T., Behrens, C. (2011). Performance of carcinogenic human papillomavirus (VPH) testing and VPH16 or VPH18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol.* 12(9):880–890
34. Lloveras, B., Gomez, S., Alameda, F., Bellosillo, B., Mojal, S., Muset, M., Parra, M., Palomares, J., Serrano, S. (2013). HPV testing by cobas HPV Test in Population from Catalonia. *PLoS One.* 8(2), e58153.
35. Heideman, D., Hesselink, A., Berkhof, J., van Kemenade, F., Melchers, W., Fransen, N., Verkuijten, M., Meijer, C., Snijders, P. (2011). Clinical Validation of the cobas 4800 VPH Test for Cervical Screening Purposes. *J Clin Microbiol.* 49(11), 3983–3985.
36. Rao, A., Young, S., Erlich, H., Boyle, S., Krevolin, M., Sun, R., Apple, R., Behrens, C. (2013). Development and Characterization of the cobas Human Papillomavirus Test. *J Clin Microb* 51(5), 1478–1484
37. Geraets, D., Cuschieri, K., de Koning, M., van Doorn, L., Snijders, P., Meijer, C., Quint, W., Arbyn, M. (2014). Clinical Evaluation of a GP5+/6+ Based Luminex Assay Having Full High-Risk Human Papillomavirus Genotyping Capability and an Internal Control. *J Clin Microb.* 52(11), 3996–4002.
38. Geraets, D., Lenselink, C., Bekkers, R., van Doorn, L., Quint, W., Melchers, W. (2011). Universal human papillomavirus genotyping by the digene VPH Genotyping RH and LQ Tests. *J Clin Virol.* 50(4), 276-280.
39. Geraets, D., Heideman, D., de Koning, M., Snijders, P., van Alewijk, D., Meijer, C., van Doorn, L., Quint, W. (2009). High-throughput genotyping of high-risk HPV by the digene HPV Genotyping LQ Test using GP5+/6+-PCR and xMAP technology. *J Clin Virol.* 46(S3), 21-26.
40. Sun, K., Kim, J., Ki, C., Lee, N. (2014). Comparison of the digene HPV genotyping LQ test and the PANArray HPV genotyping chip for detection of high-risk or probable high-risk human papillomavirus genotypes. *Ann Lab Med.* 34(4), 279-285.
41. Godínez, J., Tous, S., Baixeras, N., Moreno, J., Alejo, M., Lejeune, M., Bravo, I., Bosch, X., de Sanjosé, S. (2011). Performance of the digene LQ, RH and PS VPHs genotyping systems on clinical samples and comparison with HC2 and PCR-based Linear Array. *Infectious Agents and Cancer* 23(6), e1-10
42. Kocjan, B., Seme, K., Poljak, M. (2011). Comparison of the Abbott Real Time High Risk VPH test and INNO-LiPA VPH Genotyping Extra test for the detection of human papillomaviruses in formalin-fixed, paraffinembedded cervical cancer specimens. *J Virol Methods.* 175, 117–119.

43. Poljak, M., Kocjan, B. (2010). Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Exp Rev Anti Infect Ther.* 8:1139-1162.
44. Huang, S., Tang, N., Mak, W., Erickson, B., Salituro, J., Li, Y., et al. (2009). Principles and analytical performance of Abbott RealTime High Risk VPH test. *J Clin Virol.* 45(Suppl 1), 13-7.
45. Poljak, M., Oštrbenk, A. (2013). The Abbott RealTime High Risk VPH test is a clinically validated human papillomavirus assay for triage in the referral population and use in primary cervical cancer screening in women 30 years and older: a review of validation studies. *Acta Dermatovenerologica.* 22, 43-47.
46. Hesselink, A., Meijer, C., Poljak, M., Berkhof, J., van Kemenade, F., van der Salm, M., Bogaarts, M., Snijders, P., Heideman, D. (2013). Clinical Validation of the Abbott RealTime High Risk VPH Assay According to the Guidelines for Human Papillomavirus DNA Test Requirements for Cervical Screening. *J Clin Microbiology.* 51(7), 2409–2410
47. Poljak, M., Kovanda, A., Kocjan, B., Seme, K., Jancar, N., Vrtacnik-Bokal, E. (2009). The Abbot RealTime High Risk HPV test: comparative evaluation of analytical specificity and clinical sensitivity for cervical carcinoma and CIN 3 lesions with the Hybrid Capture 2 HPV DNA test. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 18, 94- 103.
48. Herraes, E., Alvarez, M., Navarro, G., Esquivias, J., Alonso, S., Aneiros, J., Lacruz, C., Sanchez, M., Saenz, J., Chacon, J., Rodriguez, J. (2013). VPH Direct Flow CHIP: A new human papillomavirus genotyping method based on direct PCR from crude-cell extracts. *J Virol Met.* 193, 9-17.
49. Herraes, E., Preda, O., Alonso, S., Serrano, S., Olmo, A. (2013). Detection and Genotyping of Human Papillomavirus DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Specimens with the VPH Direct Flow CHIP System. *The Open Virology Journal.* 7, 91-95
50. Eklund, C., Forslund, O., Wallin, K., Dillner, J. (2014). Global Improvement in Genotyping of Human Papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study. *J Clin Microb.* 52(2), 449-459.
51. van Hamont, D., van Ham, M., Bakkers, J., Massuger, L., Melchers, W. (2006). Evaluation of the SPF10-Inno LiPA human papillomavirus (VPH) genotyping test and the roche linear array VPH genotyping test. *J Clin Microbiol.* 44, 3122–3129.
52. Ngou, J., Gilham, C., Omar, T., Goumbri, O., Doutre, S., Michelow, P., Kelly, H., Didelot, M., Chikandiwa, A., Sawadogo, B., Delany, S., Meda, N., Costes, V., Mayaud, P., Segondy, M. (2015). Comparison of analytical and clinical performances of the digene HC2 HPV DNA assay and the INNO-LiPA HPV genotyping assay for detecting high-risk HPV infection and cervical neoplasia among HIV-positive African women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 68(2), 162-168.
53. Didelot, M., Courgnaud, V., Nagot, N., Ouedraogo, A., Konate, I., Mayaud, P., Weiss, H., van de Perre, P., Segondy, M. (2005). Comparison of INNO-LiPA VPH Genotyping v2 with PCR product subcloning and sequencing for identification of genital human papillomavirus genotypes in African women. *J Virol Methods.* 135, 181–185
54. Kocjan, B., Maver, P., Hošnjak, L., Zidar, N., Odar, K., Gale, N., Poljak, M. (2012). Comparative evaluation of the Abbott RealTime High Risk VPH test and INNO-LiPA VPH Genotyping Extra test for detecting and identifying human papillomaviruses in archival tissue specimens of head and neck cancers. *Acta Dermatovenerologica.* 21, 73-75.
55. Schopp, B., Holz, B., Zago, M., Stubenrauch, F., Petry, K., Kjaer, S., et al. (2010). Evaluation of the performance of the novel PapilloCheck VPH genotyping test by comparison with two other genotyping systems and the HC2 test. *J Med Virol.* 82, 605–615.
56. van Doorn, L., Quint, W., Kleter, B., Molijn, A., Colau, B., Martin, M., Kravang, I., Torrez, N., Peyton, C., Wheeler, C. (2002). Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMV line blot assay and the SPF10 line probe assay. *J Clin Microbiol.* 40, 979–983.
57. Else, E., Swoyer, R., Zhang, Y., Taddeo, F., Bryan, J., Lawson, J., van Hyfte, I., Roberts, C. (2011). Comparison of Real-Time Multiplex Human Papillomavirus (VPH) PCR Assays with INNO-LiPA VPH Genotyping Extra Assay. *J Clin Microbiology.* 49 (5), 1907–1912
58. Ratnam, S., Coutlee, F., Fontaine, D., Bentley, J., Escott, N., Ghatage, P., Gadag, V., Holloway, G., Bartellas, E., Kum, N., Giede, C., Lear, A. (2011). Aptima VPH E6/E7 mRNA Test Is as Sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but More Specific at Detecting Cervical Precancer and Cancer. *J Clin Microbiol.* 49(2), 557-564
59. Dockter, J., Schroder, A., Eaton, B., Wang, A., Sikhamsay, N., Morales, L., Giachetti, C. (2009). Analytical characterization of the APTIMA VPH assay. *J Clin. Virol.* 45(Suppl 1), S39–S47.
60. Ciesielska, U., Nowinska, K., Podhorska, M., Dziegiel, P. (2012). The role of human papillomavirus in the malignant transformation of cervix epithelial cells and the importance of vaccination against this virus. *Adv Clin ExpMed.* 21(2), 235-244.
61. Wang, F., Lu, D., Wang, Y., Johnson, M., Johanning, G. (2002). Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papnicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer.* 94(8), 2199–2210.
62. Dockter, J., Schroder, A., Hill, C., Guzinski, L., Monsonego, J., Giachetti, C. (2009). Clinical performance of the APTIMA VPH Assay for the detection of high-risk VPH and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol.* 45(Suppl 1): 55-61.
63. Heideman, D., Hesselink, A., van Kemenade, F., Iftner, T., Berkhof, J., Topal, F., Agard, D., Meijer, C., Snijders, P. (2013). The APTIMA VPH assay fulfills the cross sectional clinical and reproducibility criteria of international guidelines for VPH test

requirements for cervical screening. *J Clin Microbiol.* 51(11), 3653-3657.


64. Monsonego, J., Hudgens, M., Zerat, L., Zerat, J., Syrjänen, K., Halfon, P., Ruiz, F., Smith, J. (2011). Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: The FASE study. *Intern J Cancer.* 129(3): 691-701.

65. Cox, T. (2003) A randomized trial on the management of Lg.Sil cytology interpretations ALTS Group. *Am J Obst Gin.* 188, 1393-1400.

66. ASCUS-LSIL Traige Study (ALTS) Group. (2003). Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of indetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.* 188(6), 1383-1392.

67. Arbyn, M., Buntinx, F., van Ranst, M., et al. (2004). Virologic versus cytologic triage of women with equivocal pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 96(4), 280-293.

68. Nobbenhuis, M., Walboomers, J., Helmerhorst, T., et al. (1999). Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: Aprospective study. *Lancet.* 354(9172), 20-25

Nobbenhuis, M., Meijer, C., van den Brule, A., et al. (2001). Addition of high-risk VPH testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer.* 84(6), 796-801. 

La importancia de las estrategias de mercadeo social en la captación de donantes de sangre

Roger Soto Palma¹

Resumen:

Los avances técnicos y científicos en el campo de la medicina transfusional serían de poca relevancia sin la participación del actor más importante del proceso transfusional: el donador de sangre. Los bancos de sangre deben realizar esfuerzos para atraer nuevos donadores y conservar los actuales. Los conceptos del mercadeo social pueden utilizarse para el estudio de lo que piensan las personas sobre la donación sanguínea, en cuanto a sus aspectos positivos y negativos. A partir de este conocimiento, se elaboran estrategias de mercadeo de la donación sanguínea, con el fin de aumentar el número de donaciones y mantener un abastecimiento adecuado de hemocomponentes. Al día de hoy, no se tiene conocimiento certero sobre las motivaciones de la población costarricense para donar sangre.

Palabras clave: Mercadeo social, donador de sangre, hemocomponente, bancos de sangre.

Abstract:

Technical and scientific advances in transfusion medicine field would be irrelevant without the participation of the most important character in the transfusion process: the blood donor. Blood banks have to make efforts to attract new blood donors and keep their present donors. Concepts from social marketing could be used for studying what people think about blood donation, including positive and negative aspects, and from this knowledge, construct new marketing strategies for blood donation, in order to raise donation numbers and keep a sufficient blood component supply. Currently, we don't have the knowledge concerning the motivations for the Costa Rican population to donate blood, or in the other hand, to what keeps possible blood donors away from the blood banks.

Key words: Social marketing, blood donor, blood component, blood banks.

Artículo recibido el 05/10/2015 / Aceptado para su publicación el 17/11/2015.

1. Banco de Sangre Hospital ClIMA, San José-Costa Rica

Correspondencia: rsoto@hospitalcima.com

La transfusión sanguínea, como estrategia terapéutica, ha sido empleada desde hace muchas décadas, aunque en la mayoría de los casos, los intentos incipientes resultaron poco exitosos. Fue hasta el descubrimiento de Karl Landsteiner, en 1901, del Sistema Sanguíneo ABO, que la transfusión sanguínea inició como ciencia, y que, poco a poco, con la consecución de nuevos descubrimientos como los otros sistemas de grupo sanguíneo, las estrategias de almacenamiento, la mejora en los procesos técnicos de análisis y la implementación finalmente de las pruebas serológicas para enfermedades infecciosas, que se consolida como terapia contra múltiples padecimientos y en muchos casos resulta determinante para preservar la vida del paciente.

Sin embargo, pese a los avances antes mencionados, la terapia transfusional resultaría imposible sin el elemento más importante en este proceso: el donador de sangre. El éxito de cualquier sistema de medicina transfusional, ya sea en centros de salud particulares como en las redes de bancos de sangre que abastecen a toda una región o país, depende de la capacidad de adquirir y mantener un suministro de hemocomponentes suficiente para satisfacer la demanda de la población que atiende, según la complejidad de las patologías que presenta dicha población. El suministro de hemocomponentes dependerá de la cantidad de personas que acuden a los centros de donación y que acceden a someterse a este procedimiento, pensando en que, tal como lo dicta la Organización Mundial de la Salud en sus recomendaciones, no obtendrá ningún beneficio económico o en especie por su donación. Es decir, la recompensa que alcanza el donador, no va más allá de la satisfacción por ayudar a otro ser humano.

Dado este escenario, es imprescindible para los centros de salud y para las redes de recolección de sangre, diseñar estrategias que les permitan atraer efectivamente a los posibles donadores, apelando a los valores de solidaridad y conciencia social de los individuos. Para tal cometido, es importante conocer las posibles variables que definen y estimulan su intención por realizar la donación, o por el contrario, causan el rechazo hacia la idea de donar sangre⁽¹⁾. A partir de este conocimiento, es posible elaborar estrategias dirigidas a la atracción de nuevos donadores de sangre y a mantener la fidelidad de los donadores actuales.

La promoción de la donación altruista no remunerada ha demostrado que aumenta la seguridad de las transfusiones sanguíneas por la menor probabilidad de transmisión de enfermedades contagiosas a través de

los hemocomponentes. La Organización Panamericana de la Salud, en su resolución CD4 R15/9, de 1999, expresó la necesidad de que los servicios de transfusión “tuviesen como base la donación altruista y repetida de sangre”. La donación por reposición demuestra dos debilidades importantes, por un lado “la alta prevalencia de patógenos de transmisión sanguínea, y por el otro, el cuestionamiento ético que surge de la obligatoriedad de este sistema”⁽²⁾.

Un estudio presentado por la OMS, en el 2005, muestra evidencia de más alta prevalencia de serología positiva para enfermedades transmitidas por productos sanguíneos en los países cuya donación de sangre está compuesta por menos de un 50% de donadores voluntarios comparado con los países que reportan más de 50% de donadores voluntarios y repetitivos⁽³⁾.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, para mantener un abastecimiento adecuado de hemocomponentes, es necesario que del 4 al 5% de la población de un país done sangre de forma regular⁽⁴⁾.

La Organización Mundial de la Salud designó, a partir del 2004, el día 14 de junio de cada año para la celebración del Día Mundial del Donador de Sangre Voluntario. La OMS alienta a sus países miembros para que desarrollen actividades destinadas a llamar a nuevos donadores de sangre. Las estrategias planteadas por la OMS presentan un especial énfasis en la realización de actividades educativas, el premiar en forma pública a los donadores de sangre regulares e involucrar a toda la comunidad, a los medios de comunicación y la empresa privada en la organización de actividades de estímulo de la donación de sangre. Sin embargo, es común el hecho, en numerosos países, que la oferta de donaciones de sangre no sea suficiente para satisfacer la demanda de transfusiones, por lo que se puede deducir que no se atraen suficientes personas a los bancos de sangre para hacer la donación. Esta situación representa un reto importante para los centros de recolección de sangre que deben encontrar los mecanismos para aumentar las donaciones, y que los individuos se sientan motivados para convertirse en donadores de sangre voluntarios y repetitivos⁽⁵⁾.

Las circunstancias que determinan que un individuo acuda a donar sangre o que por el contrario no lo haga, varían de persona a persona y pueden estar influenciadas por factores sociales y educativos. Las personas pueden manifestar miedo a las agujas, sensaciones desagradables al ver sangre, miedo a sentirse mareado o enfermo o considerar desagradables los centros de donación⁽⁴⁾.

El mercadeo social

Para los bancos de sangre, es valioso tener conocimientos sobre la forma de pensar o de comportarse de los donantes regulares y de los posibles donantes, para diseñar estrategias que permitan atraer esas personas a los centros de donación. Para el diseño de estas estrategias, es posible utilizar el conocimiento existente en el campo del mercadeo, aplicado al contexto social. El mercadeo social nació en los años setentas, como una ciencia dedicada a influenciar sobre el comportamiento humano y social⁽⁶⁾. Kotler y Zaltman acuñaron el término cuando se dieron cuenta que los mismos principios de mercadeo que eran usados para vender productos a los clientes, podían ser usados para vender ideas, actitudes y comportamientos⁽⁷⁾. El mercadeo social sigue una serie de acciones que deben ser planeadas en forma ordenada como la investigación del consumidor, análisis de mercado, segmento del mercado, determinación de los objetivos, escoger los canales de comunicación adecuados, identificación de tácticas y estrategias, e implementar estrategias a largo plazo. La aplicación de estos conceptos para la atracción de donadores de sangre implica, desde luego, el conocimiento de los individuos o grupo social al que será dirigido el programa de promoción, sabiendo de antemano que es un segmento de mercado dinámico y que el programa debe estar en constante evaluación. Es necesario un conocimiento exhaustivo del proceso de comportamiento de los donantes de sangre para establecer nuevas estrategias de comercialización que mejoren la eficacia y la eficiencia de los bancos de sangre⁽⁴⁾.

A inicio de los años noventa en Chile, se inició el proceso de centralización de la donación sanguínea, ya que a partir de un trabajo de diagnóstico, se pudo demostrar la alta tasa de donación por reposición que prevalecía, el bajo fraccionamiento de las unidades y la alta pérdida del inventario por vencimiento⁽²⁾. En una investigación realizada entre los estudiantes la Universidad de Talca en Chile, en el 2002, sobre lo que pensaba esta población respecto a la donación de sangre, se supo, entre otros resultados, que el deseo de ayudar a un familiar o un amigo es una fuerte motivación para donar (97.6%). Por otro lado, como factores que desmotivan la donación se encuentran la desconfianza en la esterilidad del material que se usa (73.4%), el rechazo al ambiente hospitalario (48%), el temor a contraer alguna enfermedad (94.6%) y el riesgo a quedar con anemia (73%).

En investigaciones realizadas en Estados Unidos y Canadá en diferentes grupos de población, se obtuvieron

resultados consistentes que mostraron que las personas de mayor nivel educativo y de ingresos económicos altos tenían más probabilidades de donar sangre⁽⁸⁾. Este resultado es consistente con lo obtenido por el programa Eurobarómetro en Europa, en el año 2002, en donde este tipo de personas se encontró con mayores probabilidades de donar. En este mismo estudio, se observó que el temor a contraer enfermedades como el HIV/sida es una de las principales razones para que la gente no done sangre⁽⁹⁾.

Según la investigación conducida por Nielsen en el 2004 para la Cruz Roja de Singapur, respecto a las motivaciones de los individuos para donar sangre, reveló entre otros motivos: ayudar a otras personas (47%), el deseo de salvar vidas (22%), es un buen acto (17%) y contribuir con la sociedad (16%)⁽⁷⁾. A partir de los resultados obtenidos y utilizando los conceptos teóricos del mercadeo social, se elaboró un programa de promoción de la donación que fue lanzado en el 2008 con el nombre de “Eres tu mi tipo”. El impacto de esta campaña fue medido a través del interés de las personas mostrado en Internet con el número de búsquedas hechas del tema en Google. Además del seguimiento en la red sobre los comentarios de la población, se observó un aumento del 5% en el número de nuevos donantes, 10% más de donantes regulares y el aumento de 20% de donadores jóvenes con edades entre 16 y 25 años, esto para el año 2008⁽⁷⁾.

Como seguimiento del trabajo de Nielsen, se desarrolló un programa de mercadeo para los bancos de sangre llamado “Blood Program Manager”, que integraba el conocimiento sobre la forma de pensar de los donadores así como los fundamentos del mercadeo social. Como parte de estos fundamentos, se encuentran la definición del producto, el precio, el lugar y la promoción. Para este programa, se definió como producto objeto de mercadeo al acto de donar sangre. En este sentido, se estudió lo que la población piensa del producto, más que hablar del producto en sí. Respecto al precio, que se define como lo que el cliente debe dar a cambio para obtener el producto, se buscó la estrategia de vender la donación de sangre como algo que los donadores deben hacer y pueden hacer. Como el lugar, tenemos a los centros de recolección de sangre, sitio donde el cliente puede encontrar el producto y que debe ofrecer la mayor satisfacción y comodidad para incentivar a los “clientes” a regresar. La promoción se refiere a todas las estrategias de divulgación de la información, para vender el producto, en este caso, difundir la idea de que la donación de sangre es un acto de benevolencia.

El mercadeo de la donación de sangre en Costa Rica

Los bancos de sangre en Costa Rica, tanto públicos como privados, desarrollan como parte de sus actividades diferentes estrategias para atraer donadores de sangre; para esto emplean material impreso, campañas en localidades y centros de trabajo, y comunicaciones en los medios de prensa y las redes sociales. Sin embargo, tales actividades parecen ser insuficientes, ya que el abastecimiento de sangre en los hospitales parece no llenar las necesidades y esto es debido a la limitada cantidad de donadores que se reciben. Según el documento de la Organización Panamericana de la Salud, *Estándares de Trabajo para Servicios de Sangre* de 2011, la tasa de donación reportada para Costa Rica en el año 2009 es de 129.6 por cada 100 000 habitantes⁽¹⁰⁾. Esto indica que solo el 1.3% de la población dona sangre, número que está por debajo del 4% recomendado por la OMS.

No tenemos conocimiento veraz sobre los factores que motivan a la población costarricense para donar sangre, o más importante aún, las razones por las cuales una proporción importante de la población no dona sangre. Las razones pueden ser similares a las observadas en otros países, en que el nivel educativo, factores socioeconómicos, la distancia que debe recorrerse para llegar a los centros de donación y los temores y mitos que rodean a la donación son los factores contra los cuales deben luchar los trabajadores de los bancos de sangre. Un factor difícil de determinar, pero con una influencia histórica importante en otros países, es la prevalencia de conflictos bélicos. Debido a la atención de víctimas de guerra, en muchos lugares del mundo, la donación de sangre es manejada por la Cruz Roja y la población tiene un sentido más arraigado sobre la importancia de la donación de sangre. Este factor ha estado ausente en nuestro país por muchas años (afortunadamente).

La experiencia recogida en otros países sobre el impacto del mercadeo social en la recolección de sangre debe ser utilizada en Costa Rica, y deben conducirse investigaciones sociales que nos permitan conocer la percepción de nuestra población acerca la donación de sangre.

Referencias

1. Pichardo, M. Malagón, A. (2011). Estrategias en el Reclutamiento de Donantes Voluntarios en el Banco Central de Sangre Centro Médico Nacional “La Raza”

del Instituto Mexicano de Seguridad Social. Asociación Mexicana de Medicina Transfusional A.C. Vol 4. Nº2, Mayo-Agosto, 2011. Pag 105-110.

2. Vásquez M, Ibarra P, Maldonado M. (2007). *Conocimientos y actitudes hacia la donación de sangre en una población universitaria de Chile*. Rev Panam Salud Pública. 2007; 22(5):323–328.

3. Zamorano, F. (2007). Donación Voluntaria de Sangre: Análisis de Estrategias de Articulación entre los Servicios de Salud y la Sociedad. Documento Técnico Área Temática: Políticas de Salud Pública y Control de Riesgos. Madrid, España.

4. Aldamiz-Echeverria, C. Aguirre-Garcia, M. (2014). Modelo de comportamiento de los Donantes de Sangre y estrategias de marketing para retenerles y atraerles. Revista Latino-americana de Enfermagem, País Basco, España. Mayo-jun. 2014; 22 (3):467-75

5. Masser, B. White, K. Hyde, M. Terry, D. (2008). The Psychology of Blood Donation: Current Research and Future Directions. Transfusion Medicine Reviews Vol. 22, Nº 3, pp. 215-233. Queensland, Australia

6. Gilaninia, S. Taleghani, M. Amenien, M. (2013). Effective Factors on Willingness of Blood Donors to Donate Blood again in Rasht City. Singaporean Journal of Business Economics and Management Studies. Vol 2. Nº 2. Singapore.

7. Tan. C. (2009). Donor Management: social marketing, maintenance and trust. ISBT Science Series. Vol. 4, pp. 276-280. Holanda

8. Saberton, P. Páez, A. Newbold, K. Heddle, N. (2009). Geographical variations in the correlates of blood donor turnout rates: An Investigation of Canadian metropolitan areas. International Journal of Health Geographics. Vol. 8. Nº56. Ontario, Canada.

9. Juwaheer, T. Vencatachellum, I. Pudaruth, S. Said, M. (2012). Social Marketing Efforts to Boost Blood Donor Rate in Developing Countries, A Case Study of Mauritius. International Journal of Multidisciplinary Research. Vol. 2. Nº 6. Islas Mauricio.

10. Organización Panamericana de la Salud. (2011). *Estándares de Trabajo para Servicios de Sangre*. Tercera Edición. OPS. Washington D.C., EEUU. ④

Caso clínico

Endocarditis causada por *Granulicatella adiacens* en paciente adulto

Óscar Roberto Quesada- Pacheco^I, Sergio Calderón- Bejarano^{II}

Resumen:

Se reporta el primer caso clínico confirmado de una endocarditis infecciosa causada por la bacteria *Granulicatella adiacens*, en el Hospital San Rafael de Alajuela, en un paciente masculino de 44 años de edad que consulta por cuadros de fiebre recurrentes sin respuesta a los antibióticos prescritos. A través de un ecocardiograma transesofágico, se documentan dos vegetaciones en la arteria coronaria derecha. Los hemocultivos fueron positivos a las catorce horas de incubación y se obtuvo identificación bioquímica de la bacteria *Granulicatella adiacens*. El paciente es intervenido quirúrgicamente para realizar un reemplazo valvular aórtico y mitral mecánico. Posteriormente, el paciente cursa con un choque cardiogénico de origen obstructivo con compromiso de la válvula mitral, lo que finalmente ocasiona su fallecimiento.

Palabras clave: *Streptococcus* de variante nutricional (SVN), endocarditis infecciosa, reemplazo valvular aórtico.

Abstract:

The first confirmed case report of infective endocarditis caused by the bacterium *Granulicatella adiacens* in the Hospital San Rafael de Alajuela is reported in a 44 year old male who consulted for recurrent fever episodes that did not respond to antibiotic treatment. By the use of a transesophageal echocardiogram two vegetations were found in the right coronary artery. Blood cultures were performed turning out positive after fourteen hours of incubation. Successively, the identification of *Granulicatella adiacens* was obtained by biochemical testing. The patient was surgically intervened by performing a mechanical aortic and mitral valve replacement. Later on, the patient suffered from a cardiogenic shock of obstructive origin which compromised the mitral valve and consequently caused his decease.

Key words: Nutritionally variant streptococci (NVS), infective endocarditis, aortic valve replacement.

Introducción

Con el avance de la ciencia y técnicas de laboratorio, se ha logrado identificar nuevos microorganismos responsables de patologías infecciosas que antes eran clasificados en grupos de microorganismos tradicionales. Según Tleyjeh y colaboradores⁽¹⁾, en la endocarditis infecciosa, el 44% de los casos es frecuente el aislamiento de *Streptococcus viridans*. Muchos casos quedan sin identificación por

el laboratorio, y son mal llamados “endocarditis con cultivos negativos”^(2,3)

Frenkel y Hirsch⁽⁴⁾, en 1961, describen por primera vez un caso de estreptococos no hemolíticos que crecían alrededor de otras bacterias en muestras de pacientes con endocarditis bacterianas. Posteriormente, estas bacterias fueron descritas como *Streptococcus* de variante nutricional (SVN), las cuales son responsables de aproximadamente el 5 a 6% de los casos de endocarditis bacterianas.⁽⁵⁾ Estos microorganismos crecen en presencia de L-cisteína o piridoxal. En los hemocultivos y en agar chocolate, tienen muy buen crecimiento, ya que

Artículo recibido el 09/11/2015 / Aceptado para su publicación el 12/12/2015.

I. Laboratorio Clínico, Hospital San Rafael de Alajuela.

II. Servicio de Medicina, Hospital San Rafael de Alajuela.

Correspondencia: oquesadap@ccss.sa.cr

los eritrocitos lisados proveen suficiente piridoxal para el desarrollo.

Granulicatella es parte de la microbiota normal de la mucosa oral y urogenital, ⁽⁵⁾ está presente en la placa dental y puede llegar a causar bacteriemia en casos de patología gingival. ⁽⁶⁾ Dentro del grupo de los SVN, el género *Granulicatella* ha sido el más descrito en la literatura médica, y es la especie *G. adiacens* el microorganismo más frecuentemente aislado. ⁽⁷⁾

Granulicatella spp. es un coco gram positivo, no móvil, no formador de esporas, catalasa y oxidasa negativas. Crece como colonias satélite adyacentes a *Staphylococcus epidermidis* en agar sangre. Su identificación y diferenciación usualmente se realiza con pruebas bioquímicas o por confirmación molecular.

Se describe a continuación el primer caso clínico descrito en el Hospital San Rafael de Alajuela de una endocarditis causada por la bacteria *Granulicatella adiacens*.

Caso clínico

Paciente masculino de 44 años de edad, con antecedentes de etilismo crónico y tabaquismo de larga data (consumo de un paquete diario), presenta antecedentes de hipertensión arterial que fue tratada con irbesartán más hidroclorotiazida; presenta, además, obesidad grado I y no refiere historia de procedimiento dental reciente. El paciente refiere haber tenido cuadros febriles no cuantificados seis meses previos a su hospitalización, lo cual lo llevó a consultar al médico de la empresa donde laboraba. Se le diagnosticó faringoamigdalitis aguda, y fue tratado con antibióticos por dos meses, pero al concluir el tratamiento los cuadros febriles reaparecían.

Ante la persistencia del cuadro, acude a la medicina privada donde es abordado aparentemente como una infección del tracto urinario, por lo cual vuelve a recibir un nuevo esquema de antibiótico, sin mostrar mejoría.

Es referido al Hospital San Rafael de Alajuela por el médico privado con el fin de ser estudiado por fiebre de origen desconocido. Ingresa al Salón de Medicina de Hombres con una presión arterial de 125/65 mm Hg, frecuencia cardíaca 112 latidos por minuto y una temperatura corporal de 36°C. Al examen físico se encuentra soplo sistólico grado II sin tercer ni cuarto ruido.

Se le realizó ecocardiograma transesofágico, el cual reveló la presencia del ventrículo izquierdo dilatado, con factor de eyección del 48%, insuficiencia aórtica severa,

insuficiencia mitral severa, y se documentó, además, dos vegetaciones en la arteria coronaria derecha de 8x1.2 mm adyacente al anillo y en la válvula mitral anterior región comisural de 18x9 mm. Se inicia tratamiento con 2 gramos de vancomicina, por endocarditis infecciosa y se trasladada al Hospital México donde es intervenido quirúrgicamente y se le practica un reemplazo valvular aórtico y mitral mecánico. Posteriormente, es trasladado al Servicio de Cirugía de Tórax y recibe tratamiento antibiótico con cefotaxime por 10 días y penicilina sódica por 14 días. En ese tiempo presenta una candidemia por *Candida albicans*, para la cual recibe tratamiento. Continúa evolucionando aparentemente estable y a los veintidós días de su cirugía cursa con un choque cardiogénico de origen obstructivo con compromiso de la válvula mitral, lo que ocasiona su fallecimiento.

Hallazgos de laboratorio

A su ingreso al Hospital San Rafael de Alajuela, se toman dos frascos para hemocultivos y se envían al laboratorio clínico para su estudio, los cuales son incubados en el equipo Bact/Alert 3D (bioMérieux, Francia). A las catorce horas de incubación el equipo indica crecimiento bacteriano. Se realiza un frotis de ambas botellas y se colorea con la técnica de Gram: se observan cocos gram positivos en cadenas (figura 1).

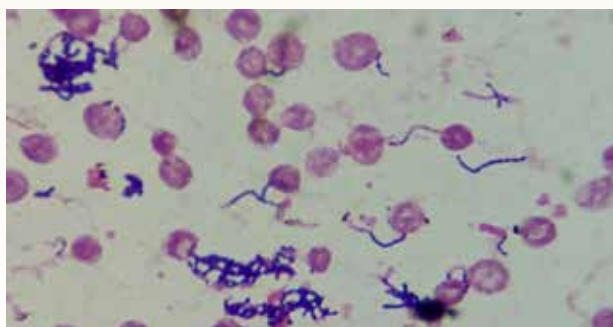


Figura 1. Tinción de Gram de hemocultivo positivo.

Se hacen repiques en agar chocolate, donde se obtienen colonias de muy pequeño tamaño color gris verdoso, catalasa y oxidasa negativas. El aislamiento fue identificado como *Granulicatella adiacens* en el equipo Vitek 2 – compact (bioMérieux, Francia).

En el Hospital México se toman nuevamente muestras para hemocultivos, de las cuales se aíslan cocos en cadena gram positivo. Se realiza la prueba de satelitismo empleando cepas de *Staphylococcus aureus*, esta resulta positiva y se identifica nuevamente la bacteria como

Granulicatella adiacens, en el equipo Vitek 2 – compact (bioMérieux, Francia).

Discusión

La bacteria *Granulicatella adiacens* pertenece al grupo de los *Streptococcus* de Variante Nutricional (SVN); son cocos gram positivos inmóviles, catalasa negativa, los cuales se desarrollan en cadenas en medios líquidos en condiciones nutricionalmente permisivas. Por su aspecto microscópico y fenotípico, estas bacterias pueden ser confundidas con otros géneros más comunes como los *Streptococcus* y *Enterococcus*, lo que conduce a un diagnóstico erróneo del microorganismo causante de una patología cardíaca.

En 1999, Collins y Lawson⁽⁸⁾ proponen la creación del género *Granulicatella*, el cual incluye las especies *G. adiacens*, *G. balaenopterae* y *G. elegans*.

Frecuentemente, a los caldos de hemocultivos se le adicionan nutrientes, los cuales actúan en forma sinérgica con la sangre del paciente, permitiendo el desarrollo de las SVN en los hemocultivos.


En la revisión realizada por Stein y Nelson⁽⁹⁾ de 30 casos clínicos de endocarditis producidas por SVN, publicados hasta 1987, los pacientes presentaban una enfermedad subaguda, de curso lento e indolente y un 90% de los pacientes eran portadores de alguna enfermedad cardíaca de base. Cheng-Hsin y Ron-Bin,⁽¹⁰⁾ en su estudio, reportan cuatro casos de endocarditis causada por *Granulicatella adiacens* y mencionan la importancia de una intervención quirúrgica rápida para evitar el deterioro de las válvulas cardíacas. Reyes y Barthel han vinculado el género *Granulicatella* spp. como responsable de diversos cuadros clínicos que difieren de su presentación habitual.⁽¹¹⁾ Shailaja y colaboradores reportan un caso similar utilizando la misma metodología que describimos en este caso.⁽¹²⁾

Aunque los aislamientos de SVN representan un pequeño porcentaje de los aislamientos de hemocultivos positivos, es importante su identificación para el diagnóstico correcto del agente causal de la enfermedad.

Agradecimiento.

Agradecemos la colaboración de la Dra. Paulina González del Laboratorio Clínico del Hospital México por colaborar en la identificación de este microorganismo.

Bibliografía

1. Tleyjeh I, Steckelberg J M, Murad H S, Anavekar N S, Ghomrawi H M, Mirzoyev Z, et al. (2005). Temporal trends in infective endocarditis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *JAMA*, 293, 3022-8.
2. Chang H, Lu CH, Hsueh P. (2002). Endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* in children. *Pediatr Infect Dis J*, 21, 697-700.
3. Hoen B. (2002). Special issues in the management of infective endocarditis caused by Gram-positive cocci. *Infect Dis Clin North Am*, 16,2, 437-52.
4. Frenkel A, Hirsch W. (1961). Spontaneous development of L forms of streptococci requiring secretions of other bacteria or sulphhydryl compounds for normal growth. *Nature*, 191, 728-30.
5. Rouff K L. Nutritionally variant streptococci. (1991). *Clin Microbiol Rev*, 4, 184-90.
6. Ohara-Nemoto Y, Kishi K, Satho M, Tajika S, Sasaki M, Nomioka A, et al. (2005). Infective endocarditis caused by *Granulicatella elegans* originating in the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43, 1405-7.
7. Christensen J J, Facklam R R. (2001). *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 39, 3520-3.
8. Collins M, Lawson P. (2000). The genus *Abiotrophia* is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50,365-9.
9. Stein D S, Nelson K E. (1987). Endocarditis due to nutritionally variant streptococci: therapeutic dilemma. *Rev Infect Dis*, 9, 908-16.
10. Lin, Cheng-Hsin, Hsu, Ron-Bin. (2007). Infective endocarditis caused by Nutritionally Variant Streptococci. *American Journal of Medical Sciences*, 334, 235-239.
11. Reyes C, Barthel E. (2015). *Granulicatella* spp. Rev. Chilena Infectología; 32 (3): 359 – 360.
12. Shailaja T.S, Sathiavathy K.A, Govindan Unni. (2013) Infective endocarditis by *Granulicatella adiacens*. *Indian Heart Journal*: 65 (4): 447-449. 

Carta al editor

Descubra su relación con los microbios

Rafael Jiménez-Bonilla*

Con este título, la distinguida viróloga Libia Herrero Uribe, PhD, escribió un libro para todo tipo de lector y quisiera hacer algunos comentarios al respecto.

Deseo empezar diciendo que me encantan los científicos que escriben obras para ser entendidas por personas que no dominan las ciencias. Su labor en la sociedad ha sido y es uno de los trabajos más importantes para que las comunidades puedan desarrollarse. Sin ellos, la vida de los seres humanos estaría todavía en tiempo de las cavernas y como ejemplo podríamos citar miles de descubrimientos.

Los científicos son las personas que más escriben en la vida. Ellos saben muy bien que lo que no se escribe en las editoriales respectivas no llega a trascender. Es más, los hombres de ciencia son conocidos precisamente por sus escritos. Si no lo hicieran se mantendrían siendo unos desconocidos en el mundo. Las personas que dominan un tema a profundidad, cuando escriben obras para el vulgo (y con vulgo quiero abarcar a todos aquellos que no dominamos determinados campos de la ciencia), ayudan grandemente a entender lo intrincada que es la vida en nuestro planeta.

En segundo lugar, quiero manifestar que a los hombres prehistóricos, posiblemente desde que tuvieron uso de razón, debió haberlos asombrado el universo o al menos lo que cada día y noche admiraban en el cielo. En aquellas comunidades nómadas y sin más luz artificial que el fuego, observar una puesta de sol, un eclipse, un arcoíris, las fases de la luna o la Vía Láctea con sus sombras, clasificadas por ellos como grandes agujeros negros y que hasta les dieron nombres según su forma, debió haber sido impresionante.

En la actualidad, los seres humanos hemos perdido la capacidad de asombro, sin embargo, aún existen muchas personas que nunca han visto un eclipse solar completo, ni han admirado la Vía Láctea; tampoco estrellas fugaces ni auroras boreales. Encerrados bajo techos de concreto o de láminas de zinc, con iluminación y temperatura reguladas, es imposible observar lo que ocurre en el firmamento.

Al mismo tiempo que existe ese mundo externo y lejano del cual el planeta Tierra es apenas un pequeño punto, también se encuentra un ambiente microscópico en constante efervescencia, que tardó muchísimo más tiempo en ser descubierto por los hombres. De manera increíble, ese mundo comprende el 80% de la masa viva de nuestro planeta y lo más llamativo es que esos microorganismos vivieron solos (sin la presencia de otras especies) durante dos billones de años.

El mundo microscópico, al igual que la observación del universo, nos coloca en dos hábitats muy particulares, porque tanto el espacial como el microscópico forman una simbiosis para que los seres humanos podamos sobrevivir en nuestro planeta azul; llamado así por las fotos que hemos descubierto al ser tomadas desde el espacio, pero que para nosotros debería ser el planeta verde, porque corrientemente cohabitamos con las plantas gracias a la fotosíntesis microbiana.

Si el sol no calentara todos los días, la vida en el planeta sería inhóspita y posiblemente no podría llevarse a cabo. De igual manera, si los microbios no actuaran todo el tiempo sobre las condiciones físicas y químicas de la superficie de la Tierra; la atmósfera y los océanos serían muy distintos y no podríamos vivir. Los organismos celulares o más pequeños realizan reacciones químicas

(*) rafael_jimenezb@yahoo.com.mx

a favor de nosotros y de muchas otras especies animales, beneficiándose también de las nuestras.

La doctora Herrero explica en su libro cómo nuestro planeta es en realidad un organismo gigantesco en el que coexisten los seres humanos junto a los microbios, y con palabras muy sencillas nos da distintas explicaciones de la manera en que se producen las enfermedades que afectan o han afectado a la humanidad a lo largo de tantos siglos.

En una época en la que las computadoras han invadido todos los ámbitos de la rutina de los seres humanos, donde el conocimiento se ha descentralizado de las universidades al ámbito personal, el hecho de que los científicos escriban libros a nivel popular toma cada día más relevancia. Únicamente de esta manera, el conocimiento especializado se hará más comprensible para las grandes masas poblacionales que no son duchas en esos temas.

El libro *Descubra su relación con los microbios* es sencillamente estremecedor, no solo para los que dominamos alguna parte de las ciencias, sino para aquellos que ignoran las nuevas palabras usadas por los científicos, como priones, epigenética, hantavirus y muchas otras; todo lo cual lo aclara la autora en el texto con gran calidad.

Los aspectos del libro que cabe mencionar son muchos, sin embargo, voy a tratar de incluir algunos pocos.

Ya expliqué que la doctora Herrero demuestra que el planeta Tierra es un superorganismo capaz de autorregularse para que la vida continúe manteniéndose en el sitio donde todos los humanos tenemos nuestros amores e ilusiones, pero lo curioso es darnos cuenta—como ella lo hace admirablemente— que la vida no significa solo la de nosotros, sino la de todos aquellos seres presentes en el mundo invisible, que constantemente interactúan y modifican el ambiente para que los mamíferos y demás criaturas que habitamos este planeta consigamos seguir viviendo.

A este respecto, la doctora Herrero explica cómo los microorganismos que producen enfermedades son en realidad un porcentaje muy pequeño de los millones de seres que conviven en nuestro cuerpo. Lo mismo ocurre con el firmamento, donde la eventual causa de muerte de nuestro planeta, como fue la de los dinosaurios, podría deberse a la caída de un meteorito gigante, que representa apenas una ínfima cantidad de los astros que pueblan el universo.

Libia expone de manera muy simple lo que son los hospederos, y cómo los virus de la influenza habitan muchas especies de animales. También señala que esos virus, además, presentan gran variación antigénica, lo que hace que muestren cantidad de mutaciones, que nos obligan a tener que vacunarnos cada año contra la gripe.

Así como la caída sobre la Tierra de un meteorito gigantesco es una posibilidad muy remota, pero que ya se presentó, la mutación de los virus de la influenza podría, eventualmente, acabar con gran parte de la población humana, lo que también ya ocurrió a principios del siglo XX con la pandemia de gripe española.

Me gustan mucho los datos que la doctora Herrero recaba:

1. En el agua de mar hay entre medio millón y un millón de bacterias por mililitro.
2. Las heces de un humano excretan más de 100 millones de bacterias por día.
3. El virus de la viruela podía mantenerse hasta por seis meses en la escama de la piel de una persona afectada.
4. Las bacterias se duplican cada 20 minutos, y en las células, los virus producen de 10 000 a 1000 000 partículas infecciosas por célula cada ocho horas.
5. El 73% de las enfermedades emergentes son zoonosis.

Estos datos son apabullantes, y para terminar, deseo mencionar que resulta difícil para una viróloga irrumpir en el campo literario y escribir un ensayo a nivel popular.

Para redactar un ensayo se requieren dos cualidades: dominio del tema y manejo del idioma. La escritura científica es muy diferente a la literaria, y para mencionar lo distintas que son ambos tipos de redacciones, citaré como ejemplo la principal diferencia que existe entre poesía y ciencia: la primera nunca miente (porque todo lo que se dice en ella es verdad: las hormigas hablan, los árboles caminan, etc.); en cambio, la ciencia no puede mentir, al menos jamás debería hacerlo, porque una de las características de los científicos es su gran responsabilidad y la publicación de solo datos verídicos. Por eso, un libro escrito por una científica simplemente resulta apasionante y muy informativo.

Felicito efusivamente a la doctora Libia Herrero, y la animo a que en el futuro nos regale más obras de este tipo. Estoy seguro de que serán el deleite de sus lectores. ☺



Instrucciones para los autores

Actualizadas a diciembre de 2015

La Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica (RCMQCCR) se publica trimestralmente. Esta se dedica a la divulgación de trabajos científicos en las diferentes disciplinas de la microbiología, inmunología, parasitología y análisis clínicos en humanos y en animales, así como de las áreas de microbiología de aguas, industrial y de alimentos.

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

Solo se aceptarán para su consideración trabajos originales, en español o en inglés, que serán clasificados en categorías de acuerdo con su naturaleza como trabajos de investigación, casos clínicos, aspectos legales de la profesión, artículos de educación continua, cartas al editor y artículos especiales. Las revisiones bibliográficas serán solicitadas al autor por el editor de la revista. Las cartas al editor se publicarán de acuerdo con el criterio del editor jefe.

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

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

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

Todos los artículos deben ser presentados de forma digital en formato de Word.doc o .docx, letra Times New Roman

12, interlineado a 2 líneas, justificado, a la dirección electrónica revistacmqc@gmail.com. Las cartas al editor no deben ser mayores de dos páginas. Las tablas, cuadros y fotografías deben presentarse correctamente identificados. Los artículos de investigación deben presentarse respetando la siguiente estructura: introducción, material y métodos, resultados y discusión. Los artículos especiales, casos clínicos y otros, pueden adaptarse a otros formatos que serán aprobados por el Comité Editorial. Todos los artículos deben ir precedidos por un resumen en español e inglés de no más de 250 palabras y las palabras clave.

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

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

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

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

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



¡Feliz 2016!

Wiener lab Group les desea
buenos augurios, salud y trabajo.



Haciendo
posible
EL FUTURO



IN VITRO DIAGNOSTICS CENTROAMERICANA S.A.

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



www.wiener-lab.co.cr
wiener.lab@racsa.co.cr