

- REVISTA DE -

# MEDICINA DE LABORATORIO

ISSN (versión papel): 2660-7484

ISSN (versión electrónica): 2660-7638

Vol. 2 Núm. 2 | mayo-agosto 2021 | Págs. 47-88

## Editorial

- Especificaciones de la calidad. *¿Quo vadis?* ..... 47  
*J. M. Morancho Zaragoza, J. Batista Castellví, Á. Salas García, E. Prada de Medio, M. E. Redín Sarasola, F. Ramón Bauzá*

## Originales

- Estudio comparativo de cinco técnicas serológicas comerciales para la determinación de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 y su interpretación ..... 50  
*N. González Pereira, J. Garralda Fernández, A.a Castañeda de la Mata, M. Pacheco Delgado, S. Prieto Menchero*

- Priorización de variantes de exoma mediante un sistema automático que emplea términos HPO ..... 59  
*J. M. Lezana-Rosales, D. Tuñón-Le Poutel, J. F. Quesada-Espinosa, E. Soengas-Gonda, A. Arteche-López, C. Palma-Milla, I. Gómez-Manjón, M. I. Álvarez-Mora, R. Pérez-de la Fuente, M. T. Sánchez-Calvin, M. J. Gómez-Rodríguez, M. Moreno García*

## Evaluación técnica/Equipos

- Estudio de la interferencia producida por la hemólisis en la medición de distintos constituyentes bioquímicos en el analizador Atellica® Solution (Siemens Healthineers) ..... 70  
*Y. Fernández Verduras, M. J. Ruiz Álvarez, M. Barrionuevo González, B. Beteré Cubillo, A. Antón Cornejo, J. M. Gasalla Herráiz*

## Casos Clínicos

- Estudio genético familiar de resistencia a hormonas tiroideas ..... 77  
*R. Cabra Rodríguez, M. José Ruiz Márquez, G. María Varo Sánchez*

- Leucemia de células plasmáticas secundaria ..... 80  
*A. Vilchez Rodríguez, R. Lluch García, N. Bru Orobal*

- Hallazgo inesperado de carcinoma de pulmón en líquido pleural enmascarado por sospecha de neumonía por SARS-CoV-2 ..... 83  
*M. Palomino Alonso, F. Calvo Boyero, M. Aramendi Ramos*

## Imagen/Infografía

- Diagnóstico: quíliuria ..... 87  
*A. Carrasco Mora, L. M. Rivas Chacón, V. Benito Zamorano*

©AEBM-ML (2021)  
©AEFA (2021)  
©Arán Ediciones, S.L. (2021)

La *Revista de Medicina de Laboratorio* es una revista open access, lo que quiere decir que todo su contenido es accesible libremente sin cargo para el usuario individual y sin fines comerciales. Los usuarios individuales están autorizados a leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar a los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor, de acuerdo con la definición BOAI (Budapest Open Access Initiative) de open access. La reutilización de los trabajos puede hacerse siempre y cuando el trabajo no se altere en su integridad y sus autores sean adecuadamente referenciados o citados en sucesivos usos, y sin derecho a la producción de obras derivadas

Esta revista se publica bajo la licencia CC BY-NC-SA (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)



ISSN electrónico: 2660-7638  
ISSN papel: 2660-7484  
Publicación cuatrimestral  
Depósito legal: M-14367-2021

#### Edición y administración:



Arán Ediciones, S.L.  
Castelló, 128, 1.º  
Tel. +34 91 745 17 29  
28006 Madrid (España)

#### Suscripciones:

##### Tarifa de suscripción anual (España):

Profesionales 95 € + IVA - Instituciones 120 € + IVA

##### Tarifa de suscripción anual (internacional):

250 € + IVA

Aran Ediciones, S.L.  
Castelló, 128, 1.º - 28006 Madrid (España) - Teléfono: +34 91 745 17 29  
Correo electrónico: [suscripc@grupoaran.com](mailto:suscripc@grupoaran.com)

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright.

La editorial declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos que aparezcan en esta publicación.

[www.revistamedicinadelaboratorio.es](http://www.revistamedicinadelaboratorio.es)



## Equipo Directivo

### DIRECTOR

Dr. Fernando Bandrés Moya  
(Universidad Complutense de Madrid, Madrid)  
bandres@ucm.es

### EDITORA JEFE

Dra. M.<sup>a</sup> del Rosario Caro Narros  
(Complejo Asistencial de Segovia, Segovia)  
rcaro@saludcastillayleon.es

### EDITORES

Dr. Vicente Morales Elipe  
(Hospital General Universitario de Ciudad Real,  
Ciudad Real)  
vmelipe@sescam.jccm.es

Dr. Enrique Rodríguez Borja  
(Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia)  
enrobor@gmail.com

## Editores Asociados

Díaz-Flores Estévez, Felicitas  
(Complejo Hospitalario Universitario de Canarias. San  
Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife)  
fdiazflo@ull.edu.es/fdiaest@gobiernodecanarias.org

Gil Ruiz, María Teresa  
(Hospital General Nuestra Señora del Prado  
de Talavera de la Reina, Toledo)  
tgruiz@sescam.jccm.es

Kabaroglu, Ceyda  
(Department of Clinical Biochemistry. School of  
Medicine. Ege University. Izmir, Turkey)  
ckabaroglu@gmail.com

Laserna Mendieta, Emilio  
(Unidad de Investigación del Hospital General  
de Tomelloso, Ciudad Real. Instituto  
de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario  
de La Princesa, Madrid)  
ejlaserna@gmail.com

López Gómez, Juan Manuel  
(Hospital Univ. de Badajoz, Badajoz)  
lopezhospi@gmail.com

Martínez Triguero, María Luisa  
(Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia)  
martinez\_mlutri@gva.es

Pérez García, Lourdes  
Laboratorio de Análisis Clínicos.  
Complejo Asistencial de Palencia. Palencia

Pineda Tenor, Daniel  
(Hospital de Antequera. Área de Gestión Sanitaria  
Norte de Málaga)  
dpinedatenor@gmail.com

Villalta Robles, Victoria  
(Complejo Asistencial de Segovia, Segovia)  
villaltarobles@gmail.com

## Consejo Asesor

Rui Manuel Amaro Pinto  
Profesor en la Facultad de Farmacia.  
Universidad de Lisboa. Portugal

Adela Castañeda de la Mata  
Especialista en Hematología y Hemoterapia.  
Hospital Universitario de Fuenlabrada.  
Fuenlabrada, Madrid. España

Gilbert C. Faure  
MD, PhD. Laboratoire d'Immunologie.  
Faculté de Médecine.  
Université Lorraine and CHU Nancy. France

Jesús Miguel García-Foncillas  
Director, Translational Oncology Division.  
Research Institute FJD-UAM. Madrid, España

Montserrat González Estechea  
Jefe de Servicio de Bioquímica Clínica.  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón.  
Madrid, España

Juan Miguel Guerrero Montávez  
Jefe de Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital  
Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. Catedrático  
vinculado a la Universidad de Sevilla. Sevilla, España

Gustav Kovac  
Slovak Medical University: Institute of Chemistry,  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.  
Bratislava, Slovak Republic

Vesna Kusec  
MD PhD. University Hospital Centre Zagreb. Clinical  
Institute of Laboratory Diagnosis Zagreb. Croatia

Juan Ernesto del Llano-Señaris  
Presidente de la Fundación Gaspar Casal.  
Madrid, España

Franklin Marques  
Profesor de la Facultad de Farmacia. Universidad  
de Porto. Laboratorio de Bioquímica. Porto, Portugal

Luis Nogueira Martins  
Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa.  
Lisboa, Portugal

Leverton Ortiz Cáceres  
Jefe del Laboratorio Clínico. Hospital de la Serena.  
Chile

Wytze Pier Oosterhuis  
Zuyderland Medical Center. Heerlen/Sittard.  
The Netherlands

M.<sup>a</sup> del Carmen Pasquel  
Directora General Revista DIV/RIA/IFCC.  
Asesora Regional de la Fundación Wiener. Ecuador

Patrick Twomey  
Professor. Consultant Chemical Pathologist.  
Head of Department/Laboratory Director for Clinical  
Chemistry. St. Vincent's University Hospital.  
Dublin, Ireland

Roberto Verna  
MD PhD. Professor Faculty of Medicine.  
Sapienza University of Rome. President of World  
Association of Societies of Pathology and  
Laboratory Medicine. President of World Pathology  
Foundation. Rome, Italy



Santiago Prieto Menchero

**Presidente de la Asociación Española  
de Biopatología Médica-Medicina de Laboratorio (AEBM-ML)**



Antonio Rider Pérez

**Presidente de la Asociación Española  
del Laboratorio Clínico**





# - REVISTA DE - MEDICINA DE LABORATORIO

www.revistamedicinadelaboratorio.es

Vol. 2 Núm. 2 | mayo-agosto 2021

## Sumario

### Editorial

Especificaciones de la calidad. ¿Quo vadis? ..... 47  
*J. M. Morancho Zaragoza, J. Batista Castellví, Á. Salas García, E. Prada de Medio,  
M. E. Redín Sarasola, F. Ramón Bauzá*

### Originales

Estudio comparativo de cinco técnicas serológicas comerciales para la  
determinación de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 y su interpretación ..... 50  
*N. González Pereira, J. Garralda Fernández, A.a Castañeda de la Mata,  
M. Pacheco Delgado, S. Prieto Menchero*

Priorización de variantes de exoma mediante un sistema automático  
que emplea términos HPO ..... 59  
*J. M. Lezana-Rosales, D. Tuñón-Le Poutel, J. F. Quesada-Espinosa, E. Soengas-Gonda,  
A. Arteche-López, C. Palma-Milla, I. Gómez-Manjón, M. I. Álvarez-Mora, R. Pérez-de la  
Fuente, M. T. Sánchez-Calvin, M. J. Gómez-Rodríguez, M. Moreno García*

### Evaluación técnica/Equipos

Estudio de la interferencia producida por la hemólisis en la medición  
de distintos constituyentes bioquímicos en el analizador Atellica® Solution  
(Siemens Healthineers) ..... 70  
*Y. Fernández Verduras, M. J. Ruiz Álvarez, M. Barrionuevo González, B. Beteré Cubillo,  
A. Antón Cornejo, J. M. Gasalla Herráiz*

### Casos Clínicos

Estudio genético familiar de resistencia a hormonas tiroideas ..... 77  
*R. Cabra Rodríguez, M. José Ruiz Márquez, G. María Varo Sánchez*

Leucemia de células plasmáticas secundaria ..... 80  
*A. Vílchez Rodríguez, R. Lluch García, N. Bru Orobal*

Hallazgo inesperado de carcinoma de pulmón en líquido pleural  
enmascarado por sospecha de neumonía por SARS-CoV-2 ..... 83  
*M. Palomino Alonso, F. Calvo Boyero, M. Aramendi Ramos*

### Imagen/Infografía

Diagnóstico: quiluria ..... 87  
*A. Carrasco Mora, L. M. Rivas Chacón, V. Benito Zamorano*



# - REVISTA DE - MEDICINA DE LABORATORIO

www.revistamedicinadelaboratorio.es

Vol. 2 No. 2 | May-August 2021

## Summary

### Editorial

Quality specifications. *Quo vadis?* ..... 47  
*J. M. Morancho Zaragoza, J. Batista Castellví, Á. Salas García, E. Prada de Medio, M. E. Redín Sarasola, F. Ramón Bauzá*

### Originals

Comparative study of five commercial serological techniques for the determination of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies and their interpretation ..... 50  
*N. González Pereira, J. Garralda Fernández, A. Castañeda de la Mata, M. Pacheco Delgado, S. Prieto Menchero*

Prioritization of exome variants through an automatic system using HPO terms .... 59  
*J. M. Lezana-Rosales, D. Tuñón-Le Poutel, J. F. Quesada-Espinosa, E. Soengas-Gonda, A. Arteché-López, C. Palma-Milla, I. Gómez-Manjón, M. I. Álvarez-Mora, R. Pérez-de la Fuente, M. T. Sánchez-Calvin, M. J. Gómez-Rodríguez, M. Moreno García*

### Technical evaluations/Equipments

Evaluation of the interference produced by hemolysis in the measurement of different biochemical constituents in the Atellica® Solution analyzer (Siemens Healthineers) ..... 70  
*Y. Fernández Verduras, M. J. Ruiz Álvarez, M. Barrionuevo González, B. Beteré Cubillo, A. Antón Cornejo, J. M. Gasalla Herráiz*

### Case Reports

Family genetic study of thyroid hormone resistance ..... 77  
*R. Cabra Rodríguez, M. José Ruiz Márquez, G. María Varo Sánchez*

Secondary plasma cell leukemia ..... 80  
*A. Vílchez Rodríguez, R. Lluch García, N. Bru Orobal*

Unexpected finding of lung carcinoma in pleural fluid masked by suspicion of SARS-CoV-2 pneumonia ..... 83  
*M. Palomino Alonso, F. Calvo Boyero, M. Aramendi Ramos*

### Image/Inphographic

Diagnosis: chyluria ..... 87  
*A. Carrasco Mora, L. M. Rivas Chacón, V. Benito Zamorano*



## Especificaciones de la calidad. *¿Quo vadis?*

### *Quality specifications. Quo vadis?*

La necesidad de fijar un requisito de la calidad para la realización de análisis clínicos ligado al intervalo de referencia fue expresado por D. B. Tonks (1) hace más de cinco décadas. Él recomendó que el error permitido para un análisis no debería ser mayor que una cuarta parte del intervalo de referencia. Cinco años después, R. N. Barnet (2) definió la calidad deseada en forma de la desviación estándar dirigida a la precisión y obviando la veracidad. En 1976 el Colegio de Patólogos Americano convocó una conferencia sobre los objetivos de la calidad en el laboratorio clínico (3), en la cual se trató la propuesta de Error Total de J. O. Westgard como criterio de aceptabilidad, siendo la que finalmente con el paso del tiempo fue adoptada por el conjunto de los laboratorios. En 1989, C. Fraser (4) propuso el modelo de variación biológica que permitía obtener valores de Error Total máximo en función de la variabilidad intraindividual. En 1999, C. Ricós (5) confeccionó una base de datos que agrupaba un número importante de estudios de variación biológica y sintetizaba una propuesta de especificaciones de la calidad (EC) para más de 300 mensurandos. También en 1999, la conferencia de Estocolmo (6) llegó a un consenso en donde se establecía una jerarquía de modelos para la selección de especificaciones de la calidad. En 2008, la Comisión de Expertos interdisciplinar en Especificaciones de la Calidad (CEIEC) empezó a publicar las especificaciones mínimas de consenso fundamentadas en el estado del arte (7). En 2014 en la reunión de Milán (8), el consenso de Estocolmo fue revisado y simplificado a una jerarquía de tres modelos que se recomendaba que fuesen seguidos:

- Modelo 1. Fundamentado en el efecto de las prestaciones analíticas sobre los resultados clínicos.
- Modelo 2. Fundamentado en los componentes de la variación biológica del mensurando.
- Modelo 3. Fundamentado en el estado del arte.

La European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) ha creado un grupo de trabajo específico para revisar las EC fundamentadas en la variación biológica dando lugar a unos criterios (9) para la selección de fuentes de calidad para la obtención de los valores de variación biológica interindividual e intraindividual y posterior cálculo de la EC (10).

Aparentemente el camino teórico está perfectamente definido, sin embargo, la practicabilidad no se ha demostrado; en una encuesta *ad hoc*, abierta y anónima, en la que han participado 285 profesionales del laboratorio, preparatoria para un curso sobre EC a desarrollar en el XV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico de 2021, las contestaciones recibidas formulan un número importante de preguntas y afirmaciones equívocas respecto a lo que son las EC y su selección, probablemente debido a una serie de hechos:

- a) Cualquier laboratorio estará de acuerdo en que su objetivo es dar información clínicamente útil y por ello las EC deben estar alineadas con ese objetivo. La pregunta subyacente es: ¿qué es clínicamente útil? El acuerdo de Milán sugiere que el laboratorio debe conocer cuáles son sus objetivos y en función de ellos debe elegir el modelo más alto de la jerarquía. Sin embargo, no es fácil poner sobre el papel el objetivo del laboratorio para cada mensurando.
- b) En España no es obligatorio cumplir con ninguna EC.
- c) Se confunde el concepto de objetivo de la calidad frente al de EC. La existencia de la EC está íntimamente ligada a su cumplimiento. Si no se puede cumplir no debe de ser seleccionada. No tiene sentido, bordear teóricamente la incapacidad de cumplir con unas EC, creando un indicador de la calidad para ver las veces que se cumple o no una determinada EC.
- d) El número de publicaciones sobre el primer modelo propuesto por el Acuerdo de Milán es muy escaso. No existe una metodología contrastada de cómo deben ser obtenidas.

- e) Pese al enorme esfuerzo de la EFLM para la normalización del modelo de variación biológica, siguen existiendo un número limitado (232 en agosto de 2021) de EC para los mensurandos y se producen cambios en los valores de EC publicados en cortos espacios de tiempo (11). Además, debe señalarse que los cálculos permiten obtener tres valores de especificaciones; mínima, deseable y óptima fruto de unos factores que dan lugar a esos valores, que son arbitrarios aunque conocidos y transparentes.
- f) En el Acuerdo de Milán ha desaparecido referencia alguna a EC preceptivas (12-14). Si bien es cierto que las EC preceptivas están pensadas para proteger al ciudadano de la mala praxis, también es cierto que han sido hasta la fecha, referencia para bastantes laboratorios que las adoptaban, máximo cuando en nuestro país no se han definido EC preceptivas.
- g) El estado del arte tiene una definición no estandarizada y por lo tanto los valores que se obtienen tienen una dosis de arbitrariedad. S. Sandberg (7) sugiere que "son el nivel más alto de prestaciones analíticas técnicamente alcanzable" o "alternativamente, el desempeño analítico alcanzado por un determinado porcentaje de laboratorios"; pero no cita ese porcentaje, mientras que para el CEIEC "es la información que caracteriza a las prestaciones de los sistemas analíticos de un grupo de laboratorios seleccionados, en un periodo de tiempo determinado"; tampoco cita el % de laboratorios, pero sí indica que es el valor de EC capaz de ser cumplido por el 90 % de los laboratorios cuando procesan en 75 % de las muestras (15).
- h) Para un % importante de mensurandos, las EC fundamentadas en el estado del arte calculadas por la CEIEC (16) son más estrictas que las EC con el modelo de variación biológica (10).

Ante lo expuesto y ante la pregunta: EC ¿*Quo vadis?*, lo más probable es que a medio plazo:

- a) Siga sin ser obligatorio en España cumplir unas EC mínimas, debido a que ello significaría reconocer que hay una calidad mínima exigible e implicaría un coste añadido a las prestaciones de los laboratorios clínicos, idea alejada de la visión mercantilista de los gestores sanitarios actuales.
- b) Los diferentes modelos de obtención de EC seguirán produciendo valores probablemente más robustos.
- c) Hay que abandonar la idea de un listado único de EC, científicamente avalado, obtenido de un único modelo.

La mejor recomendación que se puede hacer a los laboratorios clínicos es ser lo más pragmáticos posibles. Ello implica:

- Seleccionar sus objetivos como laboratorios.
- Ser congruente y consecuente con esos objetivos.
- Cumplir como mínimo con las EC mínimas obtenidas por el CEIEC (17).
- Utilizar el Acuerdo de Milán como referencia en la selección de las EC de una forma crítica, no como un estándar o norma. Esto conllevaría emplear jerárquicamente el modelo 1 (prestaciones clínicas), 2 (variación biológica) y 3 (estado del arte).
- Si la tecnología lo permite, elegir las EC basadas en el estado del arte en el caso de que sean más estrictas que las obtenidas por el modelo 1 o 2.

Jorge Matías Morancho Zaragoza, Joan Batista Castellví, Ángel Salas García,  
Enrique Prada de Medio, María Elena Redín Sarasola, Francisco Ramón Bauzá  
Comité de Expertos Interdisciplinar de Especificaciones de la Calidad

*Conflictos de interés: los autores no declaran ningún conflicto de interés.*

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tonks DB. A study of the accuracy and precision of Clinical Laboratory Determination in 170 Canadian Laboratories. *Clin Chem* 1963;217-33.
2. Barnet RN. Medical Significance of Laboratory Results. *Am J Clin Path* 1968;50:671-6.
3. Aspen Conference on Analytical Goals in Clinical Chemistry; 1976.
4. Fraser CG, Harris EK. Generation and Application of Data on Biological Variation in Clinical Chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27(5):409-37. DOI: 10.3109/10408368909106595
5. Ricós C, Álvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(7):491-500. DOI: 10.1080/00365519950185229
6. Kenny D, Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Kallner A. Strategies to set global analytical quality specifications in Laboratory Medicine - Consensus agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(7):585.

7. Buño Soto A, Calafell Clar R, Morancho Zaragoza J, Bauza FR, Ricós Aguilá C, Salas García Á. Consenso sobre especificaciones mínimas de la calidad analítica. *Rev Lab Clin* 2008;1(1):35-9. DOI: 10.1016/S1888-4008(08)74953-5
8. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, Jansen R, Jones G, Oosterhuis W, et al. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Lab Med* 2015;53(6):833-5. DOI: 10.1515/cclm-2015-0067
9. Aarsand AK, Toraas T, Fernández-Calle P, Ricos C, Díaz-Garzón J, Jonker N, et al. The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation. *Clin Chem* 2018;64(3):501-14. DOI: 10.1373/clinchem.2017.281808
10. The EFLM Biological Variation Database. [updated 15 Jul 2021]. Available from: <https://biologicalvariation.eu/>
11. Westgard S. 2021. Analytical performance specifications update. Available from: <https://www.westgard.com/tea-cc-update-2021.htm>
12. HCFA/CLIA. Proficiency Testing Requirements for Analytical Quality. *Federal Register* Feb 4, 2019;84(23):1536-67.
13. Neufassung der "Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – Rili-BÄK". Available from: [www.bundesaerztekammer.de/rilibaek2019](http://www.bundesaerztekammer.de/rilibaek2019)
14. Clinical laboratory technologies. Quality control of clinical laboratory tests. Part 1. Limits of allowable errors of the results of the analyte measurements in clinical-diagnostics laboratories. Federal Agency on Technical Regulation and Metrology: Moscow 2008:1-27 (in Russian). National Standard of Russian Federation 53133.1-2008 (GOST 53133.1-2008).
15. Prada E, Blázquez R, Gutiérrez-Bassini G, Morancho J, Jou JM, Ramón F, et al. Control interno de la calidad vs control externo de la calidad. *Rev Lab Clin* 2016;9:54-9. DOI: 10.1016/j.labcli.2016.04.003
16. Prada de Medio E, Molina Borrás Á, Alcaraz Quiles J, Batista Caltellví J, Ramón Bauzá F, Salas García Á, et al. Especificaciones mínimas de consenso de la calidad analítica en España. Comparación con valores previos, preceptivos y de variabilidad biológica. *Red Med Lab* 2020;1(3):93-107. DOI: 10.20960/revmedlab.00056
17. CEIEC EMC 2017. Disponible en : <http://www.aefa.es/wp-content/uploads/2014/03/EMC2017.pdf>





## Original

# Estudio comparativo de cinco técnicas serológicas comerciales para la determinación de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 y su interpretación

## *Comparative study of five commercial serological techniques for the determination of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies and their interpretation*

*Natalia González Pereira, Javier Garralda Fernández, Adela Castañeda de la Mata, María Pacheco Delgado, Santiago Prieto Menchero*

Hospital Universitario de Fuenlabrada. Fuenlabrada, Madrid

**Recibido:** 08/03/2021  
**Aceptado:** 26/05/2021

**Correspondencia:** Natalia González Pereira. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Camino del Molino, 2. 28942 Fuenlabrada, Madrid  
e-mail: ngpereira@salud.madrid.org

### Palabras clave:

SARS-CoV-2. Anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2. Métodos serológicos.

### RESUMEN

**Introducción:** la infección por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 ha dado lugar a una rápida proliferación de pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2. El objetivo de este trabajo fue la realización de un estudio comparativo de cinco técnicas serológicas comerciales para la detección de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2.

**Material y métodos:** la variedad de test serológicos disponibles que utilizan diferentes tipos de ensayos, distintos tipos de anticuerpos y dianas antigénicas y la falta de estandarización internacional, hace necesario una evaluación de los diferentes test actualmente disponibles con el fin de determinar, si existen diferencias significativas entre ellos y por lo tanto, si son intercambiables. Se realizó una selección de 176 muestras para comparar los resultados cuantitativos y cualitativos de los anticuerpos obteniéndose unos resultados intercambiables únicamente a nivel cualitativo.

**Resultados:** se encontraron muestras con resultados discrepantes entre las diferentes técnicas evaluadas, pero aplicando los conocimientos de los últimos estudios publicados y tras realizar un diagnóstico de laboratorio

*Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.*

DOI: 10.20960/revmedlab.00075

González Pereira N, Garralda Fernández J, Castañeda de la Mata A, Pacheco Delgado M, Prieto Menchero S. Estudio comparativo de cinco técnicas serológicas comerciales para la determinación de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 y su interpretación. Rev Med Lab 2021;2(2):50-58

personalizado y evaluar los diferentes métodos serológicos se obtuvo una correcta evaluación para la mayoría de los pacientes incorporados en el estudio.

**Conclusiones:** el diagnóstico serológico es una herramienta muy útil para conocer el estado epidemiológico de la población en cualquier situación y evaluar la repuesta a la inmunización. Además, la realización de informes interpretativos del estudio serológico por parte del Servicio del Laboratorio Clínico proporciona ayuda en el manejo de los resultados de los pacientes.

## ABSTRACT

### Keywords:

SARS-CoV-2. Anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies. Serological methods.

**Background:** infection with the novel SARS-CoV-2 coronavirus has led to a rapid proliferation of serological tests for the detection of specific antibodies against SARS-CoV-2. The aim of this study is to compare five commercial serological techniques for the detection of IgG antibodies against SARS-CoV-2.

**Material and methods:** the variety of serological tests available that use different types of tests, different types of antibodies and antigenic targets, and the absence of international standardization, makes it necessary to evaluate the different tests currently available in order to determine if there are significant differences between them and therefore, if they are interchangeable. A selection of 176 samples was compared the quantitative and qualitative results of the antibodies, obtaining interchangeable results only at the qualitative results.

**Results:** samples with discrepant results were found between the different techniques evaluated, but applying the knowledge that has been incorporated in the latest studies and after making a personalized laboratory diagnosis and evaluating the different serological methods, a correct evaluation was obtained for most of the patients incorporated into the study.

**Conclusion:** serological diagnosis is a very useful tool to know the epidemiological status of the population in any situation, to allow evaluating the response to immunization. In addition, the performance of interpretive reports of the serological study by the Clinical Laboratory Service provides assistance in the management of patient results.

## INTRODUCCIÓN

La infección por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, causante de la pandemia actual, ha supuesto un gran impacto sanitario y socioeconómico a nivel mundial. A diciembre del 2020, y según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es el responsable de más de 82 millones de personas infectadas en todo el mundo, con más de 1,8 millones fallecidos. En España, se han detectado más de 1,6 millones casos (1).

Las partículas virales del SARS-CoV-2 se componen de una nucleocápside proteica (N), dentro de la cual se encuentra una molécula de ARN de polaridad positiva que constituye el genoma viral, la cual está rodeada de una envoltura lipídica donde se inserta la proteína *spike* (S), que interacciona con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina tipo 2, a través del dominio de unión al receptor (RBP). La proteína S presenta dos dominios diferenciados, S1 y S2. La región S1 contiene la

región RBP, mientras que S2 es necesaria para la fusión de la bicapa lipídica viral con la membrana celular (2).

Actualmente son objeto de estudio los mecanismos de respuesta humoral ante el SARS-CoV-2 (3) y, aunque no se conocen en detalle, existe evidencia de que la infección COVID-19 produce una respuesta inmunogénica distinta según factores dependientes del paciente y de la enfermedad (estado clínico del paciente, gravedad, duración de la enfermedad, edad, etc.) (4). Los anticuerpos dirigidos contra la proteína S tienen capacidad neutralizante y son la diana habitual de las vacunas. La proteína N es altamente inmunogénica y los anticuerpos dirigidos contra ella, aunque no se conoce en detalle su función, suelen tener un pico alrededor de los 14 días tras el inicio de los síntomas (5). La duración de la inmunidad frente al SARS-CoV-2 continúa en investigación, aunque existen estudios que demuestran la disminución de la cantidad de anticuerpos a lo largo del tiempo, también existen evidencias de su permanencia (6,7).

La realización de pruebas serológicas permite identificar a personas que hayan estado en contacto con el virus y hayan respondido frente a este, o estén en proceso. Los datos disponibles indican que hasta el 94 % de los pacientes son capaces de responder produciendo inmunoglobulinas hacia el día 14 tras el inicio de los síntomas (8).

Hemos asistido a una rápida proliferación de pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 (9), pero la ausencia de unos requerimientos establecidos por las distintas entidades internacionales ha dado lugar a una alta variedad de test, con distintos formatos, detección de diferentes tipos de anticuerpos, diversas dianas antigénicas y la utilización de diferentes especímenes (10).

La Food Drug Administration publicó una política de control de estos test para la obtención de una autorización rápida a partir de estudios de las empresas de diagnóstico *in vitro* (10). En revisión *a posteriori*, se han retirado un total de 252 (11).

Existen recomendaciones sobre la utilización de estudios serológicos, pero no existe un consenso global. La Diseases Society of America establece cuatro escenarios posibles donde pueden ser de utilidad (12):

1. Pacientes con sintomatología sugerente de SARS-CoV-2 con detección de ARN viral negativa.
2. Selección de posibles donantes de plasma.
3. Evaluación de respuesta tras vacunación.
4. Estudios epidemiológicos.

Recientemente se ha publicado un estudio multicéntrico, en el que 51 laboratorios comparando 125 métodos, han establecido un estándar internacional para facilitar la estandarización de los métodos serológicos (13).

## OBJETIVO

Realización de un estudio comparativo entre cinco técnicas serológicas comerciales para la detección de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre ellos, y por lo tanto, si son intercambiables.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una selección de 176 muestras de suero que habían sido procesadas durante los meses de abril y mayo de 2020 en el Servicio del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Fuenlabrada. Las muestras correspondían a 176 pacientes, 69 hombres y 107 mujeres, con una edad comprendida entre 20 y 95 años con una mediana de 51 años, 119 con resultado de la detección de RNA viral SARS-CoV-2 negativo y 57 positivo.

El estudio fue revisado y aceptado por el Comité de Ética de nuestro hospital.

Todas las muestras fueron congeladas a -80 °C, realizándose únicamente un proceso de descongelación y un análisis único simultáneamente para los cinco inmunoensayos.

La técnica utilizada de manera rutinaria en nuestro laboratorio durante el tiempo en que se realizó el estudio es el test 2019-nCoV IgG de MAGLUMI® (test A), los resultados de este ensayo fueron comparados con el test TGS COVID-19 IgG Menarini® (test B), el test Access SARS-CoV-2 IgG de Beckman® (test C), el test SARS-CoV-2 S1/S2 IgG de LIASON® (test D) y el test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (anticuerpos totales IgG, IgM e IgA) de ROCHE® (test E). Las características detalladas de cada uno de los ensayos se muestran en la tabla I. Se dispone de más información en los inserts facilitados por los fabricantes (14-18).

Los resultados de los anticuerpos se obtienen en unidades arbitrarias (UA), debido a la falta de un estándar internacional que permita cuantificar la concentración de los mismos.

Además, a partir del estudio presentado por Giuseppe Lippi y cols. (19) que asumía como valor positivo resultados superiores a 1,1 UA, en nuestro laboratorio se decidió establecer una zona gris que comprendiera un 10 % de variación con respecto al punto de corte 1,0 UA (desde 0,9 a 1,1 UA) como valores indeterminados.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico MedCalc® 19.8 (MedCalc Software, Ostende, Bélgica).

Se abordó el estudio analizando por un lado los resultados cuantitativos obtenidos por los distintos ensayos utilizados y, por otro lado, de modo cualitativo, con la interpretación de los resultados de los anticuerpos como positivo y negativo.

El estudio de los resultados cuantitativos se realizó según la Guía de Consenso EP09-03 (Clinical and Laboratory Standards Institute) dirigida al estudio de comparación de métodos utilizando muestras de pacientes (20). Se realizó el análisis de *outliers* y tras esto, la regresión lineal no paramétrica de Passing-Bablok y el gráfico de Bland-Altman excluyendo el método E debido a que mide la cantidad de anticuerpos totales (IgG, IgM e IgA). Por otro lado, el análisis de los cualitativos se realizó de los cinco ensayos mediante el índice de concordancia kappa y el test de chi-cuadrado, todos ellos estableciendo un nivel de significación del 95 %.

## RESULTADOS

Para el estudio de los resultados de manera cuantitativa se realizó el estudio de regresión de Passing-Bablok y los métodos gráficos de Bland-Altman. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla II y en las figuras 1 y 2.

Por otro lado, se realizó el estudio de los resultados cualitativos, utilizando la interpretación de positivo, negativo o indeterminado.

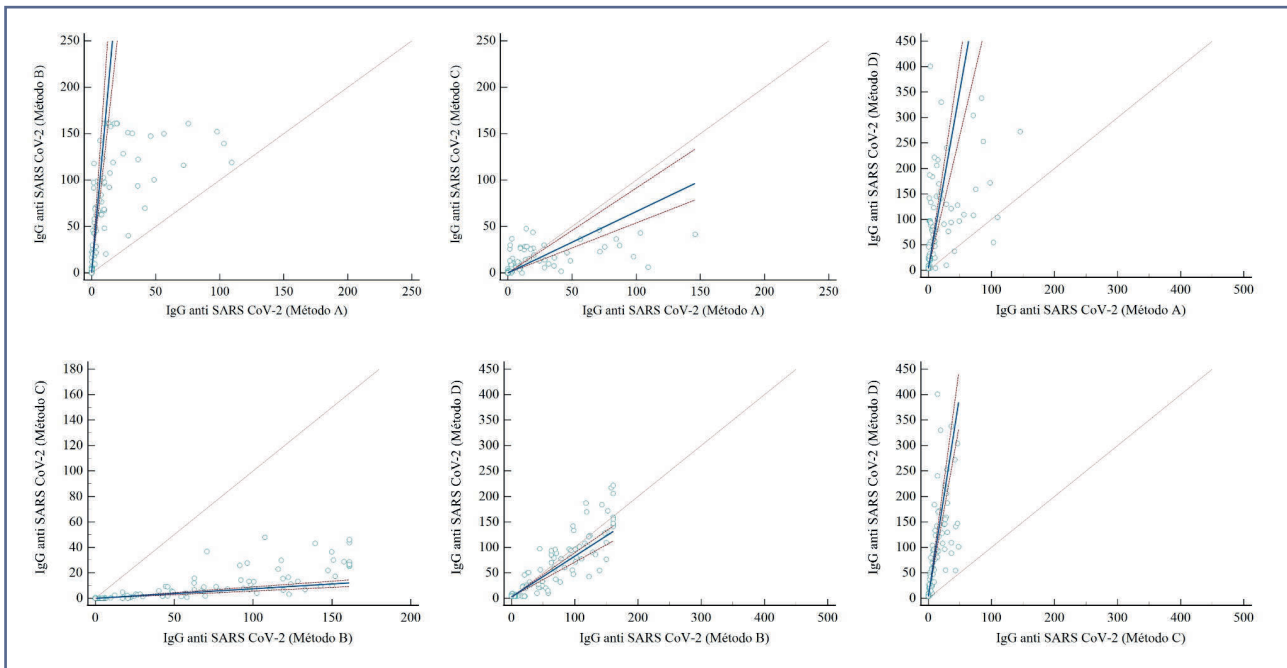
Los porcentajes de las muestras que obtuvieron un resultado positivo, negativo o indeterminado para cada uno de los test evaluados se puede observar en la tabla III.

Tabla I.					
Información comercial de los métodos utilizados para la comparación de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2					
Test	Ensayo	Antígeno SARS-CoV-2 (recombinante)	Empresa diagnóstica	Analizador	Interpretación de resultados
A	2019-nCoV IgG Automatizado CLIA	Proteína N y S	Vitro Master Diagnostica®/ Snibe Diagnostics®	MAGLUMI® 800	> 1 UA positivo < 1 UA negativo
B	TGS COVID-19 IgG Automatizado CLIA	Proteína N y S1	Menarini Diagnostics®	Zenit RA®	> 10 UA positivo < 10 UA negativo
C	Access SARS-CoV-2 IgG Automatizado CLIA	Proteína S1	Beckman Coulter®	UniCel DxI 800 Access®	> 1 UA positivo 0,8-1,0 UA indeterminado < 1 UA negativo
D	SARS-CoV-2 S1/S2 IgG Automatizado CLIA	Proteína S1 y S2	DiaSorin®	Liaison® XL	> 15 UA positivo 12-15 UA indeterminado < 15 UA negativo
E	Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Automatizado ECLIA	Proteína N	Roche Diagnostics®	Cobas e411®	> 1 UA positivo < 1 UA negativo

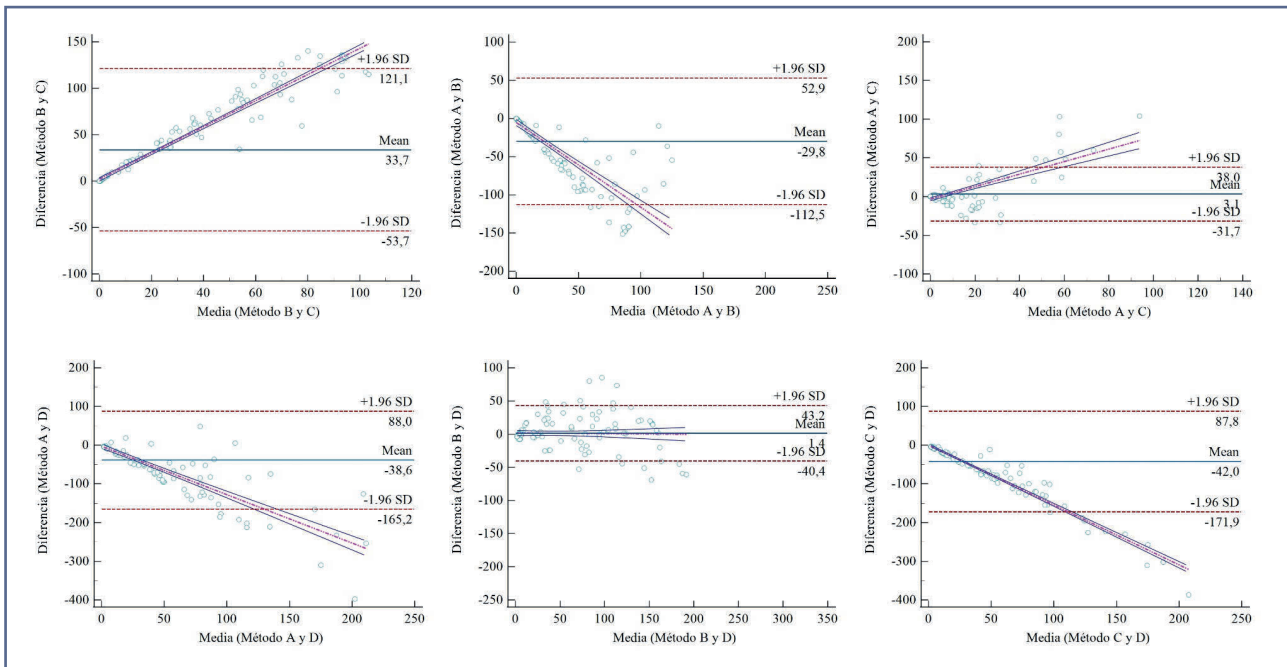
CLIA: inmunoensayo de quimioluminiscencia, ECLIA: inmunoensayo de electroquimioluminiscencia.

Tabla II.				
Ecuaciones de regresión Passing-Bablok con un intervalo de confianza del 95 %				
Test	B	C	D	
A	Pendiente	15,333 (12,484-19,961)	0,661 (0,539-0,914)	7,000 (5,239-78,251)
	Ordenada origen	0,593 (0,302-1,051)	0,008 (0,002-0,015)	3,660 (3,635-3,695)
B	Pendiente		0,075 (0,058-0,089)	0,799 (0,684-0,862)
	Ordenada origen		-0,055 (-0,103- -0,028)	2,810 (2,602-3,226)
C	Pendiente			7,958 (6,846 -9,128)
	Ordenada origen			3,641 (3,617-3,663)

Tabla III.			
Resultados de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 para los diferentes test			
Test	Resultados negativos	Resultados positivos	Resultados indeterminados
A	100 (56,80 %)	75 (42,60 %)	1 (0,57 %)
B	95 (54,00 %)	75 (46,00 %)	
C	101 (57,40 %)	73 (41,50 %)	2 (1,10 %)
D	102 (58,00 %)	73 (41,50 %)	1 (0,57 %)
E	97 (55,10 %)	79 (44,90 %)	



**Figura 1** – Regresión de Passing-Bablok con la recta de regresión, el intervalo de confianza al 95 % y en línea discontinua la recta de igualdad  $x = y$ .



**Figura 2** – Método Bland-Altman. Gráficos de Bland-Altman de la diferencia entre la medición de los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 frente a la media (mean: media; SD: standard deviation [desviación estándar]).

Se realizó el índice de concordancia kappa y el test estadístico chi-cuadrado con un intervalo de confianza del 95 % entre todos los test evaluados. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.

Por último, se hizo una revisión de las muestras que presentaban resultados discrepantes entre los test evaluados. De las 176 muestras analizadas, 14 muestras

presentan interpretaciones discrepantes entre los diferentes test, los valores obtenidos para cada una de las muestras se recoge en la tabla V.

Ante los resultados obtenidos en el test E, se decide realizar la medición de los anticuerpos IgM anti-SARS-CoV-2, en aquellas muestras que presentan resultados positivos no atribuible a los anticuerpos IgG anti-SARS-

**Tabla IV.**  
**Resultados de los índices de concordancia Kappa ( $\kappa$ ) y los resultados del test Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) con un intervalo de confianza del 95 %**

Test	B	C	D	E	
A	$\kappa$	0,91 (0,85-0,97)	0,88 (0,81-0,95)	0,87 (0,80-0,94)	0,88 (0,81-0,94)
	$\chi^2$	144,97 p < 0,0001	136,70 p < 0,0001	133,08 p < 0,0001	137,24 p < 0,0001
B	$\kappa$		0,93 (0,88-0,98)	0,92 (0,86-0,98)	0,98 (0,85-0,97)
	$\chi^2$		152,41 p < 0,0001	148,91 p < 0,0001	167,16 p < 0,0001
C	$\kappa$			0,94 (0,89-0,99)	0,95 (0,91-0,99)
	$\chi^2$			155,25 p < 0,0001	159,26 p < 0,0001
D	$\kappa$				0,94 (0,89-0,99)
	$\chi^2$				155,89 p < 0,0001

**Tabla V.**  
**Resultados de las muestras con resultados discrepantes para los test estudiados**

Test	A (UA)	B (UA)	C (UA)	D (UA)	E (UA)
Antígeno SARS-CoV-2 (recombinante)	S/N	S1/N	S1	S1/S2	N
1	0,94 (Ind)	26,68 (Pos)	2,75 (Pos)	50 (Pos)	25,01 (Pos)
2	11,21 (Pos)	20,59 (Pos)	0,06 (Neg)	3,80 (Neg)	0,985 (Neg)
3	3,44 (Pos)	22,07 (Pos)	0,94 (Ind)	19,10 (Pos)	16,36 (Pos)
4	2,63 (Pos)	9,57 (Neg)	0,16 (Neg)	3,80 (Neg)	0,097 (Neg)
5	47,95 (Pos)	17,22 (Pos)	0,03 (Neg)	3,80 (Neg)	0,14 (Neg)
6	0,53 (Neg)	30,06 (Pos)	1,38 (Pos)	26,50 (Pos)	33,08 (Pos)
7	0,76 (Neg)	20,26 (Pos)	2,17 (Pos)	45,60 (Pos)	26,26 (Pos)
8	0,31 (Neg)	12,16 (Pos)	2,33 (Pos)	6,32 (Neg)	3,89 (Pos)
9	0,27 (Neg)	22,5 (Pos)	0,83 (Ind)	21,8 (Pos)	3,80 (Pos)
10	0,11 (Neg)	17,31 (Pos)	4,73 (Pos)	22,20 (Pos)	8,13 (Pos)
11	62,21 (Pos)	57,49 (Pos)	3,96 (Pos)	14,70 (Ind)	2,62 (Pos)
12	28,66 (Pos)	40,15 (Pos)	5,94 (Pos)	9,97 (Neg)	2,08 (Pos)
13	2,00 (Pos)	58,20 (Pos)	0,73 (Neg)	9,70 (Neg)	18,57 (Pos)
14	0,76 (Neg)	20,8 (Pos)	0,32 (Neg)	3,80 (Neg)	18,82 (Pos)

CoV-2 frente al dominio de unión de receptor de la proteína N, para comprobar si los diferentes resultados obtenidos se pueden atribuir a la presencia de dichos anticuerpos. Los resultados se muestran en la tabla VI. La técnica utilizada para la medición de los anticuerpos IgM anti-SARS-CoV-2 fue el inmunoensayo quimioluminiscente de captura 2019-nCoV IgM de MAGLUMI® que establece el punto de corte de la técnica en 1 UA.

## DISCUSIÓN

El estudio de los resultados cuantitativos de los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 para los diferentes test, reveló la existencia de diferencias sustanciales y que los resultados cuantitativos no son intercambiables entre ningunos de los test estudiados (Tabla I y Figs. 1 y 2).

**Tabla VI.**  
**Resultados de los anticuerpos IgM anti-SARS-CoV-2 y los anticuerpos para el test E**

Muestra	2019-nCoV IgM de MAGLUMI® (UA)	Test E (UA)
2	0,35 UA	0,98 UA
5	0,76 UA	0,14 UA
8	4,55 UA	3,98 UA
9	1,51 UA	3,80 UA
10	2,40 UA	8,13 UA
13	1,27 UA	18,57 UA
14	0,92 UA	18,82 UA

Estos resultados eran esperables ya que los puntos de corte establecidos para cada una de las técnicas son diferentes y no existe una estandarización para la medición de estos anticuerpos que permita la interpretación de los niveles cuantitativos. Con el estándar internacional realizado recientemente por la OMS (13), los test para la detección de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 deberán modificar las unidades establecidas y las concentraciones serán trazables para todos los métodos, lo que facilitará su interpretación.

En el estudio de los resultados cualitativos de las muestras, todos los test evaluados muestran resultados *a priori* muy similares; únicamente resaltar que la prueba con más resultados positivos es el test E con un total de 79 muestras (44,9 %). Este aumento podría explicarse debido a que se realiza la medición de anticuerpos totales (IgG, IgM e IgA).

El test estadístico chi-cuadrado muestra una fuerte asociación de los resultados obteniendo una  $p < 0,0001$  en el estudio pareado de todos los métodos comparados (Tabla IV).

Por otro lado, se observa un grado de concordancia elevado con índices kappa superiores a 0,8 (0,87-0,98), que es la especificación de calidad deseada en nuestro laboratorio al reflejar una fuerza de concordancia muy buena. Los resultados con el test E son de difícil interpretación al realizar la medición de anticuerpos totales. De las demás pruebas evaluadas se obtiene un índice de concordancia mayor entre los test que miden anticuerpos frente a las mismas dianas antigénicas (véase  $K = 0,94$  para los test C y D, ambos realizan la medición de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 S1 y  $K = 0,93$  para los test B y C por la misma situación).

A pesar de ello se encontraron resultados discrepantes en un 7,95 % (14/176) de muestras.

Ante los resultados obtenidos en el test E se realizó la medición de los anticuerpos IgM anti-SARS-CoV-2 para comprobar si estos resultados se pueden atribuir a la presencia de dichos anticuerpos. Los resultados posi-

tivos del test E, se obtienen en las muestras que presentan concentraciones superiores de anticuerpos IgM anti-SARS-CoV-2, pero es difícil sacar conclusiones con un número tan reducido de muestras (Tabla VI).

En algunas muestras se obtienen valores indeterminados en alguno de los ensayos evaluados. Podrían existir dudas ante estos resultados, pero valores indeterminados sugieren presencia de anticuerpos en concentración baja, por lo que los pacientes deben ser considerados seropositivos (p. ej. muestra/test, 1 A, 3 C, 9 C, 11 D). También debe considerarse que, aunque existan resultados de anticuerpos estimados como negativos con el punto de corte establecido, los resultados son significativamente distintos de cero y que, por lo tanto, también sugieren la presencia de anticuerpos en concentración baja (véanse muestras 6, 7, 8 y 14 para el test A).

Los resultados obtenidos en las muestras 6 a 10 para el test A (test 2019-nCoV IgG de MAGLUMI®), junto con que el test A presenta los índices de concordancia kappa más bajos con los demás test evaluados y la mayor correlación la presenta con el test B (único test evaluado que mide la presencia de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 frente al dominio de unión al receptor de la proteína N), parece sugerir una pérdida de sensibilidad del test para la medición de los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 frente al dominio de unión al receptor de la proteína S y que los puntos de corte deben reevaluarse.

Por lo tanto, al igual que se concluye en otras publicaciones (21-23) parece necesario implantar en todas las técnicas utilizadas un rango de concentración indeterminado que asegure la máxima sensibilidad posible y reevaluar los puntos de corte que aseguren la presencia de anticuerpos aunque en sea en concentración baja, que parece que dista mucho de los establecidos actualmente.

Por otro lado se observan muestras que solo son positivas a anticuerpos frente a una de las dianas antigénicas del SARS-CoV-2, por lo que en las técnicas que presenten antígenos SARS-CoV-2 (recombinantes) afines serán positivos mientras que otras no; otros autores han observado este mismo fenómeno en estudios similares (22,24).

*Ejemplo.* En las muestras 2, 5, 13 y 14 solo se obtienen resultados positivos en aquellas técnicas que detectan anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 contra el dominio de unión al receptor de la proteína N, mientras que las muestras 9 y 10 presentan resultados positivos en aquellas que detectan anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 contra el dominio de unión al receptor de la proteína S1.

A la vista de estos resultados se constata que es importante tener disponible en los laboratorios técnicas que realicen la medición de anticuerpos frente a diferentes dianas antigénicas y es recomendable que la medición de los diferentes anticuerpos se realice por separado, ya que puede permitir una evaluación más completa de los pacientes.

Cuando se realizó el estudio sin tener en cuentas las consideraciones expuestas previamente, el porcentaje de muestras con resultados discrepantes era de un 7,95 % (14/176), mientras que tras su reevaluación (incorporación de valores indeterminados y consideración de pacientes seropositivos, aunque fueran únicamente frente a una diana antigénica), se logró clasificar la mayor parte de ellas, presentado únicamente un 1,14 % (2/176) resultados incongruentes.

Los últimos estudios publicados ponen en evidencia que la producción de anticuerpos frente a distintas dianas antigénicas está influenciada por factores clínicos (4), viendo que existe una mayor producción de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 contra el dominio de unión al receptor de la proteína N en pacientes con criterios de mayor gravedad y de edad avanzada.

En nuestro estudio los pacientes presentan una mediana de edad de 51 años (rango de edad comprendido entre 20 y 95 años) y la gravedad de los mismos debe ser considerada como moderada/grave, ya que durante el periodo de abril y mayo por la situación de la pandemia en ese momento, solo se atendía a pacientes con criterios de gravedad y los pacientes con enfermedad leve tenían seguimiento domiciliario.

Tal como se describe en la publicación de Caroline Atyeo y cols. (4), parece que la producción de los anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 contra el dominio de la unión N predomina cuando existe un transcurso más grave de la enfermedad. Esto puede explicar que la producción de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 contra el dominio de unión al receptor de la proteína N y la proteína S1 sean semejantes en los pacientes incluidos en este estudio y no observemos diferencias significativas en la interpretación de los resultados por los diferentes métodos estudiados.

Parece probable que si se realizara de nuevo el estudio de los anticuerpos podríamos encontrar mayores diferencias actualmente ya que existe una mayor variabilidad de pacientes atendidos.

Por otro lado, la reciente vacunación contra el SARS-CoV-2 con vacunas que producen la síntesis *in vivo* de anticuerpos IgG anti-S1 SARS-CoV-2, nos presenta un nuevo escenario donde aparecerán diferentes patrones de anticuerpos entre los pacientes vacunados y pacientes que hayan pasado de forma natural la enfermedad. Debe tenerse en cuenta a la hora de la medición y la interpretación de los anticuerpos, que la detección de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 frente a otras dianas antigénicas que no sean la S1, solo se presentará en pacientes que hayan pasado la enfermedad. Además, es importante conocer que existe un aclaramiento de los anticuerpos a lo largo del tiempo, pero que su duración es difícil de determinar, aproximadamente se ha establecido una duración de 6 meses existiendo una disminución de la concentración de los mismos a partir de los 90 días (3,6,7).

Debe tenerse en cuenta que este estudio presenta limitaciones, ya que la selección de pacientes se realizó en un periodo de tiempo con características epidemio-

lógicas concretas que seguramente hayan condicionado la generación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 y que, además, existía un sesgo en la selección de pacientes a los que se les realizaban las pruebas serológicas que no se conoce al detalle pero que, *a priori*, todos los pacientes presentaban sospecha clínica de COVID-19.

Por lo tanto, a pesar de que existen muestras con resultados de diferente interpretación a nivel técnico, tras realizar un diagnóstico de laboratorio personalizado, revisando la situación clínica del paciente y teniendo la disponibilidad de diferentes métodos serológicos se obtiene una correcta evaluación para la mayoría de los pacientes incorporados en el estudio, demostrando que el diagnóstico serológico es una herramienta muy útil para conocer el estado epidemiológico de la población en cualquier situación, que permitirá evaluar la respuesta a la inmunización y que la realización de informes interpretativos por parte del servicio del laboratorio clínico ayuda en el manejo de los resultados de los pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social - Professionals - Situación actual Coronavirus [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: <https://www.msbs.gob.es/en/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/situacionActual.htm>
2. Sun C, Chen L, Yang J, Luo C, Zhang Y, Li J, et al. SARS-CoV-2 and SARS-CoV Spike-RBD Structure and Receptor Binding Comparison and Potential Implications on Neutralizing Antibody and Vaccine Development 2020;(December 2019):1-18. DOI: 10.1101/2020.02.16.951723
3. Hope JL, Bradley LM. Lessons in antiviral immunity. *Science* 2021;371(6528):464-5. DOI: 10.1126/science.abf6446
4. Atyeo C, Fischinger S, Zohar T, Slein MD, Burke J, Loos C, et al. Distinct Early Serological Signatures Track with SARS-CoV-2 Survival. *Immunity* [Internet]. 2020;53(3):524-532.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.020> DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.020
5. Vashist SK. In vitro diagnostic assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. *Diagnostics* 2020;10(4):202. DOI: 10.3390/diagnostics10040202
6. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020;5(52):1-13. DOI: 10.1126/sciimmunol.abe0367
7. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021;371(6529). DOI: 10.1126/science.abf4063
8. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020;20(5):565-74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1). DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1
9. Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: Systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2020;370. DOI: 10.1136/bmj.m2516
10. FAQs on Testing for SARS-CoV-2 | FDA [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/faqs-testing-sars-cov-2#nolonger>



11. Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, Oteo J, Hernán MA, Pérez-Olmeda M, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet* 2020;396(10250):535-44. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31483-5
12. IDSA COVID-19 Antibody Testing Primer.
13. Mattiuzzo G, Bentley EM, Hassall M, Routley S. Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. 2020;(December):9-10. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403>
14. Beckman Coulter. Access SARS-CoV-2 IgG [Package insert]. Kraemer Blvd. Brea, CA; 2020.
15. Snibe. MAGLUMI 2019-nCoV IgG [Package insert]. Eiffestrasse, Hamburg, GE; 2020.
16. Menarini Diagnostics. TGS COVID-19 IgG [Package insert]. Corso Vittorio Emanuele II, Milano, IT; 2020.
17. Roche Diagnostics. Elecsys Anti-SARS-CoV-2 [Package insert]. Sandhofer Strasse, Mannheim, GE; 2020.
18. DiaSorin. LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG [Package insert]. Via Crescentino, Saluggia, IT; 2020.
19. Lippi G, Salvagno GL, Pegoraro M, Militello V, Caloi C, Peretti A, et al. Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(7):1156-9. DOI: 10.1515/cclm-2020-0473
20. CLSI. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. 3<sup>rd</sup> ed. Wayne, PA, USA; 2013.
21. Hörber S, Soldo J, Relker L, Jürgens S, Guther J, Peter S, et al. Evaluation of three fully-automated SARS-CoV-2 antibody assays. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(12):2113-20. DOI: 10.1515/cclm-2020-0975
22. Huyghe E, Jansens H, Matheeußen V, Hoffbauer I, Goossens H, Peeters B. Performance of three automated SARS-CoV-2 antibody assays and relevance of orthogonal testing algorithms. *Clin Chem Lab Med* 2021;59(2):411-9. DOI: 10.1515/cclm-2020-1378
23. Tré-Hardy M, Wilmet A, Beukinga I, Dogné JM, Douxfils J, Blairon L. Validation of a chemiluminescent assay for specific SARS-CoV-2 antibody. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(8):1357-64. DOI: 10.1515/cclm-2020-0594
24. Kohmer N, Westhaus S, Rühl C, Ciesek S, Rabenau HF. Brief clinical evaluation of six high-throughput SARS-CoV-2 IgG antibody assays. *J Clin Virol* 2020;129. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104480



## Original

# Priorización de variantes de exoma mediante un sistema automático que emplea términos HPO

## *Prioritization of exome variants through an automatic system using HPO terms*

José Miguel Lezana-Rosales<sup>1</sup>, Diego Tuñón-Le Poutel<sup>1</sup>, Juan Francisco Quesada-Espinosa<sup>1</sup>, Emma Soengas-Gonda<sup>2</sup>, Ana Arteche-López<sup>1</sup>, Carmen Palma-Milla<sup>1</sup>, Irene Gómez-Manjón<sup>1</sup>, María Isabel Álvarez-Mora<sup>1</sup>, Rubén Pérez-de la Fuente<sup>1</sup>, María Teresa Sánchez-Calvin<sup>1</sup>, María José Gómez-Rodríguez<sup>1</sup>, Marta Moreno García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. <sup>2</sup>Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

**Recibido:** 30/03/2020  
**Aceptado:** 08/07/2020

**Correspondencia:** Diego Tuñón-Le Poutel. Hospital Universitario 12 de Octubre. Avda. de Córdoba, s/n. 28041 Madrid  
e-mail: diegotunon@gmail.com

### Palabras clave:

Genética. Secuenciación masiva. Exoma.  
Fenotipo. Ontología de gen.

### RESUMEN

**Introducción:** la secuenciación del exoma completo (WES) representa en la actualidad el estudio de primera elección para diagnosticar molecularmente enfermedades genéticas probablemente monogénicas con elevada heterogeneidad genética, o que solapan fenotípicamente con otras enfermedades y por ello requieren analizar multitud de genes para llegar al diagnóstico. Mediante WES se identifican miles de variantes, cuyo número final depende del tamaño de captura empleado y *pipeline* bioinformático aplicado. Esto requiere implementar técnicas de filtrado y priorización: una posibilidad es emplear paneles virtuales de genes (WES subpanelado), pero en paneles amplios aparecen multitud de variantes, lo que requiere una evaluación pormenorizada por el analista. El uso de términos de ontología de fenotipo (HPO) permite filtrar las variantes a través de asociaciones HPO-gen y establecer un sistema de priorización. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un sistema de priorización automática de variantes empleando términos HPO.

*Autoría: José Miguel Lezana-Rosales y Diego Tuñón-Le Poutel figuran como primeros firmantes de este artículo.*

**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00077

Lezana-Rosales JM, Tuñón-Le Poutel D, Quesada-Espinosa JF, Soengas-Gonda E, Arteche-López A, Palma-Milla C, Gómez-Manjón I, Álvarez-Mora MI, Pérez-de la Fuente R, Sánchez-Calvin MT, Gómez-Rodríguez MJ, Moreno García M. Priorización de variantes de exoma mediante un sistema automático que emplea términos HPO. Rev Med Lab 2021;2(2):59-69

**Material y métodos:** reanálisis de 33 pacientes diagnosticados previamente por WES subpanelado empleando un sistema de priorización basado en términos HPO y en las características inherentes a las variantes detectadas.

**Resultados:** tras el reanálisis se determinó que las variantes que explicaban el fenotipo clínico se encontraban en las primeras posiciones de la lista de variantes priorizadas (media: 1,43; SD: 0,87).

**Conclusión:** el sistema de priorización desarrollado permite la detección de variantes asociadas a las patologías estudiadas de forma más eficiente que por WES subpanelado, al encontrarse las variantes relacionadas con fenotipo ordenadas según su potencial patogenicidad. Este sistema representaría, por tanto, el primer abordaje en el análisis de variantes genéticas de WES.

### Keywords:

Genetics. High-throughput nucleotide sequencing. Exome. Phenotype. Gene ontology.

## ABSTRACT

**Introduction:** whole exome sequencing (WES) currently represents the first-tier test for the diagnosis of genetic diseases that are probably monogenic with high genetic heterogeneity, or phenotypically overlapping with other diseases. Thus, they require the analysis of multiple genes to reach the diagnosis. Thousands of variants are identified by WES, the final number of which depends on the capture size, and bioinformatics pipeline used. This requires implementing filtering and prioritization techniques: one possibility is to use virtual gene panels (WES derived gene sub-panels), but in large panels many variants appear, which requires a detailed evaluation by the analyst. The use of human phenotype ontology (HPO) terms makes it possible to filter the variants through HPO-gene associations and establish a prioritization system. The objective of this work is the development of an automatic priority system of variants using HPO terms.

**Material and methods:** re-analysis of 33 patients previously diagnosed by WES derived gene sub-panels using a prioritization system based on HPO terms and the inherent characteristics of the detected variants.

**Results:** after re-analysis, it was determined that the variants that explained the clinical phenotype were in the first positions of the list of prioritized variants (mean: 1.43; SD: 0.87).

**Conclusion:** the developed prioritization system allows the detection of variants associated with the pathologies studied in a more efficient way than by WES derived gene sub-panels, since the variants related to phenotype are ordered according to their potential pathogenicity. This system would therefore represent the first approach in the analysis of genetic variants of WES.

## INTRODUCCIÓN

La secuenciación de nueva generación de ADN (*next-generation sequencing*, NGS) es una tecnología que, a diferencia de técnicas como la secuenciación Sanger, permite secuenciar en paralelo millones de fragmentos de ADN de una manera rápida y efectiva (1). La NGS permite el estudio de varios genes de manera simultánea mediante el uso de estrategias como los paneles de genes, la secuenciación de regiones codificantes e intrónicas flanqueantes de todos los genes o WES (*whole exome sequencing*) o el genoma completo (WGS). A día de hoy, hay trabajos publicados en la literatura científica que ponen de manifiesto que tan-

to el WES como el WGS son los estudios de primera elección en términos de coste-efectividad para el diagnóstico de enfermedades de etiología genética con fenotipos complejos o condiciones heterogéneas (2-4), aunque el estudio del WGS se circunscribe al uso en investigación en el artículo de Payne y cols. Sin embargo, la dificultad en la interpretación y el análisis del WGS hace que, generalmente, se estudie en aquellos pacientes sin diagnóstico por WES.

En el ámbito hospitalario, por tanto, la implementación del WES como técnica diagnóstica es cada día más frecuente. La ventaja del análisis de WES frente al análisis de paneles de genes cerrados radica en que puede llevarse a cabo un reanálisis bioinformático de

genes no incluidos en el estudio inicial, bien porque en el paciente han aparecido nuevas manifestaciones clínicas o bien porque posteriormente al estudio inicial otros genes se han asociado al fenotipo del paciente. Por el contrario, con el WES, la complejidad del procesamiento bioinformático aumenta, los requerimientos de espacio de almacenamiento son mayores, el análisis de los datos requiere un filtrado de variantes más eficiente y aumenta la posibilidad de encontrarse ante hallazgos incidentales.

Por tanto, identificar las variantes que explican el cuadro clínico del paciente estudiado, resulta un proceso de gran complejidad y es crítico el desarrollo de un adecuado método de filtrado y priorización de variantes.

La gran mayoría de los síndromes mendelianos humanos se han descrito en detalle en la base de datos de herencia mendeliana en el hombre (OMIM) y los sistemas jerárquicos basados en las descripciones clínicas de OMIM se han generado mediante minería de textos (proceso de análisis y derivación de información nueva a partir de textos) (5-7). Sin embargo, el análisis computacional de los datos contenidos en OMIM se encuentra limitado por la falta de un vocabulario estructurado y codificado que incluya anotaciones consistentes con relaciones bien definidas entre sí. Esta limitación motivó el desarrollo de la ontología del fenotipo humano (HPO), con el objetivo de describir las anomalías fenotípicas que caracterizan las enfermedades monogénicas humanas (8).

Esta ontología proporciona un vocabulario estandarizado de alteraciones fenotípicas en enfermedades humanas con base genética. Cada término ontológico describe una alteración (por ejemplo, el identificador *HP:0000256* se corresponde a macrocefalia). El sistema de ontología fenotípica HPO se está desarrollando actualmente utilizando la literatura médica, Orphanet, DECIPHER y OMIM. El proyecto HPO contiene actualmente más de 13.000 términos y más de 156.000 anotaciones a enfermedades hereditarias (9). Cada característica anotada puede tener como metadatos su edad típica de inicio y la frecuencia. Estos metadatos de anotación se pueden utilizar para mejorar la precisión de los algoritmos de coincidencia basados en HPO (10).

Como componente fundamental e integrador de la Iniciativa Monarch (11,12), HPO ha sido adoptado internacionalmente por numerosas organizaciones, tanto académicas como comerciales; estos incluyen el Proyecto 100.000 Genomas, el Programa y Red de Enfermedades No Diagnosticadas del National Institutes of Health, la Red Internacional de Enfermedades No Diagnosticadas (UDNI), RD-CONNECT, Solve RD y muchos otros (13,14).

La HPO ha alcanzado el estatus de recurso reconocido por el Consorcio Internacional de Investigación de Enfermedades Raras (*IRDiRC*) (15), ya que los conceptos que maneja son extremadamente valiosos para la integración, organización, búsqueda y análisis de datos, y está siendo utilizado por la Alianza Global para la

Genómica y la Salud (16). Estas bases de datos no solo contribuyen al descubrimiento de genes y al diagnóstico de los pacientes incluidos en las plataformas, sino que también proporcionan datos fuente para muchos desarrollos computacionales.

Teniendo todo esto en cuenta, la integración de los términos HPO en el análisis de datos procedentes de WES permitiría detectar variantes asociadas a las patologías estudiadas de forma más eficiente frente al estudio mediante WES subpanelado. Esto se debe a que las variantes relacionadas con el fenotipo del paciente se encontrarían priorizadas en las primeras posiciones de la tabla de variantes, atendiendo a las relaciones gen-fenotipo. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue determinar si el sistema de priorización desarrollado en nuestro centro, que emplea términos HPO y que también tiene en cuenta las características inherentes a cada variante, es efectivo a la hora de ordenar por posible patogenicidad las variantes genéticas detectadas mediante WES, facilitando el diagnóstico genético. Se trató, además, de ver si esto representa una ventaja frente al sistema de filtrado de variantes mediante WES subpanelado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Selección de pacientes

Se seleccionaron retrospectivamente 33 pacientes, en los cuales se habían identificado, mediante un estudio individualizado de WES subpanelado en el propio Servicio de Genética, variantes patogénicas y/o probablemente patogénicas asociadas a su cuadro clínico. En cuanto a la selección de los genes de los subpaneles analizados en estos pacientes se seleccionaron en base a consultas en bases de datos como OMIM, GeneReviews, DisGeNet, HGMD y PanelAPP, así como revisando la literatura científica.

Cabe decir, que el fenotipo de estos pacientes es variado, no se circunscribe a ningún grupo de patologías en concreto y son las enfermedades de herencia dominante o recesiva.

La clasificación de las variantes y diagnóstico genético se realizó por personal experto siguiendo los criterios establecidos por la American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (17). En algunos casos, y cuando fue posible, se llevó a cabo un estudio de segregación familiar para confirmar la patogenicidad de las variantes.

Todos los pacientes habían firmado el consentimiento informado para su estudio genético por parte del Servicio de Genética.

### Secuenciación

La extracción de ADN de sangre periférica en tubo EDTA de los probandos se llevó a cabo utilizando el kit de purificación de ADN en sangre *Maxwell (Pro-*

mega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de la muestra extraída se analizó mediante fluorimetría con el aparato *Qubit 4.0 fluorometer* (Invitrogen). La fragmentación del ADN genómico se realizó con el sonicador *M220 Focused-ultrasonicator*. La cuantificación y validación de la biblioteca genómica se realizó utilizando un *Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit 500rx* (Invitrogen) y un *Agilent High Sensitivity DNA Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). El ADN se capturó con el kit *IDT Exome Research Panel v1.0*, el cual abarca una región diana de 39 Mb que corresponde a 19,396 genes del genoma humano. El proceso de secuenciación se llevó a cabo en una plataforma *Illumina NextSeq 550 (2x75 pb paired-end)*.

### Pipeline bioinformático (KarMa)

El procesamiento de los datos procedentes del secuenciador se llevó a cabo a partir de un *pipeline* de desarrollo propio (*KarMa*), que cumple las especificaciones de validación establecidas por la Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists (AMP) (18).

En primer lugar, las secuencias en formato FASTQ de cada paciente fueron alineadas contra el genoma *hg19*, empleando una estrategia de doble alineamiento, usando *BWA-mem* (19) y *Bowtie2* (20). Se realizó también un doble genotipado de los archivos BAM resultantes con los programas *GATK* (21) y *VarDict* (22). Los archivos VCF obtenidos fueron anotados posteriormente con *AnnoVar* (23) y *VEP* (24), para dar lugar a un archivo tabulado con todas las variantes anotadas. Este archivo es el que posteriormente fue empleado como punto de inicio para el sistema de priorización.

Como parte de la rutina diagnóstica, y previamente al estudio mediante el sistema de priorización por HPO, se analizaron estos pacientes mediante WES subpanelado según la patología (Tabla I). La estrategia de filtrado de variantes considera los siguientes criterios que se tienen en cuenta en conjunto:

- *Frecuencia en poblaciones control* (1000G [25], ExAC [26], GnomAD [27]): menor del 3 %.
- *Frecuencia en base de datos propia* (120Var): para eliminación de variantes artefactuales.
- *Tipo de variante y posición*: se aplica un filtrado por frecuencia más estricto dependiendo de si la variante es *missense*, sinónima, truncante, si está en una región canónica de *splicing*, etc.
- *Alertas de los genotipadores*: se eliminan las variantes que no pasan los criterios de calidad establecidos por los genotipadores.
- *Combinaciones de alineadores/genotipadores con las que se ha detectado*: se aceptan solo ciertas combinaciones, aunque se permiten otras bajo ciertas premisas.
- *Frecuencia alélica*: al menos 20 % de frecuencia del alelo alternativo, aunque se baja el umbral ante ciertos parámetros de anotación de la variante.
- *Cobertura*: se establecen puntos de corte de cobertura mínimos aceptables, bajo ciertas premisas del resto de criterios.
- *Clasificación de la variante en base de datos ClinVar y HGMD*: se tiene en cuenta, independientemente del resto de criterios.

Se eliminan del análisis final del panel las variantes que no cumplen los criterios establecidos, al no considerarse candidatas a explicar el fenotipo. Las variantes que sí superaron los filtros se clasificaron según lo establecido por la ACMG.

### Asignación de términos HPO

A cada uno de los pacientes se le asignó un mínimo de 3 términos HPO relacionados con sus características fenotípicas. Para ello se consultó la historia clínica y, mediante el buscador de términos (<https://hpo.jax.org/app/>), se asignaron los términos HPO correspondientes. En este buscador, los términos están relacionados de forma jerárquica, por lo que, cuando fue posible, se tomó el término que con más precisión refleja lo descrito en la historia clínica del paciente; puede verse un ejemplo de este proceso en la figura 1.

Tabla I.

Paciente	Términos HPO	Panel	Genes panel	Genes HPO	Variantes filtradas
P1	HP:0001332, HP:0000729, HP:0002268, HP:0001250	Epilepsia Benigna del Lactante	7	1718	1
P2	HP:0006863, HP:0000965, HP:0000154, HP:0000047, HP:0005109, HP:0000729	Trastornos del Espectro Autista	293	787	22
P3	HP:0001644, HP:0025169, HP:0001653, HP:0005180, HP:0001659	Miocardopatía Ampliado	121	272	12
P4	HP:0006554, HP:0003256, HP:0001396, HP:0001511	Fallo Hepático	9	718	4
P5	HP:0003236, HP:0007340, HP:0005109	Miopatías General	205	348	23

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I (cont.)

Paciente	Términos HPO	Panel	Genes panel	Genes HPO	Variantes filtradas
P6	HP:0001249, HP:0000252, HP:0004322, HP:0000708	Discapacidad Intelectual	945	2548	57
P7	HP:0002612, HP:0000113, HP:0001409, HP:0001971, HP:0002040	Nefronoptosis y Multiquistososis Renal	45	136	2
P8	HP:0025356, HP:0000729, HP:0001273, HP:0000256, HP:0006482, HP:0001263	Discapacidad Intelectual	945	1816	51
P9	HP:0008689, HP:0004482, HP:0000325, HP:0000369, HP:0004322, HP:0011994, HP:0001642, HP:0001627	Rasopatías	28	1910	1
P10	HP:0001250, HP:0001270, HP:0100543, HP:0009729, HP:0002463, HP:0009720	Esclerosis Tuberosa	3	1925	1
P11	HP:0000044, HP:0000786, HP:0000938, HP:0010311	Hipogonadismo Hipogonadotropo	25	342	1
P12	HP:0025615, HP:0009789, HP:0001369, HP:0002251	Enfermedad de Hirschprung	12	318	2
P13	HP:0001263, HP:0001212, HP:0009882, HP:0001388, HP:0004322	Síndrome de Ehlers-Danlos e Hiperlaxitud	54	1965	4
P14	HP:0001263, HP:0004322, HP:0004325, HP:0001642, HP:0001212, HP:0000378, HP:0009909	Discapacidad Intelectual	945	2264	136
P15	HP:0003236, HP:0012548, HP:0001397, HP:0003198	Miopatías General	205	449	32
P16	HP:0001670, HP:0001279, HP:0004904, HP:0001639	Miocardopatía Hipertrófica	118	322	9
P17	HP:0009062, HP:0002779, HP:0000105, HP:0000081, HP:0001723, HP:0002652	Discapacidad Intelectual	945	249	120
P18	HP:0000729, HP:0001249, HP:0002463, HP:0001250, HP:0000256	Trastornos del Espectro Autista	293	2223	33
P19	HP:0011344, HP:0001250, HP:0002490, HP:0001510, HP:0000252, HP:0001290	Discapacidad Intelectual Ampliado	1944	2475	251
P20	HP:0000252, HP:0001320, HP:0001263, HP:0000243, HP:0000308, HP:0001770, HP:0012758, HP:0001250	Discapacidad Intelectual Ampliado	1944	2336	347
P21	HP:0001596, HP:0001007, HP:0000141, HP:0002514, HP:0001263, HP:0001250, HP:0000107, HP:0002751	Esclerosis Tuberosa	3	2273	1
P22	HP:0001634, HP:0001083, HP:0000767, HP:0000098, HP:0001488	Marfan y Aortopatías	34	456	7
P23	HP:0004440, HP:0011315, HP:0011316, HP:0001357, HP:0030867	Craneosinostosis	56	86	13
P24	HP:0001071, HP:0001653, HP:0001714, HP:0001712, HP:0001667	Miocardopatía Hipertrófica	118	198	10
P25	HP:0012265, HP:0002110, HP:0012050, HP:0002878, HP:0001935	Bronquiectasias y Discinesia Ciliar Primaria	67	293	47
P26	HP:0003530, HP:0001332, HP:0007105	Aciduria Glutárica	5	409	3
P27	HP:0001263, HP:0004322, HP:0000243, HP:0000347	Síndrome de Rubinstein-Taybi y Diagnóstico Diferencial	8	2016	2

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I (cont.)					
Paciente	Términos HPO	Panel	Genes panel	Genes HPO	Variantes filtradas
P28	HP:0002474, HP:0000174, HP:0000290, HP:0000272, HP:0000689, HP:0008936, HP:0009062	Discapacidad Intelectual	945	1380	79
P29	HP:0002123, HP:0001249, HP:0000708	Encefalopatía Epiléptica Ampliado	187	2160	15
P30	HP:0001875, HP:0001935, HP:0001873, HP:0002037	Neutropenia Congénita y Vasculitis	60	404	6
P31	HP:0000252, HP:0001250, HP:0001263, HP:0008936, HP:0002463, HP:0001999, HP:0000286, HP:0000494	Trastorno del Espectro Autista Sindrómico	181	2354	16
P32	HP:0004322, HP:0000534, HP:0001263	Rasopatías*	28	2002	1
P33	HP:0003128, HP:0003348, HP:0000816	Acidosis Láctica	110	184	12

Términos HPO asignados a cada paciente tras evaluación de la historia clínica. Paneles aplicados a cada paciente previamente al reanálisis y número de genes evaluados en cada uno de ellos.

**Historia actual:**  
Remitido a la edad de 15 años y 6 meses, [...].  
Acude para valoración por presentar:  
- **Discapacidad Intelectual** acude a centro de educación especial, desde el curso 2013-2014.  
- **Trastorno de Conducta** seguido en psiquiatría; [...]  
- **Talla baja** desde siempre [...]

**Exploración física:**  
Buen estado general, impresiona de **microcefalia**. No dismorfias craneofaciales significativas. Cuello normal. Tórax normal, abdomen normal. Auscultación cardiopulmonar normal. Miembros superiores e inferiores normales, salvo limitación leve a la extensión de ambos codos. Pies normales. [...]

HP:0001249 (Intellectual disability)

HP:0000708 (Behavioral abnormality)

HP:0004322 (Short stature)

HP:0000252 (Microcephaly)

**Figura 1** – Fragmento de historia clínica. Se seleccionan aquellos rasgos clínicos que tienen su traducción en forma de término de la base de datos HPO.

## Desarrollo del sistema de priorización

Inicialmente, se descargó el archivo de relación término HPO-gen(es) del repositorio de HPO ([http://compbio.charite.de/jenkins/job/hpo.annotations/lastSuccessfulBuild/artifact/util/annotation/phenotype\\_to\\_genes.txt](http://compbio.charite.de/jenkins/job/hpo.annotations/lastSuccessfulBuild/artifact/util/annotation/phenotype_to_genes.txt)). Se identificaron 4295 genes con asociación conocida con algún término HPO. Se descargó también del repositorio el archivo que relaciona jerárquicamente entre sí los términos HPO (<https://raw.githubusercontent.com/obophenotype/human-phenotype-ontology/master/hp.obo>). Cabe destacar que en este segundo archivo no se detallan todas las relaciones jerárquicas entre términos, ya que cada término solo se relaciona con su inmediatamente superior. Teniendo en cuenta lo anterior, se diseñó el árbol jerárquico de todas las relaciones taxonómicas de todos los términos HPO. El resultado fue un archivo de texto plano como el que se ve en la figura 2. El término más a la derecha es más específico, y a su izquierda están los términos padres menos específicos.

Adicionalmente, se adjudicó una puntuación a cada variante identificada, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

1. **Número de los términos HPO utilizados que están relacionados con el gen en el que se localiza la variante** (Fig. 3): los términos más específicos se ponderaron más en la puntuación que los más generales.
2. **Tipo de variante**: mayor puntuación para las variantes radicales y en los sitios canónicos de *splicing*, seguido de las variantes de cambio de sentido y, por último, las sinónimas e intrónicas profundas.
3. **Predicciones de patogenicidad**: mayor puntuación cuanto mayor es el número de predictores de patogenicidad *in silico* que apoyan un efecto deletéreo de la variante genética.
4. **Frecuencia global de la variante en la base de datos poblacional ExAC (26)**: más puntuación a las variantes menos frecuentes en esta base de datos.

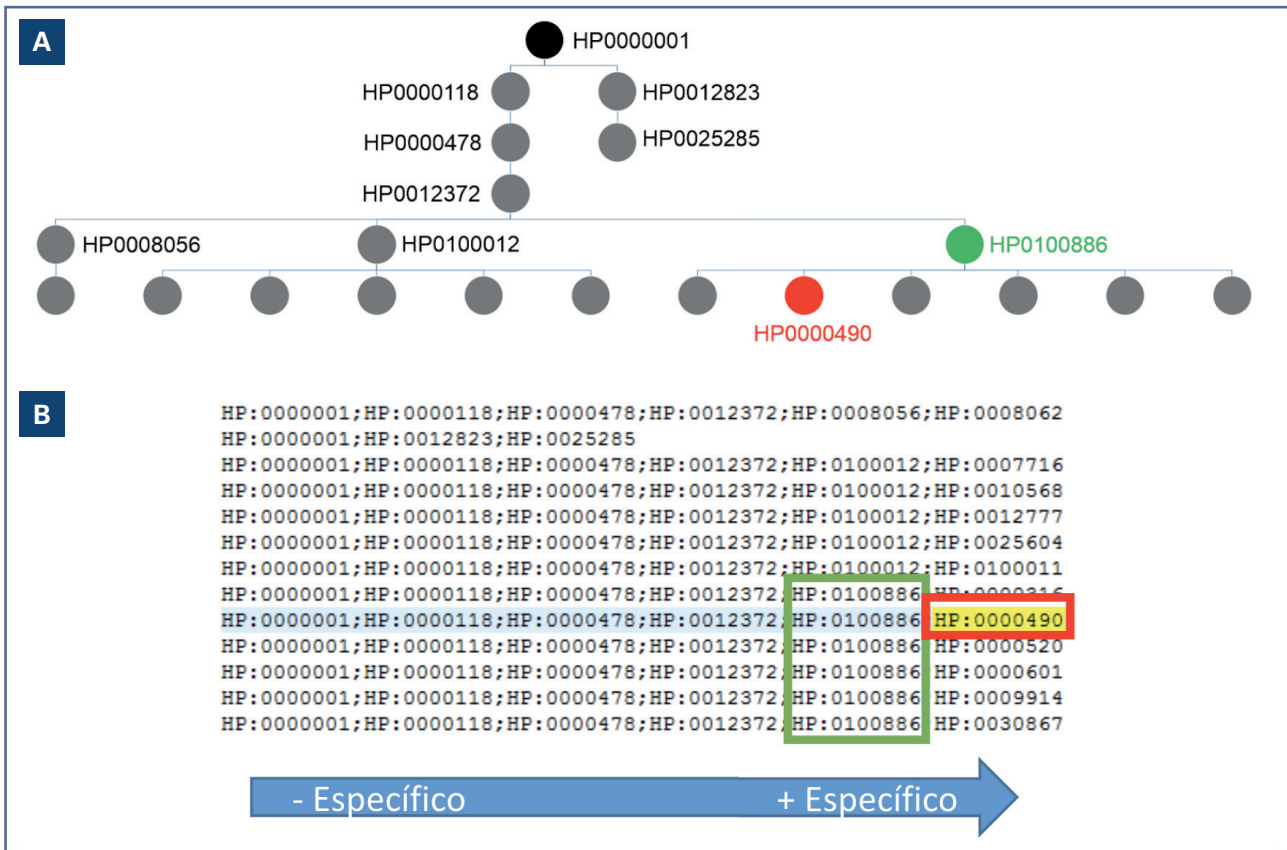


Figura 2 – A. Ejemplo de relación jerárquica de términos HPO inferida a partir del archivo original de relaciones. B. Fragmento de texto plano del que deriva la recreación taxonómica de la figura superior.

HP:0001814	Deep-set nails	3265	HRAS
HP:0001814	Deep-set nails	2146	EZH2
HP:0001814	Deep-set nails	64324	NSD1
HP:0001814	Deep-set nails	8726	EED
HP:0001814	Deep-set nails	23512	SUZ12
HP:0000490	Deeply set eye	1281	COL3A1
HP:0000490	Deeply set eye	84992	PIGY
HP:0000490	Deeply set eye	6913	TBX15
HP:0000490	Deeply set eye	2563	GABRD
HP:0000490	Deeply set eye	91147	TMEM67
HP:0000490	Deeply set eye	2314	FLII
HP:0000490	Deeply set eye	4621	MYH3
HP:0000490	Deeply set eye	6925	TCF4

Figura 3 – Extracto de relación término HPO/genes. Cada término HPO (primera columna) que refiere a una característica fenotípica (segunda columna) se asocia con ciertos genes (cuarta columna). Los números en la tercera columna corresponden al identificador de los genes.

Teniendo en cuenta lo anterior, se determinaron 4 puntuaciones diferentes:

- **Puntuación absoluta:** se generó solo teniendo en cuenta el porcentaje de términos HPO que se relaciona con cada gen asociado a la variante.

- **Puntuación absoluta filtrada:** como la anterior, pero eliminando variantes artefactuales teniendo en cuenta su aparición reiterada, sin corresponder a posiciones polimórficas, en las diferentes muestras. Para ello se empleó la base de datos de variantes 12OVar.
- **Puntuación combinada:** se generó teniendo en cuenta el porcentaje de términos HPO (dando más peso si los términos son más específicos), el tipo de variante, los predictores y la frecuencia global de la variante en ExAC.
- **Puntuación combinada filtrada:** como el anterior, pero eliminando variantes artefactuales.

## RESULTADOS

### Paneles empleados en el análisis previo

Los paneles virtuales para el diagnóstico de los pacientes, previo a la priorización por HPO incluyeron 329,94 genes como promedio (SD = 525,27). El número de variantes promedio por panel tras la aplicación del filtrado de *KarMa*, sin aplicar priorización, fue de 40,03 (SD = 75,44). Los paneles empleados y el número de variantes consideradas para el análisis se detallan en la tabla I.



### Términos HPO por paciente

Tras la revisión de la historia clínica, se asignaron 5,06 términos HPO de media por paciente (SD = 1,56). Los términos empleados en cada paciente se detallan en la tabla I.

### Orden de las variantes causales en cada paciente

Las variantes causales identificadas en el análisis previo de los pacientes y su clasificación se ilustran en la tabla II.

Como parte de este reanálisis, previamente a la priorización, se filtraron las variantes de potencial bajo impacto considerando diferentes criterios explicados previamente en la sección de materiales y métodos.

A continuación, se realizó la priorización según lo detallado en el apartado del desarrollo del sistema de priorización en material y métodos. Las posiciones alcanzadas por las variantes tras la priorización fue la siguiente:

- *Score* absoluto: media = 7,81; SD = 11,86
- *Score* absoluto filtrado: media = 4,47; SD = 7,47
- *Score* combinado: media = 3,125; SD = 5,42
- *Score* combinado filtrado: media = 1,43; SD = 0,87

En todos los pacientes, salvo un paciente (P3), la posición de la variante causal ocupaba en todos los casos las primeras posiciones de la lista (Tabla II). El caso del P3 es debido a que el gen cuya variante explicaba el fenotipo no estaba presente en la lista de asociación original de término HPO-gen. De manera gráfica, los resultados anteriores se pueden representar en forma de diagrama de caja (Fig. 4).

Tabla II.

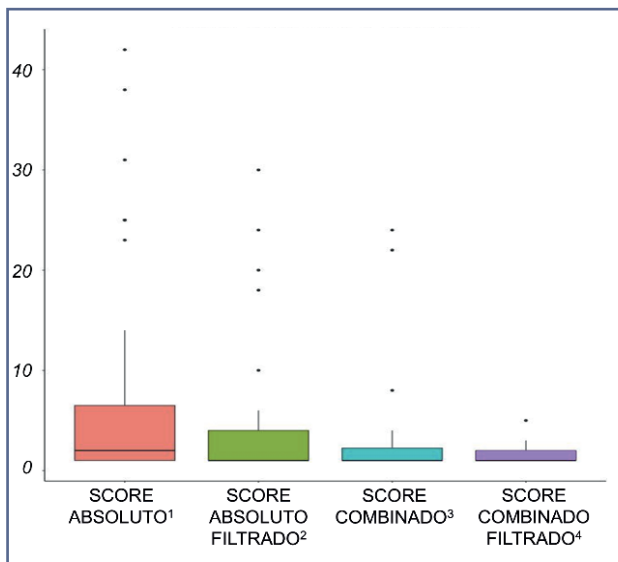
Paciente	Gen	Variante(s) causal(es)	dbSNP	Clasificación según ACMG	Score absoluto	Score absoluto filtrado	Score combinado	Score combinado filtrado
P1	<i>PRRT2</i>	NM_145239.2:c.649dupC; p.(Arg217Profs*8)	rs587778771	P	1	1	1	1
P2	<i>MED13L</i>	NM_015335.4:c.2110C>T; p.(Q704*)	-	P	2	2	2	2
P3	<i>EMD</i>	NM_000117.2:c.77T>C; p.(V26A)	rs727505029	P	-	-	-	-
P4	<i>LARS1</i>	NM_020117.10:c.1237C>T; p.(R413*) / NM_020117.10:c.1292T>A; p.(V431D)	rs773819736 / rs150429680	P / P	4	1	4	1
P5	<i>FHL1</i>	NM_001159702.2:c.486C>G; p.(C162W)	rs377693754	PP	1	1	1	1
P6	<i>KMT2A</i>	NM_001197104.1:c.3461G>A; p.(R1154Q)	-	PP	4	4	1	1
P7	<i>PKHD1</i>	NM_138694.3:c.5485C>T; p.(Q1829*) / NM_138694.3:NM_138694.3:c.10909C>T; p.(p.R3637C)	rs774759689 / rs141349745	P / VSCI	1 y 2	1 y 2	1	1
P8	<i>H1-4</i>	NM_005321.2:c.446_447insT; p.K149Nfs*46	-	P	25	3	20	2
P9	<i>PTPN11</i>	NM_002834.4:c.922A>G; p.N308D	rs28933386	P	1	1	1	1
P10	<i>TSC2</i>	NM_000548.4:c.1831C>G; p.R611G	rs45469298	P	2	2	1	1
P11	<i>FGFR1</i>	NM_023110.2:c.830G>T; p.(C277F)	-	P	1	1	1	1
P12	<i>RET</i>	NM_020975.4:c.1711G>A; p.D571N	rs750958377	PP	25	22	6	3
P13	<i>ARID1B</i>	NM_020732.3:c.2248C>T; p.R750*	rs797045272	P	1	1	1	1

(Continúa en la página siguiente)

Tabla II (cont.)

Paciente	Gen	Variante(s) causal(es)	dbSNP	Clasificación según ACMG	Score absoluto	Score absoluto filtrado	Score combinado	Score combinado filtrado
P14	ZEB2	NM_014795.3:c.1027C>T; p.R343*	rs786204815	P	3	1	2	1
P15	RYS1	NM_000540.2:c.7038_7040del; p.(E2348del)	rs121918596	P	4	2	3	2
P16	MYBPC3	NM_000256.3:c.2308+1G>A	rs112738974	P	1	1	1	1
P17	ACTB	NM_001101.3:c.269_271del; p.(F90del)	-	P	8	4	6	3
P18	KMT2E	NM_018682.3:c.71+1G>T	-	P	31	3	24	2
P19	NEXMIF	NM_001008537.2:c.2692C>T; p.(Q898*)	-	P	6	1	4	1
P20	EFTUD2	NM_004247.3:c.2405dupA; p.(H802Qfs*83)	-	P	2	2	2	2
P21	TSC2	NM_000548.4:c.4977_4978insA; p.(G1660Rfs*44)	-	PP	2	1	2	1
P22	FBN1	NM_000138.4:c.364C>T; p.(R122C)	rs137854467	P	1	1	1	1
P23	FGFR3	NM_001163213.1:c.749C>G; p.(P250R)	rs4647924	P	1	1	1	1
P24	GLA	NM_000169.2:c.713G>A; p.(S238N)	rs730880450	P	1	1	1	1
P25	TAP2	NM_001290043.1:c.404_405del; p.K135fs / NM_018833.2:c.404_405del; p.K135Sfs*31	-	P	42	24	2	1
P26	GCDH	NM_000159.3:c.395G>A; p.(R132Q) / NM_000159.3:c.1204C>T; p.(R402W)	rs200639270 / rs121434369	P / P	1 y 2	1 y 2	1	1
P27	CREBBP	NM_004380.2:c.3610-2A>G	-	P	38	2	30	1
P28	ANKRD11	NM_001256183.1:c.2398_2401del; p.E800Nfs*61	rs797045027	P	14	3	10	2
P29	KCNB1	NM_004975.3:c.1041C>G; p.(S347R)	-	P	1	1	1	1
P30	SRP54	NM_003136.3:c.342_344del; p.(T117del)	-	P	1	1	1	1
P31	FOXG1	NM_005249.4:c.553A>G; p.S185G	-	PP	23	8	18	5
P32*	DPH1	NM_001383.4:c.229+1G>A / NM_001383.4:c.15_29del; p.Met6_Val10del	-	P / VSCI	1 y 2	1 y 2	1	1
P33	PDHA1	NM_001173454.1:c.620C>T; p.Ala207Val	rs863224150	P	1	1	1	1

Variante(s) causal(es) detectada(s) en los pacientes previamente a la reevaluación con sistema de priorización y posición según los diferentes *scores*. Las variantes se clasificaron según los criterios establecidos por la ACMG. P: patogénica; PP: probablemente patogénica; VSCI: variante de significado clínico incierto. \*En el paciente P32 la variante causal se detectó en un gen que no estaba incluido en el panel.



**Figura 4** – Distribución de posiciones de las variantes causales tras aplicar priorizaciones según los diferentes scores.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se ha empleado un sistema de priorización para ordenar las variantes generadas en estudios de exoma, y se presentan unos resultados prometedores, ya que en el 69,69 % de los casos la variante o variantes causales estaban en la primera posición de la lista de variantes y en el 93,93 % de los casos estaban dentro de las tres primeras posiciones. Esto, como se discutirá más adelante, supone una ventaja a la hora de abordar los estudios genéticos de WES.

En el contexto del estudio que se presenta, hay trabajos como los presentados por Jezela-Stanek y cols. (28), en el cual se emplea una estrategia basada en términos HPO, obteniendo rendimientos diagnósticos del 38 %, pero no emplean una comparación respecto a un abordaje de WES subpanelado ni cotejan cómo quedan las variantes causales en una lista priorizada, como sí se hace en el presente estudio. También hay iniciativas como Exomiser (29) que generan excelentes resultados en la priorización de variantes: en una evaluación independiente con 134 exomas (30) los resultados obtenidos con la configuración más favorable fueron algo inferiores (media = 2,1; SD = 5) a los presentados en este trabajo (media = 1,43; SD = 0,87).

En cualquier caso, el estudio del WES sin ningún tipo de filtrado por genes candidatos (ya sea por paneles WES subpanelado o priorizando variantes empleando términos HPO) y solo atendiendo a tipología de las variantes (tipo de cambio, frecuencias poblacionales, predictores de patogenicidad, etc.) es más complejo y requiere mayor tiempo de evaluación. Cabe indicar además, en relación con el estudio mediante WES subpanelado, que este implica tener que actualizar los paneles con relativa frecuencia y, si los paneles son muy

extensos, el número de variantes a evaluar crece dificultando el análisis. Por tanto, a nivel práctico, resulta más sencillo actualizar periódicamente los archivos de relaciones gen-término HPO y jerarquía de HPO, que actualizar cientos de paneles.

Una ventaja sustancial de este sistema de priorización es el ahorro de tiempo de análisis por parte del personal experto en diagnóstico genético, ya que evaluar las primeras variantes, en la mayoría de los casos, sería suficiente para diferenciar aquellas variantes que son verdaderamente candidatas a las que no lo son. Sin embargo, hay que tener en cuenta una limitación que se ha puesto de manifiesto en el trabajo, la cual ocurre cuando las relaciones gen-HPO no están explicitadas en la lista de asociación original de término HPO-gen (paciente P3). Es por ello que, pese a que este sistema se demuestra eficaz a la hora de establecer el diagnóstico molecular de los pacientes, como se ha podido comprobar, ha de emplearse una segunda comprobación de las variantes mediante WES subpanelado cuando el resultado no sea concluyente. Por el contrario, en pacientes como el P32, el diagnóstico molecular no se habría alcanzado de no ser por el empleo del sistema de priorización, ya que originalmente el gen donde se encontraba la variante causal afectaba a un gen no incluido en el panel.

Cabe señalar que la cohorte de pacientes empleada en el trabajo es limitada en cuanto a su número, aunque los resultados obtenidos apoyan la eficacia del sistema de priorización desarrollado, incluso ante estudios de etiología genética diversa. En un futuro, cuando se disponga de un número mayor de pacientes, se podrían refinar los parámetros empleados para puntuar las variantes y establecer a partir de qué número de términos HPO se obtienen mejores resultados de priorización. Al respecto de los términos HPO dependería, en todo caso, de la especificidad del propio término y cuán complejo es el fenotipo de cada paciente. Hay que destacar que este sistema de priorización podría solventar este problema en cuanto a que se aplica una ponderación en la puntuación teniendo en cuenta si el término es más o menos generalista.

Con vistas a la mayor automatización, es de sumo interés el desarrollo de un "lector automático" de historias clínicas que extraigan todos los términos HPO posibles. Como alternativa a esto, podría ser una buena praxis comenzar a codificar las historias clínicas con estos términos HPO, ya que estandarizar el fenotipo de los pacientes mediante el uso de estos términos permite su explotación para múltiples fines, más allá del empleado en este trabajo.

En conclusión, hemos desarrollado un sistema automático de priorización de variantes que emplea términos HPO, que por su eficiencia permite usarse como primer abordaje para el diagnóstico molecular de enfermedades monogénicas, especialmente en contextos de enfermedades con elevada heterogeneidad genética. La integración de este sistema en un *pipeline* bioinformático de análisis de variantes genéticas reduciría el tiempo de respuesta de los procesos diagnósticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009;55:641-58. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112789
- Stark Z, Schofield D, Alam K, Wilson W, Mupfeki N, Macciocca J, et al. Prospective comparison of the cost-effectiveness of clinical whole-exome sequencing with that of usual care overwhelmingly supports early use and reimbursement. *Genet Med* 2017;19(8):867-74. DOI: 10.1038/gim.2016.221
- Tan TY, Dillon OJ, Stark Z, Schofield D, Alam K, Shrestha R, et al. Diagnostic impact and cost-effectiveness of whole-exome sequencing for ambulant children with suspected monogenic conditions. *JAMA Pediatr* 2017;171(9):855-62. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2017.1755
- Payne K, Gavan SP, Wright SJ, Thompson AJ. Cost-effectiveness analyses of genetic and genomic diagnostic tests. *Nat Rev Genet* 2018;19(4):235-46. DOI: 10.1038/nrg.2017.108
- Masseroli M, Galati O, Manzotti M, Gibert K, Pinciroli F. Inherited disorder phenotypes: controlled annotation and statistical analysis for knowledge mining from gene lists. *BMC Bioinformatics* 2005;6(Suppl 4):S18. DOI: 10.1186/1471-2105-6-S4-S18
- Bajdik CD, Kuo B, Rusaw S, Jones S, Brooks-Wilson A. CGMIM: automated text-mining of Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) to identify genetically-associated cancers and candidate genes. *BMC Bioinformatics* 2005;6:78. DOI: 10.1186/1471-2105-6-78
- van Driel MA, Bruggeman J, Vriend G, Brunner HG, Leunissen JAM. A text-mining analysis of the human phenome. *Eur J Hum Genet* 2006;14(5):535-42. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201585
- Robinson PN, Köhler S, Bauer S, Seelow D, Horn D, Mundlos S. The Human Phenotype Ontology: a tool for annotating and analyzing human hereditary disease. *Am J Hum Genet* 2008;83(5):610-5. DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.09.017
- Köhler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen JOB, Danis D, Gouridine JP, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D1018-27. DOI: 10.1093/database/bay026
- Köhler S. Improved ontology-based similarity calculations using a study-wise annotation model. *Database* [Internet]. 2018 Jan 1;2018. Available from: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bay026/4953405>
- Mungall CJ, Washington NL, Nguyen-Xuan J, Condit C, Smedley D, Köhler S, et al. Use of model organism and disease databases to support matchmaking for human disease gene discovery. *Hum Mutat* 2015;36(10):979-84. DOI: 10.1002/humu.22857
- Mungall CJ, McMurry JA, Köhler S, Balhoff JP, Borromeo C, Brush M, et al. The Monarch Initiative: an integrative data and analytic platform connecting phenotypes to genotypes across species. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):D712-22. DOI: 10.1093/nar/gkw1128
- Ramoni RB, Mulvihill JJ, Adams DR, Allard P, Ashley EA, Bernstein JA, et al. The Undiagnosed Diseases Network: Accelerating Discovery about Health and Disease. *Am J Hum Genet* 2017;100(2):185-92.
- Taruscio D, Groft SC, Cederroth H, Melegh B, Lasko P, Kosaki K, et al. Undiagnosed Diseases Network International (UDNI): White paper for global actions to meet patient needs. *Mol Genet Metab* 2015;116(4):223-5. DOI: 10.1016/j.ymgme.2015.11.003
- Lochmüller H, Torrent I, Farnell J, Le Cam Y, Jonker AH, Lau LP, Baynam G, et al. The International Rare Diseases Research Consortium: Policies and Guidelines to maximize impact. *Eur J Hum Genet* 2017;25(12):1293-302. DOI: 10.1038/s41431-017-0008-z
- Boycott KM, Rath A, Chong JX, Hartley T, Alkuraya FS, Baynam G, et al. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *Am J Hum Genet* 2017;100(5):695-705. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.04.003
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-24. DOI: 10.1038/gim.2015.30
- Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, et al. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2018;20(1):4-27. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.11.003
- Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. 2013 Mar 16 [cited 2016 Mar 7];3. Available from: <http://arxiv.org/abs/1303.3997>
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;9(4):357-9. DOI: 10.1038/nmeth.1923
- Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinforma* 2013;(Suppl.43). DOI: 10.1002/0471250953.bi1110s43
- Lai Z, Markovets A, Ahdesmaki M, Chapman B, Hofmann O, Mcewen R, et al. VarDict: A novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res* 2016;44(11):108. DOI: 10.1093/nar/gkw227
- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010;38(16):e164. DOI: 10.1093/nar/gkq603
- McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 2016;17(1):122. DOI: 10.1186/s13059-016-0974-4
- Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526(7571):68-74. DOI: 10.1038/nature15393
- Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, et al. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):D840-5. DOI: 10.1093/nar/gkw971
- Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020;581(7809):434-43. DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7
- Jezela-Stanek A, Ciara E, Jurkiewicz D, Kucharczyk M, J drzejowska M, Chrzanoska KH, et al. The phenotype-driven computational analysis yields clinical diagnosis for patients with atypical manifestations of known intellectual disability syndromes. *Mol Genet Genomic Med* 2020;8(9). DOI: 10.1002/mgg3.1263
- Robinson PN, Kohler S, Oellrich A, Wang K, Mungall CJ, Lewis SE, et al. Improved exome prioritization of disease genes through cross-species phenotype comparison. *Genome Res* 2014;24(2):340-8. DOI: 10.1101/gr.160325.113
- Cipriani V, Pontikos N, Arno G, Sergouniotis PI, Lenassi E, Thawong P, et al. An Improved Phenotype-Driven Tool for Rare Mendelian Variant Prioritization: Benchmarking Exomiser on Real Patient Whole-Exome Data. *Genes (Basel)* 2020;11(4):460. DOI: 10.3390/genes11040460



## Evaluación técnica/Equipos

# Estudio de la interferencia producida por la hemólisis en la medición de distintos constituyentes bioquímicos en el analizador Atellica® Solution (Siemens Healthineers)

## *Evaluation of the interference produced by hemolysis in the measurement of different biochemical constituents in the Atellica® Solution analyzer (Siemens Healthineers)*

Yaiza Fernández Verduras, María Jesús Ruiz Álvarez, Marta Barrionuevo González, Belén Beteré Cubillo, Alba Antón Cornejo, José Manuel Gasalla Herráiz

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares, Madrid

**Recibido:** 19/01/2021  
**Aceptado:** 10/06/2021

**Correspondencia:** Yaiza Fernández Verduras. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Carretera Alcalá-Meco, s/n. 28850 Alcalá de Henares, Madrid  
e-mail: yaizafernandezverduras@gmail.com

### Palabras clave:

Interferencia. Hemólisis. Laboratorio clínico.

### RESUMEN

Uno de los efectos preanalíticos más frecuentes en el laboratorio clínico es la hemólisis. Su presencia produce un error en la determinación de diferentes constituyentes bioquímicos. La técnica de extracción o las condiciones de transporte de la muestra pueden provocar su aparición. El objetivo del estudio es la verificación del índice hemolítico (índice-H) que genera el analizador Atellica® Solution en 32 constituyentes bioquímicos. Este estudio será válido para detectar y cuantificar dicha interferencia, con el fin de conseguir resultados fiables.

*Financiación: las fuentes de financiación no han tenido participación en el diseño del estudio, en la colección, el análisis o la interpretación de datos, en la redacción del manuscrito o en la decisión de enviarlo para su publicación.*

*Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.*

DOI: 10.20960/revmedlab.00065

Fernández Verduras Y, Ruiz Álvarez MJ, Barrionuevo González M, Beteré Cubillo B, Antón Cornejo A, Gasalla Herráiz JM. Estudio de la interferencia producida por la hemólisis en la medición de distintos constituyentes bioquímicos en el analizador Atellica® Solution (Siemens Healthineers). Rev Med Lab 2021;2(2):70-76

### Keywords:

Interference. Hemolysis. Clinical laboratory services.

### ABSTRACT

One of the most common preanalytical effects in the clinical laboratory is hemolysis. Its presence produces an error in the determination of different biochemical constituents. The extraction technique or the transport and preparation can cause hemolysis. The objective of the study is to evaluate by the hemolytic index, the interference produced by hemoglobin in 32 biochemical constituents using the Atellica® Solution analyzer. This study will be used to detect and quantify such interference, in order to achieve reliable and accurate results.

## INTRODUCCIÓN

La hemólisis junto con la ictericia y la lipemia son denominadas interferencias endógenas. Estas se deben a constituyentes presentes de forma natural en la sangre, pudiendo causar un sesgo significativo en la medición de la magnitud biológica de interés (1).

La hemólisis es el proceso de destrucción de los hematíes, en el cual el contenido intraeritrocitario es liberado al plasma alterando su composición. La hemoglobina (Hb) tiene su banda de absorción característica entre 500-600 nm, aunque su espectro de absorción comienza alrededor de 340 nm, por lo que puede interferir directamente en la medición colorimétrica de diferentes magnitudes bioquímicas, afectando así a la concentración de los constituyentes medidos en este intervalo de longitud de onda.

La hemólisis de las muestras recibidas en los laboratorios clínicos puede generar resultados erróneos en muchas de las determinaciones habituales, repercutiendo negativamente en el paciente y en las decisiones clínicas (2).

Ante la incorporación de nuevos analizadores en el laboratorio, es competencia del fabricante proporcionar un estudio de interferencias según el reglamento (UE) 2017/746. La guía del CLSI, *Interference Testing in Clinical Chemistry (CLSI EP07-A247)*, es la principal fuente de estandarización para la evaluación de las interferencias por parte de los proveedores de equipos de laboratorios. Es recomendable que cada laboratorio verifique la información que los proveedores suministran respecto a las interferencias por hemólisis (3-5).

Estudios publicados sobre significación de la hemólisis utilizan criterios de error sistemático o imprecisión deseable, basados en estudios de variabilidad biológica (2).

El objetivo de nuestro estudio es la verificación del índice hemolítico (índice-H) con el fin de obtener resultados precisos y veraces relacionados con el estado de salud del paciente para un correcto diagnóstico y manejo del mismo (2-4).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Instrumentación y reactivos

Se investigaron 32 constituyentes bioquímicos, determinados en un analizador Atellica® Solution (Siemens Healthineers; Erlangen, Germany). La estimación del índice-H se realiza de forma automática mediante la comparación de la absorbancia de la muestra a varias longitudes de ondas simultáneas (desde 365-645 nm), cuantificadas mediante un fotómetro de 4 canales que mide los índices séricos de hemólisis, lipemia e ictericia. Las medidas se hacen por triplicado para cada índice previa realización de un blanco con agua destilada. Así se genera un índice hemolítico (índice-H), que es una medida semicuantitativa del grado de esta interferencia (6).

### Procedimiento

El estudio se llevó a cabo siguiendo el protocolo de la Sociedad Española de Medicina del Laboratorio (SEQC-ML), "Procedimiento para el estudio de la interferencia por hemólisis, bilirrubina y turbidez y para la verificación de los índices de hemólisis, ictericia y lipemia" (2013) (7).

### Preparación del hemolizado y sueros base con y sin interferente

La hemoglobina fue añadida en forma de un hemolizado de eritrocitos preparado por disrupción osmótica con agua destilada según el procedimiento de Meites recomendado por la SEQC-ML (7).

Se preparó un hemolizado a partir de muestras de sangre completa obtenidas por venopunción en tubos heparinizados con una concentración de Hb de 1510 mg/dL, y un suero base con una mezcla de sueros de pacientes sin interferentes conocidos, con concentraciones séricas próximas a los valores de decisión clínica.

A partir del hemolizado y del suero base se prepararon 2 sueros, uno sin interferente y otro con interferente.

Suero sin interferente (s/i): 9 mL de suero base + 1 mL de agua destilada

Suero con interferente (c/i): 9 mL de suero base + 1 mL de hemolizado

En la tabla I se muestran las diluciones seriadas realizadas entre la mezcla sin hemolizado y la mezcla con hemolizado para conseguir varios grados de hemólisis.

En la tabla II se muestra la concentración de Hb en cada una de las diluciones realizadas y el índice-H generado por el analizador al que corresponde dicha concentración de Hb.

### Medición de cada constituyente en las diluciones

Se midió la concentración de los 32 constituyentes en cada una de las 8 diluciones con distinto grado de hemólisis. Los análisis se realizaron, por duplicado, de forma aleatoria y en la misma serie analítica. A medida que la concentración de Hb va aumentando en cada una de las diluciones, se observa, en aquellos constituyentes afectados por la hemólisis, cómo varía su concentración (Tabla III). Además, esta medición también nos permite analizar cómo afecta el interferente en cada una de las magnitudes, obteniendo el grado de interferencia y el índice-H proporcionado por el analizador, como se muestra en la tabla IV.

### Evaluación de las interferencias

Las interferencias se compararon de acuerdo con las especificaciones de calidad analítica establecidas en nuestro laboratorio derivadas de la variación biológica interindividual.

Se consideró que existía interferencia significativa cuando el cambio de concentración debido a la presencia de Hb era superior a un límite máximo establecido para cada magnitud.

Se calculó el cambio de concentración (% Cambio) para cada una de las diluciones (Ci), respecto a la concentración obtenida en la muestra sin interferente (C0).

$$\% \text{ Cambio} = 100 (C_i - C_0) / C_0$$

Para establecer el límite de error máximo admisible debido a una interferencia se tuvo cuenta el coeficiente de variación analítico ( $CV_A$ ) de nuestro laboratorio obtenido promediando un mínimo de 6 valores mensuales, así como el coeficiente de variación intraindividual ( $CV_W$ )

Dilución	$\mu\text{L}$ hemolizado añadido	[Hb] mg/dL	Índice-H
1	0	0	0
2	50	76	1
3	100	151	2
4	200	305	3
5	400	604	4
6	600	906	5
7	800	1208	6
8	1000	1510	6

Hb: hemoglobina; índice-H: índice hemolítico.

de la magnitud que se estudia (obtenida de la base de datos de variación biológica) (8-11):

$$\text{Error máximo admisible} = Z (CV_A^2 + CV_W^2)^{1/2}$$

Z = estadístico bidireccional (1,96 para el 95 % de probabilidad).

Se consideró que la interferencia era clínicamente relevante cuando el porcentaje de variación del cambio era superior al error máximo admisible (8).

$$100 (C_i - C_0) / C_0 < 1,96 (CV_A^2 + CV_W^2)^{1/2}$$

## RESULTADOS

Siemens Healthineers proporciona información acerca de las sustancias interferentes conforme al documento EP07A2 del CLSI con el analizador Atellica® Solution e informa sobre el error máximo admisible que ha establecido para la interferencia de hemólisis siendo este un 10 % para todos los analitos testados en el estudio.

Siemens Healthineers aporta la equivalencia entre el índice-H proporcionado por el analizador y la concentración de Hb correspondiente.

Los valores proporcionados por el analizador para el índice-H correlacionan con las concentraciones de Hb obtenidas en las distintas diluciones del estudio (Tabla II).

Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8
Suero s/i (mL)	1.00	0.950	0.900	0.800	0.600	0.400	0.200	0.00
Suero c/i (mL)	0.00	0.050	0.100	0.200	0.400	0.600	0.800	1.00

**Tabla III.**  
**Porcentaje de cambio en la concentración de los distintos constituyentes estudiados en función del grado de hemólisis y del error máximo admisible**

	Especificaciones de calidad			Hemoglobina (mg/dL)						
	CV <sub>A</sub>	CV <sub>w</sub>	$1,96 \cdot (\frac{CV_A^2 + CV_w^2}{2})^{1/2}$	75	151	302	604	906	1208	1510
	Error máximo admisible			% Cambio						
Ácido fólico	19,12	24,00	60,14	16,27	34,16	71,02	113,80	134,56	148,30	154,86
Ácido úrico	1,45	8,60	17,09	1,65	5,41	4,47	7,18	10,94	14,12	16,24
Albumina	2,31	3,20	7,74	1,58	2,31	5,22	9,60	15,43	19,68	25,27
α-amilasa	2,70	8,70	17,85	0,00	1,47	1,47	1,47	1,47	2,94	3,68
ALT	5,40	19,40	39,47	6,90	10,34	13,79	20,69	51,72	72,41	89,66
AST	3,80	12,30	25,23	15,15	42,42	87,88	181,82	263,64	372,73	430,30
Bilirrubina directa	6,25	36,80	73,16	4,55	9,09	0,00	36,36	58,18	66,36	70,25
Bilirrubina total	6,93	21,80	44,83	5,41	9,46	2,70	1,35	4,05	4,05	1,35
BUN	4,37	12,10	25,22	4,41	2,94	1,47	1,47	2,94	5,88	8,82
Calcio	4,45	2,10	9,64	0,17	1,75	0,34	1,07	0,51	1,97	2,70
CK	3,41	22,80	45,19	3,31	10,74	26,45	38,84	83,47	99,17	125,62
Colesterol total	2,90	5,95	12,97	0,88	2,06	4,41	6,47	11,47	15,88	20,00
HDL-colesterol	7,08	7,30	19,93	1,05	1,05	3,16	1,05	5,26	5,26	4,21
Cloro	2,09	1,30	4,82	0,28	0,12	0,62	2,04	2,98	4,45	5,17
Creatinina	4,58	5,95	14,72	5,30	4,64	5,96	2,65	3,66	5,30	4,64
Ferritina	6,78	14,20	30,84	2,85	2,17	2,90	3,96	6,95	7,81	9,74
Fosfatasa alcalina	4,25	6,45	15,14	3,31	9,09	17,36	28,93	38,02	42,98	55,37
Fósforo	3,92	8,15	17,73	0,43	2,01	4,02	8,05	12,50	19,83	24,43
GGT	6,30	13,40	29,02	5,56	0,00	19,44	27,78	50,00	66,67	69,44
Glucosa	1,88	5,60	11,58	0,65	0,00	0,65	0,00	1,31	3,27	3,27
Hierro	4,15	26,50	52,57	7,35	5,15	1,47	88,97	102,94	110,29	140,44
LDH	4,90	8,60	19,40	50,18	92,73	209,1	390,55	595,27	812,00	1007,64
Lipasa	12,65	32,20	67,81	8,22	13,70	28,77	43,84	63,01	63,01	69,86
Magnesio	5,76	3,60	13,31	0,59	2,08	4,15	10,68	15,13	20,47	24,63
PCR	5,62	42,20	83,44	0,00	0,55	1,10	1,10	3,02	3,31	5,52
Proteínas totales	2,06	2,75	6,73	1,19	1,61	3,90	7,30	10,27	15,37	19,19
Potasio	1,16	4,60	9,30	5,39	10,79	22,13	43,22	64,75	86,51	108,11
Sodio	0,83	0,60	2,01	0,39	0,70	0,66	1,21	1,48	2,11	2,14
Transferrina	6,40	3,00	13,85	0,21	0,98	0,43	0,64	1,72	1,29	1,50
Triglicéridos	4,15	19,90	39,84	1,81	1,20	7,83	16,87	24,70	34,34	43,98
TSH	4,98	19,30	39,07	0,17	0,26	1,65	1,26	1,82	3,53	2,54
Vitamina B12	11,56	15,00	37,12	2,50	0,63	2,50	2,75	6,51	8,26	4,88

En cursiva se reflejan los % de cambios significativos que sería recomendable tener en cuenta al informar los resultados.

CV<sub>A</sub>: coeficiente de variación analítico de nuestro laboratorio; CV<sub>w</sub>: coeficiente de variación biológico propuesto por la SEQC-ML; CK: creatina cinasa; ALT: alani-  
na-aminotransferasa; AST: aspartato-aminotransferasa; GGT: γ-glutamilttransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; BUN: nitrógeno ureico sanguíneo; TSH: hormona  
tiroestimulante; PCR: proteína C reactiva.



Tabla IV.

## Valoración del grado de interferencia e índice-H detectado en los analitos estudiados

Constituyente	Interferencia por hemólisis	
	Grado de interferencia	Índice-H
Ácido fólico	++	3
Ácido úrico	Nula	0
Albumina	+	4
α-amilasa	Nula	0
ALT	+	5
AST	++	2
Bilirrubina directa	Nula	0
Bilirrubina total	Nula	0
BUN	Nula	0
Calcio	Nula	0
CK	+	5
Colesterol total	+	6
HDL-colesterol	Nula	0
Cloro	+	6
Creatinina	Nula	0
Ferritina	Nula	0
Fosfatasa alcalina	-	3
Fósforo	+	6
GGT	+	5
Glucosa	Nula	0
Hierro	+	4
LDH	++	1
Lipasa	+	6
Magnesio	+	6
PCR	Nula	0
Proteínas totales	+	4
Potasio	++	2
Sodio	+	6
Transferrina	Nula	0
Triglicéridos	+	6
TSH	Nula	0
Vitamina B12	Nula	0

Grado de interferencia: (+): positiva; (++): fuertemente positiva; (-): negativa; nula: no interferencia. Hb: hemoglobina; CK: creatina cinasa. ALT: alanina-aminotransferasa; AST: aspartato-aminotransferasa; GGT: γ-glutamil-transferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; BUN: nitrógeno ureico sanguíneo; TSH: hormona tiroestimulante; PCR: proteína C reactiva.

En la tabla III se expone el cambio de concentración (% Cambio) del constituyente con respecto del resultado inicial y las especificaciones de calidad analítica para el error máximo admisible. Se considera “no interferencia” cuando  $Ci-Co < \text{error máximo admisible}$ , e interferencia positiva o negativa cuando  $Ci-Co > \text{error máximo admisible}$ .

En la tabla IV se refleja el valor del Índice-H, generado por el analizador, a partir del cual se empieza detectar interferencia. Si la interferencia se detecta desde índice-H = 1 será una interferencia fuertemente positiva. La detección de un índice-H  $\geq 4$  se explica como interferencia positiva, la medición no se ve afectada por la interferencia hasta alcanzar una concentración de Hb equivalente a un índice-H = 4. Por último, para aquellos constituyentes que no se ven afectados por la hemólisis (índice-H = 0), esta interferencia no es significativa, no hay ninguna concentración de Hb que afecte a estos analitos. La concentración de Hb a la que equivale cada índice-H se expone en la tabla V.

Tabla V.

## Relación entre índice-H y concentración de Hb (Siemens Healthineers)

Índice-H	Hemólisis (mg/dL)
0	$\leq 10$
1	11-130
2	131-249
3	250-499
4	500-749
5	750-999
6	$\geq 1000$

Hb: hemoglobina; índice-H: índice hemolítico.

En la figura 1 se representan gráficamente los constituyentes bioquímicos afectados por la interferencia de manera fuertemente positiva (AST [aspartato aminotransferasa], LDH [lactato deshidrogenasa] y potasio). En la figura 2 se representa el resto de magnitudes interferidas por la hemólisis de manera positiva (14 analitos) y negativa (fosfatasa alcalina).

## DISCUSIÓN

El analizador Atellica® Solution detecta la hemólisis en muestras de suero mediante un índice-H, generando unas tablas de tolerancia con unos índices de decisión que nos indican cuándo hay una interferencia relevante. Sin embargo, los resultados de la interferencia en un sistema analítico no pueden ser generalizados para otros reactivos o instrumentos, siendo recomendable que cada laboratorio sea capaz de identificar su inter-

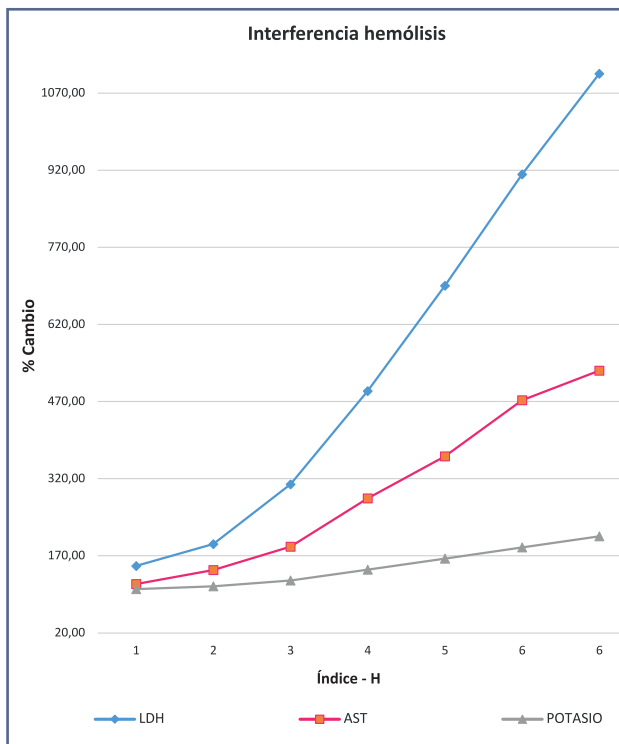


Figura 1 – Interferencia fuertemente positiva causada por la hemólisis en la medición de la LDH, AST, potasio.

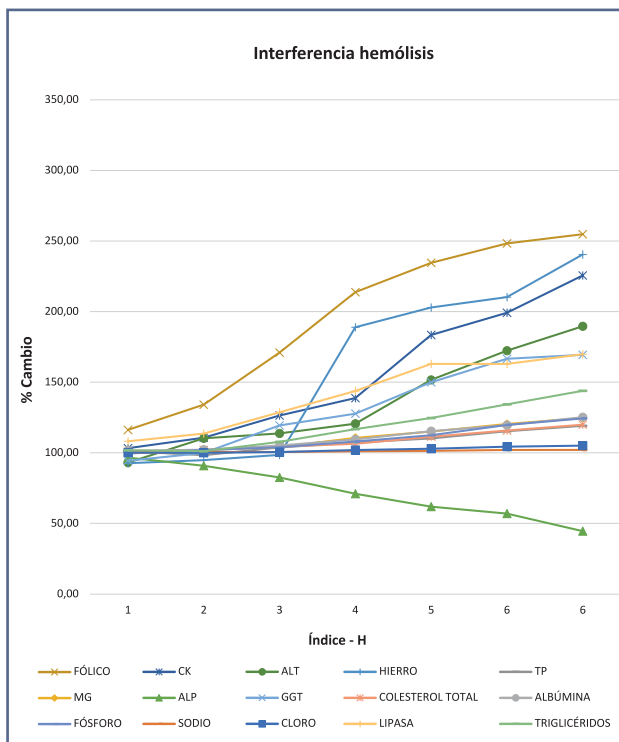


Figura 2 – Interferencia positiva causada por la hemólisis en la medición del ácido fólico, CK, ALT, hierro, lipasa, proteínas totales, magnesio, cloro, GGT, colesterol total, triglicéridos, albúmina, sodio y fósforo. Interferencia negativa causada por la hemólisis en la medición de la fosfatasa alcalina.

ferencia hemolítica, especialmente ante una incorporación de nuevos analizadores en el laboratorio, en base a su propio criterio de significación clínica de la interferencia. Los resultados que se obtengan puede que no concuerden con los resultados de nuestro estudio. Estas discrepancias pueden ser debidas a que el protocolo de estudio del fabricante puede ser distinto del empleado por el laboratorio y/o a diferentes criterios para establecer significación clínica de la interferencia. En nuestro caso, detectamos correlación entre lo que nos dice el fabricante con los resultados obtenidos en nuestro estudio. En base a nuestros resultados, con nuestro criterio para establecer significación clínica de la interferencia, decidimos que con un índice-H < 3 se informan los resultados añadiendo un comentario que refleje la presencia de interferencia. Ante una hemólisis con índice-H ≥ 4, los resultados no se informan, solicitando una nueva muestra sin interferencia en el plazo de tiempo adecuado para la atención del paciente (8,9).

Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser aplicados por aquellos laboratorios que utilizan Atellica® Solution usando su propio CV<sub>A</sub> (5).

Los laboratorios deben asegurar la detección de la hemólisis y tener establecidas las acciones llevadas a cabo frente a estas muestras. Si no se puede obtener una nueva muestra, Simundic y cols. recomiendan que el especialista de laboratorio se comunique con el médico y busque una solución adaptada al paciente individual (12). Cadamuro y cols. asesoran a los especialistas de laboratorio para que pregunten al médico por qué se solicitó el análisis de la muestra si el paciente se encuentra en una condición crítica, qué tan factible es obtener una nueva muestra y qué tan precisos deben ser los resultados para la toma de decisiones médicas (13). De esta manera, se realiza una evaluación del riesgo sopesando la probabilidad de inducir daño al no informar un resultado, contra la probabilidad de infligir daño sobre la base de informar un resultado con una incertidumbre muy grande (13).

Pineda-Tenor y cols. establecen la necesidad de tener en los laboratorios mecanismos que ayuden a minimizar todo lo posible los errores preanalíticos que puedan dar lugar a la hemólisis. La prevalencia de las muestras hemolizadas se encuentra en torno al 3,3 %, constituyendo aproximadamente del 30 al 70 % de las causas de rechazo en el laboratorio clínico. Pese a que la presencia de hemólisis puede indicar un estado patológico en el paciente, se estima que en torno al 97 % de los casos de hemólisis se originan como consecuencia de errores y actividades incorrectas durante la fase preanalítica, siendo por lo tanto evitables (14).

Se deben distinguir las situaciones en que la hemólisis es un componente relacionado con procesos preanalíticos y son situaciones controlables (*in vitro*), incluyendo aspectos relacionados con la extracción, transporte, procesado y almacenaje, de las que están relacionadas con un proceso patológico del paciente (*in vivo*), las cuales no se pueden considerar como errores preanalíticos, siendo un componente de variabilidad biológica no controlable (2,14).

Cuando nos referimos a las causas de hemólisis asociadas a un proceso patológico del paciente, aunque en la mayoría de las enfermedades que cursan con destrucción acelerada de los hematíes esta se produce en la red microvascular y en las áreas especializadas en la recuperación de los elementos intraeritrocitarios como el bazo (hemólisis extravascular), solo en las enfermedades que producen una destrucción masiva, que sobrepasa la capacidad de los sistemas de recuperación, se encuentra hemoglobina libre en el plasma (hemólisis intravascular) como ocurre en la anemia hemolítica, en patologías que producen fragmentación de los hematíes como las valvulopatías o microangiopatías y la hemólisis producida por agentes químicos o infecciosos. En la hemólisis intravascular, los componentes de mayor tamaño, como la LDH, se mantienen durante más tiempo en la circulación, lo que permite su utilización como indicador de hemólisis intravascular (15). La diferenciación entre ambos tipos de hemólisis es compleja, pudiendo ser de utilidad la determinación de bilirrubina indirecta y reticulocitos, elevados en casos de hemólisis intravascular, y de haptoglobina, disminuida en estos mismos casos (14).

El conocimiento adecuado de los factores que pueden inducir la hemólisis, así como la implementación de procedimientos de recolección estandarizados, son esenciales para minimizar las tasas de hemólisis y mejorar la fiabilidad de los resultados. Por lo tanto, debe existir una comunicación clara con los médicos que solicitan las pruebas para que tomen una decisión adecuada sobre cómo interpretar la hemólisis (15).

Dada la escasa bibliografía sobre el análisis de interferencias de hemólisis en los ensayos llevados a cabo en Atellica® Solution, con este estudio pretendemos aportar evidencia en cuanto a las decisiones a adoptar en presencia de este tipo de interferencia.

## Limitaciones

Las limitaciones de este estudio derivan del empleo de la base de datos de variación biológica, ya que muchas de ellas podrían ser consideradas como "provisionales" (12), por lo que estos resultados han de ser revisados con cada actualización de la base de datos.

El estudio se ha realizado en muestras con una concentración del analito próxima a los valores de decisión clínica. En algunos casos, el efecto de la interferencia no solo depende de la concentración de la sustancia interferente, sino también de la concentración del analito, por lo que convendría realizar el estudio de interferencias a diferentes concentraciones de analito.

## BIBLIOGRAFÍA

- López Martínez R, Alonso Nieva N, Serrat Orús N, Gella Tomás FJ, Boned Juliani B, Canalias Reverter F, et al. Procedimiento para el estudio de la interferencia por hemólisis, bilirrubina y turbidez y para la verificación de los índices de hemólisis, ictericia y lipemia. Documento Técnico. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2013.
- Gómez Rioja R, Alsina Kirchner MJ, Álvarez Funes V, Barba Meseguer N, Cortés Rius M, Llopis Díaz MA, et al. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. *Rev Lab Clin* 2009;2(4):185-95. DOI: 10.1016/j.labcli.2009.08.002
- Lima-Oliveira G, Volanski W, Lippi G, Picheth G, Guidi GC. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scand J Clin Lab Invest* 2017;77(3):153-63.
- García Aguilar GD, Pico Picos MA, Quintana Hidalgo L, Cabrera Argany A, Lorenzo Medina M, Aguilar Doreste JA. Utilidad de los índices séricos para la valoración de las interferencias causadas por la hemólisis y la bilirrubina en la medición de distintos constituyentes bioquímicos. *Química Clínica* 2007;26(4):196-201.
- Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, et al. Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:728-36. DOI: 10.1515/CCLM.2007.174
- Lippi G, Salvagno GL, Poli G, Gelati M, Favaloro EJ. Assessment of Plasma Sample Quality on Siemens Atellica COAG 360 System. *Semin Thromb Hemost* 2019;45(3):315-8. DOI: 10.1055/s-0037-1621718
- López Martínez R, Alonso Nieva N, Serrat Orús N, Gella Tomás FJ, Boned Juliani B, Canalias Reverter F, et al. Procedimiento para el estudio de la interferencia por hemólisis, bilirrubina y turbidez y para la verificación de los índices de hemólisis, ictericia y lipemia. Documento Técnico. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2013.
- Dolci A, Panteghini M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? Alberto Dolci Mauro Panteghini. *Clinica Chimica Acta* 2014;432:35-43.
- Ricos C, Álvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500. DOI: 10.1080/00365519950185229
- Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington, DC: AACC Press; 2001.
- Steen G, Klerk A, van der Laan K, Eppens EF. Evaluation of the interference due to haemoglobin, bilirubin and lipids on Immulite 2500 assays: a practical approach. *Ann Clin Biochem* 2011;48:170-5. DOI: 10.1258/acb.2010.010187
- Simundic A, Topic E, Nikolac N, Lippi G. Hemolysis detection and management of hemolyzed specimens, *Biochem Med* 2010;20(2):154-9. DOI: 10.11613/BM.2010.018
- Cadamuro J, Mrazek C, Haschke-Becher E, Sandberg S. To report or not to report: a proposal on how to deal with altered test results in hemolytic samples. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(8):1109-11.
- Pineda-Tenor D, Prada de Medio E, Belinchón Torres PM, Gascón Luna F, Morales García LJ, Lorenzo Lozano MC, et al. Handling the altered test results of hemolyzed samples. Recommendations of the Quality, Management, Safety and Evidence Committee (CCGSE) of the Spanish Association of Medical Biopathology and Laboratory Medicine (AEBM-ML). *Clin Chem Lab Med* 2018;56(1):e1-e4. DOI: 10.1515/cclm-2017-0354
- Pineda-Tenor D, Prada de Medio E, Belinchón Torres PM, Gascón Luna F, Morales García LJ, Lorenzo Lozano MC, et al. Recomendación del uso de ecuaciones de corrección de valores de potasio en presencia de interferencia por hemólisis. Documento Consenso. *Rev Lab Clin* 2016;9(4):177-83.



## Caso Clínico

# Estudio genético familiar de resistencia a hormonas tiroideas

## *Family genetic study of thyroid hormone resistance*

Rocío Cabra Rodríguez<sup>1</sup>, María José Ruiz Márquez<sup>2</sup>, Gema María Varo Sánchez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UGC Centro de Salud Alamillo. Distrito Sanitario Sevilla. Sevilla. <sup>2</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General de Riotinto. Huelva

**Recibido:** 11/12/2020  
**Aceptado:** 27/01/2021

**Correspondencia:** Rocío Cabra Rodríguez. UGC Centro de Salud Alamillo. Distrito Sanitario Sevilla. Sevilla  
e-mail: rocarod@hotmail.com

### CASO CLÍNICO

El síndrome de resistencia a hormonas tiroideas (RHT) es una rara entidad clínica, causada por mutaciones en el gen del receptor  $\beta$  de hormonas tiroideas (*thyroid hormone receptor beta, THR $\beta$* ), cuyo diagnóstico definitivo se basa en el estudio genético.

Exponemos el caso de un varón de 67 años que presenta valores elevados de la fracción libre de tiroxina (fT4) y triyodotironina (fT3) con niveles de tirotrópina (TSH) no suprimida en un análisis bioquímico realizado para el estudio familiar de RHT, motivado por el diagnóstico de una de sus hijas. Además, una sobrina fue diagnosticada recientemente de RHT con hiperfunción tiroidea, no confirmada genéticamente por negativa de la paciente.

Ante el resultado del perfil tiroideo que presentaba (fT4 2,85 ng/dL [0,93-1,70], fT3 4,65 pg/mL [2-4,40], TSH 4,57  $\mu$ UI/mL [0,5-8,90]), fue remitido al servicio de endocrinología que amplía el estudio y confirma la persistencia de hipertiroxinemia con niveles de TSH dentro del intervalo de referencia. El estudio de anticuerpos antiperoxidasa tiroidea, antitiroglobulina y antirreceptor de TSH resultó negativo y la subunidad alfa de TSH (alfaTSH) en suero dentro de la normalidad (84 mg/dL [50-117]).

El paciente ha cursado de forma asintomática y no refiere haber presentado clínica sugestiva de disfunción tiroidea a lo largo de su vida. En la exploración física solo destacó un discreto bocio que se confirma en el estudio ecográfico.

Ante la sospecha clínica de RHT se realizó estudio de secuenciación masiva. Para ello se procedió a la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de sangre periférica siguiendo los procedimientos estandarizados y se aplicó el panel de secuenciación *TruSight One (Illumina)* que incluye el gen *THR $\beta$* . La captura y enriquecimientos de las regiones exónicas y de las zonas flanqueantes de los genes analizados se realizó con la tecnología *Nextera Rapid Capture<sup>TM</sup>*, y el proceso de secuenciación en el equipo *NextSeq<sup>TM</sup> (Illumina)*.

El análisis de los datos obtenidos mediante el *software* bioinformático *Ingenuity Variant Analysis<sup>TM</sup> (QIA-GEN)* detectó la variante c.737T>C (p.L246P) en el gen *THR $\beta$*  (NM\_000461.4) en heterocigosis.

Para el análisis de la variante identificada se utilizó como genoma de referencia GRCh37/hg19, consultándose las bases de datos *The Human Gene Mutation Database (HGMD) Public*, *ClinVar*, *Exome Aggregation Consortium*, *Online Mendelian Inheritance in Man* y *Database of Single Nucleotide Polymorphisms*. Posteriormente se llevó a cabo la confirmación de la variante encontrada por secuenciación *Sanger* (Fig. 1).

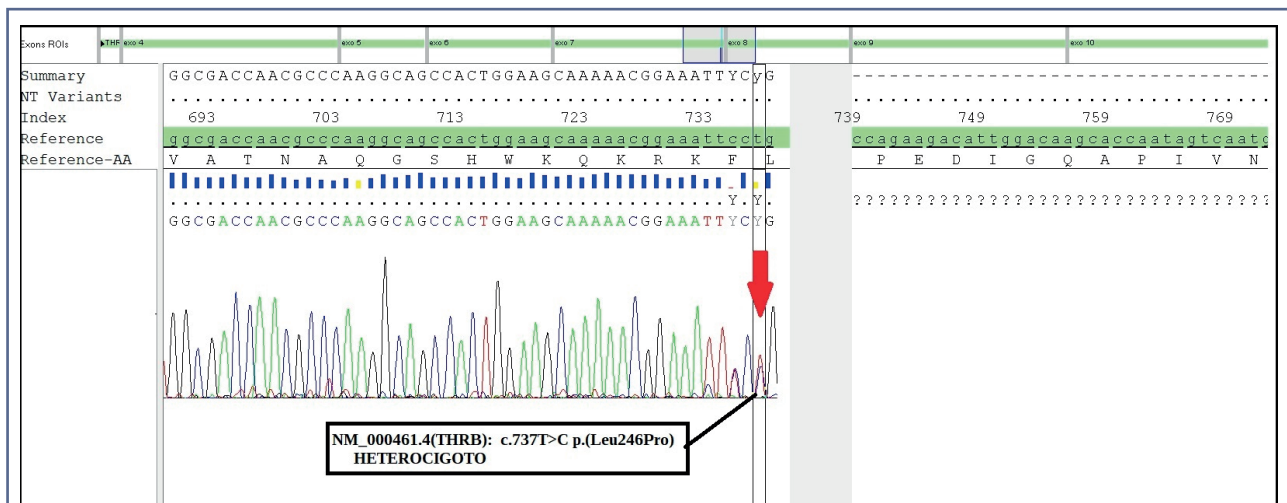
Esta variante, que también ha sido detectada en su hija primogénita (caso índice), no está descrita como patológica por lo que el resultado del estudio genético no permite establecer un diagnóstico certero de confirmación de RHT.

Continuando con el estudio de segregación, su segunda hija y el hijo de su primera hija presentaron

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00060

Cabra Rodríguez R, Ruiz Márquez MJ, Varo Sánchez GM. Estudio genético familiar de resistencia a hormonas tiroideas. Rev Med Lab 2021;2(2):77-79



**Figura 1** – Electroferograma secuenciación Sanger. Se identifica variante de significado incierto tipo missense en el paciente y su hija c.737T>C (p.L246P) en el gen *THRB* (NM\_000461.4) en heterocigosis (flecha roja).

un perfil tiroideo normal y el estudio genético por secuenciación Sanger no detectó la variante c.737T>C (p.L246P) en el gen *THRB*. Los padres y el hermano del paciente habían fallecido en el momento del estudio, por lo que no se pudieron incluir en el mismo.

## DISCUSIÓN

La RHT (OMIM 190160, 188570, 145650) es una afección endocrina muy poco frecuente, a menudo diagnosticada de forma tardía, lo que demora el manejo de la misma. Se caracteriza por un aumento de niveles de hormonas tiroideas con TSH dentro del rango de normalidad e incluso aumentada (1). A pesar de que su prevalencia no está determinada, se reconoce como una condición muy rara que afecta aproximadamente a 1 de 40.000 personas, con la publicación de unos 3.000 casos en todo el mundo.

La forma clásica de RHT está causada por variantes patogénicas heredadas o “de novo” del gen *THRB*, que codifica la subunidad beta del receptor de hormonas tiroideas *THRB*, cuya consecuencia es una falta de sensibilidad del receptor a la acción de dichas hormonas (2). Presenta un patrón de herencia autosómica dominante, y por tanto un riesgo de transmisión a la descendencia del 50 % en cada gestación. La presentación clínica de esta entidad es muy variable, pudiéndose manifestar como bocio no tóxico, como hipertiroidismo si la resistencia se limita a la hipófisis, o como hipotiroidismo en caso de resistencia periférica. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones la elevación de la concentración de la fracción libre de hormonas tiroideas compensa la resistencia del receptor y el paciente permanece eutiroideo. A pesar de esta heterogeneidad clínica, la hipertiroxemia persistente es una característica clínica común y la presencia de bocio una de las manifestaciones más frecuente, presente en el 95 % de pacientes y consecuencia de la elevación de los niveles de TSH (3,4).

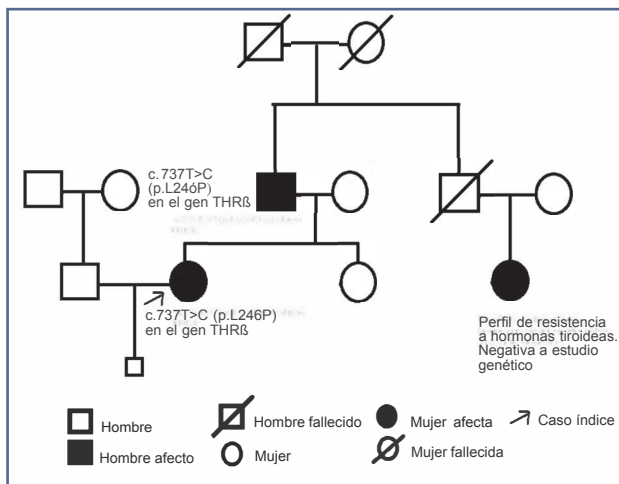
Aunque esta enfermedad tiene una predisposición genética, algunos casos son esporádicos, lo que sucede con mayor frecuencia en niños y adolescentes (3). En el diagnóstico diferencial, la RHT debe distinguirse de las enfermedades autoinmunes del tiroides, el adenoma hipofisario secretor de TSH y las anomalías en las proteínas transportadoras de hormonas tiroideas principalmente (5).

Las variantes genéticas que afectan al gen *THRB* se pueden añadir a las directrices de diagnóstico para la RHT como criterio de apoyo, aunque considerando que en el 15 % de los pacientes notificados no se detectan variantes (5).

En el caso que presentamos, la variante identificada fue hallada tanto en el caso índice como en nuestro paciente (padre), ambos con perfil bioquímico tiroideo alterado. Esta variante predice la sustitución del aminoácido leucina por prolina en la posición 246 de la proteína, afectando a varios dominios funcionales. Se encuentra descrita en las bases de datos *ClinVar* (439311) como variante de significado clínico incierto asociada a resistencia a hormonas tiroideas, sin embargo, no se encuentra descrita en la bibliografía ni en las bases de datos clínicas y poblacionales consultadas. Los predictores bioinformáticos (*MutationTaster* y *Polyphen-2*) estiman que el cambio tendría un efecto patogénico.

Al no estar descrita la variante encontrada como patológica, el resultado del estudio genético no permite establecer un diagnóstico certero de RHT autosómica dominante, por lo que está indicado el estudio de segregación, es decir, el estudio de la variante tanto en familiares sanos como afectados para ver si segrega con la enfermedad (6).

El estudio de segregación se ha llevado a cabo mediante secuenciación Sanger y no ha detectado la variante c.737T>C (p.L246P) en el gen *THRB* en los familiares que presentaron un perfil hormonal tiroideo normal (Fig. 2).



**Figura 2** – Pedigree del paciente y resultados de los estudios genéticos realizados. La variante de significado incierto tipo missense en heterocigosis, c.737T>C (p.L246P) en el gen THRβ (NM\_000461.4), se ha identificado en el caso índice y su padre, no pudiéndose confirmar con estudio genético en su prima.

Debido a la presentación clínica inespecífica de esta entidad, los pacientes pueden ser diagnosticados erróneamente si el clínico no está familiarizado con esta condición, lo que conlleva la frustración del paciente, el retraso en el diagnóstico y en ocasiones la aplicación de tratamientos inapropiados (7).

Desafortunadamente, actualmente no existe una terapia curativa para la RTH, por lo que el objetivo del tratamiento es conseguir el estado eutiroideo del paciente mediante terapia individualizada (8).

El avance en el diagnóstico de estas enfermedades raras ha sido posible en muchas ocasiones gracias a las pruebas genéticas de secuenciación masiva que han revolucionado el campo de la medicina (9,10). Por ello, debe promoverse el estudio genético para catalogar correctamente estas entidades endocrinas y detectar familiares afectados que de otro modo permanecerían sin diagnosticar.

Ante el hallazgo de una variante de significado clínico incierto, el diagnóstico se debe basar en aspectos clínicos y no solo en el estudio genético. En este caso, la valoración clínica, los predictores informáticos, el tipo de variante *missense* y el estudio de segregación familiar apoyarían el diagnóstico de RHT.

En un futuro próximo, esperamos que muchas de estas variantes de significado incierto encontradas puedan catalogarse como patológicas con la suficiente evidencia científica para arrojar más luz al proceso diagnóstico.

Por último, destacar la importancia del diagnóstico del caso índice y de la detección de familiares afectados mediante el estudio familiar ya que va a permitir no solo el manejo clínico de estos pacientes, sino también ofrecer asesoramiento genético a aquellos individuos en edad reproductiva. Al tratarse de un patrón de herencia autosómica dominante, el riesgo de transmisión a la descendencia es del 50 % en cada gestación.

## PUNTOS A RECORDAR:

- La RHT (OMIM 190160, 188570, 145650) es una afección endocrina muy poco frecuente, caracteriza por un aumento de niveles de hormonas tiroideas FT4 y FT3 con TSH no suprimida.
- La forma clásica de RHT está causada por variantes patogénicas heredadas o “de novo” del gen *THRβ*, que codifica la subunidad beta del receptor de hormonas tiroideas, cuya consecuencia es una falta de sensibilidad del receptor a la acción de dichas hormonas.
- La presentación clínica de esta entidad es muy variable, incluyendo hipertiroidismo, hipotiroidismo o bocio no tóxico.
- El objetivo del tratamiento es conseguir el estado eutiroideo en el paciente.
- El avance en el diagnóstico de estas enfermedades raras ha sido posible gracias a las pruebas genéticas de secuenciación masiva.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Choi JH, Cho JH, Kim JH, Yoo EG, Kim GH, Yoo HW. Variable Clinical Characteristics and Molecular Spectrum of Patients with Syndromes of Reduced Sensitivity to Thyroid Hormone: Genetic Defects in the THRβ and SLC16A2 Genes. *Horm Res Paediatr* 2018;90(5):283-90. DOI: 10.1159/000493468
2. Arsov T, Xie C, Shen N, Andrews D, Vinuesa CG, Vaskova O. Genomic test ends a long diagnostic odyssey in a patient with resistance to thyroid hormones. *Thyroid Research* 2019;12(1):7. DOI: 10.1186/s13044-019-0068-y
3. Wang J, Lv H. Identification of a novel mutation in the thyroid hormone receptor β gene that causes thyroid hormone resistance syndrome: A case report. *Molecular Medicine Reports* 2019;20(5):4683-7. DOI: 10.3892/mmr.2019.10703
4. Peña A, Giménez M, Cerezo AM, Serrano S, Prada E, Alramadan M. Resistencia a hormonas tiroideas: sospecha de una nueva mutación en el gen rTHRβ. *Rev Lab Clín* 2016;9(4):173-6. DOI: 10.1016/j.labcli.2016.06.001
5. Xiao X, Lv C, Zhu T, Chen H. Thyroid hormone resistance and the value of genetics: Three case reports. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(9):e14675. DOI: 10.1097/MD.00000000000014675
6. Guo QH, Wang BA, Wang CZ, Wang M, Lu JM, Lv ZH, et al. Thyroid hormone resistance syndrome caused by heterozygous A317T mutation in thyroid hormone receptor β gene: Report of one Chinese pedigree and review of the literature. *Medicine* 2016;95(33):e4415. DOI: 10.1097/MD.0000000000004415
7. Rivas AM, Lado-Abeal J. Thyroid hormone resistance and its management. *Proc* 2016;29:209-11. DOI: 10.1080/08998280.2016.11929421
8. Yusufu A, Chen WJ, Zhang MC. Thyroid hormone resistance syndrome with P453T mutation in thyroid hormone receptor β gene: A pedigree report. *Medicine* 2020;99:44. DOI: 10.1097/MD.00000000000022824
9. Cyniak-Magierska A. The syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone – the current state of art. *Thyroid Res* 2015;8:A5. DOI: 10.1186/1756-6614-8-S1-A5
10. Weiss RE, Refetoff S. Thyroid hormone resistance syndromes. *The Thyroid and Its Diseases*. Springer, Cham: 2019. pp. 741-9. DOI: 10.1007/978-3-319-72102-6\_49

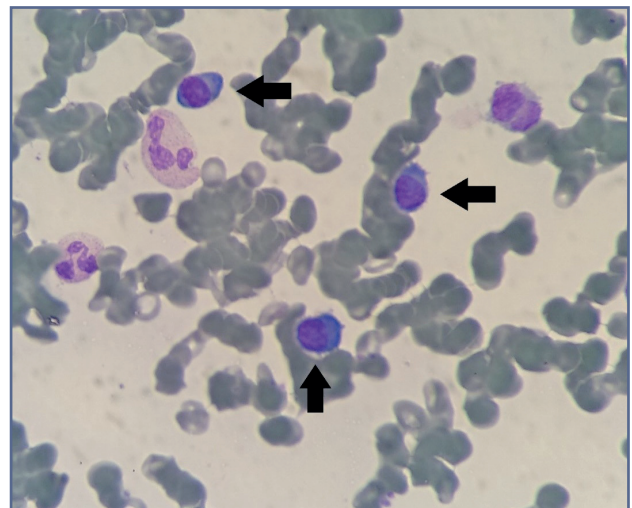
**Caso Clínico****Leucemia de células plasmáticas secundaria***Secondary plasma cell leukemia*Alberto Vilchez Rodríguez<sup>1</sup>, Rafael Lluch García<sup>2</sup>, Noelia Bru Orobal<sup>2</sup><sup>1</sup>Área de Diagnóstico Biológico y <sup>2</sup>Servicio de Hematología. Hospital Universitario de La Ribera. Alzira, ValenciaRecibido: 24/02/2021  
Aceptado: 10/06/2021Correspondencia: Alberto Vilchez Rodríguez. Área de Diagnóstico Biológico. Hospital Universitario de La Ribera. Km. 1, Ctra. Corbera. 46600 Alzira, Valencia  
e-mail: vilchez\_alb@gva.es**CASO CLÍNICO**

Mujer de 75 años, caucásica, con antecedentes personales de hipertensión arterial, diabetes *mellitus* tipo 2, dislipemia e hipotiroidismo tras tiroidectomía total. Mantiene controles en Hematología por mieloma múltiple (MM) quiescente IgG lambda. Le fue diagnosticado en 2018, estadio DS IIIB e ISS III con hemoglobina 81 g/L (115-165 g/L), creatinina 2,48 mg/dL (0,55-102 mg/dL) y  $\beta$ 2-microglobulina 12,1 mg/L (1,2-3 mg/L). El estudio de FISH resultó negativo para p53, CDKN2C/CKS1BR e IgHR. Inició tratamiento con daratumumab-lenalidomida-dexametasona.

Durante la revisión en septiembre de 2020, presenta dolor óseo en la zona lumbosacra, incapacitante, que empeora con los movimientos y que no mejora con analgésicos, precisando el uso de opiáceos. La exploración física cardiopulmonar y neurológica es normal. Las radiografías de serie ósea no muestran lesiones líticas y/o aplastamientos y/o fracturas. En la tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada (PET-TC) se observan fracturas costales y aplastamiento vertebral en L2.

En las pruebas complementarias, la hematimetría identifica una hemoglobina 75 g/L (115-165 g/L), un volumen corpuscular medio 102,7 fl (80-99 fl), siendo lo restante normal. El autoanalizador describe una alarma de células atípicas, procediendo a realizar un frotis

de sangre periférica, donde se observa la presencia de células plasmáticas circulantes (CPC) en el 24 % de la celularidad global (Fig. 1) con fenómeno de Rouleaux. La bioquímica muestra un aumento de creatinina 2,95 mg/dL (0,55-1,02 mg/dL), gamma glutamil-transferasa de 113 U/L (< 38 U/L), lactato deshidrogenasa de 332 U/L (120-246 U/L) y calcemia de 10,9 mg/dL (8,7-10,4 mg/dL). La determinación de vitamina B12, ácido

**Figura 1** – Presencia de células plasmáticas en sangre periférica.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00073

Vilchez Rodríguez A, Lluch García R, Bru Orobal N. Leucemia de células plasmáticas secundaria. Rev Med Lab 2021;2(2):80-82

fólico y marcadores tumorales (CEA, CA19.9 y AFP) son normales. Los resultados de serología microbiana, los anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo son negativos.

Siendo los resultados orientativos para un MM sintomático con leucemización, se solicitan pruebas dirigidas a cuantificar la paraproteína y se realiza punción de médula ósea, incluyendo estudio citométrico. La inmunoglobulina IgG es de 2230 mg/dL (700-1600 mg/dL) con inmunoparesia concomitante. La electroforesis de proteínas con 21,8 g/L de componente monoclonal, cuya inmunofijación en suero es IgG lambda. Las cadenas ligeras libres lambda de 11300 mg/L (< 11,3 mg/L), las cadenas ligeras libres kappa de 44 mg/L (< 25,8 mg/L) y el cociente kappa libre/lambda libre de 0,001 (0,3-1,56). La proteinuria de 24 horas es 6180 mg (< 150 mg) y la proteinuria de Bence-Jones es positiva, siendo la inmunofijación en orina tipo IgG lambda. La punción aspirativa de médula ósea (MO) muestra una infiltración plasmocitaria del 55 % (Fig. 2). Las características morfológicas observadas son las típicas de células plasmáticas. Presentan una forma ovalada con abundante citoplasma basófilo y pelúcido con elevada relación núcleo/citoplasma. El núcleo es redondo y excéntrico, y la cromatina dispuesta en bloques piramidales contra la membrana nuclear. El estudio inmunofenotípico en sangre periférica y médula ósea muestra antígenos CD19-, CD45-, CD56+, CD38+++, CD138++. Todos estos hallazgos son compatibles con una leucemia de células plasmáticas (LCP), secundaria a su mieloma múltiple conocido.

## DISCUSIÓN

Las discrasias plasmocelulares incluyen entidades como las gammopatías monoclonales de significado incierto, el mieloma múltiple (MM), el plasmocitoma extramedular, el plasmocitoma solitario de hueso y la LCP (1).

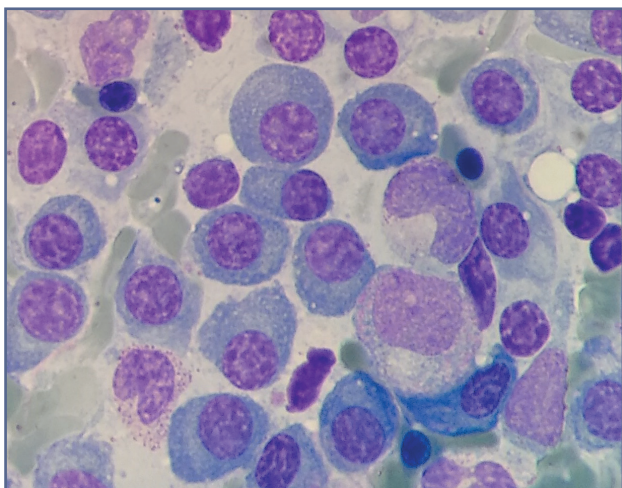


Figura 2 – Presencia de células plasmáticas en médula ósea.

La LCP es una variante infrecuente, de curso clínico agresivo y corta supervivencia. Se clasifica en primaria (LCPp), originada “de novo” y secundaria (LCPs), que corresponde a la transformación leucémica de un MM (2).

La incidencia y prevalencia se desconoce, pero se ha estimado en el 0,5-3 % de todas las discrasias plasmocelulares, siendo el 60 % las formas primarias y el 40 % las formas secundarias (progresión en 1-4 % de los MM) que van siendo cada vez más comunes, al aumentar la supervivencia de los MM en tratamiento (1-4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la International Myeloma Working Group (IMWG) definen a la LCP como la presencia de células plasmáticas circulantes en al menos el 20 % de los leucocitos de sangre periférica y/o un valor absoluto de  $2 \times 10^9 / L$  (3).

El diagnóstico requiere de una historia completa, examen físico, pruebas de laboratorio y radiológicas similares a las necesarias para cualquier discrasia plasmocelular.

La forma de presentación varía, teniendo la LCPp un curso clínico más leucémico, a edades más jóvenes, con insuficiencia medular (plasmocitosis moderada), infiltración hepatoesplénica y nodal, fracaso renal, marcadores tumorales elevados (LDH,  $\beta$ 2-microglobulina) y menor afectación ósea. La LCPs cursa en edades más avanzadas, con síndrome de hiperviscosidad, hipercalcemia, fracaso renal, proteinuria de Bence-Jones, citopenias por infiltración medular y lesiones osteolíticas, correspondiendo a la fase terminal del MM. La paraproteína más común es IgG (33 %), seguido de IgA (20 %) e IgD (3 %), sin describirse apenas casos de IgE (1%) (2,3,5).

En cuanto al inmunofenotipo, la expresión de antígenos CD38 y CD138 son excelentes marcadores de células plasmáticas y no difieren entre MM y LCP, mientras que CD2, CD3 Y CD16 son consistentemente negativos. La inactivación del alelo tp53 ocurre en el 56 % de la LCP primaria y en el 83 % de la LCP secundaria (2,5).

La definición de LCP, por medio de la evaluación microscópica de un frotis sanguíneo, se deriva del recuento diferencial de glóbulos blancos (donde cuantificamos las CPC en porcentaje o valor absoluto). A pesar del uso cada vez más extendido de la automatización en hematología, y teniendo en cuenta que estos equipos registran algunas alarmas “células atípicas, entre otras”, la citomorfología sigue siendo una herramienta para la orientación y diagnóstico de algunas hemopatías, bajo una estrecha relación con la clínica y facilitando diferentes estrategias de tratamiento. Por otro lado, la relación entre el recuento de CPC y la supervivencia ha sido motivo de varios trabajos, observando que hay muchos más pacientes con MM con 5 a 19 % de CPC que se comportan fenotípicamente similares a los que tienen MM con  $\geq 20$  % de CPC. Algunos autores proponen, que la LCP debería definirse como la presencia de  $\geq 5$  % de CPC en un frotis de sangre periférica, en pacientes que cumplen con los criterios de diagnóstico para MM, ya que la LCP es una entidad clínica y biológicamente distinta del MM, específicamente del MM de



alto riesgo, y conlleva un peor pronóstico (6). Como es el caso que se comunica, la correcta realización e interpretación de un frotis sanguíneo, junto con las pruebas de laboratorio clínico y hematológico, han permitido el diagnóstico precoz de LCPs para, posteriormente, ofrecer el tratamiento más oportuno. Es por esto que el especialista de laboratorio debe estar en continua formación citomorfológica, ya que estos hallazgos pueden suponer parte de su carga asistencial, tanto en el laboratorio de rutina como en el laboratorio de urgencias.

#### PUNTOS A RECORDAR:

- La LCP es una variante infrecuente, de curso clínico agresivo y corta supervivencia, dentro de las discrasias plasmocelulares.
- La LCP se define por la presencia de CPC  $\geq 20$  % del conteo total de leucocitos y/o un valor absoluto de  $2 \times 10^9/L$ .
- Las LCP pueden ser primarias (60 %) o secundarias (40 %), presentando diferencias biológicas y clínicas.

- El estudio morfológico de sangre periférica es fundamental en esta patología, ya que permite una rápida orientación diagnóstica.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Swaminathan N, Varadi G. Secondary Plasma Cell Leukemia: A Case 125 Report. *Cureus* 2020;12:e8693. DOI: 10.7759/cureus.8693
2. Albarracín F, Fonseca R. Plasma cell leukemia. *Blood Rev* 2011;25:107-12. DOI: 10.1016/j.blre.2011.01.005
3. Gundesen MT, Lund T, Moeller HEH, Abildgaard N. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Curr Oncol Rep* 2019;21:8. DOI: 10.1007/s11912-019-0754-x
4. Sher T, Miller KC, Deeb G, Lee K, Chanan-Khan A. Plasma cell leukaemia and other aggressive plasma cell malignancies. *Br J Haematol* 2010;150:418-27. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08157.x
5. Jiménez-Zepeda VH, Domínguez VJ. Plasma cell leukemia: a rare condition. *132 Ann Hematol* 2006;85:263-7. DOI: 10.1007/s00277-005-0054-4
6. Ravi P, Kumar SK, Roeker L, Gonsalves W, Buadi F, Lacy MQ. Revised diagnostic criteria for plasma cell leukemia: results of a Mayo Clinic study with comparison of outcomes to multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2018;15:116. DOI: 10.1038/s41408-018-0140-1



## Casos Clínicos

# Hallazgo inesperado de carcinoma de pulmón en líquido pleural enmascarado por sospecha de neumonía por SARS-CoV-2

## *Unexpected finding of lung carcinoma in pleural fluid masked by suspicion of SARS-CoV-2 pneumonia*

*Maialen Palomino Alonso, Fernando Calvo Boyero, Mercedes Aramendi Ramos*

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

**Recibido:** 25/03/2021  
**Aceptado:** 07/06/2021

**Correspondencia:** Maialen Palomino Alonso. Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos. Hospital Universitario 12 de Octubre. Avda. de Córdoba, s/n. 28041 Madrid  
e-mail: maialen.palomino@salud.madrid.org

### CASO CLÍNICO

Mujer de 67 años, sin hábitos tóxicos ni antecedentes de interés, acude a urgencias por tos seca sin expectoraciones, acrecentada en los últimos días. No presenta fiebre, disnea ni ortopnea, pero sí mialgias asociadas al esfuerzo tusivo. En radiografía de tórax se observan opacidades bibasales en mayor proporción en el pulmón izquierdo, con patrón en vidrio deslustrado bilateral y periférico. Se diagnostica de neumonía bilateral por SARS-CoV-2 bajo criterios clínicos, con pruebas PCR (*polymerase chain reaction*) negativas en 2 ocasiones. Es derivada a un hospital de campaña con tratamiento (hidroxicloroquina y antibióticos) y tras unos días se da de alta.

Pese a una leve mejoría inicial, comienza un empeoramiento con tos seca, disnea y fiebre, y regresa a urgencias. En la exploración se aprecia un derrame pleural izquierdo (Fig. 1A). Por ello, se le realiza un drenaje torácico extrayéndose líquido pleural para su estudio inicial en el laboratorio.

El análisis hematimétrico del líquido (DxH-900, Beckman Coulter) revela elevada presencia de células, tan-

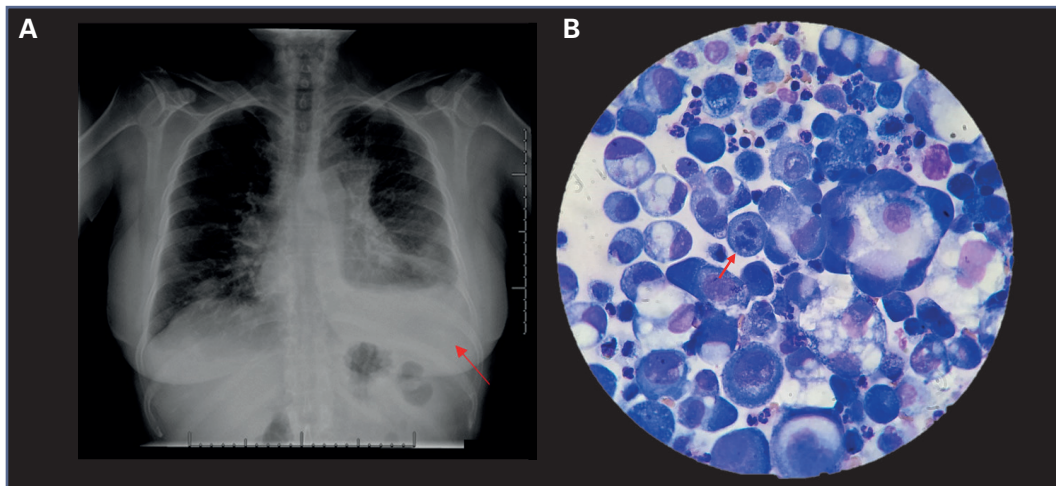
to hematíes (5233/ $\mu$ L), como leucocitos (4593/ $\mu$ L), con predominio neutrofílico (75 %).

Los resultados de las pruebas bioquímicas indican que se trata de un exudado según los criterios de Light (Tabla I). Estos criterios orientan a exudado si se cumple una de las tres características: ratio proteínas líquido/suero  $> 0,5$ ; ratio lactato deshidrogenasa (LDH) líquido/suero  $> 0,6$ ; concentración de LDH en el derrame superior a 2/3 el límite superior en suero (1). En este caso además de cumplir los tres criterios, destaca la alta concentración de LDH presente en el derrame. Debido a este hallazgo, junto con la distribución de poblaciones anómala del scattergrama, se realiza una citocentrifugación con posterior tinción de Wright-Giemsa para comprobar el aspecto celular. Al microscopio óptico se observaron poblaciones de células atípicas con características citológicas de malignidad (Fig. 1B): células con cromatina laxa, intensa basofilia citoplasmática, grandes vacuolas, presencia de varios núcleos, mitosis, tendencia a formar "nidos celulares" y a constituir sincitio (2). Se informa al servicio peticionario de los hallazgos y de la ampliación de un panel de marcadores tumorales en suero y líquido (Tabla I).

*Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.*

DOI: 10.20960/revmedlab.00076

Palomino Alonso M, Calvo Boyero F, Aramendi Ramos M. Hallazgo inesperado de carcinoma de pulmón en líquido pleural enmascarado por sospecha de neumonía por SARS-CoV-2. Rev Med Lab 2021;2(2):83-86



**Figura 1** – A. Derrame pleural izquierdo en radiografía de tórax. B. Estudio citológico inicial (tinción de Wright-Giemsa tras citocentrifugación). Las células presentan características citológicas de malignidad: grandes vacuolas, intensa basofilia, agrupaciones celulares y gran tamaño celular, junto a hallazgo de mitosis (flecha).

El servicio peticionario envía también muestra al servicio de Anatomía Patológica (AP) para confirmación diagnóstica.

A la espera de los resultados se le realiza una exploración por tomografía axial computarizada (TAC) observándose masas pulmonares sospechosas de malignidad, confirmándose posteriormente desde AP el diagnóstico en biopsia bronquial: carcinoma de células no pequeñas, con perfil inmunohistoquímico congruente con adenocarcinoma de origen pulmonar. La paciente es derivada al servicio de Oncología Médica clasificando el tumor como estadio IV (T3N3M1a) con

invasión mediastínica bilateral, parenquimatosa pulmonar contralateral, pleural y pericárdica en progresión clínica y metástasis única occipital izquierda. El estudio de biología molecular mediante NGS (*next generation sequencing*) indica una fusión positiva en gen EML4-ALK, siendo su diagnóstico principal un carcinoma de células no pequeñas de LII en forma de linfangitis carcinomatosa estadio IV ALK traslocado (EML4-ALK).

Se comienza tratamiento y en la revisión a los dos meses se observa desaparición de la metástasis occipital y ausencia de captaciones patológicas en TAC abdominal.

**Tabla I.**

**Resultados de las pruebas bioquímicas y del panel de marcadores tumorales del líquido pleural (LP) y del suero del paciente**

Parámetro	LP	Suero	Valor referencia (suero)	Cociente LP/suero
Glucosa, mg/dL	32*	139	70-110	0,2
Proteínas, g/dL	4,4	6,3	6,4-8,3	0,7
LDH, U/L	3288*	313*	135-214	10,5*
CEA, ng/mL	356*	2,54	< 5	140,2
Ca15.3, U/mL	566*	107*	< 28,50	5,3
Ca125, U/mL	39970*	214*	< 35	186,8
Ca19.9, U/mL	43530*	29,2	< 34	1490,7
Ca72.4, U/mL	1980*	43,10*	< 6,9	45,9
CYFRA21.1, ng/mL	8520*	9,58*	< 3,3	889,3
NSE, ng/mL	> 1500*	24,20	< 16,3	-
SCC, ng/mL	13,1*	5,3*	< 2,5	2,5

\*Parámetros alterados.

## DISCUSIÓN

Los líquidos serosos (pleural, pericárdico y peritoneal) son ultrafiltrados del plasma que se encuentran en las cavidades correspondientes rodeando las vísceras. En condiciones normales se presentan como un líquido de pequeño volumen que actúa como lubricante y que permite el movimiento de los órganos evitando la fricción y su colapso.

El mantenimiento de este volumen depende de las tasas de producción y reabsorción, que es producto tanto de las presiones hidrostáticas y coloidales, como de la permeabilidad vascular y linfática (3). Todo acúmulo se considera anormal y puede ser reflejo de una enfermedad pleural, pulmonar o extrapulmonar. Es lo que se denomina derrame pleural y requiere ser analizado para establecer su causa (1).

El derrame pleural maligno es una de las causas más frecuentes de exudado pleural. Se ha demostrado que del 42 al 77 % de los exudados pleurales son secundarios a malignidad (4). Los procesos neoplásicos más comúnmente asociados a derrames malignos son, en primer lugar, el cáncer de pulmón (50 %), seguido del cáncer de mama (20 %), linfomas y mesoteliomas (5,6). Cuando existe metástasis y se produce afectación de la pleura, se generan cambios en el mesotelio (capa de células que recubre el espacio pleural), lo que puede inducir descamación o engrosamiento del mismo y en algunos casos fibrosis de la pleura. Todo esto puede derivar en un bloqueo del drenaje linfático, causante del acúmulo del líquido en el espacio pleural (4,6).

En relación al análisis citológico de los líquidos biológicos es importante diferenciar las células que aparecen frecuentemente, como eritrocitos, leucocitos, macrófagos y células mesoteliales, de las células atípicas. Hay que considerar que el aspecto de las células hematológicas en los líquidos puede variar en relación a las encontradas en sangre, debido al proceso de centrifugación (mayor tamaño y basofilia, pérdida del contorno celular y nuclear) (2). Las células mesoteliales son células heterogéneas de revestimiento de las cavidades serosas, por lo que es frecuente encontrarlas en los líquidos sin asociarse a ninguna patología. Por esta heterogeneidad que presentan es importante conocer sus características para saber identificarlas y distinguir las de las células atípicas tumorales.

El hallazgo citológico de células atípicas orienta la patología de la paciente hacia una causa tumoral. La elevación generalizada de los marcadores tumorales en el líquido indica una alta probabilidad de derrame maligno. Una vez descartadas la insuficiencia renal, hepatopatía y enfermedades dermatológicas, un aumento de los antígenos carbohidratos CA72.4 > 21 U/mL, CA19.9 > 201 U/m, CA15.3 > 82 U/mL o del antígeno carcinoembrionario (CEA) > 60 ng/mL en el líquido pleural junto con un cociente líquido/suero > 1,2 tienen un valor predictivo positivo mayor de 99 % en el diagnóstico de derrame pleural maligno (7), situación también descrita por otros autores aunque con diferencias en los puntos de corte propuestos (8,9).

En cuanto al tipo de tumor, en el suero de la paciente destaca una elevación de SCC > 2 ng/mL (antígeno de carcinoma de células escamosas) que orienta hacia el carcinoma de células no pequeñas (NCICP) junto con la elevación (> 3,3 ng/mL) del antígeno del fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA 21.1) y mucinas (Ca15.3, Ca72.4). Además, la enolasa-neuro-específica (NSE), que es un marcador de carcinoma de células pequeñas, tiene un valor inferior a 25 ng/ml, que es el punto de corte considerado como discriminante de malignidad, lo que apoya la sospecha de NCICP (10). En resumen, los parámetros de laboratorio indican con alta probabilidad una etiología maligna del derrame que impresiona como NCICP, posteriormente confirmado y tipificado por AP como carcinoma de células no pequeñas con perfil inmunohistoquímico congruente con adenocarcinoma de origen pulmonar. El subtipo histológico de carcinoma de células no pequeñas no siempre es posible sospecharlo en base al patrón de marcadores tumorales estudiados como es el caso del CYFRA 21.1, marcador importante de NCICP que aunque asociado con mayor frecuencia a tumor escamoso puede estarlo en menor grado a adenocarcinoma por lo que no es tan clara su relación en algunos casos y puede existir discrepancia con la histología.

Resulta imprescindible la interpretación por parte del laboratorio del análisis integrado de la hematimetría, bioquímica y citología de los líquidos biológicos, así como una correcta identificación de células atípicas que pueda sugerir la etiología del derrame. En el caso de nuestra paciente, el informe del hallazgo a los clínicos, así como la ampliación del panel de marcadores tumorales por parte del laboratorio, ha sido crucial para reorientar el diagnóstico inicial y detectar así una patología tumoral no sospechada.

## PUNTOS A RECORDAR:

- La citocentrifugación es una técnica fundamental para la correcta interpretación citológica y para el hallazgo de células atípicas.
- Las células atípicas presentan intensa basofilia, varios núcleos con posibilidad de observar mitosis, grandes vacuolas y tendencia a formar nidos celulares o "sincitios".
- La correcta interpretación de los marcadores tumorales en el líquido y suero con la aplicación de ratios y puntos de corte puede ayudar a orientar el diagnóstico clínico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Porcel Pérez JM. ABC del líquido pleural. *Semin de la Fund Española de Reumatol* 2010;11(2):77-82. DOI: 10.1016/j.semreu.2010.02.003
2. Merino A. Citología normal de los líquidos biológicos (LCR, líquidos serosos). En: *Citología de líquidos biológicos: experiencia del Grupo Catalán de Citología Hematológica*. Madrid: Acción Médica; 2011. pp. 7-11.

3. González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3.ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2019.
4. Izquierdo Patrón M. Derrames pleurales malignos. En: Pérez Rodríguez E, Villena Garrido MV, editores. Enfermedades de la pleura. Madrid: Monografías de la Sociedad Madrileña de Neumología y Cirugía Torácica; 2003. pp. 95-123.
5. Hiscock LJ, Bravo JLB y Gaviria JZ. Derrame pleural maligno. *Rev Patol Respir* 2017;20(3):77-8.
6. Lola A, Fashoyin-Aje, Brahmer JR. Derrames relacionados con neoplasias malignas. En: Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, editores. *Abeloff. Oncología Clínica*. 6.ª ed. España: Elsevier; 2020. pp. 863-73.
7. Trapé J, Sant F, Franquesa J, Montesinos J, Arnau A, Sala M, et al. Evaluation of two strategies for the interpretation of tumour markers in pleural effusions. *Respir Res* 2017;18(1):1-8. DOI: 10.1186/s12931-017-0582-1
8. Antonangelo L, Sales RK, Corá AP, Acencio MMP, Teixeira LR, Vargas FS. Pleural fluid tumour markers in malignant pleural effusion with inconclusive cytologic results. *Curr Oncol* 2015;22(5):e336-e341. DOI: 10.3747/co.22.2563
9. Hackner K, Errhalt P, Handzhiev S. Ratio of carcinoembryonic antigen in pleural fluid and serum for the diagnosis of malignant pleural effusion. *Ther Adv Med Oncol* 2019;11:1-8. DOI: 10.1177/1758835919850341
10. Molina R, Filella X, Augé JM, Escudero JM, editores. *Utilidad clínica de los marcadores tumorales. Estado actual y perspectivas de futuro III*. Madrid: Roche Diagnostics; 2011.

**Imagen/Infografía****Diagnóstico: quiluria****Diagnosis: chyluria****Araceli Carrasco Mora<sup>1</sup>, Luz del Mar Rivas Chacón<sup>1</sup>, Verónica Benito Zamorano<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Getafe. Getafe, Madrid. <sup>2</sup>Diagnoslab S.L. Collado Villalba, Madrid**Recibido:** 02/07/2021  
**Aceptado:** 02/08/2021**Correspondencia:** Araceli Carrasco Mora. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Getafe. Carretera de Toledo, km. 12,500. 28905 Getafe, Madrid  
e-mail: araceli.carrasco@salud.madrid.org

Paciente de 71 años con demencia ingresada en nuestro hospital por deterioro funcional progresivo. Debido a su malnutrición, le colocan una gastrostomía endoscópica percutánea (PEG) para proporcionarle nutrición enteral y, horas después, la paciente emite una orina de aspecto lactescente de la que envían una muestra al Laboratorio de Urgencias (Fig. 1).

Su apariencia recuerda a la de líquidos pleurales de aspecto lechoso, en los cuales hay que diferenciar entre derrames quilosos (relacionados con el sistema linfático y altas concentraciones de triglicéridos) y derrames pseudoquilosos (no relacionados con el sistema linfático y caracterizados por la presencia de colesterol) (1,2). Así, ante el aspecto macroscópico de la orina y para hacer el diagnóstico diferencial, se midió la concentración de triglicéridos, siendo esta 598 mg/dL. Tras informar al médico y ante la posibilidad de que la orina estuviera contaminada con la nutrición enteral que se estaba proporcionando a la paciente por la gastrostomía (3), se retiró la PEG, resultando orinas normocolúricas.

Particularmente, esta paciente presentaba el "síndrome de Chilaiditi", una alteración anatómica en la que una parte del colon se interpone entre el hígado y el diafragma (4,5). Teniendo en cuenta este fenómeno anatómico y debido a que la aparición de la orina lactescente fue posterior a la colocación de la PEG y cesó cuando esta se retiró, se pensó que pudo haber sido una inadecuada colocación de la PEG la que causó la aparición de la nutrición enteral en la muestra de orina.

**Figura 1 – Muestra de orina lactescente.***Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.*

DOI: 10.20960/revmedlab.00083

Carrasco Mora A, Rivas Chacón LM, Benito Zamorano V. Diagnóstico: quiluria. Rev Med Lab 2021;2(2):87-88

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, editores. Harrison. Principios de Medicina Interna. 20.<sup>a</sup> ed. Nueva York: McGraw-Hill; 2019.
2. Gonzalez Hernandez A, editor. Principios de Bioquímica Clínica Y Patología Molecular. 3.<sup>a</sup> ed. Barcelona: Elsevier; 2019.
3. Chicharro L, Puiggrós C, Cots I, Pérez-Portabella C, Planas M. Complicaciones inmediatas de la gastrostomía percutánea de alimentación: 10 años de experiencia. *Nutr Hosp* 2009;24(1):73-6.
4. De Pablo Márquez B, Pedrazas López D, García Font D, Roda Diestro J, Romero Vargas S. Chilaiiditi's sign. *Gastroenterol Hepatol* 2016;39(5):361-2. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2015.12.002
5. Andrés González A de, Lumbreras Torija C, Blanco Gutiérrez M. Síndrome de Chilaiiditi: a propósito de un caso. *Pediatr Aten Primaria* 2011;13(49):89-92.

